

令和 3 年 4 月 6 日現在

機関番号：23701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23707

研究課題名(和文)黄斑ディストロフィー錐体細胞側リスク因子の探索と新規薬剤スクリーニング法の開発

研究課題名(英文) Establishment of novel chemical screening assay for risk factors in cone photoreceptors of macular dystrophies

研究代表者

大津 航(Otsu, Wataru)

岐阜薬科大学・薬学部・特任助教

研究者番号：50843091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では黄斑変性時の視細胞保護治療法開発を目的として、光ストレスに対する視細胞応答シグナル経路について、青色光曝露による障害系を用いて解析を行った。視細胞培養株を用いた検討により、青色LED光照射下でライソゾーム膜透過性亢進が引き起こされると同時に、TFEBの核内移行を介してライソゾーム関連因子の発現が上昇することが明らかとなった。またこれらの障害系に対し、抗酸化作用をもつ薬物が保護作用を示した。以上の結果は、黄斑ディストロフィーにおける錐体細胞保護の新たな標的としてのライソゾームの可能性を示唆するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、黄斑ディストロフィーの病態解明を目的に実験を行い、光障害に対する視細胞のストレス応答反応におけるライソゾームの重要性について明らかにした。ライソゾームは細胞が取り込んだ物質の消化に関わるのみならず、mTOR経路などを介して、細胞の代謝全体に重要な細胞内小器官である。また、ライソゾームの異常は特に神経変性疾患との関わりがよく知られており、本研究で明らかになった知見は、眼科領域だけでなく、脳や神経の分野において広く貢献できると考えられる。黄斑ディストロフィーは現時点では根治療法がないため、研究成果を更に発展させることにより新たな治療法開発への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：It has been known that excessive light stress causes photoreceptor death. Blue light has the shortest wave length of visual light, and therefore is thought as a risk for damaging retina and vision loss because of the highest amount of energy. However, it remains less known the molecular mechanism how blue light damages photoreceptors. To address this question, the role of lysosomes in the stress response to blue light was examined. Blue light-emitting diode (LED) light induced lysosomal membrane permeabilization and Transcription Factor EB (TFEB) nuclear transport, resulting in the activation of the lysosome related genes. Antioxidant ameliorate this change, suggesting that oxidative stress is a cause for lysosomal damages. These finding indicates that chemicals which protects lysosomes from light might be a new target for preserving vision from retinal diseases such as macular dystrophy.

研究分野：網膜基礎研究

キーワード：ライソゾーム 視細胞 光障害 錐体細胞 黄斑ディストロフィー

1. 研究開始当初の背景

網膜の視細胞は光受容体とも呼ばれ、光刺激を電気信号に変換する働きを持つ。過剰な光は加齢黄斑変性症のリスク因子として知られているが、光による網膜障害の分子基盤については多くは明らかになっていない。ライソゾームは細胞が取り込んだ物質を消化する働きを持つ細胞小器官であり、網膜の機能と構造維持にその働きが不可欠である。本研究では視細胞のライソゾームに着目し、黄斑変性とライソゾームとの関わりを明らかにすることを目的に実験を行った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ストレス応答時における視細胞のライソゾーム役割について明らかにすることである。培養細胞による青色発光ダイオード (light-emitting diode, LED) 光障害モデルを用い、ライソゾームの形態やライソゾーム局在タンパク質の発現について解析を行った。更に、ライソゾーム関連遺伝子は、転写制御因子である Transcription Factor EB (TFEB) により制御されていることが知られているため、TFEB の局在とその下流の遺伝子発現について解析を行った。最後に、抗酸化物質である N-アセチルシステインを用い、光による酸化ストレスに対する保護作用の検討を行った。

3. 研究の方法

視細胞由来株である 661W 細胞に対し、既報¹⁾に基づいて青色 LED 光を 3 時間もしくは 6 時間照射し、生細胞観察、免疫染色、リアルタイム PCR、ウェスタンブロッティングに供した (図 1)。ライソゾーム透過

