

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07733

研究課題名(和文)呼吸器腫瘍における薬物療法による免疫原性細胞死誘導能の探索研究

研究課題名(英文) Exploratory research for immunogenic cell death induced by anti-cancer drugs in lung cancer

研究代表者

井上 博之 (INOUE, HIORYUKI)

福岡大学・医学部・准教授

研究者番号：80529967

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)：免疫チェックポイント阻害薬と抗癌剤の相乗効果に、癌細胞死の過程でDAMPsの放出で特徴づけられる免疫原性細胞死(ICD)の関与が示唆されている。本研究で、6種類のNSCLC細胞株において、代謝拮抗薬及び微小管阻害薬はプラチナ系抗癌剤より強くEcto-CRTおよびeIF2のリン酸化を誘導すること、Ecto-CRT発現量とアポトーシス誘導能の強い正の相関を明らかにした。第三世代EGFR-TKIオシメルチニブもNSCLC細胞株においてEcto-CRT発現量を増加させた。さらに、ペメトレキセド/ドセタキセル単剤およびオシメルチニブで治療した進行期肺癌患者において血中可溶性CRT濃度の増加を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果より、代謝拮抗薬、微小管阻害薬及び第三世代EGFR-TKIオシメルチニブは、複数のNSCLC細胞株におけるEcto-CRT発現量及びNSCLC患者血液中の可溶性CRTを効果的に誘導し、これらの薬剤は長期抗腫瘍効果を期待できるICIを含む複合免疫療法において、ICDを誘導することで抗腫瘍免疫効果の増強に寄与している可能性が示唆された。また、今後CRTのみでなくその他のDAMP分子を含む統合解析により、これらDAMP分子が治療効果予測バイオマーカーとなりうる可能性も示唆された。現在我々は、血中DAMP分子値とICI治療効果の相関解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：The synergistic effects of immune checkpoint inhibitors and cytotoxic anticancer drugs in the treatment for solid cancers have been implicated in immunogenic cell death (ICD), a process characterized by the release of DAMPs (damage-associated molecular patterns) during cancer cell death. In this study, we found that antimetabolites and microtubule inhibitors induced phosphorylation of Ecto-CRT and eIF2 more strongly than platinum-based anticancer drugs in six human NSCLC cell lines, and a strong positive correlation between Ecto-CRT expression level and apoptosis induction ability. The third generation EGFR-TKI osimertinib also increased Ecto-CRT expression in NSCLC cell lines. In addition, we demonstrated that soluble CRT levels in serum were increased in patients with advanced stage lung cancer treated with pemetrexed/docetaxel monotherapy and osimertinib.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：ICD DAMP NSCLC Calreticulin

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肺癌は生存率が低く世界中で増加の一途を辿っている。近年免疫チェックポイント阻害薬(ICIs)は、進行期固形癌の治療展望を変えてきており、多くの臨床試験の結果、プラチナ併用抗癌剤に抗 PD-1 抗体や抗 PD-L1 抗体を加えることで、進行期 NSCLC 患者の全生存期間を有意に延長することを示してきた。実臨床における ICIs と殺細胞性抗癌剤の併用での抗腫瘍効果の増強は、抗癌剤が腫瘍の ICI 治療への感受性を高めることを示唆している。多くの抗癌剤は直接的な殺細胞性効果を有するのみならず宿主の抗腫瘍免疫応答を修飾すると考えられており、その一つの機序として ICD 誘導の関与が示唆されている。ICD は制御性細胞死の一形態で、ecto-CRT や high-mobility group box 1 (HMGB1)、ATP などの DAMPs の放出を介して宿主の獲得免疫系を刺激する。アントラサイクリンやドキソルピシンなどの殺細胞性抗癌剤は大腸癌において細胞内の CRT を細胞膜表面上に移行させ、in vitro で癌細胞の樹状細胞による貪食を促進させ、一方で in vivo マウスモデルでの組換え CRT の投与は ICD を誘導しなかった殺細胞性抗癌剤の抗腫瘍効果を増強させた。CRT は通常小胞体内部に存在するが、アポトーシス誘導に関連して細胞膜表面上に移行し(Ecto-CRT)、貪食細胞に“eat me”シグナルとして働き続発性獲得免疫を促進する。臨床における破壊過程における腫瘍細胞から放出される可溶性 CRT(sCRT) の免疫学的関連は不明であるが、近年の研究により in vitro でリコンビナント CRT が単球・マクロファージを刺激し、in vivo で免疫原性を促進し、これらの効果は部分的に蛋白質の自己オリゴマー形成に依存することが明らかとなった。これらの結果は、ecto-CRT 及び sCRT の両者が DAMPs として働き、抗腫瘍免疫応答に寄与する可能性を示唆しており、免疫原性抗癌剤を用いた新しい治療戦略を練る上での基礎知見となるかもしれない。

