

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K08311

研究課題名(和文) TRECK法によるミクログリア除去モデルを用いた脱髄性疾患とてんかんの病態解明

研究課題名(英文) Pathophysiology of demyelinating diseases and epilepsy using microglia removal model by TRECK system

研究代表者

佐久間 啓 (SAKUMA, Hiroshi)

公益財団法人東京都医学総合研究所・脳・神経科学研究分野・プロジェクトリーダー

研究者番号：50425683

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)：組織特異的にジフテリア毒素受容体を発現させるためのノックイン(DTR-KI)マウスを用いて、ジフテリア毒素(DT)の投与によりミクログリアまたはアストロサイトを選択的に除去することを試みた。In vitroではDT投与によりミクログリアが選択的に死滅したが、CX3CR1-CreERT2・GFAP-CreマウスとDTR-KIマウスを交配してDTを投与しても目的の変化は得られず、何らかの理由によりグリア細胞に目的の遺伝子組換えが起こっていないと考えられた。並行して実験的自己免疫性脳脊髄炎、pilocarpineによるけいれん重積モデルを用いて検証を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ジフテリア毒素受容体を用いるTRECK法ではDT投与後1-2日という極めて短時間で標的細胞を除去することができる。病相特異的なグリア細胞の役割を明らかにするためには目的の時期に合わせて迅速かつ確実に除去する必要があるため、速効性というTRECK法の長所は大きな強みとなる。また組織特異的Creマウスを用いることで様々な組織の研究に幅広く応用が可能であり、疾患動物モデルと組み合わせることで特定の細胞が疾患において果たす役割を包括的に解析することができる。

研究成果の概要(英文)：Using knock-in mice for tissue-specific expression of the diphtheria toxin receptor (DTR-KI), we attempted to selectively eliminate microglia or astrocytes by administration of diphtheria toxin (DT). Although microglia were selectively eliminated by DT in vitro, DT administration did not produce expected changes in tissue-specific DTR-KI mice (in which CX3CR1-CreERT2 or GFAP-Cre mice were crossed with DTR-KI mice) in vivo, suggesting that for some reason the genetic recombination was not occurring in glial cells. We also validated the experimental autoimmune encephalomyelitis and pilocarpine-induced status epilepticus models.

研究分野：小児神経学

キーワード：ミクログリア アストロサイト ジフテリア毒素受容体 TRECK法

1. 研究開始当初の背景

炎症・免疫性神経疾患や難治てんかんなどの後天性神経疾患の病態解明は遺伝性神経疾患の研究と比べて遅れをとり、小児医学領域のアンメットニーズとして残っている。これらの疾患では病的な状態の脳において恒常性の維持や組織の再生・修復に關与するグリア細胞の重要性について認識が高まりつつある。脳の免疫担当細胞であるミクログリアは、いずれの病態においても炎症のプロセスを伴うことから特に関係が深いとされ、アストロサイトは神経細胞の物理的・栄養的支持細胞というだけでなく、正常な神経活動や病的な脳において能動的な役割を果たすことが明らかになっている。

近年グリア細胞の機能を制御する新たな分子が次々と明らかになり、グリア細胞の機能制御というアプローチは中枢神経疾患に対する新たな治療戦略として期待が高まっている。例えば抗生物質ミノマイシンがミクログリアの機能を抑制することが知られており、炎症性/非炎症性神経疾患を問わずグリア細胞を標的とした治療は大いなる潜在的可能性を秘めている。しかしその前提として、グリア細胞がそれぞれの疾患に対して「全体として」保護的/増悪的のいずれに働いているのか、またそれは疾患の発症から治癒(寛解)に至る過程でどのように変化するのか、について知る必要がある。