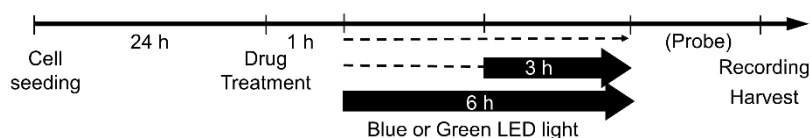


図1 青色LED光照射実験のタイムライン

性亢進の評価は、アクリジンオレンジ (R&D Systems) を添加・培養した生細胞の共焦点顕微鏡観察により行った。ライソゾームの分布と形態は、酸性小器官蛍光染色試薬であるライソトラッカー (DND-99, Invitrogen) と Hoechst-33342 の核染色をともに行い、Lionheart FX (BioTek) 顕微鏡下で観察した。ライソゾーム関連遺伝子の mRNA 量についてはリアルタイム PCR を用い、タンパク質発現についてはウェスタンブロッティングにて評価を行った。TFEB の核内移行については、661W 細胞において TFEB-GFP (Addgene, plasmid ID 38119) の安定発現株を樹立し、それらに青色 LED 光を照射したのちに、パラホルムアルデヒド固定し、蛍光免疫染色し、共焦点顕微鏡で撮影した画像を用いて評価を行った。

4. 研究成果

450ルクスの青色LED光照射において、時間依存的にアクリジンオレンジの細胞質への漏出が増加し、6時間照射下におけるこれらの漏出は1 mMのN-アセチルシステインの処置により抑制された(図2A)。一方で、同様のエネルギー量の緑色LED照射では、アクリジンオレンジの漏出は認められなかった(図2A)。細胞画分のウェスタンブロッティングによる解析により、青色LED光照射により、ライソゾーム内腔の消化酵素であるカセプシンDの細胞質におけるシグナルが増加した(図1B,C)。以上の結果から、青色LED光によりライソゾーム膜透過性亢進が起こり、内腔タンパク質の細胞質への漏出が引き起こされ、これらの変化に対してN-アセチルシステインが保護作用を示すことが明らかになった。

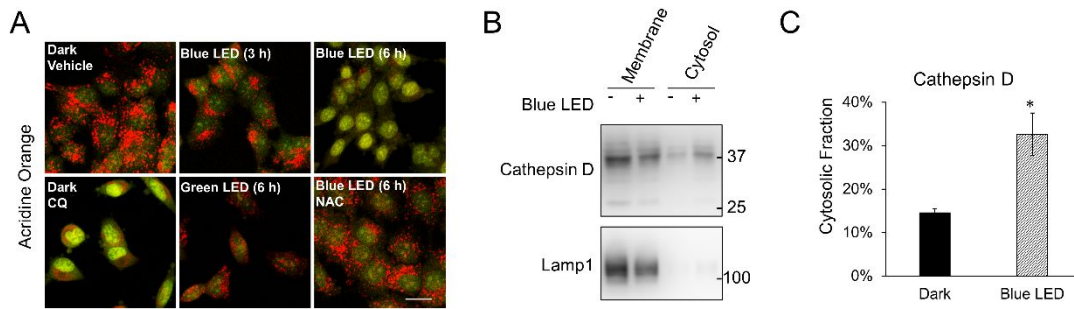


図2 青色LED光によるライソゾーム透過性亢進 (Otsu *et al.*, 2020より改変引用)

A, Representative images of AO staining in live 661W cells. Red and green represent AO signals in acidic compartments, mainly lysosomes, and those under neutral pH conditions, in the cytosol and the nucleus, respectively. **B,C**, Immunoblots of cathepsin D and lamp1 on subcellular fractionation samples of 661W cells with or without exposure to blue LED light for 6 h. Data are expressed as the means \pm S.E.M. ($n = 4$). * $p < 0.05$ by student's *t*-test vs Dark.

次に青色LED光照射時のライソゾームの分布と形態についてライソトラッカーを用い評価した。青色光照射下において、ライソトラッカーのシグナルの核近傍へのクラスター形成が認められ、それらは照射時間依存的に増加した(図3A,C)。これらのクラスター形成に対し、N-アセチルシステインの処置は抑制的に作用し、クラスター保持細胞の割合は非照射下と同程度まで減少した(図3B,C)。

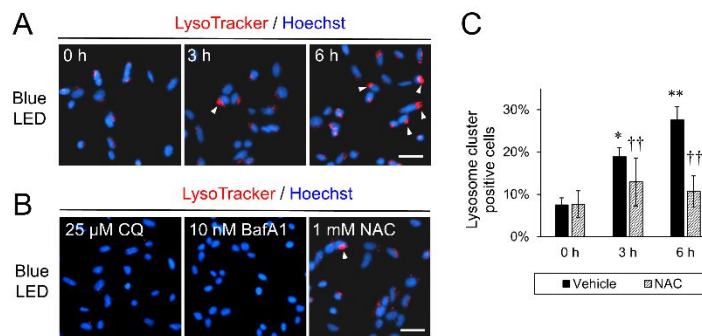


図3 青色LED光照射によるライソゾームクラスター形成 (Otsu *et al.*, 2020より改変引用)

