

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05584

研究課題名(和文) 多様な点突然変異に対応する人工核酸の設計と難治性がん治療への応用

研究課題名(英文) Design and evaluation of artificial nucleic acid covering various point mutations of genes.

研究代表者

櫻井 敏彦 (SAKURAI, Toshihiko)

鳥取大学・工学研究科・准教授

研究者番号：10332868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：シトシン、アデニン、チミン、ウラシルと網羅的に塩基対を形成するヒポキサンチンを側鎖に有するPNAモノマーを合成し、oligo PNAとsynDNAとの相補鎖形成挙動を解析することにより、点突然変異に対応した核酸医薬への展開について検討した。この結果、G以外のC、A、Tの網羅的な相補鎖形成では、GGTとGTTの $\Delta G(37^\circ\text{C})$ 値の差が0.17 kcal/molと算出され、GとTの認識が困難であることがわかった。一方で、WT (GGT) とMT (GCT) との差は2.75 kcal/molと見積もられ、野生型がシトシンであるその他の1塩基変異性疾患への応用について展開できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

KRAS遺伝子のexon2codon12を中心とした多様な点突然変異はすい臓がんの90%、大腸がんの40%にみられ、がん疾患全体の約40%に生じる遺伝子変異である。この変異により、最新の分子標的薬(抗EGFR抗体薬)の薬効が期待できない問題点を引き起こすが、変異のパターンは多様であるため、それぞれに対応した核酸医薬を開発しなければならない。ヒポキサンチンがゆらぎ塩基として作用することに着目し、細胞内で正常な塩基配列とそれ以外の点突然変異群を識別する新たな核酸モデルの設計と物性評価は、多様な変異を網羅したアンチセンス型核酸医薬としての展開が可能となる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we synthesized a PNA monomer with hypoxanthin (Hyp) at the side chain, which forms a comprehensive base pair with cytosine (C), adenine (A), thymine (T), and uracil (U), and we investigated the application to nucleic acid medicines corresponding to point mutations by analyzing the complementary hybridization behavior of oligo PNA and synDNA. As a result, in the comprehensive complementary chain formation of C, A, and T other than G, the difference between the values ( $\Delta G$  at  $37^\circ\text{C}$ ) of GGT and GTT is estimated to be 0.17 kcal/mol, which makes it difficult to recognize G and T. This means that it is difficult for oligo PNA to comprehensively recognize anything other than G. On the other hand, the difference between the values of  $\Delta G$  at  $37^\circ\text{C}$  between WT (GGT) and MT (GCT) is estimated to be 2.75 kcal/mol. It was suggested that it could be applied to other single nucleotide polymorphic disease in which the wild type is cytosine.

研究分野：生体分子化学

キーワード：ペプチド核酸 KRAS遺伝子 アンチセンス核酸医薬 ヒポキサンチン 相補鎖形成

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

難治性がんであるすい臓がんは他のがんと比較して早期発見が難しい上に進行が早く、約7割の患者は診断時にすでに多臓器へ転移して完治できない状況で発見される(5年生存率:10%以下)。すい臓がんはいくつかの重要な遺伝子変異が原因となっており、中でもKRAS遺伝子の変異が極めて早い段階で起こることが知られている。KRAS遺伝子に点変異が生じることで発現する変異型KRASタンパクでは細胞増殖のON-OFF制御ができなくなり、常に増幅シグナルを送り続けることで腫瘍細胞が増殖し続ける。このKRAS遺伝子点突然変異はエクソン2コドン12、13、エクソン3コドン59、61、エクソン4コドン117、146に現れ、特にコドン12に高い確率(80%以上)で確認されている。これらの変異はすい臓がん患者の90%、大腸がん患者の40~50%、肺線がんの20~30%、肛門部胆管がんの50%など、実に多くの臓器がんでは認められており、がん細胞の増殖アクセラレーター(ドライバー遺伝子変異)としてがん化に関与している。さらに、このようなKRAS遺伝子の変異により、最新の分子標的薬(抗EGFR抗体薬)の薬効が期待できない問題点を引き起こす。これは、抗EGFR抗体薬は上皮成長因子(EGF)と上皮成長因子受容体(EGFR)との結合を阻害することにより細胞増殖のシグナル伝達を遮断するが、変異型KRASではEGFRの活性を阻害してもシグナル伝達が抑制されず、腫瘍の増殖にストップがかからないためである。このため、KRAS遺伝子に変異が認められる先のがん患者には分子標的薬(抗EGFR抗体薬)が使用できない。このような変異型KRASの機能・発現抑制により副作用を伴わないがん治療が期待できるが、現時点ではこのような遺伝子治療薬は開発されていない。

