

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04268

研究課題名(和文)大腸がんを指標とした組織幹細胞でのゲノム変異解析系の確立

研究課題名(英文) Establishment of system for genomic mutation analysis using tissue stem cell in intestinal tumor

研究代表者

藤原 智子(石川智子)(Ishikawa-Fujiwara, Tomoko)

大阪大学・放射線科学基盤機構附属ラジオアイソトープ総合センター・特任研究員(常勤)

研究者番号：70402922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子変異と発がん過程進行との相関を詳細に解析できる発がんモデル系の開発を目標とした。開発の基礎となる幹細胞由来大腸がんを自然発症するrev3変異体のがん細胞において、がん関連遺伝子の発現が変動していることをRNA-Seqにより確認できた。発がんに影響を与える遺伝的要因として、他のTLSポリメラーゼ(polh, polk, poli)、ヌクレオチドレベルの変異に關与するmsh2、染色体レベルの変異(SV)に關与するatmについて二重変異体を作製し、いずれも相加的な寿命短縮が確認できた。発がんにおいて点突然変異とSVは相加的な影響があること、DSB修復はSV誘発の抑制作用を持つことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんは我が国でも死因の上位に占める疾患で、突然変異誘発が「発がん」の有力要因である事は明らかである。本研究では大腸がんを自然発症するメダカにおいて、がん細胞では哺乳類同様がん関連遺伝子の発現の上昇、低下が観察され、他の、突然変異を誘発する遺伝子との二重変異体では表現型が亢進することが示された。このように遺伝子変異と発がん過程進行がリアルタイムにモニタリングできる実験モデル動物系の開発により発がんのイニシエーションからプロモーションの変遷における遺伝子変異の役割解明が可能となると考えられる。今後、本系の完成により当該分野のみならず、広く生物・医学分野で極めて大きな役割を果たすと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have been trying to establish a spontaneous tumorigenesis model system that can analyze the correlation between genome mutations and tumorigenesis in detail. We have already found intestinal tumor prone rev3 deficient medaka mutant. In this study we found expression of several tumor-related genes were up- or down-regulated in tumor cells derived from abdominal cavity of the rev3 mutant using RNA-Seq. We generated double mutants with rev3 for other TLS polymerases (polh, polk, poli) which suppress induction of genome structure variants (SVs), for msh2 which is involved in nucleotide level mutations, and for atm which is involved in regulation of double strand break repair and subsequent chromosomal level rearrangements. In all case, the life span was shortened additionally in double mutant compared to each single mutant. These results suggest that induction of point mutations and SVs have additive effects on tumorigenesis, and that DSB repair has suppressive effect on SV induction.

研究分野：分子放射線生物学

キーワード：損傷乗り越えDNA合成断(DSB) 点突然変異 遺伝的不安定性 発がん ミスマッチ修復 Structure Variant (SV) 二重鎖切

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

「発がん」は環境変異原や環境放射能による生物影響のエンドポイントである。がんは遺伝子の病気と言われているように、遺伝子変異は発がんの最重要要因である。がん細胞については大規模ゲノム解析により莫大な量のゲノム変異情報が得られているものの、遺伝子変異と発がん過程進行との相関は未だに議論が多く残されている。発がん過程の理解には、この相関を詳細に解析できる発がんモデル系の開発が急務の課題として長く認識されている。このような系には、遺伝学的手法の適用が容易であり、しかも分子遺伝学的手法の導入が可能なモデル生物の利用が必須である。一方、遺伝子変異は分化した体細胞に生じたとしても、その変異が継続的に維持されることはないが、組織幹細胞に生じた変異は継続的に維持されることから発がんにより大きな寄与を示すと考えられている。

我々は、年齢依存的に全ての個体で大腸がんを発症するメダカ変異体を樹立した。このがん細胞は、幹細胞特異的遺伝子である *Msi1* を高発現していることを免疫組織染色により確認している。更に、がん細胞が原発巣から腹腔内に播種しており、*Msi1* 抗体陽性がん細胞の回収が容易に行える。これらの特性は、本変異体が「幹細胞へのゲノム変異導入」と「発がん」を解析できるこれまでにないユニークな解析系である事を示しており、本系を用いがんゲノム解析系の確立を目指したのが研究開始当時の背景である。

