

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03514

研究課題名(和文)スタチンが効くがんを見極める予測因子の探索とがん転移抑制剤に向けたエビデンス構築

研究課題名(英文) Exploring predictive factors to identify statin-sensitivity of cancer cells and building evidence for cancer metastasis inhibitors

研究代表者

割田 克彦 (Warita, Katsuhiko)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：40452669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：脂質異常症治療薬のスタチンは、近年がん治療への応用が期待されている。本研究では、スタチン感受性および耐性がん細胞株を用い、(1)上皮間葉転換(EMT)とスタチン感受性との関連、(2)がん細胞のスタチン感受性に関わる代謝系、(3)転移に関わる細胞運動への影響を解析した。その結果、EMTはスタチン感受性を増加させることが示され、また、スタチン感受性/耐性がん細胞株は、スタチン処置後に異なる代謝プロファイルを示し、その差異がスタチン感受性に関わる候補因子として浮かび上がった。さらに、スタチン感受性がん細胞では、薬剤耐性能や浸潤転移能が亢進する低酸素条件でも、制がん効果を発揮する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スタチンの作用メカニズムを考えると、スタチンと他剤の併用で、がんの治療効果が上がることが予想される。しかしながら、それは、がん細胞がスタチンに対して感受性を示すのが前提であって、そもそもスタチンに感受性を示さないがん細胞では他剤との併用効果が望めない。本研究では、がん細胞の上皮間葉転換(EMT)とスタチン感受性との関連性を示し、また、スタチン処置したがん細胞の代謝物から情報を得て、スタチンの効果を増強させる可能性のある代謝系をスクリーニングした。候補に挙げた代謝系の阻害剤とスタチンを併用することにより、スタチンが効果を発揮するがんの種類や適用範囲を広げられるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Statins are drugs used for hyperlipidemia and are expected to be used in cancer therapy from the viewpoint of drug repurposing (also termed drug repositioning). In this study, we used statin-sensitive and -resistant cancer cell lines to analyze (1) relationship between epithelial-mesenchymal transition (EMT) and statin sensitivity, (2) metabolic systems involved in statin sensitivity, and (3) effects on cell motility involved in cancer metastasis. As a result, EMT increased statin sensitivity of cancer cells. Also, statin-sensitive and -resistant cancer cell lines showed significantly different metabolic profiles after statin treatment, and these differences emerged as candidate factors related to statin sensitivity. The results also suggest that statins may exhibit anti-cancer effects in statin-sensitive cancer cells, even under hypoxic conditions, where drug resistance and invasive metastatic potential are enhanced.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：スタチン がん細胞 メバロン酸経路 細胞運動 メタボローム

## 1. 研究開始当初の背景

スタチン系薬剤は血中コレステロール値の低下薬としてその有用性が証明され、1980年代以降、脂質異常症の患者に広く使用されている。スタチンが阻害するメバロン酸経路からはコレステロールのほか、タンパクの翻訳後修飾に必要な脂質や、電子伝達系に関わるヘム A・ユビキノンなど、細胞活動に重要な中間代謝体も生合成される。一般に、がんは代謝が盛んであることから、スタチンががんの増殖を抑えるのではないかと期待が高まっているが、スタチンが制がん効果を発揮する作用メカニズムには不明な点が多い。とくに *in vitro* の先行研究に着目すると、スタチンによる制がん効果は、がん細胞種によってかなりの差がみられることがわかる。これまでに我々は、スタチンに感受性を示すがん細胞は間葉系、一方、耐性を示すがん細胞は上皮系の傾向を示すことを報告してきた。しかし、上皮系がん細胞が上皮間葉転換 (EMT) を起こした際のスタチン感受性の変化は不明であり、また、スタチン処置後の細胞内代謝物の変動は明らかでない。さらに、がん細胞が低酸素状態に置かれた際のスタチンに対する感受性変化にも不明な点が多く残されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、スタチン感受性がん細胞株 (間葉系) およびスタチン耐性がん細胞株 (上皮系) を用い、(1) 悪性化因子 Transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) による EMT とスタチン感受性との関連、(2) スタチン感受性に関わる代謝系のスクリーニング、(3) 低酸素下における細胞運動へのスタチンの影響を解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