### 2. 研究の目的

本研究は、複数の塩基(C, A, T, U)と塩基対を形成するヒポキサンチン(Hyp)を側鎖に配したペプチド核酸(PNA)を合成し、多様なKRAS遺伝子1塩基変異を網羅的に標的とする遺伝子治療薬の開発を目的とした。難治性がんである膵臓がんを対象とした新たながん治療への可能性を検討した。

KRAS遺伝子にみられる多様な点突然変異を細胞内で認識する遺伝子治療薬の開発を念頭に、本研究グループではinchworm型PNA-PEG(ポリエチレングリコール)コンジュゲート(i-PPc)による1塩基の違いに依存した遺伝子発現制御について検討し、細胞膜透過シグナルペプチドを付与させたi-PPcが細胞内で塩基配列依存的に遺伝子の発現を制御できることを報告してきた。この1塩基認識能はi-PPcのinchworm型の化学構造と各PNA部の相補鎖形成温度の違いが原因となって生じる現象であり、従来のブロック型PNAと比較して1塩基認識能が増幅されることがわかった。一方で、変異型に多様性がある場合はそれらと相補性を有するi-PPcを逐一合成する必要があった。

N-リボシドであるイノシンは、ヒポキサンチン(Hyp)を塩基部にもつRNA中にごくわずかに存在する微量塩基の1種である。RNA編集酵素がアデノシンをイノシンへと変換(加水分解的脱アミノ化反応)することで、RNaseによる二本鎖RNAの分解を促進してmiRNAを制御したり、tRNAのアデノシンをイノシンへと変換することでmRNAに対してゆらぎ塩基として作用することが報告されている。いずれの機構もイノシンの塩基部であるHypがシトシン(C)、アデニン(A)、チミン・ウラシル(T, U)とワトソン-クリック型の安定な塩基対を形成するのに対し、グアニン(G)と形成する塩基対はエネルギー的に不安定であることに起因する。このHypの塩基対形成特性は、先のKRAS遺伝子エクソン2コドン12に生じる多様な点突然変異群と網羅的に相補鎖を形成することができることを意味している。このHypを核酸塩基とするi-PPcを調製することでHypの塩基対形成能を増幅し、細胞内で正常な塩基配列(GGT)とそれ以外の点突然変異群を差別化してKRASタンパクの発現を抑制するアンチセンス型の遺伝子治療薬が予想される。

本研究では、Hypを側鎖に有するPNAモノマーを合成して1塩基認識能を誘起するi-PPcにHypを組み込むことで、KRAS遺伝子のexon2codon12に見られる点突然変異とi-PPcの相補鎖形成挙動を解析し、KRAS遺伝子変異をもつ各種すい臓がん細胞の細胞死誘導ならびに細胞死の作用機序解明を目的とする。下記に、本申請で検討した項目を列記した。

- 1) Fmoc-Hyp(Bn)-OH PNA monomer の合成
- 2) Hypを側鎖に配するOligo PNA の合成
- 3) Oligo PNA と synDNA との相補鎖形成挙動評価

### 3. 研究の方法

#### (1) Fmoc-Hyp(Bn)-OH PNA monomer の合成

N-[2-(N-9-fluorenylmethoxycarbonyl) aminoethyl] glycine hydrochloride (Fmoc-aeg-OH·HCl) の化学合成