2. 研究の目的

本変異体は特殊なタイプの DNA ポリメラーゼ (*Rev3*) の欠損変異体であり、染色体レベルの遺伝子変異を誘発し、腸幹細胞へ変異が蓄積したため発がんに至ったと考えられる。実際、本変異体から樹立した培養細胞では、通常の培養条件で DSB 生成量の増加に伴い染色体異常が頻発しており、腸幹細胞においても構造変化を伴うゲノム変異が多発している事が示唆されている。大腸がん発症因子としてよく知られるミスマッチ修復欠損では点突然変異誘発を特徴とするが、本変異体はこれとは対照的に染色体レベルの構造変異が原因であると考えられる。本研究では、1) 当該がん細胞が示す遺伝子発現異常を検討することにより発がん要因の一端を明らかにする、2) 発がんに与える遺伝的要因を検討するために、本変異体で変異している遺伝子以外の DNA ポリメラーゼ群、及び DNA 修復遺伝子群の変異を本変異体に導入したダブル変異体 (DKO) を樹立し、その表現型の解析を行う、以上 2 つの解析を目指した。

3. 研究の方法

遺伝子発現解析：生後 8-9 ヶ月の変異体腹腔からがん細胞を回収し、RNA を抽出する。同時にコントロールとして、がん細胞回収個体、及び野生型個体から、大腸及び鱗を回収し、がん細胞と同様に RNA 抽出を行う。これら RNA サンプルから、cDNA を合成し、次世代シーケンサー (NGS) による解析を行なった (RNA-Seq)。得られた NGS データから各遺伝子発現量について、がん細胞での発現量と同一個体腸あるいは野生株腸での発現量との比をとり、 $p < 0.01$ の遺伝子について \log_2 値が >4 あるいは <-4 のものを pick up した。さらに、これらの遺伝子発現変動が、本変異体由来のがん細胞で共通に見られるかどうかを検証するために、雌雄各々 4 個体計 8 個体からがん細胞を回収し、qRT-PCR により遺伝子発現量を決定した。

関連遺伝子変異の影響：関連遺伝子群についての遺伝子変異個体を作製した。方法としては、旧来の TILLING 法あるいはゲノム編集 (TALEN 及び CRISPR) を用いた。本研究では、DNA ポリメラーゼ群として *polh*, *polk*, *poli* を、DNA 修復関連遺伝子としてはミスマッチ修復欠損 (*msh2*) 及び DSB 修復欠損 (*atm*) を取り上げた。作製したこれら遺伝子変異を、交配により *rev3* 変異体に導入し、DKO 個体を樹立し、各々の遺伝子型について約 50 匹の個体について寿命測定を行った。

4. 研究成果

遺伝子発現解析

多数の遺伝子群について、発現量の変動が同定できた。がん細胞で腸に比べ発現量が上昇 ($\log_2 > 4$)、あるいは低下 ($\log_2 < -4$) している遺伝子群の主なものについて図 1 にまとめたが、これらは大きく分けて 4 つのカテゴリーに分けうる。1) 転写因子・シグナル伝達因子、2) 増殖因子あるいはがん抑制因子、3) 細胞内外骨格関連因子、4) 核酸代謝関与酵素、等である。1) に関しては、既知の、あるいは新規の多数の Zinc Finger 遺伝子やホメオボックス遺伝子が、2) に関しては、がん関連増殖因子やその受容体、及び様々な GTPase 類似遺伝子が、3) に関しては、細胞内外骨格のみならず GAP-junction やカドヘリン等の細胞接着因子遺伝子が、4) に関しては *endo-/exo-nuclease* やスプライシング関与因子遺伝子等が含まれている。更に、各々のカテゴリーに含まれる幾つかの遺伝子について、8 種類のがん細胞について発現量を qRT-PCR で定量したところ、RNA-Seq の結果と一致する発現変動を一部のがん細胞で確認できた。しかし

