

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08556

研究課題名(和文) 心血管疾患関連遺伝子CSRPのヒト遺伝子変異による分子機能異常の解明

研究課題名(英文) Investigation of the molecular malfunction of CSRP human single amino acid variants

研究代表者

中島 康弘 (NAKASHIMA, YASUHIRO)

京都大学・医学研究科・特定講師

研究者番号：20565585

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)：CSRP1のLIMドメインに存在するヒトアミノ酸変異の分子機能異常を検討し、トランスクリプトーム解析(RNA-seq)によりin vitroにおいて遺伝子発現制御に異常を来す事が示された。疾患との関連の指摘のないデータベース上のヒトアミノ酸変異においても有意な機能異常を有するものがあり、疾患の遺伝的要因となる可能性がある事が示唆された。RNA-seqにおいてSRFやGATAのターゲット遺伝子の発現制御へのCSRPの関与がプロファイル上確認され、同変異はその一部に異常を来した。分子機能異常が示唆される他のCSRPのヒトアミノ酸変異も含め、病態生理への影響につき詳細な検討が必要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CSRPおよびCSRP1ヒトアミノ酸変異による遺伝子発現制御についてin vitroでの網羅的遺伝子発現解析(RNA-seq)を行い、関連因子との協調的転写調節におけるCSRPおよび同LIMドメインの構造の重要性を示したとともに、意義が不明なヒトアミノ酸変異においても分子機能異常を示すものがあることの実例を示した。遺伝子のアミノ酸変異は分子機能上の多様性につながっており、疾患に影響するのはどのようなものであるのか、またどのような形で影響するのかについて分子生物学的側面を含め詳細に検討することが、疾患における遺伝的素因を理解していく上で重要であることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：The malfunction of human single amino acid variant (SAV) of CSRP1 in LIM domain was investigated in vitro including transcriptome analysis by RNA-seq. Expression of the examined variant, which was detected on human genome database but not suggested pathogenicity, led to abnormal gene expression profile compared to the wild type control, implicating a potential for a genetic factor to related diseases or trait. The expression of several SRF and GATA target genes was affected in the transcriptome of the variant. Further biological investigation about the impact on pathophysiology including other SAVs of CSRPs would be needed to examine the significance of the variants to the disease.

研究分野：循環器内科学 分子生物学

キーワード：ヒト遺伝子変異 分子生物学 ゲノム医学 動脈硬化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年のゲノム解析技術の進歩から個人レベルのゲノム情報が広く解析可能となり、ゲノム上に一塩基変異をはじめとする多種多数の遺伝子変異が検出されている。一方、これらの各ヒト遺伝子変異がどのような分子機能異常を来たすのかについては大多数のもので不明であり、疾患発症や病態生理における意義についてはまだよくわかっていない。疾患の遺伝的要因について GWAS (Genome-wide association study) をはじめとする大規模なゲノム疫学研究による検討が進んでいるが、変異遺伝子が来たす分子病態やその病的意義、標準治療以外の特異的な予防・治療法の可能性等の検討のためには、分子生物学的な側面からの検討が必要である。蛋白コード領域にも多数の一塩基変異による一アミノ酸変異の検出があり、検出頻度が稀なものが多いが、構造変化による分子機能異常を来たすことから、その程度によっては生体での病態生理に影響することが考えられ、疾患の遺伝的要因となりうるものと考えられる。遺伝性疾患の原因として同定されたヒト遺伝子変異では機能異常について検討されることが多いが、それ以外の多くのものの機能異常については不明である。