### 2. 研究の目的

本研究では、殺細胞性抗癌剤や EGFR チロシンキナーゼ阻害薬など、現在 NSCLC の標準治療として投与される種々の殺細胞性抗癌剤の ecto-CRT 誘導能を、複数の NSCLC 細胞株を用いて比較評価した。また、抗腫瘍薬治療中の進行期 NSCLC 患者血中 sCRT 濃度を測定した。

### 3. 研究の方法

- (1) 細胞培養と試薬：全てのは細胞株は、10%のウシ胎児血清と 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを含む RPMI もしくは DMEM (GIBCO)で培養された。ペメトレキセドジナトリウム塩 (PEM) は LKT laboratoris 社から、ドセタキセル(DTX)、シスプラチン(CDDP)、カルボプラチン(CBDCA)は Tocris 社ら、ジェムシタピン(GEM)は Tront から、パクリタキセル(PTX)、ビノレルピン二酒石酸塩(VNR)、ジメチルスルフォキシドは和光社から、Z-VAD-FMK は Selleck 社から購入した。
- (2) MTS アッセイ：細胞生存は MTS アッセイを用いて評価した。細胞は 96 ウェル平坦底プレート (Greiner Bio-One)に播種し、検査試薬添加前に 12 時間、添加後に 72 時間培養した。セルタイター96 アクオスワンソリューション-ション(Promega)を各ウェルに加えたのち、マルチスキャン FC インストルメント(Thermo Fisher Scientific)で 489 nm での吸光度を計測した。各試薬における 50%阻害濃度 (IC50) はグラフパッドもしくは マクロソフト エクセルを用いた生存曲線より算出した。
- (3) ecto-CRT の検出：細胞は 6 ウェルプレートに播き 12 時間培養した後、各 IC50 濃度の試薬を加えてさらに 72 時間培養した。細胞表面上の CRT 及び Annexin V はフローサイトメトリーで検出した。細胞回収後、Annexin V バインディングバッファー (BioLegend)で洗浄し、氷上で 20 分、抗ヒト CRT ラビット抗体(Abcam)およびフルオレセインイソチオシアネート標識 Annexin V(BioLegend)を Annexin V バインディングバッファー中で反応させた。2% FBS と 0.1% アジ化ナトリウムを含む FACS バッファーで 2 回洗浄し、氷上で 20 分、Alexa Fluor 647 標識抗ラビット IgG ドンキー抗体 (Abcam)と Annexin V バインディングバッファー中で反応させた。さらに、FACS バッファーで 2 回洗浄し、細胞を FACS Verse (Becton Dickinson)でフローサイトメトリー解析した。
- (4) 患者と検体採取：前治療の種類によらず進行期 NSCLC 患者 25 名から、DTX や PEM 治療の 1 コースの開始前、3 日目、8 日目、最終日、もしくは、オシメルチニブ治療の 1 コース目開始前、3 日目、8 日目、以降 1 か月後までの間の 4 点で血漿を採取した。可溶性 CRT は ELISA キット(#ELH-CALR-1, Ray Biotech)で計測した。すべての患者から同意を取得した。腫瘍径は治療前と 2 コース治療後 RECIST ヴァージョン 1.1 に基づき測定した。
- (5) イムノブロット解析：細胞は RIPA バッファー(Thermo Fisher)に溶解し、SDS ポリアクリルアミド ゲル電気泳動で蛋白を分離し、ポリフッ化ビニリデン膜に転写した。膜は 4°Cで一晩、抗リン酸化 eIF2 $\alpha$  抗体(#9721, 1:1000, Cell Signaling Technology)、及び eIF2 $\alpha$  抗体 (Cell Signaling Technology)と反応させた。抗体複合体はホースラディッシュペルオキシダーゼ標識抗ラビット IgG ゴート抗体 (GE Healthcare)および、ピアス ウェスタンブロットング サブトレート プラス (Thermo Fisher)、ケミドック XRS + システム(BioRad)で検出した。

