

令和 4 年 4 月 27 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09936

研究課題名（和文）新規網膜再生誘導法の確立と網膜再生誘導薬の探索

研究課題名（英文）Investigation of novel drugs for inducing retinal regeneration

研究代表者

原 英彰（Hara, Hideaki）

岐阜薬科大学・薬学部・学長

研究者番号：20381717

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）：成体において生理的な網膜再生が起こるゼブラフィッシュを用いて新規の網膜再生誘導薬の探索を行った。本研究において、網膜再生促進作用を有する新規因子・薬物としてPDGF及びTUDCAを見出した。また、PDGFの作用解析結果より、成長因子は再生過程において異なる作用を有し、複合的に作用していることが示唆された。TUDCAは単独ではミュラーグリア活性化を誘導しないため、成長因子を含むミュラーグリア活性化因子との組み合わせにより、薬理的な網膜再生誘導法として活用できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においては、網膜再生促進作用を有する新規因子・薬物としてPDGF及びTUDCAを見出し、それらの作用機序の一端を明らかにした。これらの発見は学術的な新規性を有しているのみならず、未だ達成されていない哺乳類の網膜再生制御を行うための重要な知見であり、本研究の成果は網膜再生研究の発展に貢献するものである。

研究成果の概要（英文）：We investigated new retinal regeneration inducers using zebrafish, which causes physiological retinal regeneration in adults. In this study, we identified PDGF and TUDCA as novel factors / drugs with retinal regeneration promoting activity. In addition, the analysis of PDGF function suggested that each growth factors have different functions in the regeneration process and act in a complex manner. Though TUDCA alone does not induce Muller glia activation, it has been shown that it may be used as a pharmacological method for inducing retinal regeneration in combination with Muller glia activating factors including growth factors.

研究分野：薬学

キーワード：網膜再生 ゼブラフィッシュ PDGF TUDCA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

視覚は生活の質を維持するために重要な感覚の一つである。このため萎縮型加齢黄斑変性症や網膜色素変性症などの網膜変性疾患における視細胞（光や色を感受する細胞）の損失は、患者の生活の質を大きく低下させる。しかし現在、これらの疾患に対する治療薬は存在しない。そのため、視細胞を含む網膜細胞の再生を促すような薬の創出が切望されている。ゼブラフィッシュなどの魚類やアフリカツメガエルなどの両生類の網膜は再生能を有しているのに対し、ヒトやマウスなどの哺乳類の網膜は再生能を持たないと考えられてきた。しかし近年、哺乳類においても障害後に網膜細胞の再生が起きる可能性を示唆する報告がなされてきた。そしてこれらの報告から、哺乳類の網膜では障害後に、ミュラーグリアと呼ばれる網膜特異的グリア細胞が活性化しないために再生能を発揮できないということが明らかになってきた。

2. 研究の目的

本研究においては、成体においても生理的な網膜再生が起こるゼブラフィッシュを用いて新規の網膜再生誘導薬の探索を行った。ゼブラフィッシュにおいて網膜再生を誘導する因子として、我々が近年発見した神経成長因子 Granulin1 のほか、いくつかの成長因子 (HB-EGF, Insm1) が報告されている。これらの成長因子はいずれもミュラーグリアの活性化に必要な転写因子である *ascl1a* を誘導し、ミュラーグリアの活性化に寄与することが明らかになっている。しかしながら、生理的な網膜再生の過程には、ミクログリアによる死細胞の貪食、ミュラーグリアの活性化による多能性前駆細胞の産生、多能性前駆細胞由来の非対称性分裂による網膜前駆細胞の分化・増殖、といった複数の機構が関与している。再生能を持たない哺乳類網膜において薬理的な網膜再生の誘導を達成するためには、これら複数の機構をそれぞれ活性化する薬物が必要である。このことを考慮し、今回我々は様々な観点から網膜再生を誘導する新規因子・薬物の探索を行った。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

ゼブラフィッシュは理化学研究所バイオリソースセンター (RIKEN BRC; Tsukuba, Japan) より提供された野生型 (RIKNE-WT) を交配・繁殖させ使用した。成体のゼブラフィッシュは Westerfield の手法 (*Univ. Oregon Press. Eugene, 2017*) に従い、水温 28.5 ± 0.5 °C の水槽中で、明期 14 時間/暗期 10 時間 (明期: 午前 8 時–午後 10 時) で飼育した。実験には 4–6 ヶ月齢の成魚を使用し、岐阜薬科大学本部学舎 7 階の培養室 (動物) で飼育した。すべての実験手順は、岐阜薬科大学動物飼育・動物実験委員会の承認の下で実施した。また、ARVO 宣言 [The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Reserch] に準じて実験動物を使用した。