CSRP (Cysteine and glycine-rich protein) は LIM protein の一つで、心血管疾患に関わる遺伝子の一つである。CSRP1 と CSRP2 は血管平滑筋等の細胞に発現し、ノックアウト (KO) マウスにおいて動脈障害モデルで新生内膜増生に対し互いに拮抗的に働き、動脈硬化形成過程への関与が示唆される。CSRP3 は心筋細胞、骨格筋細胞に特異的に発現し、ヒトで一アミノ酸変異や KO マウスにおいて心筋症を来たす。分子機能として、SRF や GATA 転写因子のコファクターとして転写調節に関与することや、心筋細胞ではサルコメアに結合し、負荷に応じて細胞質から核へ移行し下流へのシグナル調節に働くことが知られる。申請者は前研究において、ゲノムデータベース上に検出のある CSRP1 のヒト一アミノ酸変異において *in vitro* での分子機能異常を来たすものがあることを見出した。遺伝性疾患の指摘のないヒト遺伝子変異ではあるが、KO マウス等の既報の結果からは動脈硬化などの病態に影響する可能性が考えられる。このことは、ヒトで明らかかな疾患との関連を指摘されていない遺伝子変異においても有意な分子機能異常を認めるものがあり、潜在的な疾患発症要因となるものがある可能性を示唆する。動脈硬化に関連する遺伝子としては脂質代謝関連遺伝子がよく知られるが、動脈硬化形成の分子機構に関与する遺伝子でのヒト遺伝子変異についても、有意な機能異常を来たすものは病態の悪化要因となる可能性は考え得る。当変異を中心に CSRP のヒト一アミノ酸変異がどのような機能異常を来たすかについて検討することは、CSRP の関連疾患における遺伝的要因の理解につながると考えられる。

2. 研究の目的

上述の背景から、前研究において分子機能の異常が見出された CSRP1 のヒト一アミノ酸変異について、どのような機能異常を来たすかを分子生物学的手法を用いて検討し、分子病態および病的意義について検討を行う。

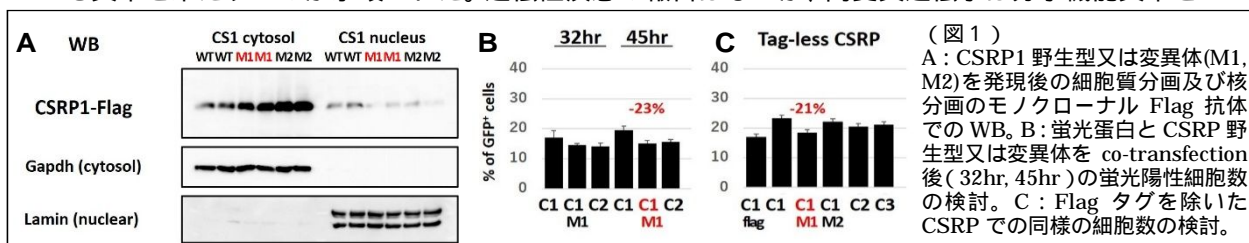
3. 研究の方法

CSRP のヒト一アミノ酸変異体の分子機能異常について、網羅的遺伝子発現解析を含めた分子生物学的手法により検討を行う。

4. 研究成果

(1) CSRP1 の LIM ドメインのヒト一アミノ酸変異による分子機能異常の検討

ヒトのゲノムデータベース上に検出のある LIM ドメインの一アミノ酸変異体の発現ベクターを作製し、培養細胞ライン (H9C2) に発現させ分子機能異常の検討を行った。細胞質分画、核分画に分けて細胞蛋白を回収し、Western Blotting (WB) にて解析を行った。Flag タグ付きの CSRP を発現させ、Flag のモノクローナル抗体により検出した。変異体では野生型に比べ、各分画での CSRP1 発現量に異常を認め、細胞内局在での異常が示唆された (図 1A)。データベースに検出のある他の複数の CSRP ヒト一アミノ酸変異においても同様に検討し、同様の分子機能異常を来すものを複数同定した。次に、同変異体による異常が細胞機能に影響するかについて、蛍光蛋白発現ベクターと CSRP 発現ベクターの co-transfection を行い、蛍光蛋白陽性の細胞数を FACS により検討した。変異体 CSRP1 の発現により野生型に比べ約 20% 細胞の減少を認めた (図 1B)。また、Flag タグを除いた一アミノ酸変異体の発現でも同様に細胞数減少を認めた (図 1C)。このことから同 LIM ドメインの CSRP1 ヒト一アミノ酸変異は分子機能異常を来たし、細胞機能にも異常を来たすことが示唆された。遺伝性疾患の報告はないが、同変異遺伝子は分子機能異常を



