

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08583

研究課題名(和文) 血管内皮細胞の硬化と機能が連携する機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of cooperation between endothelial cell stiffness and functions.

研究代表者

岡本 貴行 (Okamoto, Takayuki)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・准教授

研究者番号：30378286

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)：本研究課題では、血管内皮細胞が炎症時の細胞硬化に伴い、どのような機構で細胞機能を調節するかについて解析を行った。その結果、炎症刺激時に細胞硬化を誘導する転写共役因子YAPの活性化、細胞骨格の再編成に次いで、Notch1シグナルの抑制が起こり、血管内皮細胞の遺伝子発現が調節されることを明らかにした。また、抗凝固・抗炎症因子であるトロンボモジュリン製剤が細胞軟化を生じて白血球の接着を減弱することを見出した。これらから、血管内皮細胞の硬化に連動して誘導される細胞内シグナル伝達と細胞機能変化が明らかになり、本機構が血管炎症の制御に応用できる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動脈血管の弾性増加(硬化)は、心血管イベント発症のリスクであり、また敗血症の予後不良に繋がる可能性が指摘されている。これは血管硬化が血栓形成や炎症の活性化を助長することを示唆し、我々は血管内皮細胞の硬化が炎症の増悪化を招く可能性を示してきた。本研究では細胞硬化を基軸として炎症拡大を引き起こす新しい分子機構を明らかにした点で学術的価値に優れる。また、本分子機構が動脈硬化や敗血症の基盤に存在する血管炎症を制御するための標的となる可能性を示し、これら疾患の新しい治療法への応用に繋がると考える。

研究成果の概要(英文)：In the current study, we analyzed the mechanisms by which endothelial cells increased cell stiffness upon inflammatory stimuli to regulate cellular functions. We found that cytoskeletal reorganization and activation of the transcriptional coactivator YAP, are implicated in cell stiffening upon inflammatory stimuli, lead to suppress Notch1 signaling. Our data also revealed that the expression of pro-inflammatory and angiogenesis related genes in endothelial cells is regulated under Notch1 signaling pathway. Furthermore, we showed that recombinant thrombomodulin protein, an anticoagulant and anti-inflammatory factor, attenuates leukocyte adhesion by inducing cell softening. In summary, our results indicate intracellular signaling and cellular functional changes associated with endothelial cell stiffening and suggest that this molecular pathway may be useful for the control of vascular inflammation.

研究分野：血管生物学

キーワード：血管内皮細胞 細胞硬化 炎症 細胞骨格 ギャップ結合

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国では高齢化、食生活の欧米化、運動不足などを背景として心血管疾患、脳血管疾患など血管障害性疾患が増加している。血管障害性疾患の血管病変には、動脈硬化病変や血管壁硬化などの血管組織の弾性増加(血管硬化)がみられる。血管硬化の実態は、病的炎症を原因とした細胞外マトリックスの再編成、線維化、石灰化と血管内皮細胞や血管平滑筋細胞など細胞そのものの硬化である。他方、血管硬化がコレステロール非依存的な心血管イベント発生(病的血栓形成)のリスク因子であるという臨床的意義が明らかにされている。血管の硬さは血管の収縮と弛緩(血管内皮機能)の減退に相関するため、血管内皮機能障害の進行を判断する重要な診断項目である。

血管硬化が心血管イベント発症のリスク因子であることは、血管硬化が血栓形成や炎症の活性化を助長している可能性を示すが、その実態には不明な点が多い。細胞には細胞外微小環境の硬さや物理的環境要因を感知して細胞内シグナルへ変換し、細胞の分化、増殖、運動能を調節する仕組み(メカノバイオロジー)が備わる。細胞外環境の硬化は血管内皮細胞に動脈硬化の増悪化するシグナルを誘導することを示す報告もある。また、細胞自身にも硬さが存在し、発生時や病態形成に伴い変化し、細胞の硬さを含む細胞のメカニクスの変化が組織の形成や機能維持に重要であることが示唆されている。これらを踏まえ、血管硬化に伴う細胞のメカノバイオロジーと細胞のメカニクスの解析し、その病態生理的役割の解明が血管障害性疾患に対する新たな治療法の開発に繋がると期待される。

