

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：82641

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H04274

研究課題名（和文）mTert幹細胞に特異的な遺伝子の解析による幹細胞休止性と放射線抵抗性の理解

研究課題名（英文）Understanding the quiescence and radioresistance of tissue stem cells through analysis of mTert+ stem cells

研究代表者

大塚 健介（Otsuka, Kensuke）

一般財団法人電力中央研究所・サステナブルシステム研究本部・上席研究員

研究者番号：50371703

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,700,000円

研究成果の概要（和文）：幹細胞の休止期状態がどのように規定され、ストレス応答により活性化するか仕組みを調べることで、休止期幹細胞の動態解明につなげることを目的とした。本研究では、主にTert遺伝子を発現する腸管の休止期幹細胞に着目し、高線量放射線や低分子化合物などのゲノムストレスによる活性化を、その分子動態や細胞動態から評価するための手法を検討した。休止期幹細胞のようなごく少数の細胞動態を分子、細胞レベルだけでなく、組織・個体レベルで評価するため、次世代シーケンサー、オルガノイド培養、組織透明化とライトシート顕微鏡など最新の研究手法を基盤として、将来、組織・個体レベルでの効果的な評価・解析手法の構築を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、放射線による発がんの標的と考えられる腸管幹細胞が、高線量放射線のような著しい損傷を受けた場合に、組織内でどのような運命で発がんなどの疾患に向かうのかを理解することで、発がんリスクの線量依存性を定量的に理解することを目指したものである。特に休止期幹細胞が増殖性幹細胞を補充する仕組みは未解明の点が多く、その解析手法も十分に確立されていなかった。本研究はゲノムストレスという観点から、休止期幹細胞の応答を修飾する要因を解明するための手法を検討したものであり、放射線被ばくのみならず、さまざまな発がんリスクを定量的に比較評価する研究に貢献するものである。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to investigate the mechanisms of how the quiescence of tissue stem cells is defined and activated by stress responses, leading to a better understanding of the dynamics of quiescent stem cells. In this study, we focused on quiescent stem cells in the gastrointestinal tract, which express the Tert gene, to evaluate their activation by genomic stresses such as high-dose radiation and chemical compounds. In order to evaluate the cellular dynamics of a very small number of the quiescent stem cells not only at the molecular and cellular level but also at the tissue and whole-body level, we tried to construct effective assay and approaches, based on the latest research tools such as next-generation sequencing, organoid culture, tissue clearing and light sheet microscopy.

研究分野：分子生物学

キーワード：休止期幹細胞 腸管 高線量放射線 ゲノムストレス 次世代シーケンサー オルガノイド 組織透明化 ライトシート顕微鏡

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 組織幹細胞は、変異が生じることでがんの起源になりうる重要な細胞であることが知られている (Barker et al. 2009)。幹細胞には、休止性と増殖性の2種類があり、腸管では、定常状態の組織を維持する「増殖性幹細胞」が放射線被ばくや炎症などのストレスによって失われた場合、「休止期幹細胞」が活性化して増殖性幹細胞を補うことで組織の恒常性が保たれている。腸管の休止期幹細胞には、Tert などのマーカー分子を発現するものが知られている (Montgomery et al. 2011)。また、その他のマーカー分子の知見と照らし合わせ、本申請者は増殖性幹細胞と休止期幹細胞の間に異なる性質があると考えた。とりわけ、ストレス応答後に増殖性幹細胞を補うという性質から、休止期幹細胞は発がんリスクの真の標的であると考えられるため、どのようなストレス (放射線の強さ) によって活性化されるのかを明らかにすることは、高線量放射線の被ばくによる発がん過程を理解する上で重要である (Otsuka & Iwasaki, in press)。本研究では、高度に休止性を維持している Tert 幹細胞に着目し、組織幹細胞の休止性がどのような遺伝子やシグナル伝達経路と関連するかを解明するため、次世代シーケンサーなどの先端的手法や新たな技術の開発に取り組む。また、そのような休止期幹細胞の活性化が組織レベルに及ぼす影響を評価するための技術開発を行う。

(2) 休止期幹細胞の活性化を分子レベルで明らかにし、休止期幹細胞の動員に関わる新規ターゲットの特定を体系的に行うためには、高線量放射線のようなゲノムストレスがもたらす影響を評価することが重要である。本研究では、低分子化合物ライブラリーを用いたスクリーニングにより、さまざまなゲノムストレス下で、休止期幹細胞の活性化をもたらす経路があるかを検証する。