(2) ゼブラフィッシュ網膜針刺し傷害モデル

ゼブラフィッシュを 0.1% フェノキシエタノール溶液に浸漬し、外部刺激に反応しなくなるまで麻酔処置を行った。その後、湿らせたキムタオル上でゼブラフィッシュ網膜針刺し傷害を行った。実体顕微鏡下で操作をし、30G の針を用いて強膜側から 90° ずつの等間隔に 4 点、針刺しを行った。針は先端部分が見えなくなるおおよそ 1.5 mm の深さまでそれぞれ刺した。針刺し後、ゼブラフィッシュは水槽に戻し、評価時まで通常通り飼育を行った。

(3) mRNA 抽出

0.1% フェノキシエタノール溶液に 5 分間浸漬し、過麻酔により安楽死させたゼブラフィッシュから網膜を単離し、RNA を抽出した。抽出した RNA の濃度は NanoVue Plus (GE Healthcare Bio-Sciences AB) で 260 nm の波長の分光測定により求め、RNase-free H₂O を用いて各サンプルの RNA 濃度が等しくなるよう調整した。cDNA への逆転写は PrimeScript[®] RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Takara Bio) を用いて、製品プロトコールに従って行った。5 × PrimeScript Buffer (for Real Time) 2 μL、PrimeScript RT Enzyme Mix I 0.5 μL、Oligo dT Primer (50 μM) 0.5 μL、Random 6 mers (100 μM) 0.5 μL、各 RNA サンプル 6.5 μL の全量 10 μL として、混合した。その後、PCR Thermal Cycler Dice (Takara Bio) を用いて 37°C で 15 分間逆転写反応を行い、その後 85°C で 5 秒間静置し、逆転写酵素を失活させた。

(4) 定量的リアルタイム PCR 法を用いた mRNA 発現評価

リアルタイム RT-PCR には、SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (Takara Bio) を用いた。SYBR[®] Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 10 μL に各 primer 及び滅菌水、cDNA 1 μL を加え、全量を 20 μL とし、primer 濃度が 0.2 μM となるように調整した。その後、Thermal Cycler Dice Real Time System (Takara Bio) を用いて、95°C、30 秒を 1 サイクル、95°C で 5 秒間、60°C で 30 秒間を 40 サイクル行い、PCR 反応を行った。用いた primer を表 1 に示す。

Primer designs for qPCR	
Gene	Primer sequence
<i>ascl1a</i>	F: 5'-ATCCGCGCGCTGCAGCTTCTGG-3'
	R: 5'-CGAGTGCTGATATTTTTAAGTTTCC-3'
<i>pax6b</i>	F: 5'-ATGGCCACTTCTGGCACCGCTTCCACAGGAC-3'
	R: 5'-AGTTCTGGGAGTGTGAAAAGAGCTCGCGCCTC-3'
<i>pdgf-a</i>	F: 5'-TTCCCCGAGAGCTGATTGAG-3'
	R: 5'-TGCTCCTTATGGTGGCCTTG-3'
<i>pdgf-b</i>	F: 5'-AGGAAGATGATGAGAAGCCAGAG-3'
	R: 5'-TTACACATAGCCTGCTGGGC-3'
<i>gapdh</i>	F: 5'-ATGACCCCTCCACCATGA-3'
	R: 5'-GGCGGTGTAGGCATGAAC-3'
<i>p21</i>	F: 5'-CCGCATGAAGTGGAGAAAAC-3'
	R: 5'-ACGCTTCTTGGCTTGGTAGA-3'
<i>p27</i>	F: 5'-TGAAGCCTGGAACCTCGACT-3'
	R: 5'-TGTGAATATCGGAGCCCTTC-3'
<i>p53</i>	F: 5'-GCTTGTACAGGGGTCATTT-3'
	R: 5'-ACAAAGGTCCCAGTGGAGTG-3'

表 1. プライマー配列表

各 PCR において、勾配係数、R2 係数、段階希釈したスタンダードカーブの直線範囲を算出した。すべての反応は *gapdh* による内部補正を行った後、その平均値を用いた。