### 4. 研究成果

- (1) 殺細胞性抗癌剤は NSCLC 細胞株で細胞表面 CRT(ecto-CRT)を誘導  
まず、MTS アッセイを用いて、実臨床において NSCLC 治療に使用される殺細胞性抗癌剤 CDDP、CBDCA、VNR、DTX、PTX、GEM、PEM の、6 種類のヒト NSCLC 細胞株における IC50 を算出した(Table 1)。次に、それぞれの薬剤の IC50 濃度における ecto-CRT の誘導強度をフローサイトメトリー法を用いて比較定量した。その結果、すべての 7 種類の抗腫瘍薬は 6 種類の NSCLC 細胞において顕著な ecto-CRT 発現を誘導した (Fig.1A)。未治療(コントロール)と比較し、白金製剤である CDDP と CBDCA は有意な発現量増加を認めなかったが、代謝拮抗薬の PEM と GEM、微小管阻害薬の PTX、DTX、VNR では有意な ecto-CRT の増加を呈した。真核生物翻訳開始因子 2 $\alpha$ (eIF2 $\alpha$ )のリン酸化は、小胞体(ER)ストレス兆候の一つで下流の ecto-CRT 誘導に関連するため、我々は種々の殺

細胞性抗癌剤処理による NSCLC 細胞における eIF2 $\alpha$  のリン酸化強度を比較解析した。イムノブロット解析の結果、白金製剤の CDDP 及び CBDCA と比較し、代謝拮抗薬の PEM 及び GEM や代謝拮抗薬の DTX 及び PTX は、NSCLC 細胞において eIF2 $\alpha$  をより強くリン酸化させた(Fig.1C)。

(2) 殺細胞性抗癌剤暴露 NSCLC 細胞における ecto-CRT 発現量とアポトーシスの関係

抗腫瘍薬が癌細胞においてアポトーシスを起す過程で ecto-CRT を誘導することを考慮し、抗腫瘍薬による ecto-CRT と、細胞膜表面の Annexin V で検出されるアポトーシスを同時に評価した。DTX 及び GEM においては統計学的有意差はなかったが、それ以外の 7 種類の殺細胞性抗癌剤で治療(暴露)した 6 種類の NSCLC 細胞株において、ecto-CRT 陽性率と Annexin V 陽性率に統計学的に有意な正の相関を認めた(Fig.2A)。これらの正の相関とアポトーシス過程における各カスパーゼの役割を考慮し、EBC1 細胞において、7 種類の殺細胞性抗癌剤処理による ecto-CRT 誘導に対する汎カスパーゼ阻害薬 Z-VAD-FMK の影響を検証した。その結果、CBDCA、VNR、PTX、GEM および PEM によって誘導された ecto-CRT 発現量は、Z-VAD-FMK (50 $\mu$ M)付加により有意に抑制され(Fig. 2B)、カスパーゼ依存性アポトーシスが ecto-CRT 誘導の一部に寄与することが示された。

(3) オシメルチニブは EGFR 遺伝子変異陽性 NSCLC 細胞株で ecto-CRT 発現を強化

オシメルチニブは EGFR 遺伝子変異陽性 NSCLC 患者の治療の第一選択薬となる第 3 世代 EGFR-TKI である。これまで EGFR-TKI による EGFR 遺伝子変異陽性 NSCLC 細胞株での ecto-CRT 発現効果は明らかにされておらず、EGFR 遺伝子エクソン 19 欠損を有する PC9、H1650、HCC827、HCC4006 細胞および L858R 点突然変異を有する H1975 細胞を用いてオシメルチニブの ecto-CRT 誘導能を評価定量した。オシメルチニブの各 IC50 (Table 2) による治療(暴露)は、5 種類全ての EGFR 遺伝子変異陽性細胞株で ecto-CRT 陽性率を上昇させた(Fig. 3A)。オシメルチニブによる ecto-CRT 発現の平均相対増加率は統計学的に有意であった(Fig. 3B)。また、5 種類の細胞株での CRT 陽性率と annexin V 陽性率の間に有意な相関を認めた(Fig.3C)。オシメルチニブ処理による ecto-CRT および annexin V の相対的発現量の増加は、Z-VAD-FMK の併用処理により有意に減弱した(Fig. 3D、3E)。