2. 研究の目的

(1) ヒトやマウス成体は様々な組織から成り立っている。組織の機能を果たす細胞 (機能細胞) の起源は、組織中に存在する組織幹細胞である。これまでに様々な組織幹細胞が同定されており、腸管では腸管基底部のクリプト部位に集団 (プール) を形成して前駆細胞を産生する増殖性幹細胞 (Lgr5 陽性細胞) が知られている。Lgr5 陽性細胞は、がん変異を獲得することで腫瘍を形成することが初めて示された幹細胞であり (Barker et al. 2009) 現在、がんは組織幹細胞の変異を起源とする考えが広く受け入れられている。一方、組織幹細胞は、その性質から2つに大別される。Lgr5 陽性は分裂頻度の高い増殖性幹細胞であるが、ストレスに対して高感受性であり、放射線や化学物質などの影響で失われやすいため、我々の体にはそのような増殖性幹細胞プールを補う仕組みが備わっている。外部ストレスにより初めて活性化し、増殖性幹細胞を生み出すストレス抵抗性の細胞のうち、休止状態にある細胞は「休止期幹細胞」と呼ばれている。休止期幹細胞は、Wnt シグナルに反応せず、Tert を発現するものなどが知られている (Montgomery et al. 2011)。

本研究の目的は、幹細胞の休止期状態がどのように規定されストレス応答により活性化するか仕組みを調べることで、休止期幹細胞の動態解明につなげることである。近年、様々な幹細胞培養技術が確立して、幹細胞のシグナル応答性をより詳細に理解することが可能になった。Lgr5 陽性細胞は、「オルガノイド」と呼ばれるクリプトに類似の突出構造を持つ3次元構造として培養可能である (Sato et al. 2009)。一方、休止期幹細胞はオルガノイドを形成しないが、本研究では、休止期幹細胞を活性化させるゲノムストレスにより休止期幹細胞が活性化し、その結果、Lgr5 への遷移が生じて、失われた増殖性幹細胞プールが補充されるものと仮説を立てた (Otsuka and Iwasaki, 2015)。実際、mTert 幹細胞は高線量の放射線被ばくや飢餓からの回復などにより活性化するものの、それがどのような仕組みで増殖性幹細胞を補うのかについては未解明であった。本研究では、高線量放射線のようなゲノムストレスにさらされた休止期幹細胞の細胞動態を明らかにするため、次世代シーケンサー、オルガノイド培養、組織透明化などの研究手法を基盤として、将来、組織・個体レベルでの効果的な評価・解析手法の構築を目指した。

3. 研究の方法

(1) 休止期幹細胞の動態を評価するための動物モデルの導入
マウスの休止期幹細胞マーカーである Tert 遺伝子を発現する細胞でのみ GFP を発現するマウス (mTert-EGFP) および、Tert 陽性細胞で CreER を発現し、タモキシフェンの投与に依存して ROSA26 領域に挿入した loxP の組換えにより lacZ 遺伝子を発現するマウス (mTert-CreER/lacZ) をボストン小児病院より分与いただいた。Tert-CreER/lacZ マウスは、自身が系統維持している ROSA26-tdTomato マウスとも交配し、蛍光レポーターマウスとしても活用できるように繁殖を行った。増殖性幹細胞は Lgr5 陽性細胞でのみ GFP を発現するマウス (Lgr5-EGFP) から採材した。mTert-EGFP マウスおよび Lgr5-EGFP マウスから小腸を摘出し、2% EDTA/PBS で 30 分処理してクリプト部分を回収した。次に、TrypLE Express を用いてシングルセルに分散させてから、セルソーター (MoFlo Astrios EQ, Beckman Coulter) により EGFP 陽性細胞のみ単離した。Tert-EGFP マウスの場合、Tert 遺伝子は目的の腸管の休止期細胞以外 (リンパ球など) にも発現することが知

られているため、セルソーティングを行う前に、CD45 を発現する細胞を磁気ビーズ (MojoSort Mouse CD45 Nanobeads) により標識したうえで、あらかじめ磁気分離により除去した。