(5) 免疫染色用網膜組織切片作製

ゼブラフィッシュ眼球を摘出後、4%パラホルムアルデヒド含有 0.1 M PB (pH 7.4) の浸漬及び眼内硝子体内投与による固定をし、一晩処置した。その後、5%、12.5%、20%スクロース含有 0.1 M PB (pH 7.4) 液に移し各 1 時間ずつ 4°C にて処置した。液体窒素を用いて O.C.T. compound により凍結し、薄切するまで -80°C にて保存した。凍結した眼球を O.C.T. compound を用いて -20 °C 下で固定し、クライオスタット (Leica, Wetzlar, Hesse, Germany) を用いて厚さ 12 μm の切片を作製し、MAS コーティングされたカバーガラス (Matsunami, Osaka, Japan) に載せ、-80°C で保存した。

(6) 組織切片免疫染色による評価

染色時、-80 °C より凍結切片を取り出し、-20 °C で 1 時間放置した後、4 °C で 1 時間放置し、さらに室温で 2 時間乾燥させた。その後、Super PAP pen (Daido sangyo, Osaka, Japan) にて反応液の流出を防ぐために切片の周囲を囲んだ。その後、10% goat serum により 1 時間ブロッキングを行った。ブロッキング後、一次抗体 (溶媒: ブロッキング剤) を用いて 4 °C で一晩反応させた。その後、二次抗体 (溶媒: ブロッキング剤) を 1 時間反応させた。つづいて、Hoechst 33342 により核染色を行った。染色後、Fluoromount (水溶性封入基材) で封入した。一次抗体には、rat anti-BrdU antibody (1:200 dilution; Abcam, Cambridge, UK)、rabbit anti-PCNA antibody (1:100; GeneTex, Irvine, CA, United States)、mouse anti-4C4 antibody (1:200; Kindly gifted by Dr. Hitchcock's lab.)、mouse anti-glutamine synthetase (GS) antibody (1:500; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) を用いた。二次抗体にはそれぞれ Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (1:200)、Alexa Fluor 546® goat anti-mouse (1:1000)、Alexa Fluor® 546 goat anti-rat IgG (1:1000 dilution; Thermo Scientific) を用いた。染色した切片はオールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X700, Keyence, Osaka, Japan) 共焦点レーザー走査型顕微鏡 (LSM700, Carl Zeiss, Jena, Germany) を用いて撮影した。

(7) 統計学的解析

実験成績は平均値 ± 標準誤差で示した。統計学的な比較は、SPSS Statistics soft ware を用いて F 検定を行った後、Student's *t*-test または Welch's *t*-test、一元配置分散分析を行った後、Dunnett's test、Tukey's test により行った。危険率が 5% 未満を有意差有りとした。

4. 研究成果

(1) ゼブラフィッシュ網膜再生における PDGF の寄与

ゼブラフィッシュ網膜再生に寄与する因子を探索するため、網膜針刺し傷害後にゼブラフィッシュ網膜において発現上昇する mRNA を探索した。この結果、血小板由来成長因子 (PDGF) の二種類のサブタイプ *pdgf-a* 及び *pdgf-b* の早期発現上昇が認められた (図 1)。これらの発現変動は *ascl1a* の誘導よりも早期に起こっており、*pdgf-a* 及び *pdgf-b* がミューラグリア活性化よりも早期の再生応答に寄与している可能性が示唆された。さらに、PDGF シグナルを阻害した際の再生応答への影響を PDGF 受容体チロシンキナーゼ阻害剤である AG1295 を用いて検討した。10 nM の AG1295 を針刺し傷害と同時に硝子体内投与した結果、傷害 4 日後に網膜に出現する BrdU 陽性増殖細胞数が有意に減少した (図 2)。このことから PDGF シグナルの網膜再生への寄与が確認された。

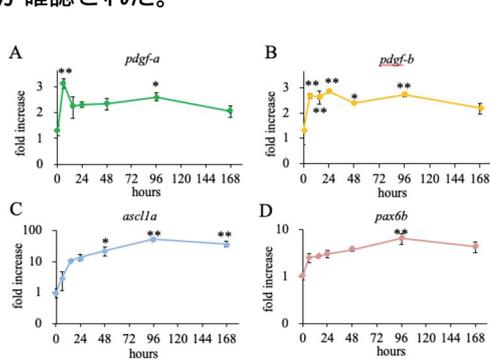


図 1. 網膜針刺し傷害後の *pdgf* 早期誘導

(A–D) mRNA fold changes of (A) *ascl1a*, (B) *pax6b*, (C) *pdgf-a*, and (D) *pdgf-b*. The vertical axis is the logarithm of the expression level. The horizontal axis is the number of hours after injury. Data are the means \pm standard error of the means (SEMs) (n=3). *P<0.05, **P<0.01 vs 0 h groups (Dunnett's test).