有し、病態生理にも影響を来たす可能性が示唆された。

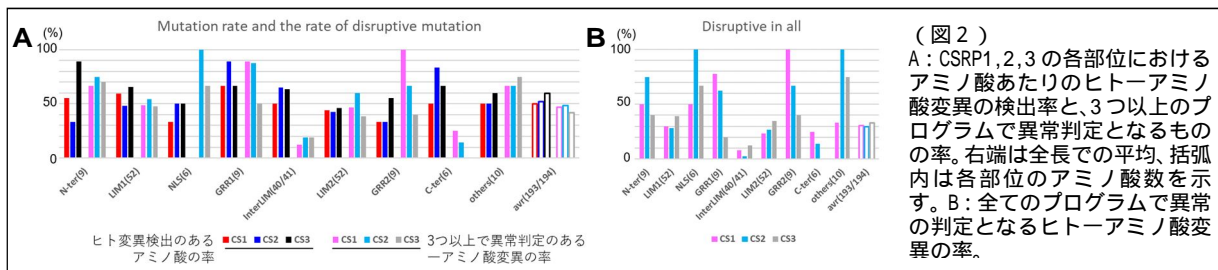
(2) ヒトゲノムデータベースおよび *in silico* 解析での CSRП のヒトアミノ酸変異の検討

上記で検討したものの以外にもデータベース上に CSRП のヒトアミノ酸変異は多数検出が見られるが、分子機能への影響については CSRП3 の心筋症を来たす報告のあるもの以外では不明である。そこでまず、どのようなヒトアミノ酸変異が検出されているか、NCBI のゲノムデータベースを調べた (図 2A)。現時点で dbSNP において、CSRП1,2,3 のそれぞれで少なくとも約 100 か所のアミノ酸に幅広く変異が検出されていた。Minor allele frequency が 0.01 を超えるアミノ酸変異は見られず、大部分は rare variant であり、CSRП1,2,3 間での検出件数にも大きな違いはなかった。フレームシフトやナンセンス変異も一部見られた。CSRП3 のヒトアミノ酸変異で心筋症の報告のある LIM ドメインや核移行配列(NLS)の変異が含まれていた。CSRП1,2 のヒトアミノ酸変異では疾患との関連の指摘はなかった。CSRП1,2,3 において、殆どは rare variant にあたるもので頻度は稀であるが、少なくとも蛋白全長の約半分のアミノ酸にヒトアミノ酸変異の検出があった。次に、*in silico* 解析においてこれらのヒトアミノ酸変異が異常であるか 4 種の予測ツール (PolyPhen2, SIFT, PROVEAN, PANTHER) を検討した。まず、CSRП3 のヒト変異について検討した。心筋症の報告のあるヒトアミノ酸変異は異常の判定であったが、スコアの低い病的変異も一つ見られた。Zinc-finger 構造の形成に必要な cysteine 部分のヒトアミノ酸変異は非常に高いスコアが見られた。肥大型心筋症の報告のあるヒトアミノ酸変異と同程度の異常スコアを示すヒトアミノ酸変異が、N 末、LIM ドメイン、Glycine rich repeat (GRR)、inter-LIM に複数見られたが、これらでは心筋症の報告はなかった。データベースのヒトアミノ酸変異のうち、3 つ以上のプログラムで異常の判定のものが、N 末、LIM ドメインから GRR にかけての部位に複数見られ (図 2A)、全てのプログラムで異常の判定となるものの率はやや減少が見られたが、CSRП ヒトアミノ酸変異の 30% 近くに見られた (図 2B)。Inter-LIM では異常の判定となる率が低く、NLS と GRR では高かった。CSRП1,2 についても同様の傾向であった。*In silico* 解析において、CSRП で検出されているヒトアミノ酸変異の数割に異常の予測が見られ、分子機能異常を来たす可能性があるものは多く見られた。*In silico* 解析の結果が実際の機能異常の程度と完全に一致するわけではないと考えられるが、モチーフ構造部位の変異では異常の判定であることが多く、蛋白構造における重要部位は指摘されていると考えられる。一方、蛋白はドメイン毎に分子上の機能は異なることから、同じ判定レベルであっても必ずしも同じような機能異常を来たすわけではないと考えられる。(1) で検討した分子機能異常を来たす CSRП1 の LIM ドメインのヒトアミノ酸変異は 4 つ全てのプログラムで異常の判定であり、*in silico* 解析上も分子機能異常を来たすことが示唆された。実際の機能異常がどのようなものであるかさらに検討するため、同 CSRП1 ヒト変異の影響について *in vitro* で RNA sequencing (RNA-seq) でのトランスクリプトーム解析を行い、遺伝子発現変化を網羅的に検討した。