(2) 次世代シーケンサーを用いた解析手法の検討

高線量放射線を用いた腸管クリプトの応答を評価するために、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析 (RNA-Seq) を行った。一方、休止期幹細胞にのみ着目すると、増殖性幹細胞に比べて極めて存在比が小さいことから、休止期幹細胞だけを回収して次世代シーケンサーで分析するためには、アッセイごとに微量の試料を測定するためにプロトコルを最適化する必要があった。ここでは、シングルセル、数細胞から RNA-Seq を行うための RamDA-Seq (Hayashi et al. 2018)、オープンクロマチン領域部を解析するための ATAC-Seq (Buenrostro et al. 2013)、そして、エピジェネティックなヒストン修飾部位を評価するための CUT&RUN (Skene & Henikoff, 2017) により、それぞれどの程度の細胞数からライブラリーの作製が可能かを検討した。

(3) オルガノイド培養による休止期幹細胞の応答を活性化する薬剤スクリーニング系の開発

休止期幹細胞のオルガノイド形成が、どのような環境で活性化するかを確かめるために、DNA 損傷応答関連の低分子化合物ライブラリー (Selleck) をカスタム設計した。mTert 陽性細胞をセルソーティングにより回収し、96 ウェルプレートに播種した。低分子化合物ライブラリーを培養環境に分注し、オルガノイド形成能を評価した。

(4) 組織透明化による休止期幹細胞の組織レベルの放射線応答動態の評価

タモキシフェンの投与により mTert 陽性細胞のみで蛍光タンパク (tdTomato) を発現するマウスを交配により作出した。mTert 陽性細胞は極めて低頻度であるため、従来の組織切片的作出では定量的な評価が困難であった。そこで、組織全体で細胞動態を評価するために、組織を透明化する技術を適用した。親水性の透明化試薬 CUBIC (Tainaka et al. 2018) を用いて、高線量 (10 Gy) 照射したマウスにおける mTert 由来の tdTomato 細胞を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。さらに、高い深度まで細胞の蛍光動態を評価するため自作型のデスクトップライトシート顕微鏡 (descSPIM) (Otomo et al. 2023) を先端バイオイメージング支援プラットフォーム (ABiS) の支援により導入し、腸管組織全体で観察する手法を検討した。

(5) ゲノムストレスを全身で可視化するマウスモデルの活用

組織幹細胞の高線量放射線によるゲノムストレスが組織全体に及ぼす影響を評価するためには、放射線応答の初期過程である DNA 損傷修復と細胞周期状態を同時に観察可能な実験モデルが有用である。本申請者は、DNA 二本鎖切断修復タンパクである 53bp1 タンパクと Fucci 技術 (Sakaue-Sawano et al. 2008) で使われる細胞周期指示タンパクを 3 つの異なる蛍光でライブイメージングする実験系 (Focicle) を構築している (Otsuka & Tomita, 2018)。また、この Focicle 発現遺伝子をマウス受精卵にゲノム編集によりノックインした新規マウスモデル (以下、Focicle マウス) の系統樹立に成功している。そこで、個体および臓器レベルのゲノムストレスを解析する手段のひとつとして Focicle マウスを CUBIC により透明化し、脳や肺などの臓器から画像を取得する手法を検討した。

4. 研究成果

(1) 休止期幹細胞の単離と放射線応答の評価

図 1 に Tert 陽性細胞のみが EGFP を発現するマウス (mTert-EGFP) と比較のために増殖性幹細胞として知られる Lgr5 陽性細胞のみが EGFP を発現するマウス (Lgr5-EGFP) のスキャッタグラムを示す。Lgr5-EGFP マウスでは、EGFP 高発現する細胞分画がクリプトに多く存在するが、Tert 陽性細胞は極めて低い存在比率を示した。一方、マウスに 10 Gy の高線量率放射線を照射した場合、小腸クリプトにおける遺伝子発現を RNA-Seq により解析したところ、照射後に増殖性幹細胞マーカーである Lgr5 や Ascl2 などが急激に低下し、72 時間まで発現が認められなかったのに対し、Tert 遺伝子は照射後 2~6 時間後にすみやかな発現の活性化が認められ、その後低下するという一過性の回復を示唆する発現動態を示した (図 2)。このことから、Tert 遺伝子が増殖性幹細胞の回復に先立ってボールの再形成に寄与することが考えられた。今後は、シングルセルレベルで細胞の回復動態を追跡する技術の構築や、線量・線量率による応答を評価する研究に発展させていく。