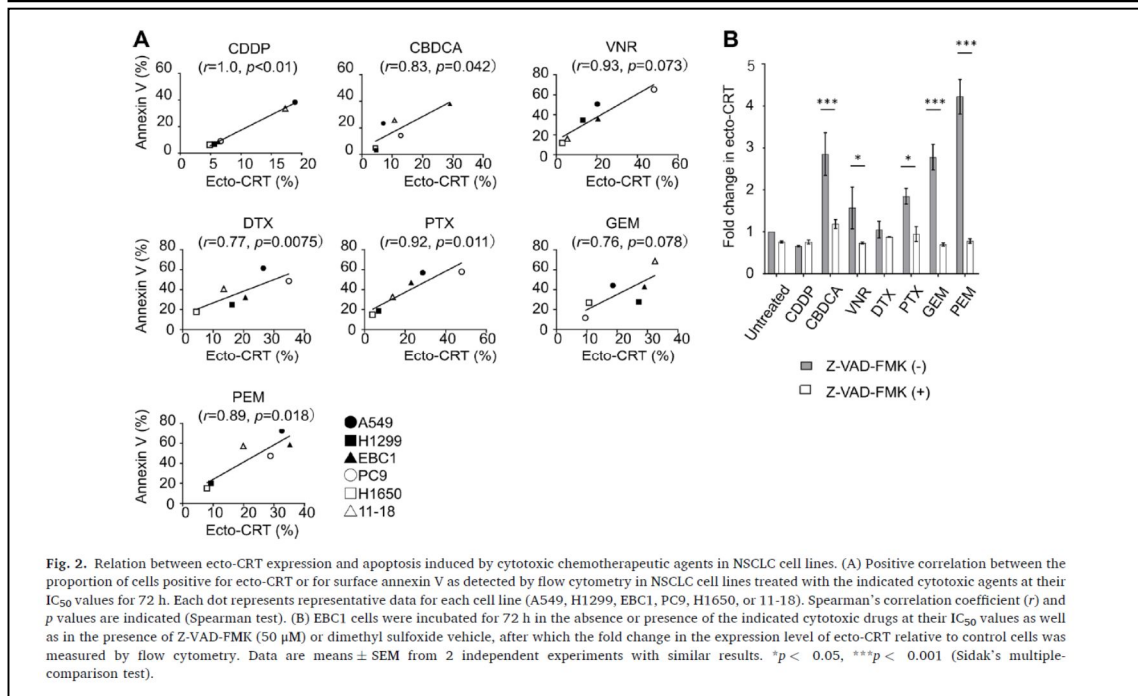
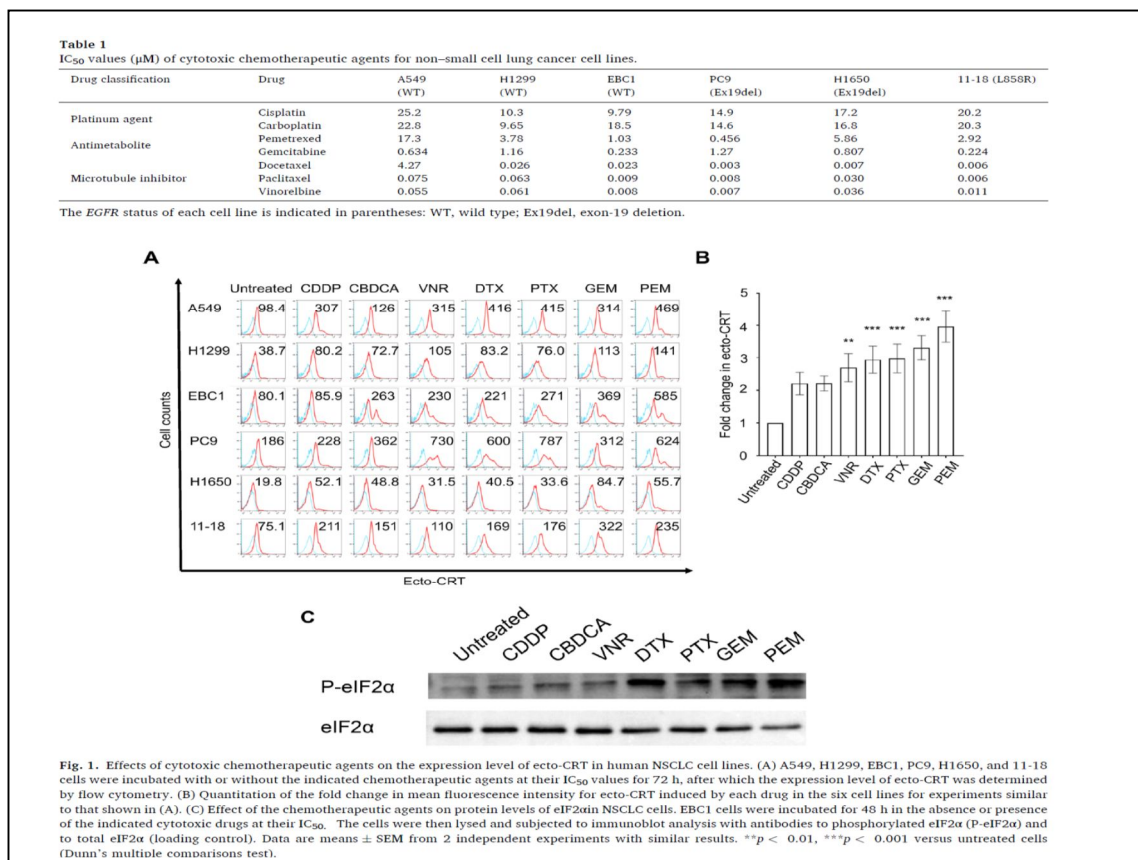
(4) 殺細胞性抗癌剤もしくはオシメルチニブで治療した NSCLC 患者の血漿中可溶性 CRT 量  
実臨床において全身化学療法を受けた進行期 NSCLC 患者において、腫瘍組織を採取し ecto-CRT 発現量の評価する機会は非常に限られており、患者血漿中における可溶性 CRT 濃度の変化の有無を ELISA 法を用いて評価した。NSCLC 細胞株で比較的 ecto-CRT 誘導効果の高かった(Fig1.1) DTX もしくは PEM 単剤治療を受けた NSCLC 患者の血漿中可溶性 CRT を測定した。血漿は 16 人の非小細胞肺癌患者から、治療 1 サイクル目の開始前(pre)、3 日後、8 日後、1 コース終了時の異なる 4 点で採取された。治療開始後の可溶性 CRT の最大値は治療開始前より有意に増加した(Fig. 4A)。最後に、同様の解析をオシメルチニブを投与された EGFR 遺伝子変異陽性進行期 NSCLC 患者で施行した結果、治療開始後の可溶性 CRT の最大値は治療前より有意に増加した (Fig. 4B)。