合成スキーム (Scheme 1) に従い、目的とするFmoc-aeg-OH·HClを合成した。

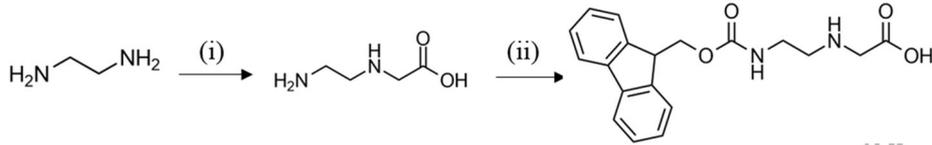
2-(O<sup>6</sup>-benzyloxy-purin-9-yl) acetic acid (Hyp(Bn)-COOH) の合成

合成スキーム (Scheme 2) に従い、目的とするHyp(Bn)-COOHを合成した。

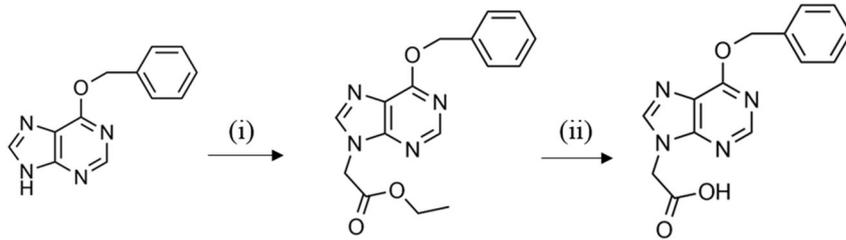
N-(2-((fluorenylmethoxycarbonyl)aminoethyl)-N-(2-(6-(hydroxyl)-9H-purin-9-yl)acetyl) glycine (Fmoc-Hyp(Bn)-OH PNA monomer) の合成

合成スキーム (Scheme 3) に従い、目的とする Fmoc-Hyp(Bn)-OH PNA monomer を合成した。

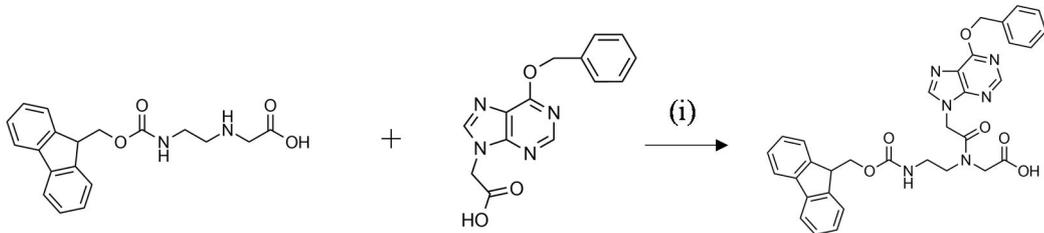
Scheme 1 (i) Chloroacetic acid, 4, r.t., o.n., DMSO, EtOH/water = 2/1, (ii) Water, DMF, Fmoc-OSu in DMF,



3, DIPEA in DMF, r.t., o.n., 0.01 N HCl, DCM, (60.3%).



Scheme 2 (i) NaH, DMF, r.t., 2 h, 4, 30 min, ethyl bromoacetate, r.t., o.n. (ii) 2 M NaOH, 0, 30 min.



Scheme 3 (i) DMF, TSTU, DIPEA, 20 min, DMF, DIPEA, 1 h 30 min, 20% citric acid, Recrystallized from 70% MeOH aqueous solution with 0.1% TFA.