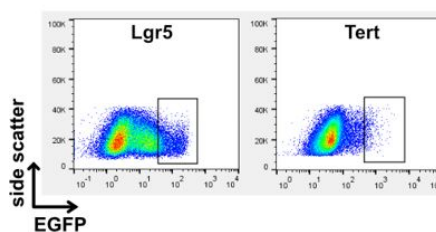


図 1 マウス腸管の Lgr5、Tert 陽性細胞の分布

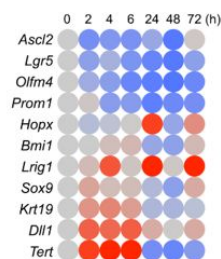


図 2 幹細胞関連遺伝子の照射後時間変化

(2) 次世代シーケンサーを用いた小スケール細胞のための解析手法の検討

これまでの知見の通り、休止期幹細胞は回収可能な細胞数が極めて少ないことから、次世代シーケンサーを用いた解析においては、少ない試料からデータを取得することが求められる。本研究

では、遺伝子発現解析のために、RamDA-Seq を基盤としたサンプルの調製によるライブラリー作製を検討した。しかしながら、昨今はシングルセル遺伝子発現解析 (scRNA-Seq) の技術が急速に進み、マイクロ流路を用いたエマルジョン作成と分子バーコードを組み合わせたハイスループットな手法に比べ、手作業によるライブラリー調製では、効果的な成果に結びつけることは難しいと考えられた。一方、幹細胞に対する放射線による DNA 損傷や応答は、遺伝子発現のみならず、エピジェネティックな変化に影響を及ぼすと考えられた。そこで、クロマチンの開閉状態を評価する ATAC-Seq と、ヒストンの修飾状態を評価する ChIP-Seq により、小スケールの細胞集団でピークの検出ができるかを検討した。図 3 に ATAC-Seq と ChIP-Seq で同じ遺伝子領域のピーク位置を評価した結果を示す。本研究の成果からマウス培養細胞を用いて双方のピーク比較が可能であった。また、ATAC-Seq による評価では 4 千細胞でも期待されるピーク検出が可能であった。ChIP-Seq は CUT&RUN の採用により、従来手法よりも少ない 2×10^5 細胞で、H3K4me3 の活性化が認められる Trp53 や、幹細胞以外では発現しない Lgr5 など、予想されたピーク分布を得ることができた。以上の結果から、休止期幹細胞の評価において、クロマチンの開閉状態については数匹のマウス個体から回収すれば達成できるものの、ChIP-Seq については、さらに少スケールで感度が得られる手技の開発が求められると考えられた。本手法を基盤に、今後は様々なゲノムストレスによる休止期幹細胞のエピジェネティックな変化を評価する研究に発展させていく。

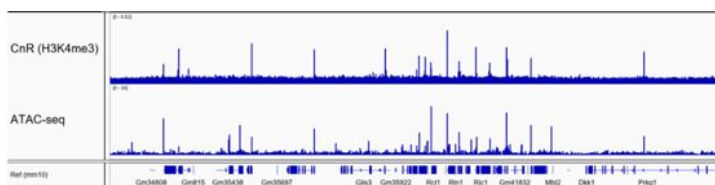


図 3 ATAC-Seq と ChIP-Seq による同一遺伝子座位でのピーク比較

(3) オルガノイド培養による休止期幹細胞の応答を活性化する薬剤スクリーニング系の開発
 休止期幹細胞は、通常の培養環境ではオルガノイド形成能を示さないが、ゲノムストレスによる活性化が起こることで、オルガノイド形成能を示す幹細胞へと分化をするものと仮説を立て、低分子化合物ライブラリーを用いてオルガノイド形成を示す条件があるかを検討した。マウスから Tert-EGFP 細胞もしくは Lgr5-EGFP 細胞をセルソーティングし、マトリゲルと混合した後、96 ウェルプレートに播種した。その後、各ウェルに異なる低分子化合物を添加し、オルガノイド形成能を評価した。予想した通り、低分子化合物を含まないプレートでは Lgr5 陽性細胞を播種した場合では多くのオルガノイドが観察されたが、Tert 陽性細胞からはほぼオルガノイドの形成が認められなかった (図 4)。一方、低分子化合物を含むライブラリーではいくつかの条件下で、Tert 陽性細胞由来のオルガノイド形成が認められた。今後はオルガノイド形成を示した培養条件でどのような遺伝子が活性化したかの分子機構の解明につなげていく。

