

令和 6 年 9 月 9 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03854

研究課題名(和文) エピゲノムによる生活習慣病の世代間継承と内在性オステオカルシンによる回避

研究課題名(英文) Studies on the effect of maternal uncarboxylated osteocalcin on the metabolic properties of next generation

研究代表者

平田 雅人 (Hirata, Masato)

福岡歯科大学・口腔歯学部・客員教授

研究者番号：60136471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：高シヨ糖高脂肪食を負荷した妊娠母体では胎児の肝臓グリコーゲンホスホリラーゼ(Pygl)遺伝子のプロモーター領域にDNAメチル化が起こり、出生後の産仔ではPygl発現量が少なく、肝臓内にグリコーゲンが溜まりやすくなり、脂肪分解に至りがたく中性脂肪が蓄積する事を明らかにした。妊娠中にオステオカルシン(OC)を経口投与するとDNAメチル化が軽減した。これにより産仔肝臓のPygl発現を回復させるとともに、(母体由来のOCをきっかけとするが)OC自身が自己再生的に増加してPygl発現をさらに増強することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生活習慣病、特に肥満に関わるDOHaD (Developmental Origin of Health and Disease; 生活習慣病胎児期起源説)の一例を分子メカニズムレベルで解明した学術的意義は大きい。また、妊娠期間中に投与したOCで、産仔の肥満を軽減する分子メカニズムも明らかにした意義も大きい。さらには母体に投与したOCが胎盤を介して胎児に、そしてさらに産仔に影響し肝臓内で自己再生的にOGが増える事を示した。今回の成果は、生活習慣病、特に肥満に対する新たな生理・薬理学的アプローチにつながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：An increasing amount of evidence indicates that an adverse perinatal environment contributes to a higher risk of metabolic disorders in later life of the offspring. We show that a maternal high-fat-high-sucrose diet during pregnancy causes metabolic disorders in the offspring via hypermethylation of the liver Pygl gene, encoding glycogen phosphorylase L, which mediates hepatic glycogenolysis. The lower expression of Pygl induced by the maternal diet causes the hepatic accumulation of glycogen and triglyceride in the offspring, which remains in adulthood. The administration of osteocalcin during pregnancy upregulates Pygl expression via both direct and indirect epigenomic pathways, resulting in the mitigation of the maternal diet-induced obesity and abnormal glucose and lipid metabolism in adulthood. We propose that maternal energy status is reflected in the hepatic glycogenolysis capacity of the offspring via epigenetic modification of Pygl and osteocalcin regulates glycogenolysis.

研究分野：生化学

キーワード：生活習慣病胎児期起源説 オステオカルシン グリコーゲンホスホリラーゼ エピゲノム one carbon metabolism

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

世界保健機関 (WHO) は、生活習慣の改善により予防可能な疾患を非感染性疾患 (NCDs: Non communicable Diseases) と総称しているが、これには生活習慣病全般が含まれる。NCDs は全世界で死因の約 70% (第 1 位) を占めることから (文献 1)、NCDs 制圧は世界規模の課題となっている。そこで、WHO は 2013 年に国際的な NCDs 制圧の目標として「25 by 25」(2025 年までに NCDs による 30-70 歳までの死亡率を 25% 削減する目標) を掲げ、NCDs の予防と管理の課題解決を提案したが (図 1)、道半ばの今、目標達成の困難さが窺える。

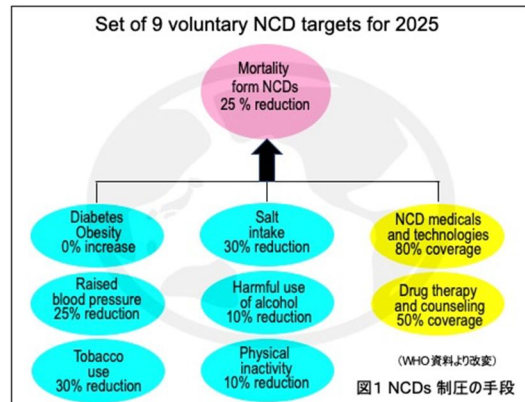
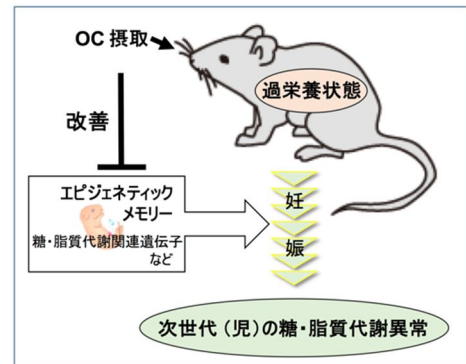