**実験 (1)** アトルバスタチンの前処置が、EMT を誘導した上皮性がん細胞の増殖に及ぼす影響を検証した。上皮系のスタチン耐性株として NCI-H322M (肺がん由来) を用いた。まず 24 時間の血清飢餓培養を行い、培養液中の TGF- $\beta$  の影響を除去した (図 1A)。次に、24 時間のアトルバスタチン (0, 1, 5  $\mu$ M) を前処置し、10 ng/mL の recombinant human TGF- $\beta$  1 を含む血清飢餓培地に交換した。6 日間の培養を行った後、細胞形態、細胞数、細胞容積を評価し、また、上皮系マーカーである E-cadherin、間葉系マーカーである N-cadherin および Vimentin、ならびに細胞増殖因子である c-Myc、スタチンの阻害ターゲットである HMGCR のタンパク量をウェスタンブロットで解析した。TGF- $\beta$  1 を処置した細胞を TGF- $\beta$  (+) 群、TGF- $\beta$  1 未処理の細胞を TGF- $\beta$  (-) 群とした (図 1A)。アトルバスタチンの溶媒である DMSO を 0.1% の終濃度で処置した群をアトルバスタチン 0  $\mu$ M とした。

**実験 (2)** 代謝物の変動を解析することを目的とし、スタチン感受性がん細胞株 HOP-92 (間葉系肺がん細胞) と、スタチン耐性がん細胞株 NCI-H322M (上皮系肺がん細胞) のそれぞれに 1  $\mu$ M のアトルバスタチンを 24 時間処置した。対照群には 0.1% DMSO の処置を行った。インキュベート後、培養液を除去し、5% マンニトール溶液で細胞を洗浄した。続いて、内部標準液 (H3304-1002; Human Metabolome Technologies [HMT]) を含んだメタノールで細胞内代謝物を溶出させた。その後、細胞抽出液を 2,300 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心分離し、さらにその上清を Millipore 5 kDa cut-off filter (UltrafreeMC-PLHCC、HMT) で 9,100 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C、120 分間、限外ろ過して高分子を除去した。この上清を用いて、CE-TOFMS および CE-QqQMS により水溶性代謝物の測定を行った (C-SCOPE; HMT)。

**実験 (3)** 低酸素誘導因子 HIF-1 は低酸素環境への順応をもたらすとともに、EMT を誘導し、がんの悪性化に関わる様々な遺伝子の転写を促す。しかし、低酸素下におけるスタチンの制がん効果については不明な点が多い。そこで、通常酸素下および低酸素下におけるアトルバスタチンの制がん効果について細胞の運動性を含めて評価することを試みた。具体的には、スタチンに耐性を示す NCI-H322M、および感受性を示す HOP-92 を用い、アトルバスタチンを 0, 0.1, 1  $\mu$ M の濃度で培養液に添加した。通常酸素下および低酸素下 (1% O<sub>2</sub>) で 72 時間培養後、50% 阻害濃度 (IC<sub>50</sub>)、スクラッチアッセイによる遊走能、インベーションアッセイによる浸潤能を評価した。さらに、スタチンが低酸素誘導因子である HIF-1 $\alpha$  の発現量とその細胞内局在に及ぼす影響を評価するため、ウェスタンブロットおよび免疫細胞化学的解析を行った。

## 4. 研究成果

### 実験 (1)

#### 【スタチン耐性がん細胞における EMT 誘導後のスタチン感受性の変化】

TGF- $\beta$  (+) 群と TGF- $\beta$  (-) 群を比較すると、アトルバスタチン 0  $\mu$ M では細胞数に有意差はみられなかった (図 1C)。しかし、アトルバスタチンの濃度が増すにつれ、TGF- $\beta$  (+) 群では細胞数の有意な減少が観察された ( $p < 0.01$ )。このことから、スタチン耐性の上皮性がん細胞が間葉系の

性質を帯びると、スタチンに対する感受性が增強する可能性が示唆された。

Lamouille と Derynck ら (*J. Cell Biol.*, 2007) は、TGF- $\beta$  1 が mammalian target of rapamycin (mTOR) 経路を活性化することによって細胞容積を増加させることを報告している。本研究において細胞形態に着目すると、TGF- $\beta$  (+) 群の細胞容積はアトルバスタチン処置の有無にかかわらず、TGF- $\beta$  (-) 群の約 1.3 倍となった ( $p < 0.01$ ) (図 1B, D)。このことから、アトルバスタチン処置は mTOR のシグナル系に大きな影響を及ぼさないものと推察された。