(3) *In vitro* での transcriptome 解析による CSRП1 ヒトアミノ酸変異の機能異常の検討

CSRП1 の LIM ドメインのヒトアミノ酸変異体に (1) で見られた分子機能異常が示唆されることから、生体においても病態生理に関わるような機能異常を来たす可能性が考えられる。このため、*in vitro* で網羅的遺伝子発現解析を行い同ヒト変異が来たす影響について検討した。アミノ酸変異の影響を検討する系として、当初、培養細胞のゲノムレベルでの一塩基変異体をゲノム編集により作製することを試みたが、作製効率が不良であったため、レンチウイルスベクターで一塩基変異体を発現させる系での検討を行った。強制発現させる各野生型 CSRП および変異体間で発現レベルを合わせた解析を行うために、蛍光レポーターをタグ付けした CSRП の発現ベクターを作製して H9C2 細胞に発現させ、同じ蛍光レベルの細胞を FACS で選別し一旦培養したのちにサンプルの RNA を回収し、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行った。

遺伝子発現プロファイルを野生型または変異体の CSRП を発現した各ライン間で比較検討を行い、発現変動遺伝子を検討した。ハウスキーピング遺伝子 (β -actin など) や SRF, GATA などの関連転写因子、内因性の CSRП1,2,3 の発現レベルにライン間で差は見られなかった。強制発現された蛍光タグ付き CSRП1 の mRNA 発現レベルは、野生型、変異体ともに内因性 CSRП1 の発現レベルと同レベルで、約 2 倍の過剰発現であった。野生型の CSRП1,2,3 を発現するライン間で異なる遺伝子発現レベルを示すものには、心臓遺伝子、応答性遺伝子、細胞周期関連遺伝子などが見られ、SRF のターゲット遺伝子も多く含まれていた。機能不明の transcript も多く見られた。LIM ドメインの本アミノ酸変異により遺伝子発現調節に異常を来たすかということに着目し、同変異体ラインと CSRП1 野生型間で発現プロファイルの比較を行い、変異による遺伝子発現変化を検討した。変異体では、野生型に比べ発現レベルの異なる遺伝子が多数見られた (図 3A)。また、



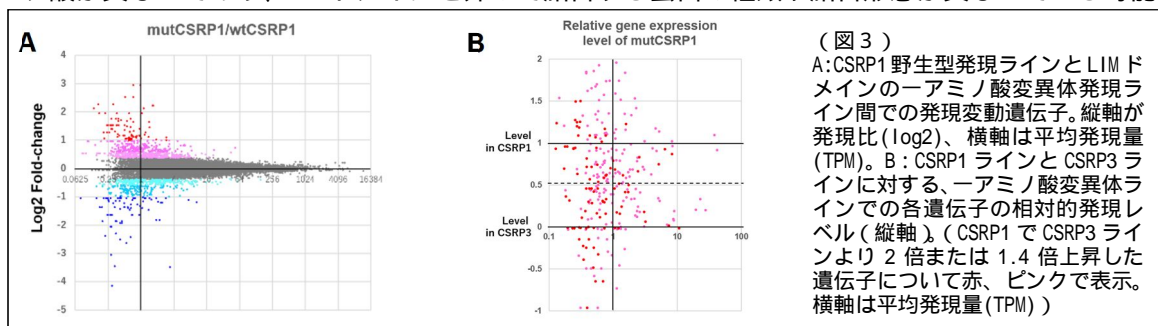
野生型 CSR1 と CSR2,3 のライン間で発現レベルが大きく異なる遺伝子群に注目して変異の影響を検討したところ、変異により野生型 CSR1 での発現レベルに比べ、野生型 CSR2,3 での発現レベルに近い発現を示す遺伝子が多数見られた(図3B)。これらの結果から、同 LIM ドメインのヒトアミノ酸変異は、CSR1 による遺伝子発現調節に明らかな異常を来たことが示唆された。