2. 研究の目的

これまで我々は、血管の組織と細胞レベルでの硬さに着目し、炎症時に血管内皮細胞自身も硬化して細胞硬化が単球の接着を亢進すること、硬化血管組織がマクロファージの炎症性分化を促進することを明らかにしてきた。本研究では、炎症刺激時の血管内皮細胞の硬化によってどのような細胞機能の変化が生じるのか、また、細胞機能変化がどのような機構で誘導されるか理解すること目的とする。ここでは転写共役因子 Yes-associated protein (YAP)に着目し、本分子を起点として血管内皮細胞の硬さ制御に関わる細胞骨格や細胞間結合の編成、および細胞機能である血管新生・炎症・血液凝固関連因子の発現の変化を解析した。

3. 研究の方法

(1) 細胞の硬さ測定

培養ヒト臍帯静脈内皮細胞を 90%コンフルエントまで培養し、Vehicle もしくは LPS (Lipopolysaccharide)存在下で細胞を YAP 活性化剤である XMU-MP-1、または、YAP 阻害剤である Verteporfin で 4 時間処理した。処理後、フレッシュな培地に交換し、原子間力顕微鏡で生細胞の硬さを測定した。測定時に得られるフォースカーブより算出した弾性率を硬さとして示した。

(2) 細胞接着斑、細胞骨格の評価

刺激を加えた血管内皮細胞を 4%パラホルムアルデヒドによって固定し、0.05% Tween-20 を含む PBS で浸透化処理を行った。細胞接着斑は抗ピンキュリン抗体で染色し、得られたシグナル数を個々の細胞ごとに計数して評価した。細胞骨格はローダミンファロイジンをを用いて線維状アクチンを染色し、蛍光顕微鏡を用いて観察するとともに細胞ごとの蛍光シグナル強度を ImageJ で数値化し、定量に用いた。

(3) ギャップ結合の評価

ギャップ結合の評価は色素移行アッセイで行った。未染色の血管内皮細胞を 90%コンフルエントまで培養し、別途準備したカルセインで染色した細胞を加えて共培養した。共培養後洗浄し、カルセイン染色細胞から未染色細胞へのカルセイン色素の移行を蛍光顕微鏡で観察し、評価した。

(4) 遺伝子発現解析

血管内皮細胞に XMU-MP-1、または Verteporfin を作用させたのち、RNA を回収し、逆転写反応によって cDNA を作製した。定量的 PCR 法を用いて DLL4 (Delta-Like Protein 4) と Notch1 mRNA の発現を解析した。次に、DLL4 siRNA、またはコントロール siRNA をリポフェクション法によって細胞に導入し、RNA の回収と cDNA 作製を行った。定量的 PCR 法を用いて Notch1 シグナルによって制御される HEY1、HES1、血管内皮増殖因子受容体 (VEGFRs) および各種炎症・血液凝固関連遺伝子の mRNA の発現を解析した。

(5) 血管内皮細胞への白血球接着の評価

血管内皮細胞を 24 穴プレートに播種し、rTM で処理した後、LPS 刺激を 4 時間加えた。刺激後、細胞を洗浄してカルセインで染色したヒト単球由来細胞株 THP-1 細胞を共培養した。共培養後、洗浄操作によって非接着細胞を除き、血管内皮細胞に結合している THP-1 細胞の数をセルフアンクシオンイメージャーで検出した。

4. 研究成果

(1) YAPを介した血管内皮細胞の硬さ制御機構

YAP 活性化剤の XMU-MP-1 で培養血管内皮細胞を処理し、細胞の硬さを測定した結果、XMU-MP-1 処理で細胞の硬さが増加した (図1)。一方で YAP 阻害剤の Verteporfin を処理した血管内皮細胞に LPS 刺激を加えて細胞の硬さを測定したところ、YAP 阻害により細胞の硬化が抑制されることが明らかになった。次いで、細胞の硬化に関わる細胞接着斑と線維状アクチンの形成を評価した。その結果、YAP を活性化することで細胞接着斑と線維状アクチンの形成促進が生じ、また、YAP の阻害は LPS で誘導される線維状アクチン形成を抑制した。また、ギャップ結合の形成について色素移行アッセイを用いて解析した。LPS などの炎症刺激はギャップ結合の形成を減弱し、細胞硬化を誘導する。本実験では YAP の活性化はギャップ結合機能を抑制し、YAP の阻害は LPS による減弱効果を抑制した。これらの結果から細胞の硬さは YAP 活性化の下流で生じるギャップ結合抑制・細胞接着斑形成・細胞骨格の編成によって制御されることが示唆された。