		メス変異体 がん細胞 / 変異体腸	オス変異体 がん細胞 / 変異体腸	メス変異体 がん細胞 / 野生株腸	オス変異体 がん細胞 / 野生株腸		
転写因子・シグナル伝達因子	ENSORLT00000011876	-7.125345131	-7.849559303	-7.21259054	-7.794991034	Forkhead box F1	
	ENSORLT00000009586	-9.374491263	-4.936642673	-8.308334067	-5.000330997	Mab-21-like 2	
	ENSORLT00000009913	-8.175560624	-9.956798501	-9.519236005	-9.519639995	HoxC12a; Uncharacterized protein	
	ENSORLT00000010330	-6.514591729	-7.814220035	-7.610129962	-8.701676267	PDZ and LIM domain 3a	
	ENSORLT00000010371	-5.581587809	-11.58764442	-8.088265823	-13.02107408	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2	
	ENSORLT00000034633	-1.988897399	-3.64176468	-6.841463738	-7.175397631	Intestine-specific homeobox-like	
	ENSORLT00000038456	-4.691078778	-10.95051615	-7.494067631	-11.32463936	Zinc finger, LIM-type	
	ENSORLT00000041561	-7.904937611	-11.2065319	-8.621496236	-10.8438676	Cyclic AMP-responsive element-binding protein 3-like protein 3-A	
	ENSORLT00000045361	-6.807149231	-5.139353934	-6.022308467	-5.401915475	SRY-box containing gene 18 (sox18-201)	
	ENSORLT00000046875	-4.739373663	-6.609054161	-7.712673692	-8.199516867	Indian hedgehog B protein	
	ENSORLT00000016673	0.553609531	1.895636814	9.454276127	5.527660455	LIM homeobox transcription factor 1, beta a	
	ENSORLT00000017363	0.378907534	-0.290978546	6.619233384	5.057715746	Zinc finger protein 585A	
	ENSORLT00000020662	0.614291722	1.163373952	8.124128917	5.219435801	Achaete-scute family bHLH transcription factor 1a	
	ENSORLT00000027269	6.140554693	5.596203319	6.701791536	6.867689538	Protein-kinase domain	
	ENSORLT00000031324	3.55157639	7.235278185	6.190177229	7.694994297	Iroquois-class homeodomain protein irx-5-like	
	ENSORLT00000033409	0.635833894	8.188222146	7.334029252	9.679929911	Hematopoietic transcription factor GATA-1 (gata-1-201)	
	がん抑制因子・増殖因子	ENSORLT00000010278	-1.16323611	-4.643729146	-5.600423011	-5.905142012	Toll-like receptor 3
		ENSORLT00000014723	-8.045862983	-9.145527194	-8.856275601	-9.224536273	Delta/notch-like EGF repeat containing
ENSORLT00000009184		-1.946392327	-3.313213126	-6.166276815	-6.107508287	ELMO/CED-12 domain containing 2	
ENSORLT00000027192		-3.797896746	-3.923641754	-6.335563388	-5.426547671	Cell death-inducing p53-target protein 1	
ENSORLT00000032732		-5.578377733	-3.918475222	-7.966636789	-5.057084271	Tumor susceptibility gene 101 protein	
ENSORLT00000037951		-8.416902336	-7.481243094	-8.130140236	-7.774985746	Neurogenic locus notch homolog protein 1	
ENSORLT00000044582		-9.533482255	-6.045155172	-13.19053744	-7.951680873	Deleted in malignant brain tumors 1 protein	
ENSORLT00000046352		-6.557919991	-5.795874739	-8.714224061	-7.142044368	Death-like domain superfamily/DAPIN dpmain	
ENSORLT00000005066		0.609476315	1.357210616	7.808150237	6.325877712	Protein Wnt	
ENSORLT00000034465		0.708390927	2.738124809	4.019610697	4.046475385	RAB27B, member RAS oncogene family (rab27b-201)	
ENSORLT00000004471		3.688608549	7.279816266	8.819093484	7.498133166	Receptor protein-tyrosine kinase; Epidermal growth factor receptor	
ENSORLT00000006185		0.749251319	1.562279564	6.185501265	5.408217009	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b	
ENSORLT00000022436		-7.349480931	-7.579031883	-8.584109955	-7.735622331	Gap junction protein	
ENSORLT00000030663		-4.623192182	-6.927281194	-7.465951143	-7.616680626	NACHT, LRR and CARD domain containing	
ENSORLT00000042517		-6.91981779	-7.418704793	-9.429001481	-7.84410219	Extracellular Matrix Glycoprotein Related	
ENSORLT00000014144		5.000241562	7.220483216	8.587509519	7.196136347	Claudin 23	
核線代謝関連因子		ENSORLT00000009561	-6.021302111	-9.204898108	-7.555238768	-10.01182126	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 22
		ENSORLT00000034234	-7.560876063	-7.637232361	-8.689978435	-7.868042753	Endonuclease, poly(U) specific
	ENSORLT00000034791	-8.661809511	-9.913564435	-10.90747573	-10.68437909	Ribonuclease H-like/Integrase catalytic core	
ENSORLT00000005531	1.209632332	1.904543251	4.184600534	4.670574462	DNA topoisomerase 2		

