

令和 4 年 4 月 5 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07534

研究課題名(和文) Cholix 毒素の致死性肝炎発症機構におけるエクソソームmiRNAの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of exosome siRNA in Cholix-induced hepatic cell death

研究代表者

八尋 錦之助 (Yahiro, Kinnosuke)

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80345024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：コレラ菌由来外毒素 Cholix toxin (Cholix) は、N末側に宿主認識領域、C末側に毒性発現領域を持つ蛋白毒素である。宿主細胞内に侵入後、eEF2 を ADP-リボシル化し、タンパク質合成阻害活性に起因するアポトーシスを引き起こす。

本研究は、ヒト由来不死化正常肝臓細胞を用い、細胞致死に至る過程での細胞内と放出されるエクソソーム内の microRNA (miRNA) を解析し、新たな細胞死亢進因子、致死過程特異的なコミュニケーション因子の同定・機能解析を行うことを目的とする。また、Cholix との相互作用する宿主細胞内蛋白質を同定する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑膿菌の産生するExoA とよく似た構造と活性を持つ Cholix は、肝障害を引き起こす毒素である。今回、Cholix の新規宿主細胞由来結合蛋白質としてProhibitin1,2 (PHB) を同定した。Cholix の細胞死に PHB が関与している事が分かった。ヒト由来不死化正常肝臓細胞を用いて Cholix による細胞内の mRNA, miRNA の網羅的解析 (RNAseq 解析、マイクロアレイ解析) を行った。この解析結果は、これまで未知であった ADP-リボシル化による細胞死において、新規の宿主障害機構を見出す貴重な基礎データとなると確信している。

研究成果の概要(英文)：Cholix cytotoxin (Cholix) was identified as a novel eukaryotic elongation factor 2 (eEF2) ADP-ribosyltransferase produced mainly in non-O1/non-O139 V. cholerae. The function and role of Cholix in infectious disease caused by V. cholerae remain unknown. We identified prohibitin (PHB) 1 and 2 as novel Cholix-interacting membrane proteins in immortalized human hepatocytes. Cholix-induced reactive oxygen species (ROS) production and accumulation of fragmented mitochondria were enhanced in PHB-knockdown cells. Our findings identify PHB as a new protein that interacts with Cholix and is involved in Cholix-induced mitochondrial dysfunction and cytoskeletal rearrangement by ROCK1 activation during apoptosis. In addition, we investigated the change of mRNA or miRNA by RNAseq or miRNA microarray analysis in Cholix-treated cells. We believed that these data are crucial informations to provide us novel cell damage or response pathways.

研究分野：細菌学

キーワード：細菌毒素 ADP-リボシル化 PHB マイクロアレイ解析 miRNA エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

コレラは、コレラ菌を摂取することで起きる急性下痢性感染症である。今なお、世界では、毎年、発展途上国を中心に約 130~400 万人の患者が発生し、約 10 万人が死亡していると推定される重要な感染症である。下痢症の原因は、コレラ毒素によるものである。一方、近年、コレラ感染は腸管だけでなく、肝臓、肺などの他臓器に炎症を引き越すことが報告されている。

コレラ菌ゲノム遺伝子の解析から、新規病原因子として Cholix 毒素 (Cholix) がコードされていることが明らかにされた。重篤な下痢を引き起こすことが知られているコレラ毒素は、O-1/O-139 血清型コレラ菌のみ産生するが、Cholix は O-1/O-139 血清型の約 20 %、非 O-1/O-139 型では約 40 % と多くの血清型で保有されており、下痢症以外のコレラ感染症の病態発症に Cholix が関与している可能性がある。

Cholix は、細胞内侵入後、eEF2 を ADP-リボシル化することでタンパク質合成阻害を引き起こし、カスパーゼ依存、非依存性の機構を使いアポトーシスを誘導する (Ogura K. et al., J Biol Chem. 2011)。また、精製した Cholix のマウス腹腔内への投与は、腸管に対しては著名な障害を認めず、致死性肝炎を発症することを見出した (Ogura K. et al., Toxicol Sci. 2017)。Cholix の宿主受容体は、LDL 受容体 LRP1 であることが、マウス由来の線維芽細胞を用いた研究から明らかにされている。しかし、ヒト肝臓細胞では、その受容体 (結合タンパク質) が明らかになっていない。Cholix による致死性肝炎の全容は未だ、不明な点が多く残っている。