これらの発現変動遺伝子について、enrichment 解析により gene ontology (GO) および転写制御因子について検討した。CSR1 と CSR2 は *in vivo* での血管障害後の動脈硬化病変形成においてそれぞれ促進的、抑制的に働き拮抗的な機能をもつため、両ラインで特異的に発現上昇が見られる遺伝子群に注目し検討した。GO 解析において、CSR1 ラインで CSR2 ラインに比べ発現が高い遺伝子(1.5 倍以上)には細胞分裂関連遺伝子が有意に enrich されていた。これらの遺伝子発現は LIM ドメインの同変異体ラインでは野生型 CSR1 ラインに比べ発現が軽度低下しており、(1)に矛盾しない結果であった。転写調節因子に関しては、CSR1 によりコントロールに比し発現が上昇した遺伝子群のうち ENCODE での SRF のターゲット遺伝子について enrichment を検討した。野生型 CSR1 で CSR2 よりも発現が高い遺伝子群と、その逆のパターンの遺伝子群、また変異体ラインで遺伝子発現に影響があったかで遺伝子群を分けて検討したところ、各遺伝子群に enrich される転写因子やクロマチン制御因子は異なっていた。また、CSR1 ラインで発現が高い遺伝子の多くは LIM ドメインのアミノ酸変異により発現が低下したが、CSR2 ラインで発現が高い遺伝子群では同変異による発現レベルの変化はやや少ない傾向が見られ、同変異による CSR1 の発現制御への影響は発現変動遺伝子毎で必ずしも同じではなかった。同じ遺伝子であっても、発現させる CSRP や変異体によって遺伝子発現の挙動は異なり、SRF や GATA のターゲット遺伝子に対しても同様であった。各野生型 CSRP や変異体での分子構造の違いにより転写調節因子群との相互作用が異なることが示唆され、さらに ChIP 解析等を含めた詳細な分子機構の検討が望まれる。本結果から、CSR1 の同 LIM ドメインのヒトアミノ酸変異は CSR1 の遺伝子発現調節に明らかに異常を来し、遺伝性疾患の指摘のない、データベース上のヒト遺伝子変異においても明らかな分子機能異常を来すものがあることが示唆された。これらの変異による異常が疾患や病態生理にどのような形として現れるかが重要であり、さらに検討が必要である。

(4) 考察

本研究により、CSR1 の LIM ドメインに存在するヒトアミノ酸変異の機能異常を検討し、トランスクリプトーム解析(RNA-seq)により *in vitro* において遺伝子発現制御に有意な異常を来たことが示唆された。疾患と関連の指摘されていない、データベース上のヒトアミノ酸変異においても有意な機能異常を有するものがあり、疾患の遺伝的要因となる可能性があることが示唆された。RNA-seq 解析において、同 LIM ドメインのアミノ酸変異は多数の遺伝子の発現レベルに野生型に比して異常を来した。ライン間で大きな変化を来した遺伝子には、SRF や GATA により制御される遺伝子が多く含まれ、既報で知られる両転写因子を介した転写調節への CSRP の関与が発現プロファイル上でも確認された。同ヒトアミノ酸変異は、生体において CSR1 を発現する各細胞種での遺伝子発現制御に異常を来すと考えられる。また、ヒトゲノムデータベース上には他にも CSRP のアミノ酸変異を来す rare variant が多数検出されており、*in silico* 解析において分子機能異常の可能性が示唆されるヒトアミノ酸変異は他にも多く見られたが、実際の機能異常については分子生物学的解析による確認が必要である。