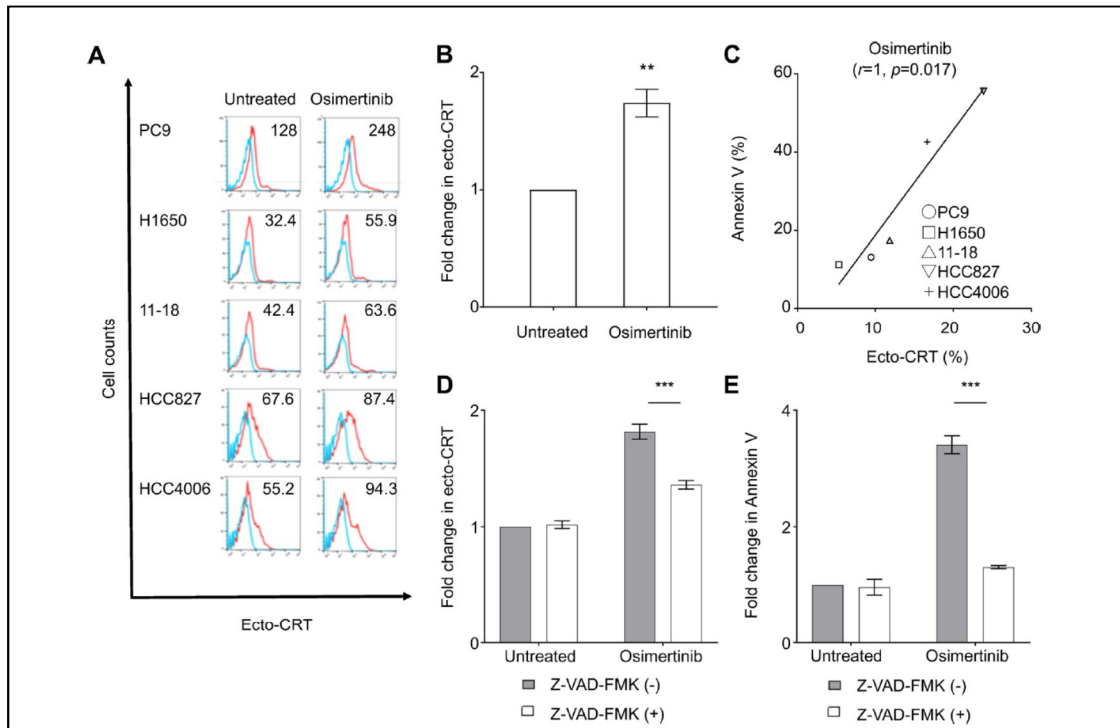
<考察>

ICD の程度を反映して抗腫瘍免疫応答を惹起する分子の同定は、免疫療法を含むより効果的な複合免疫療法の設計に役立つ可能性がある。細胞表面への CRT 露出は癌細胞死の免疫原性に貢献し、細胞死形態の非 ICD よりも選択的に ICD と相関性があることが示されてきた。シクロフォスファミド、ドキソルビシン、オキザリプラチン、ミトキサントロンなどの殺細胞性抗癌剤は DAMPs を誘導して抗腫瘍免疫を刺激することが示されている。このような抗腫瘍薬に癌細胞を曝すことでシャペロン蛋白である CRT を細胞表面に移行させ、抗原提示細胞による腫瘍貪食を促進することで抗腫瘍免疫誘導を誘導する。しかしながら、肺癌細胞における、CDDP、CBDCA、PEM、GEM、DTX、PTX、VNR といった一般的な肺癌治療薬の ecto-CRT 誘導効果は不明であった。本研究では代謝拮抗薬の PEM と GEM や微小管阻害薬の DTX、PTX、VNR が白金製剤の CDDP や CBDCA より NSCLC においてより強く ecto-CRT を誘導することを明らかにした。ヒト骨肉腫細胞株において ER ストレスが ecto-CRT を誘導すると報告されており、我々の実験結果は、NSCLC 細胞株において代謝拮抗薬や微小管阻害薬は白金製剤より強 ER ストレスを誘発する可能性を示唆した。本研究ではまた、抗腫瘍薬で治療された NSCLC 細胞株における ecto-CRT 発現量が細胞膜表面の Annexin V 発現に反映されるアポトーシスと正の相関を示すことを示した。これは腫瘍検体中や癌患者の血漿中のアポトーシスマーカーの検出が、抗腫瘍薬治療中の ecto-CRT 発現および ICD 誘導を反映する可能性を示唆した。マウス大腸癌細胞において汎カスパーゼ阻害薬 Z-VAD-FMK がドキソルビシンやミトキサントロンによる ecto-CRT 誘導を減弱させたように、我々はヒト NSCLC 細胞株における抗腫瘍薬による ecto-CRT 発現誘導も Z-VAD-FMK によって阻害されることを示した。これらの結果は、NSCLC 細胞において ICD に関連した ecto-CRT の増強におけるアポトーシスを示唆した。

血漿中可溶性 CRT 濃度は健康人より肺癌患者で高いことが報告されている。また、化学療法を受けていない患者より治療後の患者群で高いことも報告されている。実臨床において、進行期 NSCLC 患者の腫瘍組織における ecto-CRT 発現の量的評価は、特に抗腫瘍薬全身投与後の腫瘍崩壊後において、再生検の施行に限られるため困難である。腫瘍細胞における CRT 誘導の変化を捉える代替的手法として、本研究では、代謝拮抗薬の PEM もしくは微小管阻害薬の DTX の単剤治療中の進行期 NSCLC 患者の血漿中可溶性 CRT を測定した。これらの治療は第 1 サイクルの間に可溶性 CRT 濃度の有意な増加に寄与することを示した。抗腫瘍薬治療中における腫瘍組織中 ecto-CRT 発現レベルと血漿中可溶性 CRT 濃度の関連は不明であるが、本研究は血漿中可溶性 CRT が腫瘍細胞や腫瘍細胞破壊における ecto-CRT 発現を反映させる可能性を示唆した。この可能性を検証するために、さらなる研究が必要である。我々はまた、オシメルチニブによる暴露が EGFR 遺伝子変異陽性 NSCLC 細胞株において ecto-CRT 発現を強く増強させること、この効果がアポトーシスの程度と相関することを初めて明らかにした。さらに、オシメルチニブ治療は EGFR 遺伝子変異陽性の進行期 NSCLC 肺癌患者での血漿中可溶性 CRT 濃度増加にも関連していた。これらの所見はオシメルチニブが誘導した細胞死が CRT の細胞膜への移行や血漿中への遊離につながり、このような患者において抗腫瘍免疫を誘導されていることを示唆した。本研究では患者数が少なく統計学的有意差を示すのは困難であるものの、相関解析では腫瘍縮小との関連を示すことはできなかった(Supplementary Fig. 2)。