2. 研究の目的

コレラ菌由来外毒素 Cholix toxin (Cholix) は、N 末側に宿主認識領域、C 末側に毒性発現領域を持つ蛋白毒素である。宿主細胞内に侵入後、eEF2 を ADP-リボシル化し、タンパク質合成阻害活性に起因するアポトーシスを引き起こす。申請者は、本毒素が ① 標的臓器として肝臓を特異的に認識し致死性肝炎を誘導すること、② マクロファージ由来の炎症性サイトカイン TNF- α と相乗的に細胞致死を亢進させることを見出した。

本研究は、ヒト由来不死化正常肝臓細胞を用い、細胞致死に至る過程での細胞内と放出されるエクソソーム内の microRNA (miRNA) を解析し、新たな細胞死亢進因子、致死過程特異的なコミュニケーション因子の同定・機能解析を行うことを目的とする。また、Cholix との相互作用する宿主細胞内蛋白質を同定する。本研究結果は、細菌感染症に於ける毒素による宿主応答機構の理解を深め、致死性肝炎発症機構の解明に繋がると確信している。

3. 研究の方法

1) Cholix の精製

大腸菌 (BL21) で発現させた GST-タグ付き Cholix と酵素活性中心アミノ酸を置換した変異体 GST-タグ付き mt Cholix をグルタチオンセファロース 4B カラムに結合させた後、GST タグを PreScissionTM Protease で外して、Cholix を精製して実験に用いた。

2) ヒト由来不死化肝臓細胞株の培養と miRNA, mRNA の精製

ヒト由来不死化肝臓細胞 hepatocyte を RPMI1640 に 10% ウシ血清を添加した培養液で培養した。6 well plate に細胞を培養し、Cholix を添加 8 時間後に ISOGEN II を添加し、細胞を回収した。Total RNA をマニュアルに従って精製した。

3) マイクロアレイ、RNAseq 解析

精製した RNA を miRNA アレイ、mRNA アレイ (Macrogen) で解析を行った。Cholix により有意に増加或いは、減少する遺伝子を抽出し、ヒートマップ、Volcano プロット、KEGG 解析、統合解析を行った。

4) RT-qPCR

マイクロアレイの統合解析結果から、細胞の生死、炎症応答などに関与すると推定される miRNA を選択する。次いで、アレイの発現、減少パターンを確認するため、Mir-X miRNA qRT-PCR TB Green Kit (Takara) を用い、精製した miRNA の 3' 側に poly A を付加し、cDNA を合成する。次に、個々の miRNA のプライマーを用い、miRNA を定量する

5) ウェスタンブロット法

阻害剤や siRNA を導入した Cholix で処理した。1x SDS サンプルバッファーで可溶化し、熱変性した後、SDS-PAGE した。PVDF 膜に転写し、ブロッキングバッファー (ATTO) でブロックした。Immunoshot バッファー中で、一次抗体と反応させた。洗浄後、二次抗体と反応させ、ECL で検出した。

6) 遺伝子導入

不死化正常肝臓細胞 hepatocytes に、種々の siRNA とコントロール (NC) siRNA を Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen) により遺伝子導入し、48 時間後、標的蛋白質の発現をウェストウエスタンブロットティングにより確認した。

発現プラスミドは、PEI と混合した後、細胞に添加して遺伝子導入し、48 時間後にその発現をウエストウエスタンブロッティングで確認した。

7) エキソソームの精製

10 cm シャーレに培養したヒト不死化肝臓細胞を、無血清 RPMI1640 培地に換え、精製した野生型或いは、毒素活性中心のアミノ酸を置換し活性を持たない Cholix (コントロール) を添加する。細胞死のマーカーである PARP の切断が検出され始める 8 時間目と細胞の核の断片化が観察される 18 時間後の培養上清 (20 ml) を回収する。ホスファチジルセリン (PS) に結合するタンパク質と磁気ビーズを利用した新規アフィニティー法 (WAKO, MagCapture Exosome Isolation Kit) を用いて精製する。各時間のエキソソームの回収量は、エキソソームの表面マーカー蛋白質抗体 (抗 CD63 抗体) によるウエストウエスタンブロットで確認、比較する。

8) 精製エキソソームからの miRNA の精製

従来のゲル切り抽出による miRNA の精製法では、rRNA や tRNA の分解物のコンタミ、低収量が問題となっているため、本実験では、microRNA Extractor SP kit (WAKO) を用い抽出する。精製 miRNA の量と質を確認するため、SuperSep RNA (15%, WAKO) で電気泳動後、染色する。