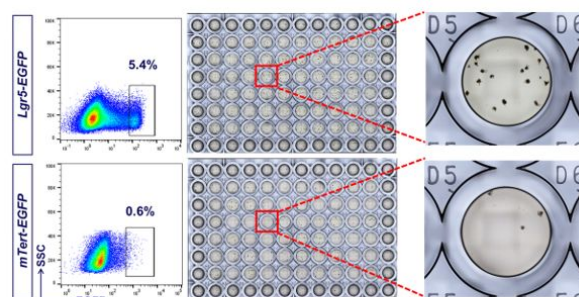


図 4 96 ウェルプレートを用いた腸管幹細胞のオルガノイド培養

(4) 組織透明化による休止期幹細胞の組織レベルの放射線応答動態の評価

腸管における低頻度な休止期幹細胞の動態を組織全体で評価するため、Tert-EGFP マウスに高線量放射線 (10 Gy) を照射し、小腸を摘出した。4%パラホルムアルデヒドにて固定後、CUBIC による脱脂、PI 染色および屈折率調整による透明化処理を行った。共焦点レーザー顕微鏡により、放射線照射した腸管で EGFP 細胞の増加が認められ、遺伝子発現のみならず、細胞レベルでの放射線照射後の回復も確認されたが、透明化を経ても従来の共焦点レーザー顕微鏡では 150 μm 程度の深さまでしか十分な蛍光が得られなかった。そこで、自作した descSPIM を用いて観察したところ、腸管全体の Tert 陽性細胞の蛍光画像を取得することに成功した (図 5)。今後は、細胞レベルの蛍光強度を立体画像から定量化し、幹細胞ターンオーバーを指標とした放射線応答動態を簡便に評価する手法の構築をめざしていく。

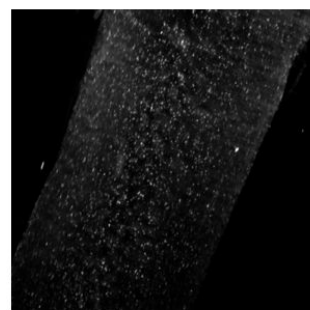


図 5 ライトシート顕微鏡で観察した

透明化処理後の腸管における
Tert 陽性細胞

(5) ゲノムストレスを全身で可視化するマウスモデルの活用
 ゲノムストレスを全身で評価するために、申請者が開発した DNA 損傷修復と細胞周期を同時観察する蛍光イメージング遺伝子 Focicle を発現するマウス (Focicle マウス) を系統樹立した。このマウスは表現型が野生型に近い性質を示すことが分かり、先端モデル動物支援プラットフォーム (AdAMS) の支援で病理解

析したところ、特徴的な死因を示す病像は観察されなかった。また、ABiSの支援により、CUBICによるFocicleマウスの個体(胎児)を透明化し、ライトシート顕微鏡による観察を行った。その結果、マウス胎児でFocicle遺伝子を全身に発現するマウスは、透明化により全身の臓器での蛍光を検出することが可能であった。また、Focicleマウスより採材した組織をdescSPIMで観察したところ、腸管のみならず、脳などでもDNA損傷応答を示す部分で高い蛍光強度を示すことが分かった(図6)。今後は上述の休止期幹細胞の細胞動態と合わせて、放射線応答の臓器レベルのゲノムストレスにより幹細胞ターンオーバーが引き金となって疾患への進展するプロセスを解明することを目指す。