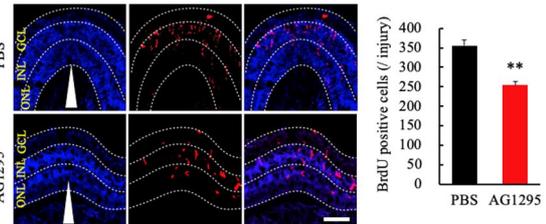


図 2. PDGF シグナルの阻害による網膜再生の抑制 (A) Representative images of immunostained retina at 4 days after injury. Red shows BrdU-positive proliferative cells, and blue shows Hoechst 33342-positive nuclei. White dotted lines indicate each retinal cell layer. White arrows indicate the injury site. The scale bar represents 50 μ m. (B) BrdU-positive cell number per injury area. Data are the means \pm SEMs (n=4). **P<0.01 vs PBS group (Student's t-test). GCL; ganglion cell layer, INL; inner nuclear layer, ONL; outer nuclear layer.

また、ヒトリコンピナント PDGF-AA 及び PDGF-BB を硝子体内投与することによって増殖細胞が誘導されることを確認した (図 3)。このような作用はすでに網膜再生関連因子として報告されている HB-EGF 及び Grn1 でも認められているが、PDGF はそのサブタイプに応じて局在の異なる増殖細胞誘導作用を示した。PDGF-BB は、HB-EGF や Grn1 と同様にミューラグリアを活性化し、網膜内顆粒層の増殖を強く誘導した。これに対し PDGF-AA は、網膜神経節細胞層及び網膜内顆粒層に局在するミクログリアを主に誘導した。PDGF-AA の投与によっても、網膜内顆粒層のミューラグリアは活性化されている様子が認められたが、ミューラグリア由来の増殖細胞は PDGF-BB 投与後に比べ少なかった (図 4)。これらのことから、PDGF-AA はミクログリアの活性化を誘導する作用を有し、成長因子ごとに異なる再生過程への寄与が示唆された。

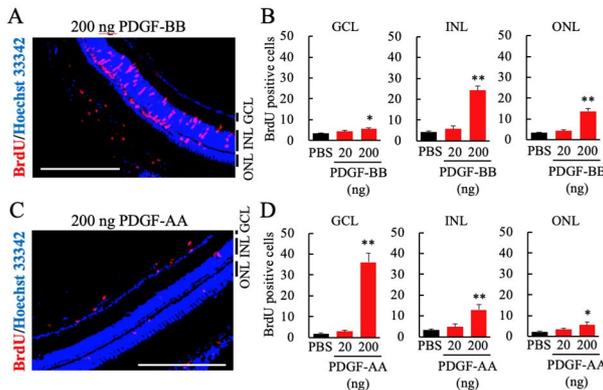


図 3. 二種類の PDGF による増殖細胞誘導作用

(A, C) Representative images of immunostained retina at 4 days after intravitreal injection of human recombinant PDGF-BB (A) or PDGF-AA (B). Red shows BrdU-positive proliferative cells, and blue shows Hoechst 33342-positive nuclei. The scale bar represents 200 μ m. (B, D) Quantification of BrdU-positive cell numbers at GCL, INL, and ONL. Data are the means \pm SEMs (n=5). *P<0.05, **P<0.01 vs PBS group (Dunnett's test).

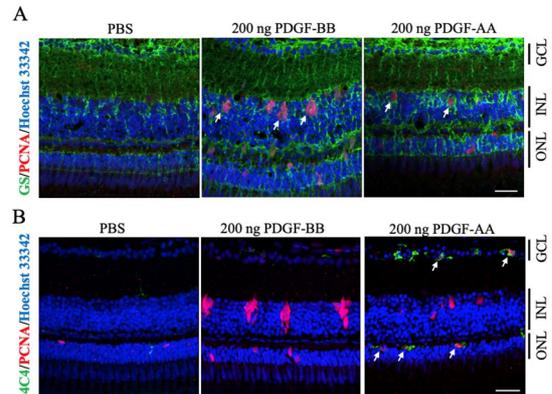


図 4. 二種類の PDGF による増殖細胞の同定

(A–B) Representative images of immunostained retina with PCNA and GS (A) or 4C4 (B) antibody at 4 days after intravitreal injection of human recombinant PDGF-BB or AA. The scale bar represents 30 μ m. (A) White arrows indicate neurogenic clusters. (B) White arrows indicate proliferating microglia.