## (2) Hyp を側鎖に配する Oligo PNA の合成

Oligo PNA (3'-TC GAC HAC-5') は Fmoc (9-fluorenylmethoxycarbonyl) 固相合成法を用いて合成した。Rink Amide 樹脂表面に、Fmoc/Bhoc 基で保護された PNA モノマーを DIC/Oxyma を用いて縮合し、8-mer からなるオリゴ PNA を合成した。20% piperidine/NMP により Fmoc 基を脱保護し、その過程は Fmoc 脱保護時に生じる dibenzofulvene を UV でモニタリングした。樹脂からの切り出しと PNA 側鎖保護基の最終的な脱保護は 95% trifluoroacetic acid (TFA), 2.5% triisopropylsilane (TIS), 2.5% dichloroethane 混合溶媒で 4°C, 1h 反応させて処理した。濃縮後、diethyl ether で析出させて粗晶を得た。得られた Oligo PNA は ODS カラムを用いた HPLC により精製した。

## (3) Oligo PNA と synDNA との相補鎖形成挙動評価

相補鎖形成挙動の解析を目的として、相補的な synDNA (5'-AAT ATA AAC TTG TGG TAG TTG GAG CTG GTG GC-3') との融解温度を測定した。Oligo PNA および synDNA 溶液の濃度は円二色性 (CD) 測定によって  $\lambda = 263 \text{ nm}$  より算出した。所定の濃度に調整した Oligo PNA と synDNA の溶液 (10 mM PBS (pH 7.0), NaCl 濃度 150 mM) を、ペルチエ温度コントローラーを備えた J-820 円偏光二色性分光器 (JASCO International Co., Ltd.) と石英セルを用いて測定した (測定条件: 昇温速度 1°C/min, 測定波長 260 nm, 測定温度域 4~95°C)。測定で得られた融解曲線より融解温度  $T_m$  値を見積もり、熱力学的パラメータ (エンタルピー変化 ( $\Delta H_0$ ), エントロピー変化 ( $\Delta S_0$ ) ならびにギブス自由エネルギー変化 ( $\Delta G_0$ )) を算出した。

## 4. 研究成果

### (1) Fmoc-Hyp(Bn)-OH PNA monomer の合成

Fmoc-aeg-OH·HCl (ESI-MS: obs. = 341.14 (cal.  $M_w = 340.14$ ), 収率: 60.3%), 2-(O<sup>6</sup>-benzyloxy-purin-9-yl) acetic acid (Hyp(Bn)-COOH) (ESI-MS: obs. = 285.09 (cal.  $M_w = 284.27$ ), 収率: 44.0%) と、最終的に N-(2-((fluorenylmethoxycarbonyl)aminoethyl)-N-(2-(6-(hydroxyl)-9H-purin-9-yl)acetyl) glycine (Fmoc-Hyp(Bn)-OH PNA monomer) (ESI-MS: obs. = 607.23 (cal.  $M_w = 606.63$ )) は Yield 22.8%, Purity 95.0% であった。

### (2) Hyp を側鎖に配する Oligo PNA の合成

得られた Fmoc-Hyp(Bn)-OH を用いて oligo PNA を合成した結果、TOF-MS 測定 (obs. = 2199.33, cal.  $M_w = 2197.13$ ) ならびに HPLC 測定 (純度: 90.5%) より目的とする oligo PNA が合成されたことが確認された (収率: 17.1%)。

### (3) Oligo PNA と synDNA との相補鎖形成挙動評価

合成した oligo PNA と synDNA 二重鎖の熱力学的安定性を検討するため、融解曲線のシグ

モイド近似式より  $T_m$  値を算出し熱力学パラメータを求めた。UV 測定からの融解曲線を解析したものの  $T_m$  値に対する oligo PNA/synDNA 濃度との相関性が低く、明確な  $T_m$  値を算出するに至らなかった。これは、塩基対が 8 bp と短く UV での検出精度が低くなったことが原因