図1. RNA-Seq解析 発現が上昇しているものを赤で、低下しているものを緑で示している。

ながら、全てのがん細胞で共通に発現変動している遺伝子は同定できなかった。当研究室では、本変異体がん細胞ではゲノム構造変異 (structure variant: SV) が頻発している事を確認している。これら SV は、基本的にはゲノム上の様々な場所に導入されるが、SV 変異により多様な遺伝子発現変異が誘発されていると考えられる。今後、全てのがん細胞で共通に発現変動を起こしている遺伝子を見出すことにより、本がん細胞の原因遺伝子の同定が可能になることが期待される。

関連遺伝子変異の影響

TLS DNA ポリメラーゼ群：通常の DNA ポリメラーゼは、DNA 損傷部位、あるいは特殊な高次構造を形成しているゲノム配列部位において複製反応を停止してしまうが、TLS DNA ポリメラーゼは、停止したポリメラーゼに置き換わって複製反応を継続することにより、複製フォーク停止に伴う危険なゲノム変異を回避する働きを担っている。脊椎動物の TLS DNA ポリメラーゼ遺伝子としては本 *rev3* を含み 8 種類が知られており、これら遺伝子の機能欠損が *rev3* 変異個体の表現系に与える影響を検証することにより、これら遺伝子群の機能分担の一端を明らかにするとともに、*rev3* の発がん抑制機能の実体を明らかにすることを目指した。今回の解析では、*polh*, *polk*, *poli* の 3 種の TLS ポリメラーゼ遺伝子変異を *rev3* 変異体に導入し、寿命測定を行った(図 2)。各々の単独変異体について寿命測定を行ったところ、*polk* 変異(PoIkH)は野生型に近い寿命を示したが、*poli* 変異(PoIiH)はわずかな寿命短縮が、*polh*(PoIhH)では *rev3*(R3H)と同様の寿命短縮が見られた。*rev3* との DKO 個体では、いずれの遺伝子変異も *rev3* 単独に比べ更なる寿命短縮を示したが、*poli* に比べ *polk* 及び *polh* は短縮の程度が強いことが分かった。

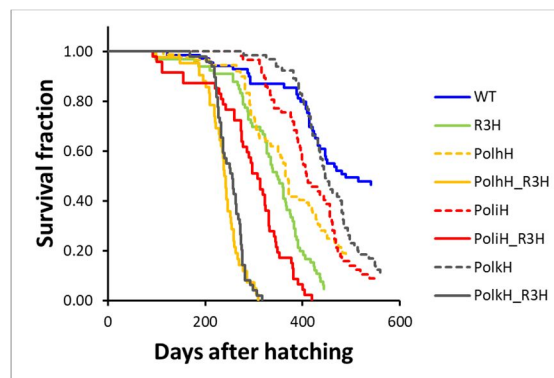


図2. TLS DNA ポリメラーゼ群遺伝子変異の影響

TLS 反応は、複製停止部位において非対合塩基を挿入するインサーター活性と、非対合末端からの複製継続を行うエクステンダー活性から構成されている。前者に関しては、いずれの TLS ポリメラーゼもその活性を有しているが、PoIh が最も強力な活性を示すことが、また後者の活性は、PoIk と *Rev3* が示すが、*Rev3* が強力な活性を示すことが知られている。更に *Rev3* は、複製フォーク停止部位においてこれら TLS ポリメラーゼが反応を行う足場タンパク質としての機能も有していることが知られている。上記 DKO 個体の表現型から、*Rev3* 欠損の場合でも、いずれの TLS ポリメラーゼも TLS 反応をある程度行える事、PoIk がエクステンダー反応欠損を相補できる事、TLS 活性としては PoIh が最も強力である事を示しており、これまでの報告に矛盾せず、それを個体レベルで証明する結果となった。