近年、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌患者におけるオシメルチニブと抗 PD-L1 抗体のデュルバルマブの併用効果を検証した試験において、間質性肺疾患の増悪を呈する肺癌患者が多く認められたため試験継続が困難であることが判明した。我々の結果から、この有害事象がオシメルチニブ治療によって増強した腫瘍組織中の ecto-CRT や他の DAMPs により肺組織中の自己抗原への過度もしくは異常な自己免疫反応が原因である可能性を示唆された。殺細胞性抗癌剤は、末梢血の制御性 T 細胞を減らすことで直接的に、もしくは免疫抑制的な腫瘍微小環境の打破や免疫細胞による攻撃への感受性の増強によって間接的に抗腫瘍免疫を促進することが報告されている。したがって、DAMPs のような ICD 関連バイオマーカーの確立は、個別化複合免疫療法の腫瘍免疫応答の回復もしくは改善に役立つかもしれない。結論として、我々は様々な殺細胞性抗癌剤と第 3 世代 EGFR-TKI オシメルチニブ治療が、*in vitro* において NSCLC 細胞株の CRT 細胞膜発現に関連した ICD を誘導することを示した。加えて、そのような薬剤を用いた治療が進行期 NSCLC 患者の血漿中可溶性 CRT 濃度増加に関連することが明らかになった。以上の結果より、これらの薬物療法が抗腫瘍免疫応答を促進して ICI 治療に適した併用薬となる可能性を示した。