2. 研究の目的

ジフテリア毒素受容体(DTR)遺伝子上流に loxp 配列で挟んだ STOP カセットを導入したノックインマウスと CX3CR1-CreERT2 マウスを交配することで、ミクログリアが tamoxifen 誘導下を選択的に DTR を発現する遺伝子改変マウスが得られ、ジフテリア毒素(DT)の投与によりミクログリアを選択的に死滅させることができる。また同様の方法で GFAP-Cre マウスを用いてアストロサイトを選択的に除去できる。これらのマウスに実験的自己免疫性脳脊髄炎や pilocarpine によるけいれん重積を誘導し、疾患の様々な phase で DT を投与することでミクログリアの病相特異的な役割を解明する。さらに病態修飾の分子機構を解析することで、最終的にミクログリアの除去がもたらすマクロ/ミクロの変化を同定し、その分子基盤を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では後天性脱髄性疾患のモデルとして実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE) けいれん性疾患のモデルとして pilocarpine によるけいれん重積(pSE)を使用する。CX3CR1-CreERT2 マウスならびに GFAP-Cre マウスと DTR-KI マウスを交配して得られたマウスに tamoxifen と DT を投与してミクログリアまたはアストロサイトを選択的に除去する。

(1) TRECK 法による実験プロトコルの確立

交配したマウスに DT を投与し、ミクログリアまたはアストロサイトが除去されることを確認する。DTR を発現するミクログリアは Td tomato を発現するため、FACS により解析する。投与時期や投与量についてプロトコルを最適化する。

(2) ミクログリアまたはアストロサイトの除去が臨床経過に及ぼす影響の観察

PBS 投与群を対照として、DT 投与によるミクログリアまたはアストロサイトの除去が EAE および pSE の臨床経過に及ぼす影響を観察する。EAE では臨床スコア、pSE ではてんかん発症率と死亡率を評価し、神経病理学的に脱髄や神経細胞脱落の程度を比較する。

4. 研究成果

(1) ジフテリア毒素受容体ノックインマウスの作製

最初に組織特異的にジフテリア毒素受容体(DTR)を発現させるためのノックイン(DTR-KI)マウスの作製を試みた。Rosa26 遺伝子領域に loxp 配列で挟んだ STOP カセットを挿入し、その下流に DTR (ヒト HB-EGF) 遺伝子と Td tomato 遺伝子を挿入した targeting ベクターを作製した。このベクターを RENKA (B6N) ES cells に電子穿孔法を用いて導入し、得られた 190 コロニーのうち陽性クローン 4 つを CD1 マウスに移入した。キメラマウスまでは順調に得られたが、F1 ヘテロマウスの妊娠性が低く、かつ KI/KI マウスがなかなか得られなかった。最終的に系統維持に十分な数の DTR-KI マウスが得られるまでに約 1 年間を要した。DTR-KI 雌マウスを、ミクログリア特異的発現を誘導する Cre マウスである CX3CR1-CreERT2 雌マウスを交配し、2020 年 2 月に CX3CR1-iDTR マウスが 9 匹出生した。

(2) In vitro における TRECK システムの検証

次に作製したマウスにおける TRECK システムが機能するかどうかを in vitro で検証した。日

齢 3 の CX3CR1- iDTR マウス脳より混合グリア培養を作製し、10 日後より 4-hydroxy-tamoxifen を 2 日間投与した。1 週間後に DT を 2 日間投与したところ、2 日後をピークに培養細胞中のミクログリアは 1%未満にまで減少した。一方、iDTR マウスおよび CX3CR1-Cre マウス由来の混合グリア培養に 4-hydroxy-tamoxifen と DT を投与してもミクログリアの減少は見られなかった。以上のことから、CX3CR1- iDTR マウスでは Cre による組み替えの結果 DTR が発現し、DT に対する感受性を獲得したと考えられた。