CSRP は細胞骨格に結合する一方で細胞の状態により核へ移行する蛋白であり、特に CSR3 はサルコメアに結合し、機械的刺激等の負荷により核に移行することが報告されている(Boateng *et al.* 2007)。また核内での働きとして、SRF、GATA 転写因子と結合し、CSRP を合わせた 3 者の存在によりターゲットの転写活性が著明に上昇することが血管平滑筋マーカー遺伝子で *in vitro* において報告されている(Chang *et al.* 2003)。今回の RNA-seq 解析の結果においても、各ライン間で発現レベルの変化を認めた遺伝子には SRF や GATA のターゲット遺伝子はメジャーな遺伝子も含め多く含まれていたが、CSR1,2,3 の各ライン毎で変化する遺伝子には違いがみられた。前述の既報においても SRF、GATA と協調した転写調節が示されているが、CSR1,2,3 間で転写活性化の程度に違いが見られるようであり、両転写因子との相互作用における構造面での違いや、他の介在因子の存在等があるのかもしれない。CSR1,2,3 のアミノ酸配列は、NLS から GRR には違いが少ない一方、LIM ドメインと Inter LIM では 1,2 間で約 20~30%、1,3 間で 30~60%のアミノ酸が異なっており、LIM ドメインを介して結合する蛋白の種類や結合形態が異なっている可能



性は考えられる。ヒト-マウス間については、各 CSRP のアミノ酸配列はほぼ同一である。本検討において LIM ドメインの一アミノ酸変異により転写調節に有意な異常を来たしたことから、同ドメインの詳細な構造が転写因子等との相互作用やそれに伴う転写調節活性に重要であることが示唆される。これらの分子機構については、さらに ChIP 解析も含めた蛋白相互作用の検討が望まれる。核移行配列については CSRP1,2 では KKYGPK、CSRP3 では RRYGPK となっており、心筋症を来たす報告のある変異体には RRCGPK、RRYGPR の報告がある。今回検討した変異は LIM ドメインの変異であるが、LIM ドメインを介した結合蛋白に対する変化が核移行にも影響する可能性は考えられる。刺激応答など核移行の契機となるステップでの変異による応答異常や、shuttling 過程での蛋白相互作用への変異による影響などの可能性は考えられ、核内ではさらに上述のような変異による転写調節作用への異常を来たすと考えられる。

CSRP1,2 は、既報の KO マウスの結果で見られるように動脈硬化形成過程に関与しており (Lilly *et al.* 2010)、変異の影響による異常な遺伝子発現は程度によっては同病態を悪化させる可能性も考えられる。今回検討のヒトアミノ酸変異体では SRF の制御ターゲットを含め遺伝子発現に異常を認めた。SRF は血管平滑筋細胞を含め発現細胞での分化や細胞機能維持に重要であり、各組織での機能は conditional KO (CKO) マウスを用いてよく検討されている。平滑筋については Myh11-CreERT2 での SRF の CKO マウスは腸管の機能不全を生じ致死となる。他に、肝臓の stellate cell (HSC) での SRF の CKO では CCl₄ による肝線維化が減少する。CSRP1,2 は幅広い臓器に発現し、血管平滑筋以外にも同 HSC や肺の線維化巣などでも発現の報告があり、各発現細胞種において CSRP と SRF による協調的な遺伝子発現制御機構の存在が示唆される。今回検討したヒトアミノ酸変異の SRF 制御遺伝子発現への影響は完全な SRF KO に比べると部分的であるとは考えられるが、機能異常の強い変異では CSRP1,2 の KO マウスや SRF の CKO マウスで見られるような組織での病態生理の異常を来たす可能性は考えられる。また、動脈硬化の遺伝的要因については脂質代謝関連遺伝子がよく知られるが、ごく最近の報告に、早発性冠動脈疾患の症例でみられた Netrin1 遺伝子の稀な一アミノ酸変異が *in vitro* の検討で動脈硬化形成過程に異常を来たすとの報告がある (Bruikman *et al.* 2020)。早発性の AMI を来たした発端者は重喫煙者であるが、脂質異常、糖尿病はなかった。同じリスクファクターはないが、同変異を持つ兄に早発性の冠動脈石灰化、母親は同変異はないが早発性の AMI がみられた。生活習慣や他の潜在的遺伝的要因の影響も含むとは考えられるが、同 Netrin1 変異の動脈硬化進行への影響は疑われる。動脈硬化の形成機序に関わる遺伝子群の rare variant においても、大きな分子機能異常を来たすものでは遺伝的要因として病態を悪化させる可能性が有り得ることが示唆される。