Representative images of lysosome clusters (LysoTracker, red) and nuclei (Hoechst, blue) in 661W cells exposed to blue LED light at the indicated time point (**A**) or for 6 h (**B**). The quantification of lysosome cluster-positive cells with or without NAC is shown in **C**. CQ; chloroquine, BafA1; bafilomycin A1, NAC; N-acetyl cysteine. Arrowheads indicate lysosomal clusters. Bars = 40 μ m. Data are expressed as the means \pm S.E.M. ($n = 5$), * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ by student's *t*-test vs 0 h, † $p < 0.005$ by Student's *t*-test vs Vehicle.

次に青色 LED 光照射のライソゾーム関連遺伝子の発現への影響についても検証した。ライソゾーム構成タンパク質である、Lamp1、Mcoln1、Ctsd、Atp6v1h いずれも照射時間依存的な増加が認められた (図 4A)。Lamp1 の発現に関しては、タンパク質レベルにおいても青色 LED 光照射 12 時間で有意な上昇が認められた (図 4B,C)。一方で興味深いことに、Tfeb の mRNA 量は青色 LED 光照射下で増加せず、むしろ減少傾向を示した (図 4A)。TFEB はライソゾーム関連遺伝子のマスター制御因子として知られ、ライソゾーム傷害時に核内に移行することが知られている。青色 LED 光照射下で TFEB の核内移行が認められ (図 4D,E)、ライソゾーム関連遺伝子発現への TFEB の関与が示唆された。

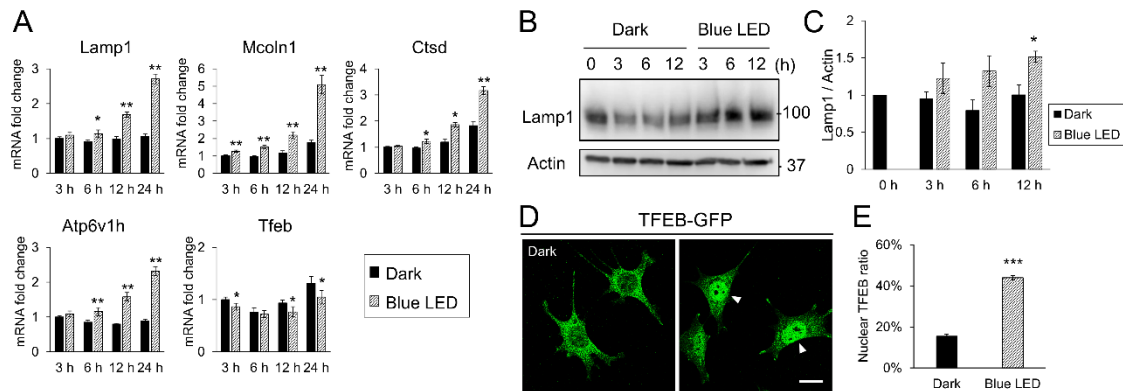


図4 青色LED光曝露によるTFEBの核内移行とライソゾーム関連遺伝子発現亢進 (Otsu *et al.*, 2020より改変引用)

A, mRNA transcript level of lysosomal-related genes in 661W cells exposed to blue LED light. **B,C**, Immunoblotting of lamp1 in 661W cell lysates at the indicated time point without (Dark) or with exposure to blue LED light. The quantitative data is shown in (C). **D, E**, Representative images for the intracellular localization of TFEB-GFP under blue LED light (D). The ratio of TFEB-positive nuclei are (E). Arrowheads represent TFEB signals in the nuclei. Data are expressed as the means \pm S.E.M. n = 6 (**A, D, E**) or 4 (**B, C**) * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$ by student's *t*-test vs Dark.

以上、青色 LED 光照射が、ライソゾーム膜透過性亢進と TFEB の核内移行、そしてライソゾーム関連遺伝子発現誘導を引き起こすことが明らかとなった。TFEB によるライソゾーム関連遺伝子の発現は、傷害されたライソゾームを代償するためのストレス応答反応であると考えられる。実際に、網膜が過剰な光にさらされた際にライソゾームにおいて同様の反応が起きるか、また黄斑ディストロフィーなどの病態とこれらの細胞応答との関連については今後の検討課題である。今回報告した結果については、2020 年 5 月に *Biochemical and Biophysical Research Communications* にて公表済みである²⁾。