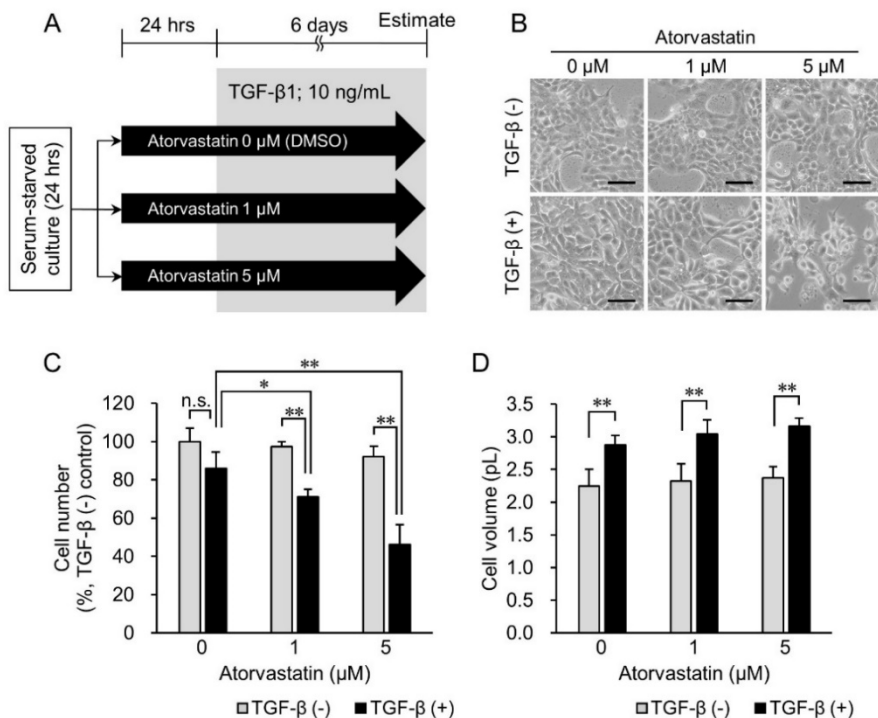


図 1. EMT 誘導がん細胞におけるアトルバスタチンの影響

(A) 実験プロトコルの概要。アトルバスタチン存在下で TGF- $\beta$  1 を処置した群を TGF- $\beta$  (+)、一方、PBS で処理した群を TGF- $\beta$  (-) とした。アトルバスタチンの溶媒である DMSO で処理した細胞を陰性対照とした。(B) TGF- $\beta$  1 シグナルを誘導した後、0~5  $\mu$ M のアトルバスタチンで処置した細胞の位相差像。TGF- $\beta$  (+) 群 (下段) では、アトルバスタチンの用量依存的に細胞数の減少が観察された。さらに、TGF- $\beta$  (+) 群の細胞は、TGF- $\beta$  (-) 群の細胞よりも大きく観察された。Scale bar = 100  $\mu$ m (C) 0~5  $\mu$ M のアトルバスタチンで処置した TGF- $\beta$  (-) 群および TGF- $\beta$  (+) 群における細胞数の変化。TGF- $\beta$  (-) 群の対照細胞 (アトルバスタチン 0  $\mu$ M) の値を 100% とした。(D) TGF- $\beta$  (-) 群および TGF- $\beta$  (+) 群における細胞容積。Bonferroni-Dunn post-hoc test, Mean  $\pm$  SD, n=3, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , n.s. not significant.

アトルバスタチンの処置が、TGF- $\beta$  1 の作用にどのような影響を与えるのか、とくに EMT マーカーの発現と c-Myc、HMGR の発現量に焦点を当て解析を行った (図 2)。低用量 (1  $\mu$ M) のアトルバスタチン処置において、E-cadherin の発現は TGF- $\beta$  (+) 群・TGF- $\beta$  (-) 群ともに遺伝子発現、タンパク量に変化はみられなかった (図 2A, F)。しかし、5  $\mu$ M のアトルバスタチンで処置すると、TGF- $\beta$  1 による E-cadherin 発現のダウンレギュレーションがみられた (図 2A, F)。興味深いことにアトルバスタチンは TGF- $\beta$  1 誘導性の N-cadherin 発現を用量依存性に減少させた (図 2B, F)。一方、TGF- $\beta$  (+) 群の Vimentin の発現は、mRNA レベルではアトルバスタチンの用量依存性に増加する傾向を示したが、タンパクレベルでの検出は認められなかった (図 2C, F)。Vimentin のタンパク量は非常に低いものと考えられた。