(2) TUDCA によるゼブラフィッシュ網膜再生促進作用

肝臓は成体の哺乳類においても再生能力を維持している特殊な臓器である。胆汁酸は肝臓において再生反応の制御・促進に働いていることが報告されており、その中でもタウロウルソデオキシコール酸 (TUDCA) は非常に強い肝細胞分化誘導・増殖促進作用を有していることが報告されている。そこで本研究においては、TUDCA を薬理的網膜再生誘導法の候補化合物として、TUDCA がゼブラフィッシュ網膜再生に及ぼす作用について検討を行った。はじめに、網膜針刺し傷害後 4 日間 500 μ M の TUDCA にゼブラフィッシュを暴露することにより、4 日後の BrdU 陽性増殖細胞数が有意に増加することを確認した (図 5)。

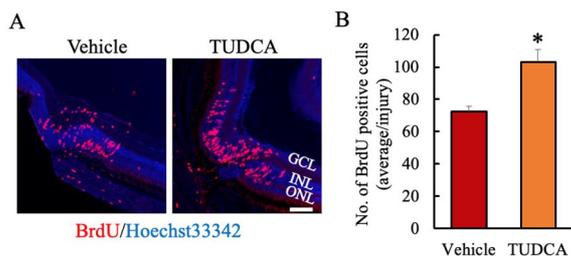


図 5. 網膜再生に対する TUDCA の作用

(A) Retinal cross sections were stained with BrdU (red, as a proliferative cell marker), Hoechst 33342 (blue, as a nuclei marker). The scale bar represents 200 μ m. (B) Quantitative data of the average BrdU-positive proliferating cells of injury site which evaluated by continuous retinal cross sections. Data are shown as means \pm SEM (n=4). *P<0.05, vs. Vehicle (Student's *t*-test). TUDCA was administered at a final concentration of 500 μ M.

TUDCA が網膜再生における過程を促進するのかについて調べるため、非傷害のゼブラフィッシュ網膜増殖に対する作用を検討した。正常網膜においては、TUDCA の投与により網膜外顆粒層の増殖細胞が特異的に増加した (図 6A-B)。また、この際の網膜における mRNA 発現変化を評価したところ、細胞周期の抑制因子として知られるサイクリン依存性キナーゼである *p21*, *p27*, *p53* の発現減少が認められた (図 6C)。ゼブラフィッシュを含む魚類の網膜においては、正常状態でも桿体細胞前駆細胞が恒常的に産生されており、mRNA の発現変化を考慮すると TUDCA は桿体細胞前駆細胞の細胞周期を促進したものと考えられる。また、TUDCA の投与のみではミュラーグリアを含む網膜内顆粒層における増殖細胞を誘導しなかった。このことから、TUDCA は細胞周期へのリエントリーを誘導する作用はもたず、すでに細胞周期が回転している増殖期の細胞にのみ増殖促進作用を示すことが示唆された。

これらの検討により、我々は網膜再生促進作用を有する新規因子・薬物として PDGF 及び TUDCA を見出した。また、PDGF の作用解析結果より、成長因子は再生過程において異なる作用を有し、複合的に作用していることが示唆された。TUDCA は単独ではミュラーグリア活性化を誘導しないため、成長因子を含むミュラーグリア活性化因子との組み合わせにより、薬理的な網膜再生誘導法として活用できる可能性が示された。