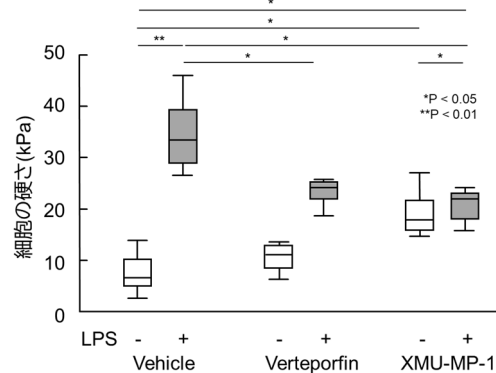


図1. YAPの活性化による血管内皮細胞の硬さ変化
XMU-MP-1によるYAP活性化時に血管内皮細胞は硬化した。LPS刺激で硬化した細胞のYAP活性化を抑制することで血管内皮細胞の硬化は阻害された。

(2) YAPを介した Notch1 シグナルの制御

これまでの先行研究によって細胞外環境の硬化が YAP 活性化を誘導することが明らかにされている。我々の先行プロジェクトにおいて、細胞外環境の硬化が YAP 活性化を誘導して細胞の形態が変化すること、さらに同環境下で DLL4 の発現を介して Notch1 シグナルに影響を及ぼすことを見出した。これらの結果から YAP が DLL4 (Delta-Like Protein 4) の遺伝子発現を調節すると考え、本仮説を検証した。XMU-MP-1、または Verteporfin による YAP の活性化に応じて DLL4 mRNA の発現量が変動した。次に、siRNA を導入して DLL4 の発現をノックダウンした細胞の遺伝子発現解析を行い、DLL4 の発現低下に伴い、HEY1、HES1、VEGFR1 および 2 の mRNA の発現も減少した。これらの結果は、YAP が DLL4 の発現を介して Notch1 シグナルを制御し、血管内皮細胞の遺伝子発現を調節することを示唆した。

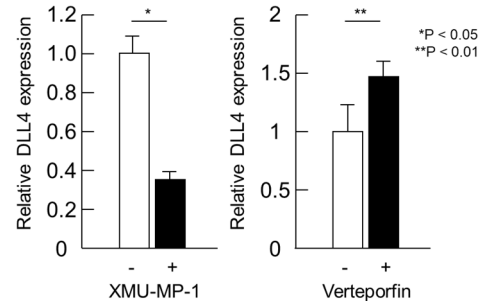


図2. YAPの活性化によるDLL4 mRNAの変化
XMU-MP-1によるYAP活性化時にDLL4の発現は低下した。一方で、VerteporfinによるYAP不活性化はDLL4の発現を増加した。

(3) YAPを介した Notch1 シグナルの制御

リコンビナントトロンボモジュリン製剤(rTM)は血管内皮細胞に対して抗血液凝固作用、抗炎症作用を示し、播種性血管内凝固症候群の患者に適応される。ここでは rTM が血管内皮細胞の硬さや YAP 活性化に及ぼす影響を解析することで、rTM の抗炎症・抗血液凝固作用発現における YAP や細胞の硬さの関与を明らかにした。まず細胞の硬さに関して検討を行い、rTM は LPS 刺激時によって硬化した血管内皮細胞を柔らかくすることを見出した。さらに、rTM は細胞接着斑や細胞骨格の形成を抑制し、LPS 刺激によるギャップ結合の減弱を抑制した。また、YAP の活性化を解析した結果、rTM は YAP の活性を抑制する可能性が示唆された。次いで、rTM は白血球の接着を抑制して抗炎症作用を発揮することから、この白血球接着抑制作用に血管内皮細胞の硬化が関与するか解析した。rTM により軟化した血管内皮細胞上には細胞の硬さ依存的に白血球の接着が減弱することを明らかにした。