細胞増殖因子 c-Myc の発現において、TGF- $\beta$  (-) 群では、mRNA、タンパクともにアトルバスタチンの影響はみられなかった (図 2D, F)。一方、TGF- $\beta$  (+) 群では、アトルバスタチンの用量依存性に c-Myc の発現が抑えられていたことから、図 1C にみられた細胞増殖の抑制が裏付けられた。

また、TGF- $\beta$  (+) 群において、5  $\mu$ M のアトルバスタチン処置は HMGR の遺伝子発現誘導を有意に抑制した (図 2E, F)。一般にスタチン処置は HMGR 発現を強力に誘導することが報告されているが (Jiang *et al.*, *Nat. Commun.*, 2018)、TGF- $\beta$  により EMT を誘導したがん細胞では、スタチン処置による HMGR の発現増加が抑えられる可能性が示唆された。HMGR の発現低下はスタチン感受性の増加に直結することが報告されており (Ishikawa *et al.*, *Oncotarget*, 2018)、アトルバスタチンが TGF- $\beta$  (+) 群において細胞増殖を抑えた一因であると推察された。

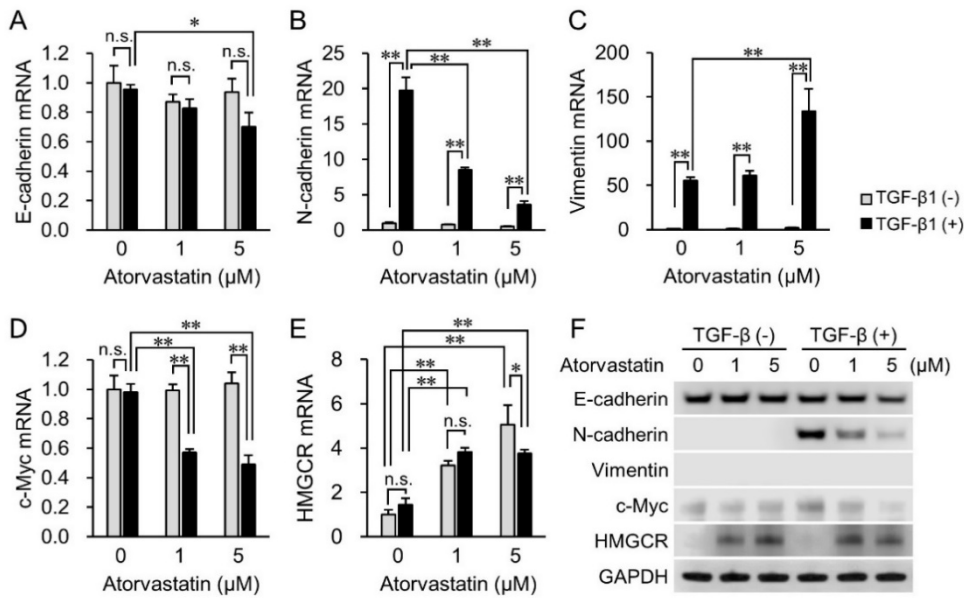


図 2. EMT 誘導がん細胞における EMT 関連分子、c-Myc、HMGR の遺伝子およびタンパク発現レベル (A) E-cadherin、(B) N-cadherin、(C) Vimentin、(D) c-Myc、(E) HMGR における遺伝子発現。TGF-β1 非処置群を TGF-β (-) とした。各遺伝子発現のデータは 18S rRNA 量で正規化し、相対値で示した。Bonferroni-Dunn post-hoc test、Mean±SD、n=3、\*p<0.05、\*\*p<0.01、n.s. not significant. (F) TGF-β (-) 群と TGF-β (+) 群における E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、c-Myc、HMGR のタンパク量。