図 1 NCDs 制圧の手段

我が国の NCDs 対策を鑑みると、成人病という概念で病気の早期発見・早期治療を促す二次予防に始まり、現在では、病気の発症前に予防措置をとる一次予防の取組みにシフトしている。しかし、例えば摂取カロリーや肥満者は増加していないが、糖尿病罹患の増加は著しいこと等から疾患の因果を一貫して説明することが困難な事態が生じており、NCDs 制圧の限界が窺える。

ところで、「疾病 (生活習慣病) 胎児期起源説」(DOHaD, Developmental Origin of Health and Disease) (文献 2) という概念がある。これは胎児期から乳幼児期における種々の環境が、成人となってからの疾病発症リスクに影響することを疫学研究ベースで唱えた学説である。DOHaD の立場から見ると、この矛盾は当然と思える。そもそも NCDs 素因は、可塑性が高い胎児期から乳児期の栄養環境が規定する疾患関連遺伝子のエピゲノム異常を介して形成されていることが想定されるため、成熟後の一次予防の考え方だけでは、根本的な NCDs 制圧は不可能といえる。

近年、骨の状態 (有り様) が血中オステオカルシン (OC) に反映し、インスリンを起点とする糖代謝に関わる事が報告され、骨は運動器官であると共に内分泌器官でもあることが知られるようになった。 (文献 3)



(図 2) メタリックドミノの最上流は胎児期にあり、OC は胎内での負のメタリック素因を改善する

これらの背景から、我々は、OC が制御する多彩な臓器間ネットワークの総合的理解を目指し、OC の糖・脂質代謝改善機構について、細胞およびマウス個体レベルで検討してきた (文献 4,5)。それらの解析の中で、高脂肪食を摂取する妊娠母体に経口投与した OC が胎盤を通過して、直接あるいは間接的に産子の成熟後の肥満や糖・脂質代謝を改善することを見出し、DOHaD の一端に OC が関わることを示した (文献 6) (図 2)。エピゲノム変化が関わると思われるが、その機序は不明である。

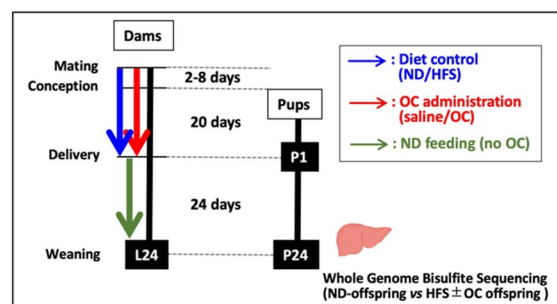
## 2. 研究の目的

上記の研究背景を踏まえ、本研究では妊娠母体の栄養状態 (特に過栄養) によって発現が制御される糖・脂質代謝に関わる遺伝子群のエピジェネクスとその世代間継承並びに OC による影響を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (i) 妊娠母体の飼育

妊娠母体は ND (normal diet) あるいは HFS (high-fat-high-sucrose diet) で飼育し、また OC 投与は妊娠期間のみ行う。出産以降は普通食で、OC 投与なしで 24 日間の授乳を経る (図 3)。



(図 3) 動物実験

### (ii) 仔の解析

産仔については主に雌を使用する。生後 24 日目 (離乳時) に肝臓の DNA メチル化解析 (パイサルファイト法) を行い、想定される責任遺伝子を同定する。それに基づいた分子生物学的かつ生化学的解析を行う (詳細は研究成果欄)。

## 4. 研究成果

### (i) 責任遺伝子の同定

バイサルファイト法による DNA メチル化解析を行い、HFS 負荷による DNA メチル化の変化が大きく、かつ糖・脂質代謝に関わるとされる 38 の遺伝子を同定した。その中から RT-PCR 法による mRNA 発現と DNA メチル化に相関のある 9 つの遺伝子を抽出、さらには OC 投与による緩和効果が観察された遺伝子として *Pygl* (glycogen phosphorylase をコードする遺伝子) を同定した。