9) マイクロアレイを用いた miRNA の発現比較解析

毒素処理初期と後期で得たエキソソーム由来の miRNA の 3' 末端に蛍光色素を結合させた後、Human miRNA Oligo chip (TORAY) 或いは、Human miRNA マイクロアレイ (Agilent) で、発現量を比較、定量解析する。この miRNA の網羅的な発現解析は受託で行い、客観的に得られたデータから、群分け解析、群比較解析など

10) RNAseq を用いた mRNA の発現解析と統合解析

miRNA の発現比較解析の結果をより明確にするため、個々の miRNA がどの転写産物分解に関わるか明らかにするため、mRNA のマイクロアレイ解析を行う。この miRNA と mRNA の網羅的な解析データをバイオインフォマティクスによる標的遺伝子予測解析から本毒素で調節されるエキソソームに由来する miRNA の転写産物分解機構を検索する。

11) エキソソーム阻害剤の細胞死に与える影響

エキソソーム阻害剤 GW4869, Altenusin 等の Cholix による細胞死への影響を調べるため、hepatocytes に阻害剤を添加して、8 時間後の細胞死のシグナル伝達機構をウエストウエスタンブロッティングにより解析した。

4. 研究成果

ヒト肝細胞上の Cholix 結合タンパク質の同定

Cholix の宿主結合タンパク質を検索するため、HepG2 細胞表層タンパク質をビオチン標識した可溶性溶液に、Cholix を添加した後、抗 Cholix ペプチド抗体 (M1 或いは C1)、Protein G セファロースで沈降させた。SDS-PAGE 後、PVDF 膜に転写し、Avidin-HRP で検出した。熱失活させた Cholix (HI) と比較し、Cholix (N) 特異的に、30-kDa, 33-kDa の 2 つのタンパク質が検出された。この検出されたタンパク質は、抗 Cholix C1 抗体を使った時のみ観察され、M1 のペプチド抗体や全長を免役して得られた抗体では検出されなかった。Cholix の細胞膜結合領域は N 末端側であることから、C 末端側を認識する C1 抗体が立体障害もなく、沈降しやすい状態であると推察された。

この Cholix 結合タンパク質を同定するため、プロテオミックス解析を行った。当初、ゲル電気泳動後に目的の分子量の部分を取り出して解析を行った結果、prohibitin1, 2 (PHB1, 2) であることが示唆された。

Cholix 結合タンパク質 PHB1, 2 の細胞内局在

過去の報告から、PHB は、主にミトコンドリアに局在し、一部が、細胞膜、細胞質、核に局在することが知られている。そこで、Cholix による PHB の細胞内局在変化を調べるため、蛍光免疫染色の後、共焦点顕微鏡により観察した。

Cholix 添加初期の段階では、PHB1 は、細胞質やミトコンドリアなどの細胞内オルガネラに広く分布していた。一方、PHB2 は多くがミトコンドリアに局在していた。Cholix による細胞死シグナルが観察される、インキュベーション後半では、PHB1 は細胞質から、ミトコンドリアへ集積しているように見えた。PHB2 は、初期と変化無く、ミトコンドリアで観察された。

Cholix 結合タンパク質 PHB1, 2 の発現抑制/高発現による細胞致死機構への影響

次に、Cholix 結合タンパク質 PHB に対する siRNA を不死化正常肝細胞に遺伝子導入した後、Cholix が誘導するアポトーシスシグナル (PARP の切断) を調べた。当初、PHB の発現抑制により PARP の切断は抑制されると予想していたが、予想に反し、Cholix による PARP の切断は劇的に亢進した。反対に、PHB を一過性に高発現させた場合は、Cholix による、Bax, Bak の構造変化、PARP の切断を阻害し、アポトーシスに対してプロテクトに機能していた。即ち、Cholix 結合タンパク質 PHB は、Cholix の細胞致死に関与することが示唆された。

Cholix により変動する mRNA 解析

不死化正常肝臓細胞を用いて、Cholix 添加後の mRNA の発現変化を RNAseq により解析した。Cholix により 477 個の mRNA の増加、194 個の減少が認められた。GO functional analysis から、蛋白質のフォールディングシャペロン等に関連するグループの増加が有意であった。