## 実験 (2)

### 【スタチン耐性株 NCI-H322M と感受性株 HOP-92 におけるスタチン処置後の代謝物変動】

アトルバスタチン 1 μM を処置した HOP-92、NCI-H322M の代謝変動の全体像を表 1 にまとめた。

表 1. アトルバスタチン処置後の細胞内代謝系に生じる変化のまとめ

代謝経路	HOP-92 (0 μM vs. 1 μM)	NCI-H322M (0 μM vs. 1 μM)	NCI-H322M (1 μM) / NCI-H322M (0 μM) vs. HOP-92 (1 μM) / HOP-92 (0 μM)
解糖系	抑制傾向にあり、グルコース取り込み量が減少している可能性	グルコース取り込み量が増加し、解糖系が亢進している可能性	グルコース取り込み量に大きな差があり、HOP-92 では F1,6P が低値、かつ、スタチン添加によって著しい減少傾向を示す
TCA 回路	TCA 回路後半の代謝物が大きく低値、物質の流出入に影響が出ている可能性	物質は増加傾向で、問題なく代謝が起きている	TCA 回路前半の物質は HOP-92 で高値だが、後半の物質は HOP-92 で低値、スタチン添加時には後半の物質が HOP-92 で大きく減少するが NCI-H322M では変動なし
プリン	合成が抑制傾向	合成が亢進、分解が抑制	HOP-92 は PRPP が低値だが、プリン代謝物は高値の傾向で、代謝全体の変動は僅か NCI-H322M では、スタチン添加時にプリン合成の亢進と分解抑制の傾向を示す
細胞内エネルギー状態	ATP が低下傾向		HOP-92 ではスタチン添加時に ATP が減少するが、NCI-H322M では変化なし
ポリアミン	全体的に低値の傾向		HOP-92 で Ornithine が高値だが、ポリアミンはすべて低値、スタチン添加時の減少量も大きい
アミノ酸	全体的に低値の傾向、アミノ酸分解が亢進している可能性を示唆	HOP-92 細胞と比べると全体的な変動は小さい	多くのアミノ酸について HOP-92 で高値、スタチンの添加によって HOP-92 ではアミノ酸が減少傾向だが、NCI-H322M では変動が小さい
CoA 関連物質	HMG-CoA が低値の傾向、Malonyl-CoA が高値の傾向	いずれも高値の傾向で、合成量増加の可能性を示唆	HOP-92 では全体的に低値、スタチン添加時に HMG-CoA は、HOP-92 では減少傾向だが、NCI-H322M では増加傾向
その他		Homocysteine が高値の傾向	HOP-92 で SAM 関連物質が低値の傾向

実験 (3)

【低酸素下におけるがん細胞のスタチン感受性】

低酸素下で安定化する HIF-1 は、がん細胞の薬剤耐性を誘導することが知られている (Jing *et al.*, *Mol. Cancer*, 2019; Sowa *et al.*, *Cancer Med.*, 2017)。そこで、アトルバスタチンの制がん効果に対する HIF-1 の影響を評価するため、通常酸素下および低酸素下でのスタチン耐性がん細胞 NCI-H322M およびスタチン感受性がん細胞 HOP-92 の生存曲線を求めた (図 3)。その結果、スタチンに耐性を示す NCI-H322M 細胞の通常酸素下での IC<sub>50</sub> は、約 24.1 μM、低酸素下の IC<sub>50</sub> は約 22.9 μM であり、通常酸素条件と低酸素条件との間に大きな差はみられなかった。スタチン感受性の HOP-92 においても、通常酸素下、低酸素下ともに IC<sub>50</sub> は、それぞれ約 0.7 μM と算出された。このことから、スタチンの制がん効果は低酸素条件による薬剤耐性の影響を受けにくいこと、また、低酸素条件がスタチンの制がん効果を増強するわけではないことが考えられた。

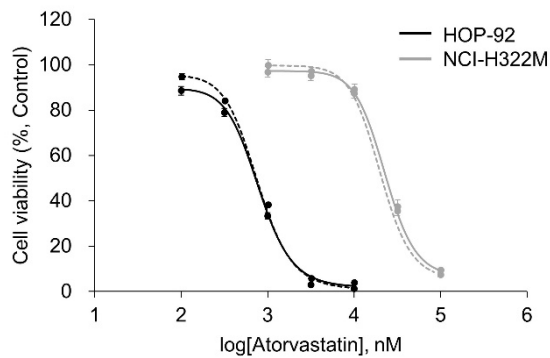


図 3. 通常酸素条件および低酸素条件において、アトルバスタチンを処置したがん細胞の生存曲線

NCI-H322M および HOP-92 を用い、正常酸素条件および低酸素条件で、アトルバスタチン 0.1~100 μM を処置し、72 時間後に細胞数を測定した。実線は通常酸素下での細胞生存率、破線は低酸素下での細胞生存率を表す。50% 阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) は、ImageJ ソフトウェアを用いて算出した。Mean ± SD、n=3