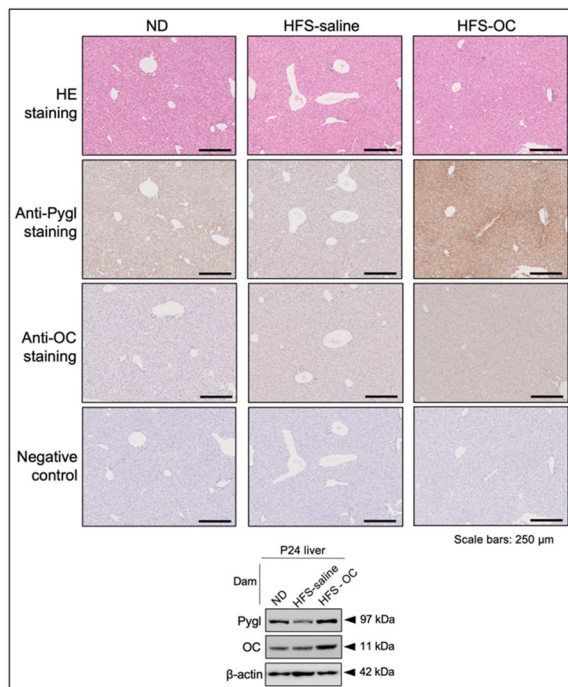
### (ii) *Pygl* が関わることの確認

*Pygl* のプロモーター領域のメチル化が HFS 負荷によって増加し、OC 投与によって緩和されることを確認した。また、DNA メチル化に関わる酵素 (DNMT3A) 並びに脱メチル化に関わる酵素 (TET1) のプロモーター領域への集積がメチル化程度と相関していることも確認した。さらには肝細胞株を用いた luciferase-reporter アッセイで、*Pygl* のプロモーター領域の確認と転写因子のリガンド刺激で *Pygl* 発現の亢進を観察した。

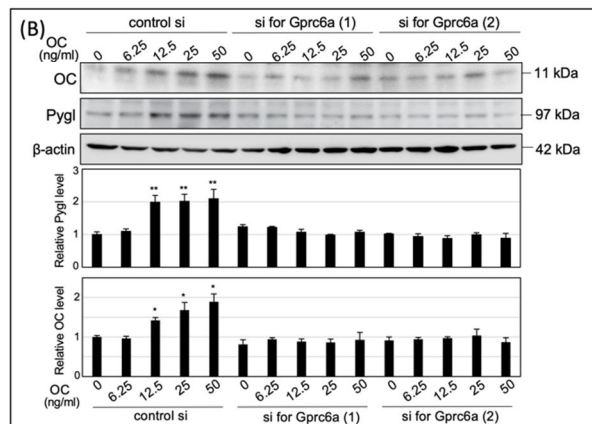
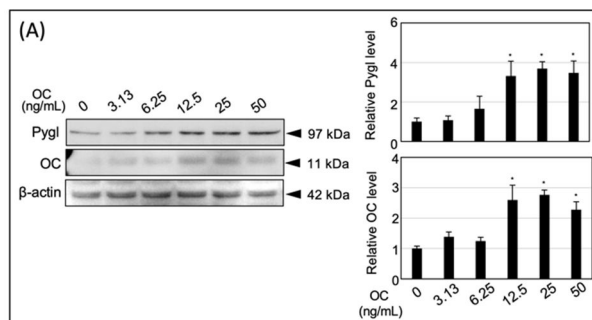
### (iii) *Pygl* 発現への OC の関わり

P24 歳の肝臓を用いて *Pygl* の発現をウエスタンブロット法並びに免疫組織学的染色で観察した。妊娠期間中の HFS 負荷でやや減少し、OC を投与したものでは著明に増加していることを確認した (図 4)。HFS 負荷による減少は *Pygl* 遺伝子のプロモーター領域のメチル化の亢進によると思われるが、OC 投与による著しい増加は脱メチル化に加えて OC による付加的な作用を窺わせた。肝臓に内在する OC を観察すると、母体の妊娠中に OC を投与された産仔では内在性 OC が増加していた。

そこで、肝細胞株を用いて OC 添加による *Pygl* の発現を調べた (図 5)。OC 添加の用量に応じて *Pygl* の発現が増加した。同様に OC 自身も増加した (図 5A)。OC と *Pygl* 発現の因果関係を検討するために、OC 受容体である GPRC6A の siRNA を用いたノックダウンを試みた。2 種類の siRNA を用いたが、