ゲノムデータベース上、rare variant が主であるが、CSRP 蛋白全長の半分におよぶ多くのアミノ酸においてヒトアミノ酸変異が検出されており、*in silico* 解析でも異常が示唆されるヒトアミノ酸変異は多くみられた。同解析で蛋白上の構造的な重要部位はある程度予測されているものと考えられるが、実際の機能異常がどのような、どの程度の異常であるのかやその発症様式、病的意義を知るにはさらに生体での分子生物学的な検討が必要となる。また、データベースの蓄積から、遺伝学的検討で原因変異と同定された CSRP3 の一アミノ酸変異例において心疾患が検出されていない例も一部 ClinVar で見られた。病的変異を持つ場合でも、プレクリニカルな状態であったり、環境因子や経年変化など他の要因の負荷やあるいは他の遺伝子変異の存在が疾患の顕在化に必要という可能性は考え得る。ヒト変異の個体への影響については、依然分子機能異常の検討や生体での分子病態の検討も含め、さらに詳細な検討が必要と考えられる。

今回の検討では、CSRP3 で肥大型心筋症の報告のあるヒトアミノ酸変異と同じ形の一アミノ酸変異がヒト CSRP1 上で見られることから、同ヒトアミノ酸変異を中心に検討を行った。培養細胞に変異体を発現させると、心筋症の報告のある CSRP3 の変異と同様のパターンの分子機能異常を WB で見出したため、より詳細に検討を行った。今回 *in vitro* で機能異常についての検討を行うことで、CSRP1 の LIM ドメインの同部位の稀な変異が SRF のターゲット遺伝子を含めた転写制御に明らかに異常を来たすことが明確となった。少なくとも体質的な個人差となることは示唆される。*In silico* 解析で異常が示唆されるヒトアミノ酸変異は他にも多数見られるが、変異部位や変化するアミノ酸が異なれば必ずしも本変異と同様の *in vitro* での異常な結果を示すとは限らず、別途確認が必要である。これら異常が示唆される変異については実際の変異体の分子病態をよく検討し、生体での病態生理への有意な異常により疾患発症や特異病態の要因となるのか、あるいは病的でない個人差の範囲内なのかさらに詳細に検討することが必要である。遺伝的要因も含めた病態生理の理解についてはまだ不明な点が多く、主な対象は各疾患の一部の症例に限られるとは考えられるが、遺伝子変異の疾患発症機構への影響を十分に検討することが、変異症例での病態評価や治療検討の手がかりとなると考えられる。データベース上にない変異も実在しており対象変異は非常に多いが、機能異常の大きな変異については特に検討が望まれる。この点から、*in vitro* においてもハイスループットに多くの変異体を対象に機能異常が評価できる方法は必要と考えられ、その解析手法の構築に着手している。

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 Kimura M, Horie T, Baba O, Ide Y, Tsuji S, Ruiz Rodriguez R, Watanabe T, Yamasaki T, Otani C, Xu S, Miyasaka Y, Nakashima Y, Kimura T, Ono K.	4. 巻 21
2. 論文標題 Homeobox A4 suppresses vascular remodeling by repressing YAP/TEAD transcriptional activity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EMBO Reports	6. 最初と最後の頁 e48389
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.201948389.	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
---------	---------