(3) In vivo における TRECK システムの検証：CX3CR1- iDTR マウス

さらに CX3CR1- iDTR マウスに tamoxifen と DT を投与することでミクログリアが *in vivo* でも除去されるかどうかを確認することを試みた。しかしこの時期（2020 年）に COVID-19 が拡大し、予定していた実験計画が大幅に遅れることとなった。実験を担当する職員が出勤できなかったためマウスの系統維持のみを行い、また飼育可能なマウスケージ数が限られたため、DTR-KI マウスは従来予定していた WT マウスとヘテロ交配ではなく DTR-KI マウス同士のホモ交配にせざるを得なかった。さらに研究代表者は COVID-19 に関する疫学調査等に従事したために本研究に費やすエフォートが大幅に制限された。ようやく COVID-19 の状況が落ち着き始めた 2021 年度後半よりマウスの繁殖を開始し、CX3CR1- iDTR マウスによる実験を再開した。日齢 14 と 15 に tamoxifen 1mg/匹を皮下投与し、生後 6 週で DT を投与した。ミクログリア以外に血球系細胞の一部も CX3CR1 を発現するため、tamoxifen 投与後に 1 ヶ月の間隔（血球系の turnover が完了しミクログリアのみに Cre 発現が残存するまでの期間）を空けた。その後マウスから脳を摘出してミクログリアが除去されているかどうかを免疫組織化学法により確認したが、コントロールマウスと比べてミクログリアの数に変化は見られなかった。そのため tamoxifen の投与時期を変える、投与回数を増やす、投与間隔を変更する、DT の投与量を増やす等の様々な試みを行ったが、いずれも期待した変化は見られなかった。

(4) In vivo における TRECK システムの検証：CX3CR1- iDTR マウス

さらに DTR-KI マウスと、アストロサイト特異的発現を誘導する GFAP-Cre マウスである GFAP-Cre マウスを交配し、アストロサイトが選択的に DTR を発現する遺伝子改変マウス（GFAP- iDTR）を作製した。GFAP-Cre/+マウスと DTR-KI マウスの交配により得られた仔のジェノタイプピングを行い、約半数の仔で組換えが起きていることを確認した。これらのマウスに生後 8 週の時点で DT を投与したが、明確な症状の出現を認めなかった。DT の投与量を増やしたところ、一部のマウスで衰弱と体重減少が見られたものの、GFAP- iDTR マウスとコントロールマウスとの間に明らかな差を認めず、DT 投与による非特異的な衰弱と考えられた。組織学的には脳の部位によっては GFAP 陽性細胞の減少が認められたが、総じてコントロールと比較して有意な差は認めなかった。

以上の結果から、DTR-KI マウスに予期せぬ遺伝学的変化が生じている可能性を考えた。まず、ミクログリアに Cre-loxp システムによる組換えが生じているかどうかを確認するために Td-Tomato を確認したが、傾向強度が弱く組換えの有無を評価することはできなかった。次にヒト DTR に対する抗体による評価も試みたが、ミクログリアに DTR の染色は認められなかった。そこで CX3CR1- iDTR マウスの脳より混合グリア培養を作製し、*in vitro* で 4-OH-tamoxifen と DT を投与したが、やはりミクログリアの減少は認められなかった。これらの結果から、何らかの理由によりミクログリアにおいて目的の遺伝子組換えが起こっていないと結論した。