(図 4) 肝臓 (P24 歳) の免疫組織染色



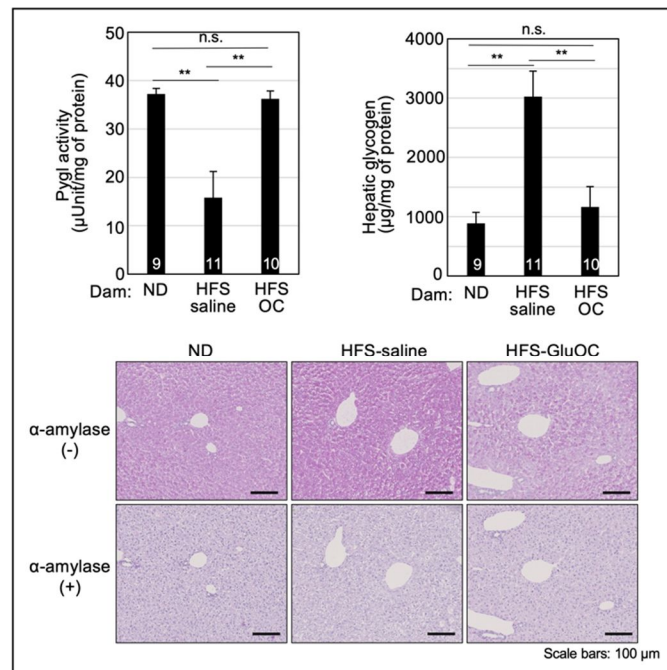
(図 5) 肝細胞における OC と *Pygl* の関係

も GPRC6A のノックダウンは観察された (結果不掲載)。GPRC6A がノックダウンされた細胞では対照 siRNA 処理では観察された *Pygl* 並びに OC の添加 OC 依存性の発現増加は認められなかった (図 5B)。この結果は、OC が特異的受容体を介するシグナル伝達によって *Pygl* と OC 自身の発現を促している事を示している。

母体の血中 OC は胎盤を通過することが報告されている (文献 7) ことに鑑みて、妊娠期間中に OC 投与された母体から生まれた産仔の肝臓では、母体からもたらされた OC に基づき自己再生的に OC が産生され、それに応じて *Pygl* 産生が促されている事が示唆される。

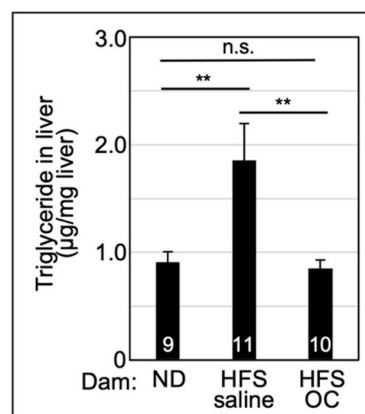
#### (iv) P24 齡産仔肝臓の代謝

P24 齡の産仔の肝臓におけるグリコーゲンホスホリラーゼ活性を検討した (図 6)。HFS 負荷の母体から生まれた産仔では Pygl 活性が低く、OC を投与された産仔では高かった。肝臓が貯蔵しているグリコーゲン量も分解酵素である Pygl 活性に呼応していた。図 6 下の組織図は肝切片の PAS 染色像である。α-アミラーゼ処理によって陰性化するのを確認した。