DNA 修復遺伝子変異の影響

ゲノムは多様な DNA 損傷の脅威に常に晒されている。環境因子による影響に加え、細胞活動に伴う活性酸素生成、あるいは DNA 複製過程で生じる誤塩基挿入や DSB 誘発など細胞内要因により通常生育状態においても大量の DNA 損傷が生じている。これらの DNA 損傷により誘発されるゲノム変異は、ヌクレオチドレベルの点突然変異と染色体レベルの SV に大別できるが、前者の抑制には塩基誤挿入を修復するミスマッチ修復酵素が、後者の抑制には DSB 修復の制御因子が重要な役割を果たしている。前者として *msh2* を、後者として *atm* の各遺伝子欠損を *rev3* 変異個体に導入し DKO の表現型を解析した。

「目的」の項でも記したように、代表的なミスマッチ修復遺伝子である *msh2* 欠損は点突然変異を高頻度に誘発する大腸がん発症因子としてよく知られている。メダカ変異体においても *msh2* 単独 (M2LXH) で *rev3* (R3H) と同等の寿命短縮を示したが、DKO においては更なる寿命短縮が観られた (図 3)。一方、*atm* 単独 (AMSXH) では野生型 (WT) に比べ寿命短縮が観られるものの、*rev3* ほどではないが、*rev3* との DKO では *rev3* 単独に比べ更なる寿命短縮が観られた (図 4)。

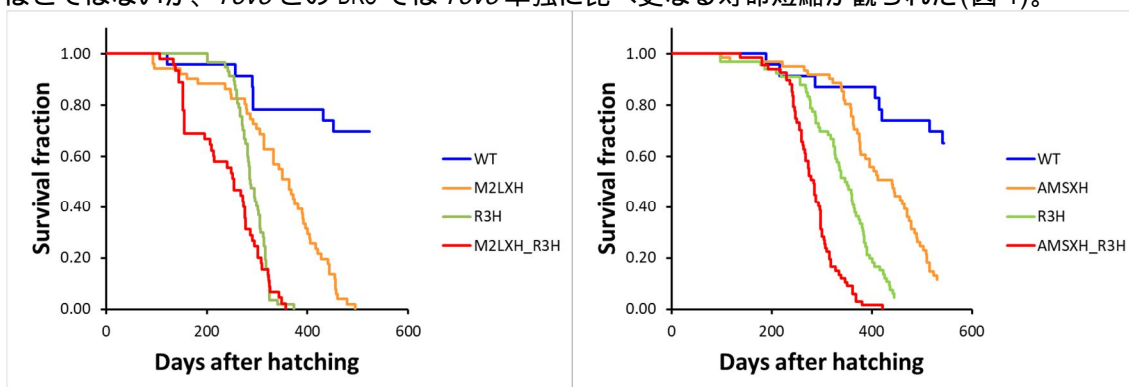


図3. *msh2* 遺伝子変異の影響

図4. *atm* 遺伝子変異の影響

rev3 変異導入により DSB 生成量が増加し、その結果染色体 SV が多数誘発され発がんに至る、というのが当研究室の作業仮説である。上記結果は、発がんにおいては、点突然変異と SV とは相加的な影響を与えること、DSB 修復は SV 誘発の抑制作用を持つことを示していると考えられる。今後は、これら DKO 個体のがん細胞のゲノム解析により、ゲノム変異と発がんの相関をより詳細に解明できることが期待される。

rev3 変異モザイク個体の作製 :