次に、通常酸素下および低酸素下において細胞遊走能を検討した。スタチンに耐性を示す NCI-H322M では、0.1 μM のアトルバスタチン処置でわずかな細胞遊走能の低下傾向があったが、有意差はみられなかった (図 4A 上段)。一方、スタチンに感受性を示す HOP-92 では、通常酸素下および低酸素下において 0.1 μM のスタチン処置で細胞遊走能が (図 4B 上段)、さらに 1 μM のスタチン処置で浸潤能が (図 4C) 顕著に抑制された。また、両細胞株ともに低酸素下において HIF-1α が核内に集積し、発現量が増加した (図 4A および B 中段・下段)。低酸素下における HOP-92 の HIF-1α 発現量にスタチンの影響はみられなかった (図 4B 中段および下段)。一方で、スタチン耐性 NCI-H322M では、低酸素下における HIF-1α の発現がスタチンの用量依存的に抑制された (図 4A 中段および下段)。

以上から、スタチンに感受性を示すがん細胞に対してアトルバスタチンは低濃度 (0.1 μM) で制がん効果を示し、かつ、低酸素下における薬剤耐性の影響を受けにくいものと考えられた。また、スタチンに耐性を示し細胞増殖に影響がみられないがん細胞であっても、低酸素条件にさらされた際に増加する HIF-1α の発現がスタチン処置により抑制されることが示唆された。

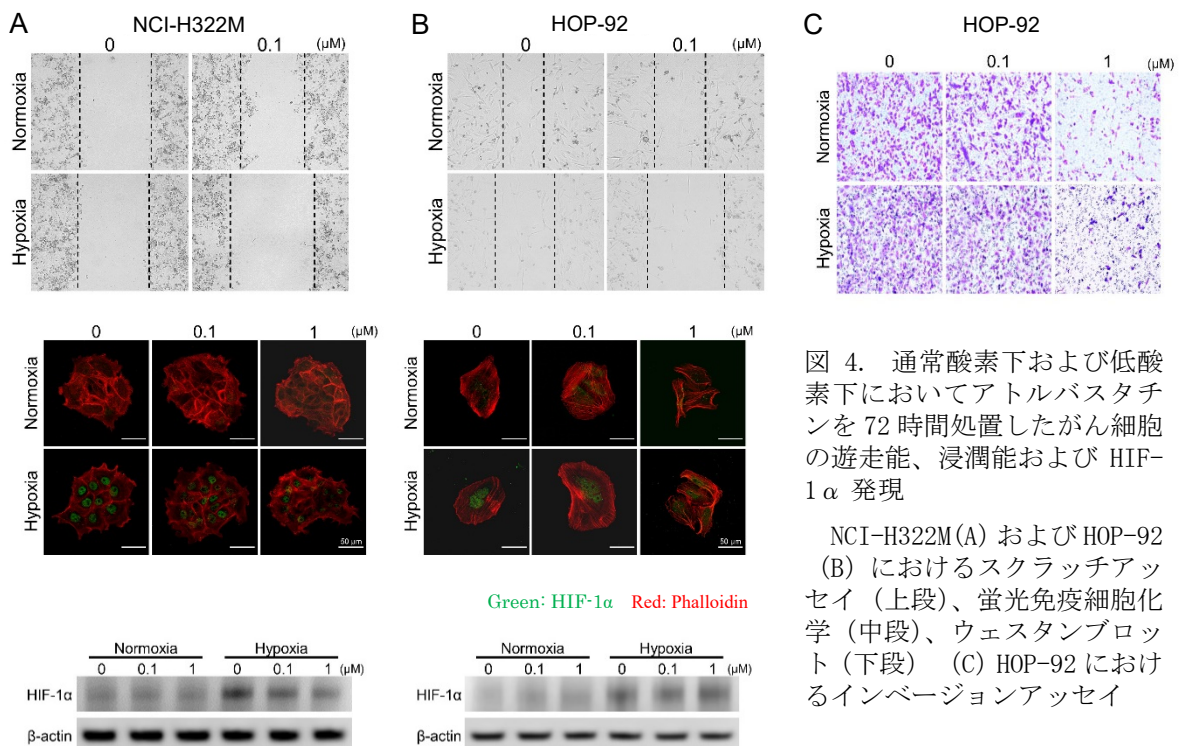


図 4. 通常酸素下および低酸素下においてアトルバスタチンを 72 時間処置したがん細胞の遊走能、浸潤能および HIF-1α 発現

NCI-H322M (A) および HOP-92 (B) におけるスクラッチアッセイ (上段)、蛍光免疫細胞化学 (中段)、ウェスタンブロット (下段) (C) HOP-92 におけるインベージョンアッセイ