(図 6) P24 齡産仔肝臓の Pygl 活性と貯蔵グリコーゲン

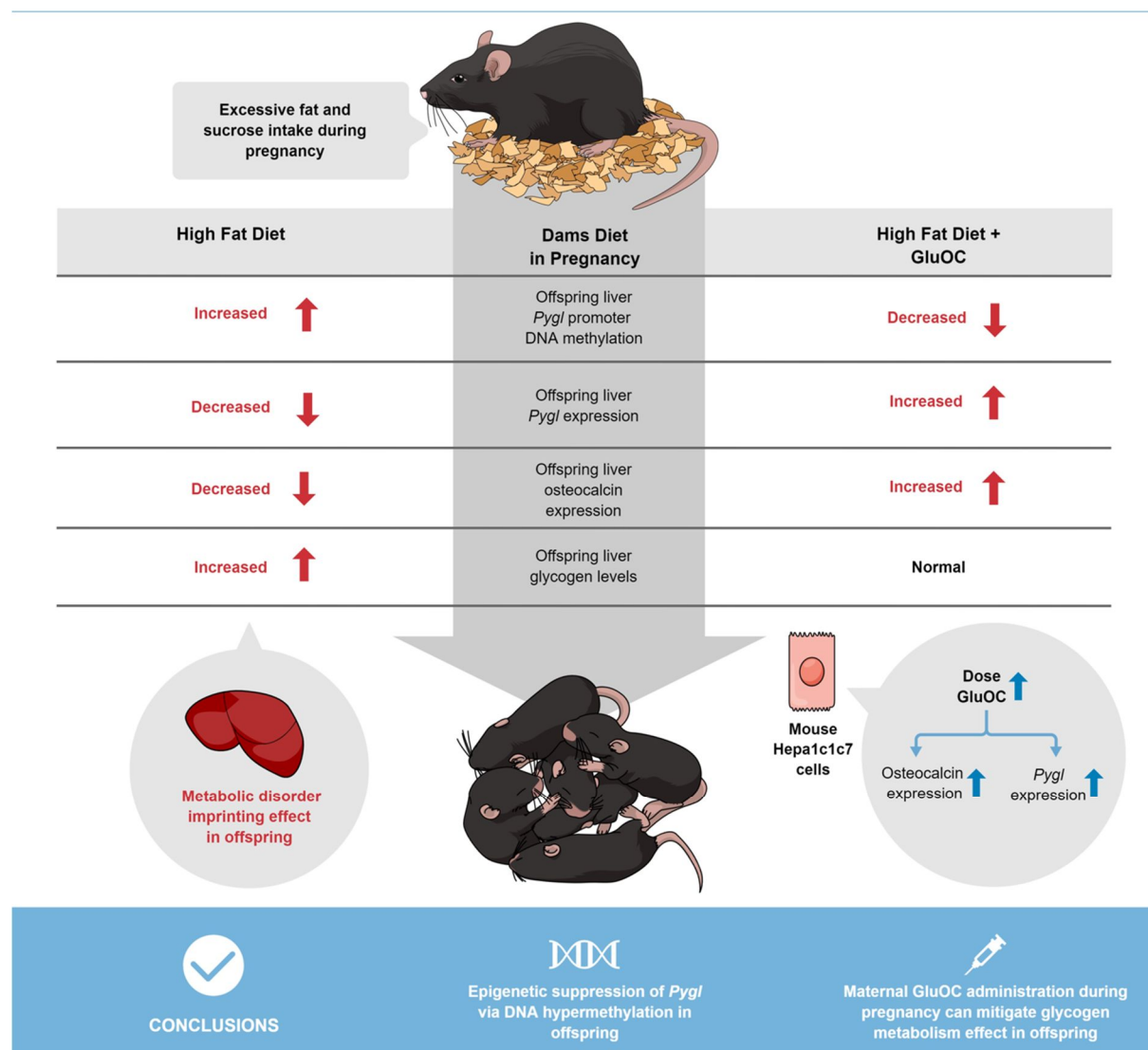
最も利用しやすい栄養素はブドウ糖である。ブドウ糖の貯蔵形態であるグリコーゲンが枯渇すると迷走神経系を介する liver-brain-adipose neurocircuitry によって脂肪組織の中性脂肪が分解され始める (文献 8)。したがって、Pygl 活性が低くグリコーゲンが残存する様な状況であれば脂肪分解は起き難く脂肪蓄積が起こるのであろう。肝臓内の中性脂肪を定量した結果を図 7 に示した。Pygl 活性やグリコーゲン量に一致する結果であった。



(図 7) P24 齡産仔の肝臓の中性脂肪

我々は、高シヨ糖高脂肪食を摂取する妊娠母体から生まれた産仔は生後、生活習慣病様の表現型 (肥満) を呈する様になる事 ; 妊娠中に OC を経口投与すると肥満が軽減される事を見出し、DOHaD の一例とそこに OC が関わることを示した (文献 6)。本研究では、高シヨ糖高脂肪食を負荷した妊娠母体では胎児の肝臓 Pygl 遺伝子のプロモーターに DNA メチル化が起こり、Pygl 発現量が少なく、肝臓内にグ