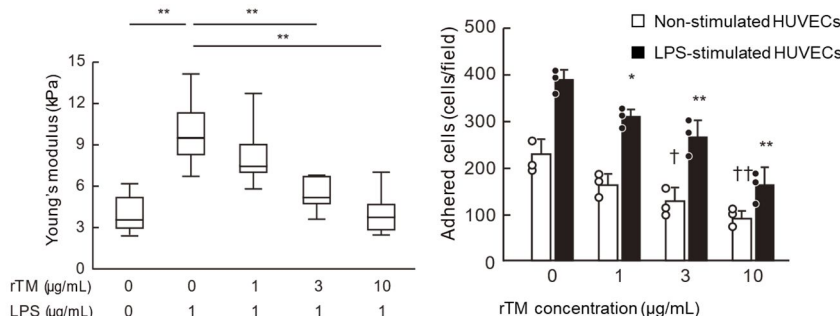


図3. rTMによる細胞硬化の抑制と細胞接着の制御
rTMはLPS刺激時による血管内皮細胞の硬化を濃度依存的に抑制した。LPSおよびrTM処理した血管内皮細胞には細胞の硬さ依存的に白血球 (THP-1細胞) が接着した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hossain KH, Okamoto T, Usuda H, Israt JAHAN, Niibayashi T, Wada K.	4. 巻 37
2. 論文標題 Differential Expression of Pro-inflammatory and Pro-coagulant Genes in Endothelial Cells Induced by Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide, Escherichia coli Lipopolysaccharide, and Zymosan.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Shimane Journal of Medical Science	6. 最初と最後の頁 123 ~ 132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Kawamoto Eiji, Nago Nodoka, Okamoto Takayuki, Gaowa Arong, Masui-Ito Asami, Akama Yuichi, Darkwah Samuel, Appiah Michael Gyasi, Myint Phyo Kyaw, Obeng Gideon, Ito Atsushi, Caidengbate Siqingaowa, Esumi Ryo, Yamaguchi Takanori, Park Eun Jeong, Imai Hiroshi, Shimaoka Motomu	4. 巻 9
2. 論文標題 The Lectin-Like Domain of Thrombomodulin Inhibits α 1 Integrin-Dependent Binding of Human Breast Cancer-Derived Cell Lines to Fibronectin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 162 ~ 162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines9020162	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 Asanuma Kunihiro, Nakamura Tomoki, Asanuma Yumiko, Okamoto Takayuki, Kakimoto Takuya, Yada Yuki, Hagi Tomohito, Kita Kouji, Nakamura Koichi, Matsumine Akihiko, Sudo Akihiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Prognostic Significance of Thrombomodulin mRNA in High Grade Soft Tissue Sarcomas after 10?years	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Orthopaedic Surgery	6. 最初と最後の頁 1726 ~ 1732
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/os.12779	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 Okamoto Takayuki, Kawamoto Eiji, Usuda Haruki, Tanaka Tetsuya, Nikai Tetsuro, Asanuma Kunihiro, Suzuki Koji, Shimaoka Motomu, Wada Koichiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Recombinant Human Soluble Thrombomodulin Suppresses Monocyte Adhesion by Reducing Lipopolysaccharide-Induced Endothelial Cellular Stiffening	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1811 ~ 1811
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9081811	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 Asanuma Kunihiro, Nakamura Tomoki, Hayashi Akinobu, Okamoto Takayuki, Iino Takahiro, Asanuma Yumiko, Hagi Tomohito, Kita Kouji, Nakamura Kouichi, Sudo Akihiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Soluble programmed death-ligand 1 rather than PD-L1 on tumor cells effectively predicts metastasis and prognosis in soft tissue sarcomas	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-65895-0	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 Wada Koichiro, Usuda Haruki, Tanaka Tetsuya, Okamoto Takayuki	4. 巻 155
2. 論文標題 Simulator-based pharmacological practice using iPad-Cloud system for medical education	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Folia Pharmacologica Japonica	6. 最初と最後の頁 185 ~ 186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1254/fpj.19115	査読の有無 無
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 Murata Yuka, Yamashiro Takashi, Kessoku Takaomi, Jahan Israt, Usuda Haruki, Tanaka Tetsuya, Okamoto Takayuki, Nakajima Atsushi, Wada Koichiro	4. 巻 2019
2. 論文標題 Up-Regulated MicroRNA-27b Promotes Adipocyte Differentiation via Induction of Acyl-CoA Thioesterase 2 Expression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BioMed Research International	6. 最初と最後の頁 1 ~ 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/2916243	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 Takayuki Okamoto, Nobuyuki Akita, Masahiro Terasawa, Tatsuya Hayashi, Koji Suzuki	4. 巻 73