<引用文献>

1. Kuse Y., Ogawa K., Tsuruma K., Shimazawa M., Hara H.
Damage of photoreceptor-derived cells in culture induced by light emitting diode-derived blue light. *Scientific Reports*, 4: 5223, 2014.
2. **Otsu W.**, Ishida K., Nakamura S., Shimazawa M., Tsusaki H., and Hara H.
Blue light-emitting diode irradiation promotes transcription factor EB-mediated lysosome biogenesis and lysosomal cell death in murine photoreceptor-derived cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun., May 28;526(2):479-484, 2020.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Miyagi Sugao, Nishinaka Anri, Yamamoto Takumi, Otsu Wataru, Nakamura Shinsuke, Shimazawa Masamitsu, Kitaoka Takashi, Hara Hideaki	4. 巻 204
2. 論文標題 Establishment of a pigmented murine model abundant with characteristics of retinal vein occlusion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Eye Research	6. 最初と最後の頁 108441 ~ 108441
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exer.2021.108441	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 Otsu Wataru, Chinen Naoki, Ohuchi Kazuki, Ando Shiori, Nakamura Shinsuke, Kono Hiroyuki, Shimazawa Masamitsu, Hara Hideaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Brazilian green propolis promotes the cytoprotective expression of heme oxygenase-1 against oxidative stress injury in murine myoblast cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Functional Foods in Health and Disease	6. 最初と最後の頁 493 ~ 493
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.31989/ffhd.v10i12.756	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 Inagaki Satoshi, Shimazawa Masamitsu, Otsu Wataru, Araki Tomoaki, Numata Yosuke, Nakamura Shinsuke, Tsusaki Hideshi, Hara Hideaki	4. 巻 17
2. 論文標題 Creation of retinal vein occlusion model in cynomolgusmonkeys and determination of its pathological features	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Neurovascular Research	6. 最初と最後の頁 E-pub
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1567202617999200831151118	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 Shiori Ando, Wataru Otsu, Daiki Osanai, Satoshi Kamiya, Kodai Ishida, Shinsuke Nakamura, Masamitsu Shimazawa, Hideaki Hara	4. 巻 3
2. 論文標題 Survival Motor Neuron Protein Modulates Lysosomal Function Through the Expression of Transcription Factor EB in Motoneurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BPB Reports	6. 最初と最後の頁 130 ~ 137
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Otsu Wataru, Ishida Kodai, Nakamura Shinsuke, Shimazawa Masamitsu, Tsusaki Hideshi, Hara Hideaki	4. 巻 526
2. 論文標題 Blue light-emitting diode irradiation promotes transcription factor EB-mediated lysosome biogenesis and lysosomal cell death in murine photoreceptor-derived cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 479 ~ 484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.03.118	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 Yuichi Saito, Hiroyuki Okuyoshi, Shinsuke Nakamura, Wataru Otsu, Akihiro Yamaguchi, Peter F. Hitchcock, Mikiko Nagashima, Masamitsu Shimazawa, Hideaki Hara	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) なし	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 Inagaki Satoshi, Shimazawa Masamitsu, Hamaguchi Koji, Otsu Wataru, Araki Tomoaki, Sasaki Yuji, Numata Yosuke, Tsusaki Hideshi, Hara Hideaki	4. 巻 17
2. 論文標題 Anti-vascular Endothelial Growth Factor Antibody Limits the Vascular Leakage and Decreases Subretinal Fibrosis in a Cynomolgus Monkey Choroidal Neovascularization Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Neurovascular Research	6. 最初と最後の頁 420 ~ 428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1567202617666200523163636	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 Kiatpakdee Benjaporn, Sato Kota, Otsuka Yayoi, Arashiki Nobuto, Chen Yuqi, Tsumita Takuya, Otsu Wataru, Yamamoto Akito, Kawata Reo, Yamazaki Jumpei, Sugimoto Yoshikazu, Takada Kensuke, Mohandas Narla, Inaba Mutsumi	4. 巻 295
2. 論文標題 Cholesterol-binding protein TSP02 coordinates maturation and proliferation of terminally differentiating erythroblasts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 8048 ~ 8063
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.011679	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 Otsu Wataru, Hsu Ya-Chu, Chuang Jen-Zen, Sung Ching-Hwa	4. 巻 39
2. 論文標題 The Late Endosomal Pathway Regulates the Ciliary Targeting of Tetraspanin Protein Peripherin 2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 2811 ~ 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.2811-18.2019	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 Hsu Kuo-Shun, Otsu Wataru, Li Yao, Wang Heuy-Ching, Chen Shuibing, Tsang Stephen H., Chuang Jen-Zen, Sung Ching-Hwa	4. 巻 9
2. 論文標題 CLIC4 regulates late endosomal trafficking and matrix degradation activity of MMP14 at focal adhesions in RPE cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-48438-0	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 該当する