(5) 実験的自己免疫性脳脊髄炎ならびにピロカルピンてんかん重積モデル

CX3CR1- iDTR マウスならびに GFAP- iDTR による検証を行っている間に、並行して実験的自己免疫性脳脊髄炎、ピロカルピンてんかん重積という二つの動物モデルに関する検討を行った。実験的自己免疫性脳脊髄炎は C57BL/6J マウスに MOG ペプチドを免疫することにより、安定した発症率と重症度が再現できるようになった。またマウスより脾臓・リンパ節・脊髄等の組織を摘出して定量 PCR 法、フローサイトメトリー、免疫組織科学法等による解析を行い、急性期における臓器炎症の変化を確認した。ピロカルピンてんかん重積モデルは C57BL/6N マウスにピロカルピンを少量ずつ分割投与することにより、てんかん重積に伴う死亡率が減少したことに加え、ピロカルピン投与量とてんかん発作の重症度（Racine スケール）をモニタリングすることが可能となった。また本モデルでピロカルピンと炎症惹起物質の同時投与を試みた結果、炎症惹起物質投与群ではてんかん発作の重症度が増悪することが明らかになった。さらに脳における炎症性サイトカインの発現が亢進し、組織学的にもより高度のミクログリアおよびアストロサイト活性化が認められた。以上のことから、本モデルは炎症に伴っててんかん発作が重症化するヒトの病態を模倣する動物モデルとして有用であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件 / うち国際共著 7件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takamatsu Tomoko, Yamanaka Gaku, Uryu Hideko, Takeshita Mika, Morishita Natsumi, Morichi Shinichiro, Ishida Yu, Oana Shingo, Terashi Hiroo, Shichino Hiroyuki, Sakuma Hiroshi, Kawashima Hisashi	4. 巻 43
2. 論文標題 Improvement in recurrent anti-myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody - positive cerebral cortical encephalitis not requiring anti - inflammatory therapy following the decrease in cytokine/chemokine levels	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Multiple Sclerosis and Related Disorders	6. 最初と最後の頁 102168 ~ 102168
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.msard.2020.102168	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 Yamaguchi Hiroshi, Nishiyama Masahiro, Tokumoto Shoichi, Ishida Yusuke, Tomioka Kazumi, Aoki Kazunori, Seino Yusuke, Toyoshima Daisaku, Takeda Hiroki, Kurosawa Hiroshi, Sakuma Hiroshi, Tada Hiroko, Nozu Kandai, Maruyama Azusa, Tanaka Ryojiro, Iijima Kazumoto, Nagase Hiroaki	4. 巻 137
2. 論文標題 Elevated cytokine, chemokine, and growth and differentiation factor-15 levels in hemorrhagic shock and encephalopathy syndrome: A retrospective observational study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cytokine	6. 最初と最後の頁 155324 ~ 155324
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cyto.2020.155324	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 Horino Asako, Kuki Ichiro, Inoue Takeshi, Nukui Megumi, Okazaki Shin, Kawawaki Hisashi, Togawa Masao, Amo Kiyoko, Ishikawa Junichi, Ujiri Atsushi, Shiomi Masashi, Sakuma Hiroshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Intrathecal dexamethasone therapy for febrile infection related epilepsy syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Clinical and Translational Neurology	6. 最初と最後の頁 645 ~ 655
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/acn3.51308	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 Yamanaka Gaku, Takamatsu Tomoko, Morichi Shinichiro, Yamazaki Takashi, Mizoguchi Izuru, Ohno Koko, Watanabe Yusuke, Ishida Yu, Oana Shingo, Suzuki Shinji, Kashiwagi Yasuyo, Takata Fuyuko, Sakuma Hiroshi, Yoshimoto Takayuki, Kato Mitsuhiro, Kawashima Hisashi	4. 巻 352
2. 論文標題 Interleukin-1 in peripheral monocytes is associated with seizure frequency in pediatric drug-resistant epilepsy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neuroimmunology	6. 最初と最後の頁 577475 ~ 577475
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jneuroim.2021.577475	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 Tanaka Tomoko, Hirai Shinobu, Hosokawa Masato, Saito Takashi, Sakuma Hiroshi, Saido Takaomi, Hasegawa Masato, Okado Haruo	4. 巻 337
2. 論文標題 Early-life stress induces the development of Alzheimer's disease pathology via angiopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 113552 ~ 113552
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.expneurol.2020.113552	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 Suzuki Tomonori, Kohyama Kuniko, Moriyama Kengo, Ozaki Mariko, Hasegawa Setsuko, Ueno Taro, Saitoe Minoru, Morio Tomohiro, Hayashi Masaharu, Sakuma Hiroshi	4. 巻 50
2. 論文標題 Extracellular ADP augments microglial inflammasome and NF B activation via the P2Y12 receptor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 205 ~ 219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/eji.201848013	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 Nosadini Margherita, Thomas Terrence, Eyre Michael, Sakuma Hiroshi, Irani Sarosh R., Dalmau Josep, Lim Ming, Dale Russell C.	4. 巻 8
2. 論文標題 International Consensus Recommendations for the Treatment of Pediatric NMDAR Antibody Encephalitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurology Neuroimmunology & Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 1052 ~ 1052
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/NXI.0000000000001052	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 Nosadini Margherita, Eyre Michael, Thomas Terrence, Irani Sarosh R., Dalmau Josep, Dale Russell C., Lim Ming, Sakuma Hiroshi, International NMDAR Antibody Encephalitis Consensus Group	4. 巻 78
2. 論文標題 Use and Safety of Immunotherapeutic Management of N-Methyl-d-Aspartate Receptor Antibody Encephalitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JAMA Neurology	6. 最初と最後の頁 1333 ~ 1344
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1001/jamaneuro.2021.3188	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 Nishida Hiroya, Kohyama Kuniko, Kumada Satoko, Takanashi Jun-ichi, Okumura Akihisa, Horino Asako, Moriyama Kengo, Sakuma Hiroshi	4. 巻 96
2. 論文標題 Evaluation of the Diagnostic Criteria for Anti-NMDA Receptor Encephalitis in Japanese Children	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurology	6. 最初と最後の頁 2070 ~ 2077
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/WNL.0000000000011789	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 Tomioka Kazumi, Nishiyama Masahiro, Tokumoto Shoichi, Yamaguchi Hiroshi, Aoki Kazunori, Seino Yusuke, Toyoshima Daisaku, Kurosawa Hiroshi, Tada Hiroko, Sakuma Hiroshi, Nozu Kandai, Maruyama Azusa, Tanaka Ryojiro, Iijima Kazumoto, Nagase Hiroaki	4. 巻 23
2. 論文標題 Time course of serum cytokine level changes within 72h after onset in children with acute encephalopathy and febrile seizures	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Neurology	6. 最初と最後の頁 7 ~ 7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12883-022-03048-8	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 Kohyama Kuniko, Nishida Hiroya, Kaneko Kimihiko, Misu Tatsuro, Nakashima Ichiro, Sakuma Hiroshi	4. 巻 17
2. 論文標題 Complement-dependent cytotoxicity of human autoantibodies against myelin oligodendrocyte glycoprotein	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1014071 ~ 1014071
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2023.1014071	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 該当する