Cholix により変動する miRNA 解析

不死化正常肝臓細胞を用いて、Cholix 添加後のトータル RNA 中の miRNA の発現変化を miRNA array により解析した。Cholix により有意に増加した 14 個と、10 個の減少した miRNA を認めた。上記で得られた mRNA との統合解析を行い、Cholix により増減する mRNA の制御に miRNA が関与しているか、RT-qPCR で確認した。

Cholix 処理した細胞からのエクソソーム回収

Cholix 処理した細胞から分泌されるエクソソームを精製するために、幾つかの精製キットを用いて検討を行った。磁気ビーズ法 (コスモバイオ) や、沈澱法 (サーモフィッシャー) を用いて回収を試みた。十分な量の RNA を回収すべく検討している。

エクソソーム阻害剤の影響

エクソソームが Cholix の誘導する細胞死に関与するか調べるため、エクソソームの分泌阻害すると報告のある GW4869 存在下調べた。結果、Cholix により誘導される PARP の切断が有意に阻害された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Yahiro K, Ogura K, Tsutsuki H, Iyoda S, Ohnishi M, Moss J. A novel endoplasmic stress mediator, Kelch domain containing 7B (KLHDC7B), increased Harakiri (HRK) in the SubAB-induced apoptosis signaling pathway. *Cell Death Discov* 2021, 7(1): 360.
2. Yahiro K, Ogura K, Goto Y, Iyoda S, Kobayashi T, Takeuchi H, et al. Subtilase cytotoxin induces a novel form of Lipocalin 2, which promotes Shiga-toxicogenic *Escherichia coli* survival. *Sci Rep* 2020, 10(1): 18943.
3. Tsutsuki H, Zhang T, Harada A, Rahman A, Ono K, Yahiro K, et al. Involvement of protein disulfide isomerase in subtilase cytotoxin-induced cell death in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2020.
4. Tsutsuki H, Ogura K, Moss J, Yahiro K. Host response to the subtilase cytotoxin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxicogenic *Escherichia coli*. *Microbiol Immunol* 2020, 64(10): 657-665.
5. Harada A, Tsutsuki H, Zhang T, Lee R, Yahiro K, Sawa T, et al. Preparation of Biodegradable PLGA-Nanoparticles Used for pH-Sensitive Intracellular Delivery of an Anti-inflammatory Bacterial Toxin to Macrophages. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2020, 68(4): 363-368.
6. Yahiro K, Ogura K, Terasaki Y, Satoh M, Miyagi S, Terasaki M, et al. Cholix toxin, an eEF2 ADP-ribosyltransferase, interacts with Prohibitins and induces apoptosis with mitochondrial dysfunction in human hepatocytes. *Cell Microbiol* 2019: e13033.
7. Suzuki H, Ataka K, Asakawa A, Cheng KC, Ushikai M, Iwai H, et al. *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin A Causes Anorexia and Anxiety via Hypothalamic Urocortin 1 in Mice. *Sci Rep* 2019, 9(1): 6011.
8. Yamaji T, Hanamatsu H, Sekizuka T, Kuroda M, Iwasaki N, Ohnishi M, et al. CRISPR knockout screening identified host factors for SubAB-induced cell death. *iScience* 2019.

[学会発表] (計 10 件)

1. 八尋錦之助、小倉康平、後藤義幸、伊豫田淳、小林達也、竹内裕紀、大西真「SubAB により誘導される新規 Lipocalin-2 の制御と細胞致死機構」第 67 回トキシシンポジウム 2021 年 9 月 9 日
2. 八尋錦之助「腸管出血性大腸菌の産生する小胞体ストレス誘導毒素の宿主受容体と宿主応答解析」第 31 回日本生体防御学会学術総会 2020 年 9 月 10 日
3. 八尋錦之助「ヒト肝臓細胞における新規 Cholix 結合膜蛋白質の同定と細胞致死機構の解明」第 93 回日本細菌学会総会(名古屋) 2020 年 2 月 19-21 日

4. 八尋錦之助「腸管出血性大腸菌の産生する小胞体ストレス誘導毒素の宿主応答機能解析」
2020年度 第30回 学校法人北里研究所 学会賞受賞者 特別講演会 2020年1月29日
5. 八尋錦之助「Cholix toxin, an eEF2 ADP-ribosyltransferase, induces cell death signaling pathway」第93回日本生化学会総会 2020年9月14-16日
6. 八尋錦之助「CRISPRライブラリーを用いたSubtilase cytotoxinによる致死に耐性を示す細胞の樹立と受容体認識機構の解明」第23回腸管出血性大腸菌研究会(愛媛) 2019年11月14-15日