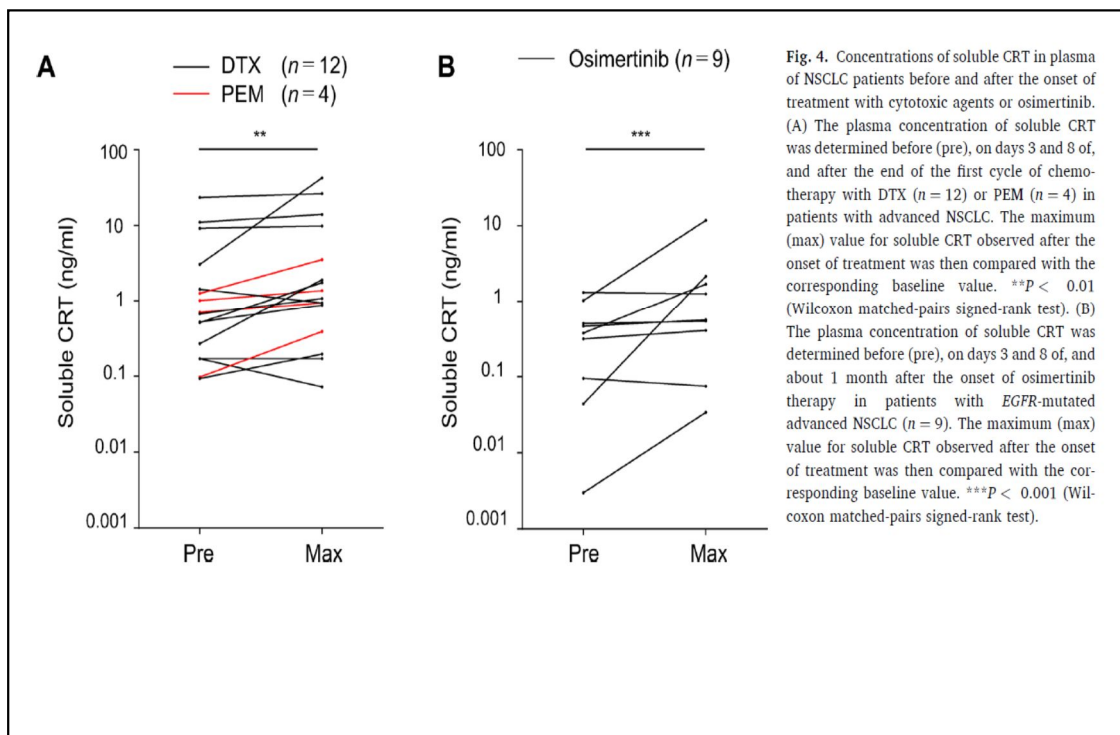


**Fig. 3.** Effects of osimertinib on ecto-CRT expression and apoptosis in human NSCLC cell lines positive for activating *EGFR* mutations. (A) Flow cytometric analysis of ecto-CRT expression in the indicated cell lines incubated in the absence or presence of osimertinib at its respective  $IC_{50}$  values for 72 h. (B) Fold change in mean fluorescence intensity for ecto-CRT induced by osimertinib in the five *EGFR*-mutated NSCLC cell lines for experiments similar to that shown in (A). Data are means  $\pm$  SEM from 2 independent experiments with similar results.  $**p < 0.01$  (Wilcoxon matched-pairs signed-rank test). (C) Positive correlation between the proportion of cells positive for ecto-CRT or for surface annexin V as determined by flow cytometry in *EGFR*-mutated NSCLC cell lines treated with osimertinib at its respective  $IC_{50}$  values for 72 h. Each dot represents representative data for each cell line (PC9, H1650, 11-18, HCC827, or HCC4006). Spearman's correlation coefficient ( $r$ ) and  $p$  values are indicated. (D, E) PC9 cells were incubated for 72 h in the absence or presence of osimertinib at its  $IC_{50}$  as well as in the presence of Z-VAD-FMK (50  $\mu$ M) or dimethyl sulfoxide vehicle, after which the fold change in the expression level of ecto-CRT (D) or Annexin V (E) relative to control cells was measured by flow cytometry. Data are means  $\pm$  SEM from 3 independent experiments with similar results.  $***p < 0.001$  (Sidak's multiple-comparison test).

**Table 2**  
 $IC_{50}$  values (nM) of osimertinib for *EGFR*-mutated non-small cell lung cancer cell lines.

| Drug classification       | Drug        | PC9<br>(Ex19del) | H1650<br>(Ex19del) | 11-18 (L858R) | HCC827<br>(Ex19del) | HCC4006<br>(Ex19del) |
|---------------------------|-------------|------------------|--------------------|---------------|---------------------|----------------------|
| Tyrosine kinase inhibitor | Osimertinib | 48.6             | 1790               | 781           | 10.2                | 43.1                 |

The *EGFR* status of each cell line is indicated in parentheses: Ex19del, exon-19 deletion.