1. 著者名 Sakuma Hiroshi, Takanashi Jun-ichi, Muramatsu Kazuhiro, Suzuki Motomasa, Kasai Mariko, Omata Taku, Abe Yuichi, Murofushi Yuka, Nagase Hiroaki, Okumura Akihisa, Sakai Yasunari, Tada Hiroko, Mizuguchi Masashi, Japanese Pediatric Neuro-COVID-19 Study Group	4. 巻 17
2. 論文標題 Severe pediatric acute encephalopathy syndromes related to SARS-CoV-2	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1085082 ~ 1085082
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2023.1085082	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 該当する

1. 著者名 Tsuboi Misato, Nakamura Yoshitaka, Sakuma Hiroshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Direct effect of 2 palmitoyl glycerol on promotion of gamma aminobutyric acid synthesis in normal human fetal derived astrocytes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 1320 ~ 1332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.13649	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 該当する

1. 著者名 Horino-Shimizu Asako, Moriyama Kengo, Mori Takayuki, Kohyama Kuniko, Nishito Yasumasa, Sakuma Hiroshi	4. 巻 1815
2. 論文標題 Lipocalin-2 production by astrocytes in response to high concentrations of glutamate	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 148463 ~ 148463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2023.148463	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 Kasai Mariko, Sakuma Hiroshi, Abe Yuichi, Kuki Ichiro, Maegaki Yoshihiro, Murayama Kei, Murofushi Yuka, Nagase Hiroaki, Nishiyama Masahiro, Okumura Akihisa, Sakai Yasunari, Tada Hiroko, Mizuguchi Masashi, Takanashi Jun-ich	4. 巻 457
2. 論文標題 Clinical characteristics of SARS-CoV-2-associated encephalopathy in children: Nationwide epidemiological study	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of the Neurological Sciences	6. 最初と最後の頁 122867 ~ 122867
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jns.2024.122867	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 該当する

1. 著者名 Moriyama Kengo, Horino Asako, Kohyama Kuniko, Nishito Yasumasa, Morio Tomohiro, Sakuma Hiroshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Oxygen-Glucose Deprivation Increases NR4A1 Expression and Promotes Its Extranuclear Translocation in Mouse Astrocytes	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Brain Sciences	6. 最初と最後の頁 244 ~ 244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/brainsci14030244	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------