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Ogura, K. Yahiro, K. Moss, J.	4. 巻 13
2. 論文標題 Cell death signaling pathway induced by Cholix toxin, a cytotoxin and eEF2 ADP-ribosyltransferase produced by <i>Vibrio cholerae</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxins13010012	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 Tsutsuki, H. Ogura, K. Moss, J. Yahiro, K.	4. 巻 64
2. 論文標題 Host response to the Subtilase cytotoxin produced by locus of enterocyte effacement (LEE)-negative Shiga-toxigenic <i>Escherichia coli</i> (STEC)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology.	6. 最初と最後の頁 657-665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12841.	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 Yahiro, K., Ogura, K., Goto, Y., Iyoda, S., Kobayashi, T., Takeuchi, H., Ohnishi, M., Moss, J.	4. 巻 10
2. 論文標題 Subtilase cytotoxin induces a novel form of Lipocalin 2, which promotes Shiga-toxigenic <i>Escherichia coli</i> survival.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports.	6. 最初と最後の頁 18943
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-76027-z.	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 Tsutsuki, H., Zhang, T., Harada, A., Rahman, A., Ono, K., Yahiro, K., Niidome, T., Sawa, T.	4. 巻 525
2. 論文標題 Involvement of protein disulfide isomerase in subtilase cytotoxin-induced cell death in HeLa cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 1068-1073
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.03.008.	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 Harada, A., Tsutsuki, H., Zhang, T., Lee, R., Yahiro, K., Sawa, T., Niidome, T.	4. 巻 68
2. 論文標題 Preparation of biodegradable PLGA-nanoparticles used for pH-sensitive Intracellular delivery of an anti-inflammatory bacterial toxin to macrophages.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chem. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 363-368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c19-00917.	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 Yahiro, K., Ogura, K., Terasaki, Y., Satoh, M., Miyagi, S., Terasaki, M., Yamasaki, E., Moss, J.	4. 巻 22
2. 論文標題 Cholix toxin, an eEF2 ADP-ribosyltransferase, interacts with Prohibitins and induces apoptosis with mitochondrial dysfunction in human hepatocytes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell. Microbiol.	6. 最初と最後の頁 e13033
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cmi.13033.	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 Suzuki, H., Ataka, K., Asakawa, A., Cheng, K., Ushikai, M., Iwai, H., Arai, T., Yahiro, K., Yamamoto, K., Yokoyama, Y., Kojima, M., Yada, T., Hirayama, T., Nakamura, N., Inui, A.	4. 巻 9
2. 論文標題 Helicobacter pylori Vacuolating Cytotoxin A Causes Anorexia and Anxiety via 1 Hypothalamic Urocortin 1 in Mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 6011
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-42163-4.	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 Yamaji, T., Hanamatsu, H., Sekizuka, T., Kuroda, M., Iwasaki, N., Ohnishi, M., Furukawa, J., Yahiro, K., Hanada, K.	4. 巻 15
2. 論文標題 A CRISPR Screen Using Subtilase Cytotoxin Identifies SLC39A9 as a Glycan-regulating Factor.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 407-420
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2019.05.005	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 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 八尋錦之助
2. 発表標題 Cholix toxin, an eEF2 ADP-ribosyltransferase, induces cell death signaling pathway
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 八尋錦之助
2. 発表標題 腸管出血性大腸菌の産生する小胞体ストレス誘導毒素の宿主受容体と宿主応答解析
3. 学会等名 第31回生体防御学会学術総会（熊本）（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 八尋錦之助
2. 発表標題 腸管出血性大腸菌の産生する小胞体ストレス誘導毒素の宿主応答機能解析
3. 学会等名 学校法人北里研究所第30回学会賞受賞者特別講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 八尋錦之助
2. 発表標題 SubAB induces a novel form of Lipocalin 2, which involves in STEC survival
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 八尋 錦之助、小倉 康平、寺崎 泰弘、宮城 聡、山崎栄樹
2. 発表標題 ヒト肝臓細胞における新規Cholix結合膜蛋白質の同定と細胞致死機構の解明
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020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

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	Dr. Joel Moss	NIH	