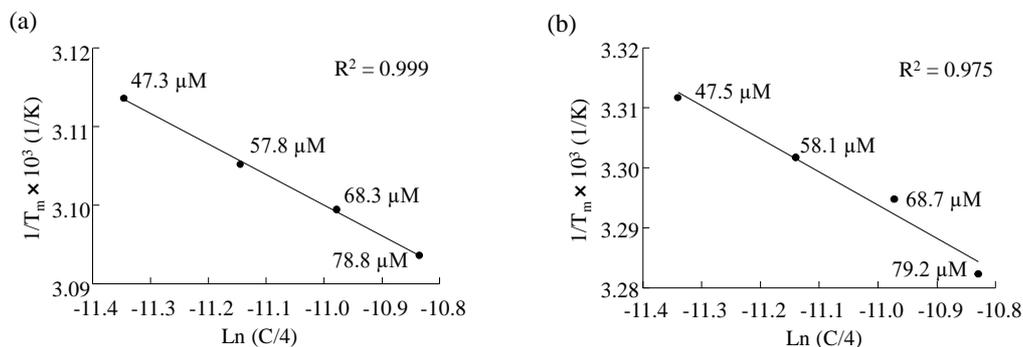


Figure 1  $1/T_m$  vs  $\text{Ln}(C/4)$  プロット, (a) GCT, (b) GGT

と考えられた。このため、CD を用いて融解曲線を測定した結果 (Figure 1), 各 synDNA との熱力学パラメータを得た (Table 1)。この結果、C と最も安定に相補鎖を形成し、次いで A, T となった。また、最も安定な oligo PNA/synDNA (GCT) と最も不安定な synDNA (GGT) との  $\Delta G_0$  の差は 2.75 kcal/mol と見積もられた。さらに、当初目的としていた G 以外の C, A, T の網羅的な認識について、GGT と GTT の  $\Delta G^{37}$  の値の差が 0.17 kcal/mol と見積もられたことから oligo PNA による G 以外の網羅的な相補鎖形成は困難であることが推察された。

Table 1 Oligo PNA/synDNA の相補鎖形成時における熱力学パラメータ

synDNA	$T_m$ 値 <sup>*1</sup>	$\Delta H$ (kcal/mol)	$\Delta S$ (cal/K·mol)	$\Delta G_{37^\circ\text{C}}$ (kcal/mol)
GCT	50.1	-51.21	-136.74	-8.80
GAT	37.7	-47.77	-132.31	-6.73
GTT	32.8	-31.14	-80.35	-6.22
GGT	31.5	-35.87	-96.12	-6.05

$\left. \begin{array}{l} 2.75 \text{ kcal/mol} \\ 0.17 \text{ kcal/mol} \end{array} \right\}$