特定の組織幹細胞に誘発されるゲノム変異を追跡する目的で、変異がモザイク状に存在する個体の作製を試みた。*rev3* 遺伝子全体を loxP に挟んだ BAC により *rev3* 変異を相補した TG 個体を樹立し、ヒートショックにより CRE の発現を誘導することにより *rev3* をモザイク状に欠損させるのが全体の方法である。TG 個体を作製し、ヒートショックにより loxP に挟まれた *rev3* 遺伝子を欠損させることに成功したが、その頻度が低く、TG 個体において発がんを解析するに至らなかった。今後、より効率的な誘導手法の開発が望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yasuda Takako, Li Duolin, Sha Erge, Kakimoto Fumitaka, Mitani Hiroshi, Yamamoto Hiroshi, Ishikawa-Fujiwara Tomoko, Todo Takeshi, Oda Shoji	4. 巻 -
2. 論文標題 3D reconstructed brain images reveal the possibility of the ogg1 gene to suppress the irradiation-induced apoptosis in embryonic brain in medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jrr/rrac005	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 -

1. 著者名 Nishiike Yuji, Miyazoe Daichi, Togawa Rie, Yokoyama Keiko, Nakasone Kiyoshi, Miyata Masayoshi, Kikuchi Yukiko, Kamei Yasuhiro, Todo Takeshi, Ishikawa-Fujiwara Tomoko, Ohno Kaoru, Usami Takeshi, Nagahama Yoshitaka, Okubo Kataaki	4. 巻 31
2. 論文標題 Estrogen receptor 2b is the major determinant of sex-typical mating behavior and sexual preference in medaka	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 1699 ~ 1710.e6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2021.01.089	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujikawa Yoshihiro, Ishikawa Fujiwara Tomoko, Kuo Tony, Shinkai Norio, Shoji Tatsuma, Kawasaki Takashi, Kamei Yasuhiro, Sakuraba Yoshiyuki, Sato Ayuko, Kinoshita Masato, Gondo Yoichi, Yuba Shunsuke, Tsujimura Tohru, Sese Jun, Todo Takeshi	4. 巻 25
2. 論文標題 Involvement of Rev1 in alkylating agent induced loss of heterozygosity in <i>Oryzias latipes</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 124 ~ 138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12746	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Tomoko Ishikawa-Fujiwara, Yoshihiro Fujikawa, Andres Canela, Tatsuma Shoji, Fei Sun, Jun Sese, Takeshi Todo
2. 発表標題 Genome instability of tumor prone rev3l deficient medaka mutant
3. 学会等名 日本放射線影響学会第64回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomoko (Ishikawa) Fujiwara, Yoshihiro Fujikawa, Andres Canela, Tatsuma Shoji, Fei Sun, Jun Sese, Takeshi Todo
2. 発表標題 Genome analysis of Rev3l deficient medaka mutant
3. 学会等名 日本放射線影響学会第63回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoko Ishikawa-Fujiwara, Yoshihiro Fujikawa, Takeshi Todo
2. 発表標題 Characteristic feature of genomic instability in rev1 and rev3 mutants
3. 学会等名 16th International Congress of Radiation Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshihiro Fujikawa, Tomoko Ishikawa-Fujiwara, Ayuko Sato, Tetsushi Sakuma, Tsutomu Shimura, Takashi Yamamoto, Seiji Kodama, Tohru Tsujimura, Takeshi Todo
2. 発表標題 A unique phenotype of medaka rev3l mutant
3. 学会等名 16th International Congress of Radiation Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoko Fujiwara, Yoshihiro Fujikawa, Takeshi Todo
2. 発表標題 Involvement of Trans Lesion Synthesis DNA polymerase on maintenance of Genome stability
3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshihiro Fujikawa, Tomoko Fujiwara, Ayuko Sato, Tsutomu Shimura, Seiji Kodama, Tohru Tsujimura, Takeshi Todo
2. 発表標題 Rev3l-deficient medaka provides an excellent model for studies of intestinal tumor development
3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤川 芳宏、藤原 智子、佐藤 鮎子、志村 勉、児玉 靖司、辻村 亨、藤堂 剛
2. 発表標題 消化管腫瘍を高頻度に発がんするメダカrev3L変異体を用いた発がんメカニズムの解析
3. 学会等名 第6回アジア環境変異原学会日本環境変異原学会第48回大会合同大会
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	辻村 亨 (Tsujimura Tohru) (20227408)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	

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
---------	---------