1. 著者名 Saito Masaki, Otsu Wataru	4. 巻 154
2. 論文標題 Mechanisms of cell proliferation through primary cilium	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Folia Pharmacologica Japonica	6. 最初と最後の頁 197 ~ 202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1254/fpj.154.197	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 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 該当する

1. 著者名 Otsu Wataru, Ishida Kodai, Nakamura Shinsuke, Shimazawa Masamitsu, Tsusaki Hideshi, Hara Hideaki	4. 巻 526
2. 論文標題 Blue light-emitting diode irradiation promotes transcription factor EB-mediated lysosome biogenesis and lysosomal cell death in murine photoreceptor-derived cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 479-484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.03.118	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12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 大津 航、石田 紘大、中村 信介、嶋澤 雅光、角崎 英志、原 英彰
2. 発表標題 次世代タバコ抽出物による角膜上皮細胞の鉄依存的細胞死
3. 学会等名 第40回日本眼薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲垣 賢、嶋澤 雅光、大津 航、荒木 智陽、沼田 洋輔、中村 信介、角崎 英志、原 英彰
2. 発表標題 カニクイザル網膜静脈閉塞症モデルの確立と病態解明
3. 学会等名 第40回日本眼薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石田 紘大、大津 航、矢古宇 智弘、中村 信介、嶋澤 雅光、角崎 英志、原 英
2. 発表標題 視細胞と角膜上皮細胞における青色LED光誘発細胞障害の分子メカニズム
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大津 航、安藤 菜、長内 大樹、神谷 聡、石田 紘大、中村 信介、嶋澤 雅光、原 英彰
2. 発表標題 運動ニューロンにおけるSMNタンパク質によるTFEBを介したライソゾーム関連因子の発現調節
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石田 紘大、知念 尚希、大津 航、中村 信介、嶋澤 雅光、角崎 英志、原 英彰
2. 発表標題 紙タバコ及び加熱式タバコ煙抽出物による角膜上皮細胞死の分子メカニズム
3. 学会等名 第138回日本薬理学会年会近畿部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 塩津 佑果、大津 航、中村 信介、嶋澤 雅光、角崎 英志、原 英彰
2. 発表標題 青色LED光障害に対するATF4経路を標的とした視細胞保護の検討
3. 学会等名 第138回日本薬理学会年会近畿部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石田 紘大、知念 尚希、大津 航、河野 宏行、中村 信介、嶋澤 雅光、角崎 英志、原 英彰
2. 発表標題 タバコ煙抽出物による角膜上皮細胞障害に対するエタノール抽出ブラジル産プロポリスによる保護作用
3. 学会等名 第11回岐阜薬科大学機能性健康食品研究講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石田 紘大、矢古宇 智弘、大津 航、中村 信介、嶋澤 雅光、角崎 英志、原 英彰
2. 発表標題 光誘発角膜上皮細胞障害に対する新規ラジカルスカベンジャーの保護作用
3. 学会等名 第137回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shinsuke Nakamura, Yuichi Saito, Tomohiro Yako, Wataru Otsu, Yuki Inoue, Aomi Muramatsu, Yasuhiro Nakagami, Masamitsu Shimazawa, Hideaki Hara
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 Otsu W., Hsu KS., Dunaief JL., Li Y., Tsang SH., Chuang JZ., and Sung CH.
2. 発表標題 MICE WITH RPE-SPECIFIC CLIC4 DEFICIENCY EXHIBIT AMD-LIKE CHANGES IN THE RETINA-RPE-CHOROID COMPLEX.
3. 学会等名 ARVO Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 信介、西中 杏里、大津 航、嶋澤 雅光、原 英彰
2. 発表標題 網膜静脈閉塞症モデルを用いた浮腫形成メカニズムに関する研究
3. 学会等名 第4回名大医薬系3部局交流シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大津 航, Hsu YC., Chuang JZ., and Sung CH.
2. 発表標題 新規錐体細胞トランスフェクション法を用いたペリフェリン2の一次纖毛輸送のメカニズムの解析
3. 学会等名 第 42 回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 正木仁	4. 発行年 2020年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 310
3. 書名 最新皮膚エイジングメカニズムと高機能性シワ改善化粧品の開発	

〔産業財産権〕

〔その他〕

岐阜薬科大学・バイオメディカルリサーチ講座のWebページ https://bmrqpu.wixsite.com/website

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