2. 論文標題 Rhamnan sulfate extracted from Monostroma nitidum attenuates blood coagulation and inflammation of vascular endothelial cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 614 ~ 619
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-019-01289-5	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 Kawamoto Eiji, Nago Nodoka, Okamoto Takayuki, Gaowa Arong, Masui-Ito Asami, Sakakura Yosuke, Akama Yuichi, Soe Zay Yar, Prajuabjinda Onmanee, Darkwah Samuel, Appiah Michael G., Myint Phyoe Kyawe, Obeng Gideon, Park Eun Jeong, Imai Hiroshi, Shimaoka Motomu	4. 巻 511
2. 論文標題 Anti-adhesive effects of human soluble thrombomodulin and its domains	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 312~317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.02.041	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 Chen Zhi, Nishimura Nobuhiro, Okamoto Takayuki, Wada Koichiro, Naora Kohji	4. 巻 2019
2. 論文標題 Molecular Mechanism of Matrine from Sophora alopecuroides in the Reversing Effect of Multi-Anticancer Drug Resistance in K562/ADR Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BioMed Research International	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/1269532	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 OKAMOTO Takayuki	4. 巻 30
2. 論文標題 The role of vascular tissue stiffness and endothelial cellular stiffness	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Thrombosis and Hemostasis	6. 最初と最後の頁 496~504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2491/jjsth.30.496	査読の有無 無
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 岡本 貴行	4. 巻 51
2. 論文標題 ギャップ結合を介した細胞間相互作用による血管内皮細胞の硬さと機能の制御	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 月刊「細胞」	6. 最初と最後の頁 678-681
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 岡本 貴行	4. 巻 13
2. 論文標題 ギャップ結合を介した細胞間相互作用による血管内皮細胞の硬さと機能の制御	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 1283-1287
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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11件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 岡本貴行, 松尾映里, 伊藤温志, 川本英嗣, 臼田春樹, 田中徹也, 和田孝一郎, 島岡要, 高尾仁二, 島本亮
2. 発表標題 細胞外環境の硬さによる血管内皮細胞の機能変化の解析
3. 学会等名 第42回 (2020年度) 血栓止血学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡本貴行, 臼田春樹, 田中徹也, 和田孝一郎
2. 発表標題 リコモジュリンによる血管内皮細胞の硬化抑制とその役割
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 臼田 春樹, 神田 翔磨, 岡本 貴行, 和田 孝一郎
2. 発表標題 食物繊維の欠乏が炎症性腸疾患に及ぼす影響に関する基礎的検討
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡本 貴行、川本 英嗣、白田 春樹、田中 徹也、本田 剛一、和田 孝一郎、島岡 要
2. 発表標題 リコモジュリンが血管内皮細胞の硬さに及ぼす影響の解析
3. 学会等名 第34回（2019年度）日本Shock学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡本貴行、白田春樹、田中徹也、和田孝一郎
2. 発表標題 細胞外環境の硬さとマクロファージの炎症性分化
3. 学会等名 第27回日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡本 貴行、白田 春樹、田中 徹也、川本 英嗣、島岡 要、和田孝一郎
2. 発表標題 血管内皮細胞の硬さ制御におけるYAPの役割
3. 学会等名 第41回（2019年度）血栓止血学会要旨
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡本 貴行、白田 春樹、田中 徹也、和田 孝一郎
2. 発表標題 軟らかい細胞外環境はマクロファージの炎症性分化を抑制する
3. 学会等名 第4回黒潮カンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡本 貴行
2. 発表標題 炎症性血管病変形成における血管内皮細胞の硬さ変化とその役割
3. 学会等名 第1回三重血栓止血研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡本 貴行、白田 春樹、田中 徹也、和田 孝一郎
2. 発表標題 細胞外環境の硬さとマクロファージの炎症性分化
3. 学会等名 第72回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡本 貴行、白田 春樹、田中 徹也、和田 孝一郎
2. 発表標題 細胞外環境の硬さ依存的なマクロファージの分化傾向の解析
3. 学会等名 第40回臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡本 貴行、白田 春樹、田中 徹也、和田 孝一郎
2. 発表標題 細胞外環境の硬さがマクロファージの炎症性分化に及ぼす影響の解析
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

島根大学医学部薬理学講座
<https://www.med.shimane-u.ac.jp/pharmacology/>

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
研究協力者	田中 徹也 (Tanaka Tetsuya)		
研究協力者	臼田 春樹 (Usuda Haruki)		
研究協力者	新林 友美 (Niibayashi Tomomi)		
研究協力者	川本 英嗣 (Kawamoto Eiji)		
研究協力者	松尾 映理 (Matsuo Eri)		

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