一方で WT (GGT) と MT (GCT) との相補鎖安定性は  $\Delta G^{37}$  値の差が 2.75 kcal/mol であり、比較的大きなエネルギー差であることが示された。Hypoxanthine を有する 8 base oligo PNA は C と強く水素結合することが示された。これらの結果は、当初 KRAS 遺伝子の 1 塩基変異箇所 (WT: GGT) を標的としたものの、G ではなく C とそれ以外の塩基を標的とすることが可能であることを意味しており、今後は i-PPc 化による細胞内遺伝子発現制御、ならびに該当する野生型がシトシンであるその他の 1 塩基変異性疾患への応用について展開できる可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hamashita Yusuke, Kise Naoki, Sakurai Toshihiko	4. 巻 94
2. 論文標題 Suppression of Intracellular Gene Expression by Inchworm-Type PNA-PEG Conjugate Depends on Recognition of a Monobasic Mutation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 1804 ~ 1806
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20210126	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 Kise Naoki, Manto Tatsuhiro, Sakurai Toshihiko	4. 巻 86
2. 論文標題 Electroreductive Coupling of Phthalimides with $\alpha$ , $\beta$ -Unsaturated Carbonyl Compounds and Subsequent Acid-Catalyzed Rearrangement to 4-Aminonaphthalen-1-ols: Density Functional Theory Study of the Acid-Catalyzed Rearrangement of Ketene Silyl Acetals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 18232 ~ 18246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.1c02512	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 Kise Naoki, Mitsui Yuki, Sakurai Toshihiko	4. 巻 95
2. 論文標題 Reductive Coupling of Isatins with $\alpha$ , $\beta$ -Unsaturated Carbonyl Compounds by Low-Valent Titanium	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 104 ~ 109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20210357	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 Iwasaki Takashi, Maruyama Aiki, Inui Yurika, Sakurai Toshihiko, Kawano Tsuyoshi	4. 巻 86
2. 論文標題 In vitro transcytosis of Helicobacter pylori histidine-rich protein through gastric epithelial-like cells and the blood?brain barrier	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 321 ~ 330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbab221	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 Yusuke Hamashita, Takahiro Shibata, Akiko Takeuchi, Takashi Okuno, Naoki Kise, Toshihiko Sakurai	4. 巻 181
2. 論文標題 Inchworm-type PNA-PEG conjugate regulates gene expression based on single nucleotide recognition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Biological Macromolecules	6. 最初と最後の頁 471-477
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijbiomac.2021.03.	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 Naoki Kise, Tatsuhiko Manto, Toshihiko Sakurai	4. 巻 76(52)
2. 論文標題 Reductive intramolecular coupling of phthalimides with esters and ketones by low-valent titanium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tetrahedron	6. 最初と最後の頁 131725
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tet.2020.131725	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 Naoki Kise, Shota Yamamoto, Toshihiko Sakurai	4. 巻 85(21)
2. 論文標題 Electroreductive Coupling of Phthalic Anhydrides with $\alpha,\beta$ -Unsaturated Carbonyl Compounds: Synthesis of 1,4-Dihydroxynaphthalenes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 13973 - 13982
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.0c02000	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 Kise Naoki, Yamamoto Shota, Sakurai Toshihiko	4. 巻 76
2. 論文標題 Reductive coupling of phthalic anhydrides with aliphatic ketones by low-valent titanium: Unusual two-to-one coupling for preparation of 3,3-disubstituted phthalides	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tetrahedron	6. 最初と最後の頁 130820 ~ 130820
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tet.2019.130820	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 Kise Naoki, Yoshimura Yoshie, Manto Tatsuhiro, Sakurai Toshihiko	4. 巻 4
2. 論文標題 Electroreductive Intermolecular Coupling of 4-Quinolones with Benzophenones: Synthesis of 2-Substituted 4-Quinolones	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 20080 ~ 20093
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.9b03342	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 Kise Naoki, Kinameri Syn, Sakurai Toshihiko	4. 巻 75
2. 論文標題 Reductive coupling of aliphatic cyclic imides and -amidoesters with benzophenones by low-valent titanium: Synthesis of 5-diarylmethylene-1,5-dihydropyrrol-2-ones, 6-diarylmethyl-2-pyridones, and -(diarylmethylene)lactams	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Tetrahedron	6. 最初と最後の頁 3553 ~ 3569
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tet.2019.05.013	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 Kise Naoki, Nagamine Hiroaki, Sakurai Toshihiko	4. 巻 2019
2. 論文標題 Electroreductive Intermolecular Coupling of Chromones with Benzophenones: Synthesis of 2-Diarylmethylchromones and Tetrasubstituted Furans	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 3662 ~ 3676
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ejoc.201900519	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 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 左右田 佳輝, 中村 朱里, 木瀬 直樹, 櫻井 敏彦
2. 発表標題 エンドソームからの薬物リリースを目的としたペプチドタグに関する研究
3. 学会等名 第35回 中国四国地区高分子若手研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 櫻井 敏彦
2. 発表標題 難治性がん治療を目指した核酸医薬の開発
3. 学会等名 PHOENICSシンポジウム特別講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 櫻井 敏彦
2. 発表標題 細胞内で1塩基変異を認識する人工遺伝子の開発 ～難治性がん疾患治療薬への応用をめざして～
3. 学会等名 関西大学先端科学技術推進機構 研究部門別発表会（第59回）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 濱下 優介, 木瀬 直樹, 櫻井 敏彦
2. 発表標題 Inchworm 型人工核酸による遺伝子変異性がん細胞の誘導死効果
3. 学会等名 第68 回高分子学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田 裕紀 江原 麻紀 , 木瀬 直樹 , 櫻井 敏彦
2. 発表標題 リソソーム内分解酵素を利用した細胞内薬物徐放に関する研究
3. 学会等名 第34回中国四国高分子若手研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 人工核酸コンジュゲートおよびその設計法	発明者 櫻井 敏彦	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2021-117807	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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