**Fig. 4.** Concentrations of soluble CRT in plasma of NSCLC patients before and after the onset of treatment with cytotoxic agents or osimertinib. (A) The plasma concentration of soluble CRT was determined before (pre), on days 3 and 8 of, and after the end of the first cycle of chemotherapy with DTX ( $n = 12$ ) or PEM ( $n = 4$ ) in patients with advanced NSCLC. The maximum (max) value for soluble CRT observed after the onset of treatment was then compared with the corresponding baseline value.  $**p < 0.01$  (Wilcoxon matched-pairs signed-rank test). (B) The plasma concentration of soluble CRT was determined before (pre), on days 3 and 8 of, and about 1 month after the onset of osimertinib therapy in patients with *EGFR*-mutated advanced NSCLC ( $n = 9$ ). The maximum (max) value for soluble CRT observed after the onset of treatment was then compared with the corresponding baseline value.  $***p < 0.001$  (Wilcoxon matched-pairs signed-rank test).

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Rie Furukawa, Hiroyuki Inoue, Yasuto Yoneshima, Hirono Tsutsumi, Eiji Iwama, Yuki Ikematsu, Nobuhisa Ando, Yoshimasa Shiraiishi, Keiichi Ota, Kentaro Tanaka, Yoichi Nakanishi and Isamu Okamoto | 4. 巻<br>155           |
| 2. 論文標題<br>Cytotoxic chemotherapeutic agents and the EGFR-TKI osimertinib induce calreticulin exposure in non-small cell lung cancer   | 5. 発行年<br>2021年       |
| 3. 雑誌名<br>Lung Cancer  | 6. 最初と最後の頁<br>144-150 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.lungcan.2021.03.018.  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する          |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Rie Furukawa, Hiroyuki Inoue, Hirono Tsutsumi, Nobuhisa Ando, Yuki Ikematsu, Eiji Iwama, Yasuto Yoneshima, Kentaro Tanaka, Yoichi Nakanishi, Isamu Okamoto             |
| 2. 発表標題<br>Pemetrexed induces calreticulin expression most robustly in parallel with apoptosis among chemotherapeutic agents used in non-small cell lung cancer (NSCLC) treatment |
| 3. 学会等名<br>The 111th Annual Meeting of the American Association of Cancer Research (AACR) (Virtual Annual Meeting II) (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2020年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|