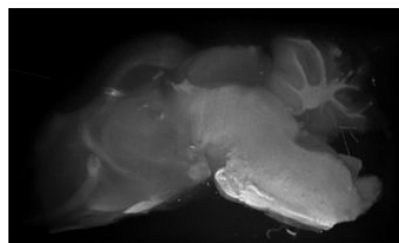


図6 透明化したFocicleマウス半脳でのDNA損傷修復像

<引用文献>

- Barker N, Ridgway RA, van Es JH, van de Wetering M, Begthel H, van den Born M, Danenberg E, Clarke AR, Sansom OJ, Clevers H. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature*. 2009, 457:608-11.
- Montgomery RK, Carlone DL, Richmond CA, Farilla L, Kranendonk ME, Henderson DE, Baffour-Awuah NY, Ambruzs DM, Fogli LK, Algra S, Breault DT. Mouse telomerase reverse transcriptase (mTert) expression marks slowly cycling intestinal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011, 108:179-84.
- Otsuka K, Iwasaki T. Insights into radiation carcinogenesis based on dose-rate effects in tissue stem cells. *Int J Radiat Biol*. 2023 Mar 31:1-19. Epub ahead of print.
- Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, van Es JH, Abo A, Kujala P, Peters PJ, Clevers H. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*. 2009, 459:262-5.
- Otsuka K, Iwasaki T. Effects of dose rates on radiation-induced replenishment of intestinal stem cells determined by Lgr5 lineage tracing. *J Radiat Res*. 2015, 56:615-22.
- Hayashi T, Ozaki H, Sasagawa Y, Umeda M, Danno H, Nikaido I. Single-cell full-length total RNA sequencing uncovers dynamics of recursive splicing and enhancer RNAs. *Nat Commun*. 2018, 9:619.
- Buenrostro JD, Giresi PG, Zaba LC, Chang HY, Greenleaf WJ. Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nat Methods*. 2013, 10:1213-8.
- Skene PJ, Henikoff S. An efficient targeted nuclease strategy for high-resolution mapping of DNA binding sites. *Elife*. 2017, 6:e21856.
- Tainaka K, Murakami TC, Susaki EA, Shimizu C, Saito R, Takahashi K, Hayashi-Takagi A, Sekiya H, Arima Y, Nojima S, Ikemura M, Ushiku T, Shimizu Y, Murakami M, Tanaka KF, Iino M, Kasai H, Sasaoka T, Kobayashi K, Miyazono K, Morii E, Isa T, Fukayama M, Kakita A, Ueda HR. Chemical Landscape for Tissue Clearing Based on Hydrophilic Reagents. *Cell Rep*. 2018, 24:2196-2210.e9.
- Otomo K, Omura T, Nozawa Y, Saito Y, Susaki E.A. descSPIM: Affordable and Easy-to-Build Light-Sheet Microscopy for Tissue Clearing Technique Users. *bioRxiv* 2023.05.02.539136.
- Sakaue-Sawano A, Kurokawa H, Morimura T, Hanyu A, Hama H, Osawa H, Kashiwagi S, Fukami K, Miyata T, Miyoshi H, Imamura T, Ogawa M, Masai H, Miyawaki A. Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell*. 2008, 132:487-98.
- Otsuka K, Tomita M. Concurrent live imaging of DNA double-strand break repair and cell-cycle progression by CRISPR/Cas9-mediated knock-in of a tricistronic vector. *Sci Rep*. 2018, 8:17309.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Otsuka Kensuke, Iwasaki Toshiyasu	4. 巻 -
2. 論文標題 Insights into radiation carcinogenesis based on dose-rate effects in tissue stem cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Radiation Biology	6. 最初と最後の頁 1~19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09553002.2023.2194398	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大塚 健介
2. 発表標題 オルガノイドと個体をつなぐDNA損傷応答のライブセルイメージング
3. 学会等名 第49回 日本毒性学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大塚 健介
2. 発表標題 放射線影響研究におけるオルガノイド研究の黎明期と未来
3. 学会等名 第65回 日本放射線影響学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuko Hoshi, Naomi Iizawa, Mikie Okada, Chiharu Furukawa, Erina Tsuta, Etsuo A Susaki and Kensuke Otsuka
2. 発表標題 Whole-body/tissue atlas enables mapping DNA damage responses and cell-cycle status with a single-cell resolution
3. 学会等名 AT workshop 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 星 裕子、飯澤 直美、 蔦 英里奈、 岡田 美紀江、大塚 健介
2. 発表標題 臓器のゲノムストレスイメージングを可能にする新規マウスモデルの樹立
3. 学会等名 日本放射線影響学会 第64回年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大塚 健介
2. 発表標題 A new mouse model for imaging of genomic stress in organs
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021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	富田 雅典 (Tomita Masanori) (00360595)	一般財団法人電力中央研究所・サステナブルシステム研究本部・上席研究員 (82641)	

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