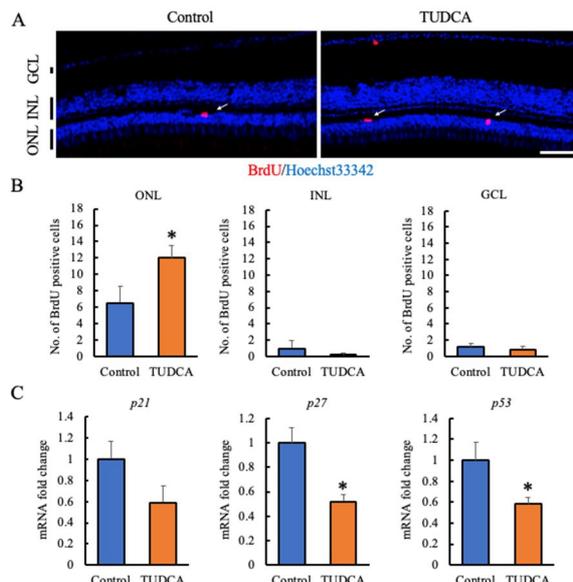


図 6. 正常網膜に対する TUDCA の細胞周期促進作用

(A) Retinal cross sections were stained with BrdU (red, as a proliferative cell marker), Hoechst 33342 (blue, as a nuclei marker). White arrows indicate proliferative cells in the ONL. The scale bar represents 50 μ m. (B) Quantitative data of BrdU-positive proliferating cells in the ONL, INL, and GCL. Data are shown as means \pm SEM (n=6-7). *P<0.05, vs. Control (Student's *t*-test). (C) mRNA expression levels quantified by real-time PCR in intact zebrafish retina after TUDCA treatment for 2 days. Data are shown as means \pm SEM (n=9-10). *P<0.05, vs. Control (Student's *t*-test). TUDCA was administered at a final concentration of 500 μ M.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Saito Yuichi, Okuyoshi Hiroyuki, Nakamura Shinsuke, Otsu Wataru, Yamaguchi Akihiro, Hitchcock Peter F., Nagashima Mikiko, Shimazawa Masamitsu, Hara Hideaki	4. 巻 3
2. 論文標題 Tauroursodeoxycholic Acid Promotes Neuronal Survival and Proliferation of Tissue Resident Stem and Progenitor Cells in Retina of Adult Zebrafish	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BPB Reports	6. 最初と最後の頁 92～96
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpbreports.3.3_92	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 Saito Yuichi, Yako Tomohiro, Otsu Wataru, Nakamura Shinsuke, Inoue Yuki, Muramatsu Aomi, Nakagami Yasuhiro, Shimazawa Masamitsu, Hara Hideaki	4. 巻 152
2. 論文標題 A triterpenoid Nrf2 activator, RS9, promotes LC3-associated phagocytosis of photoreceptor outer segments in a p62-independent manner	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 235～247
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.freeradbiomed.2020.03.012	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 Nakamura Shinsuke, Saito Yuichi, Gouda Takumi, Imai Takahiko, Shimazawa Masamitsu, Nishimura Yuhei, Hara Hideaki	4. 巻 29
2. 論文標題 Therapeutic Effects of Iron Chelation in Atorvastatin-Induced Intracranial Hemorrhage of Zebrafish Larvae	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases	6. 最初と最後の頁 105215～105215
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.105215	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 Saito Yuichi, Yamaguchi Akihiro, Nakamura Shinsuke, Okuyoshi Hiroyuki, Shimazawa Masamitsu, Hara Hideaki	4. 巻 727
2. 論文標題 Contribution of platelet-derived growth factor signaling to retina regeneration in zebrafish	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 134930～134930
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2020.134930	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 Saito Yuichi, Nakamura Shinsuke, Chinen Naoki, Shimazawa Masamitsu, Hara Hideaki	4. 巻 143
2. 論文標題 Effects of anti-osteoporosis drugs against dexamethasone-induced osteoporosis-like phenotype using a zebrafish scale-regeneration model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 117 ~ 121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2020.02.011	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4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Nakamura S, Saito Y, Yako T, Otsu W, Inoue Y, Muramatsu A, Nakagami Y, Shimazawa M and Hara H
2. 発表標題 Triterpenoid Nrf2 activator, RS9, promotes LC3-associated phagocytosis of photoreceptor outer segments without p62 induction.
3. 学会等名 ARVO 2020 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村 信介、齋藤 祐一、今井 貴彦、郷田 拓実、嶋澤 雅光、西村 有平、原 英彰
2. 発表標題 アトルバスタチン誘発ゼブラフィッシュ脳内出血モデルの作製と鉄キレート剤の効果
3. 学会等名 第63回日本脳循環代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲垣賢、青山八曇、船戸道徳、中村信介、嶋澤雅光、金子英雄、原英彰
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来血管構造を有する網膜オルガノイドの作製
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村信介、稲垣賢、青山八曇、青島弘汰、大津航、船戸道徳、嶋澤雅光、高橋一浩、原英彰
2. 発表標題 網膜オルガノイドを用いた糖尿病網膜症モデルの開発
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022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
---------	---------