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Warita K., Ishikawa T., Sugiura A., Tashiro J., Shimakura H., Hosaka Y. Z., Ohta K-I., Warita T., Oltvai Z. N.	4. 巻 11
2. 論文標題 Concomitant attenuation of HMGR expression and activity enhances the growth inhibitory effect of atorvastatin on TGF- $\beta$ -treated epithelial cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12763
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-91928-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Warita T., Irie N., Zhou Y., Tashiro J., Sugiura A., Oltvai Z. N., Warita K.	4. 巻 312
2. 論文標題 Alterations in the omics profiles in mevalonate pathway-inhibited cancer cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 121249 ~ 121249
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lfs.2022.121249	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Warita K., Sugiura A., Tashiro J., Hosaka Y. Z., Irie N., Zhou Y, Warita T., Oltvai Z. N.
2. 発表標題 Statins suppress SOAT1 expression & reduce cholesterol esterification in statin-sensitive lung cancer cells
3. 学会等名 2022 World Conference on Lung Cancer of the International Association for the Study of Lung Cancer (WCLC 2022)（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田代二郎、杉浦曜大、石川拓郎、保坂善真、割田克彦
2. 発表標題 コレステロール側鎖切断酵素の発現抑制が前立腺がん細胞の上皮間葉転換およびスタチン系薬剤感受性に及ぼす影響
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田代二郎、杉浦曜大、石川拓郎、保坂善真、割田克彦
2. 発表標題 ステロイド合成経路の阻害が前立腺がん細胞のEMTおよびアトルバスタチン感受性に及ぼす影響
3. 学会等名 日本解剖学会 第76回中国・四国支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Warita K., Ishikawa T., Sugiura A., Tashiro J., Hosaka Y. Z., Warita T., Oltvai Z. N.
2. 発表標題 Sensitivity to statin in EMT-induced NCI-H322M cells is further enhanced by simultaneous downregulation of HMGR expression
3. 学会等名 2021 World Conference on Lung Cancer of the International Association for the Study of Lung Cancer (WCLC 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Warita K., Shimakura H., Ishikawa T., Hosaka Y. Z., Mitsuhashi-Warita T., Oltvai Z. N.
2. 発表標題 Statin counteracts cell proliferation and EMT-induction in NCI-H322M cells treated with TGF-
3. 学会等名 2020 World Conference on Lung Cancer of the International Association for the Study of Lung Cancer (WCLC 2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石川拓郎、割田克彦、保坂善真
2. 発表標題 スタチンが上皮系がん細胞の運動性に与える影響の検討
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 嶋倉弘晃、割田克彦、石川拓郎、保坂善真
2. 発表標題 上皮間葉転換 (EMT) 誘導前後におけるスタチンの制がん効果
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ishikawa T., Warita K., Hosaka Y. Z.
2. 発表標題 Effect of atorvastatin on the motility of epithelial cancer cells
3. 学会等名 The 7th Congress of Asian Association of Veterinary Anatomists (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	保坂 善真  (Hosaka Yoshinao)  (00337023)	九州大学・農学研究院・教授   (17102)	
研究 分担者	太田 健一  (Ohta Kin-ichi)  (50403720)	香川大学・医学部・助教   (16201)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	オルトバイ ゾルタン  (Oltvai Zoltan)		



## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	田代 二郎  (Tashiro Jiro)		
研究協力者	杉浦 曜大  (Sugiura Akihiro)		
連携研究者	割田 友子  (Warita Tomoko)  (00753112)	関西学院大学・生命環境学部・講師   (34504)	
連携研究者	石川 拓郎  (Ishikawa Takuro)  (50938058)	愛知医科大学・医学部・助教   (33920)	

## 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

## 8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	ロチェスター大学医学部			