リコーゲンが溜まりやすくなり、脂肪分解に至りがたく中性脂肪が蓄積する事を明らかにした。妊娠中に経口投与した OC は DNA メチル化を軽減し、*Pygl* 発現を回復させるとともに、(母体由来の OC をきっかけとするが)OC 自身が自己再生的に増加し、*Pygl* 発現をさらに増強することを明らかにした。これらの成果を graphic abstract として下図に示す。



### <引用文献>

- (1) Kontis V et al. (2015) Lancet Glob Health 3, e746-757.
- (2) Waterland RA et al. (1999) Am J Clin Nutr 69, 179-197.
- (3) Ferron M et al. (2008) Proc Natl Acad Sci 105, 5266-5270.
- (4) Mizokami A et al. (2017) Biochem Pharmacol (Review) 132, 1-8.
- (5) Otani T et al. (2020) Adv Biol Regul (Review) 78, 100752.
- (6) Kawakubo-Yasukochi T et al. (2016) Obesity 24, 895-907.
- (7) Oury F et al. (2013) Cell 155, 228-241.
- (8) Izumida Y et al. (2013) Nat Commun 4, 2316.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Gao, J., Mizokami, A., Takeuchi, H., Li, A., Huang, F., Nagano, H., Kanematsu, T., Jimi, E. and Hirata, M.	4. 巻 135
2. 論文標題 Phospholipase C-related catalytically inactive protein acts as a positive regulator for insulin signalling in adipocytes.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs258584
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.258584	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 溝上 顕子、安河内（川久保）友世、大谷 崇仁、平田 雅人	4. 巻 54
2. 論文標題 オステオカルシンのホルモン作用	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 糖尿病・内分泌代謝科	6. 最初と最後の頁 1-8
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 Kawakubo-Yasukochi, T., Yano, E., Kimura, S., Nishinakagawa, T., Mizokami, A., Hayashi, Y., Hatakeyama, Y., Ohe, K., Yasukochi, A., Nakamura, S., Jimi, E. and Hirata, M.	4. 巻 54
2. 論文標題 Hepatic glycogenolysis is determined by maternal high-calorie diet via methylation of Pygl and this is modified by osteocalcin administration in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Metabolism	6. 最初と最後の頁 101360
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.molmet.2021.101360	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 Ando, E., Higashi, S., Mizokami, A., Watanabe, S., Hirata, M. and Takeuchi, H.	4. 巻 557
2. 論文標題 Osteocalcin promotes proliferation, differentiation and survival of PC12 cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 174-179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.03.146	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 Maetani, Y., Asano, S., Mizokami, A., Yamawaki, Y., Sano, T., Hirata, M., Irifune, M. and Kanematsu, T.	4. 巻 552
2. 論文標題 Expression of PRIP, a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate binding protein, attenuates PI3K/AKT signaling and suppresses tumor growth in a xenograft mouse model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 106-113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.03.045	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 Yoshimoto, S., Matsuda, M., Kato, K., Jimi, E., Takeuchi, H., Nakano, S., Kajioka, S., Matsuzaki, E., Hirofujii, T., Inoue, R., Hirata, M. and Morita, H.	4. 巻 895
2. 論文標題 Volume-regulated chloride channel regulates cell proliferation and is involved in the possible interaction between TMEM16A and LRRC8A in human metastatic oral squamous cell carcinoma cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 173881
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2021.173881	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 平田雅人	4. 巻 25
2. 論文標題 骨と臓器のコミュニケーションーオステオカルシンの研究からー	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FOOD Style 21	6. 最初と最後の頁 8-11
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 Mukai, S., Mizokami, A., Otani, T., Sano, T., Matsuda, M., Chishaki, S., Gao, J., Kawakubo-Yasukochi, T., Tang, R., Kanematsu, T., Takeuchi, H., Jimi, E. and Hirata, M.	4. 巻 296
2. 論文標題 Adipocyte-specific GPRC6A ablation promotes diet-induced obesity by inhibiting lipolysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100274	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 Yoshimoto, S., Morita, H., Matsuda, M., Katakura, Y., Hirata, M. and Hashimoto, S.	4. 巻 101
2. 論文標題 NFAT5 promotes oral squamous cell carcinoma progression in hyper-osmotic environment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 38-50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-020-00486-1	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 Otani, T., Mizokami, A., Kawakubo-Yasukochi, T., Takeuchi, H., Inai, T. and Hirata, M.	4. 巻 78
2. 論文標題 The roles of osteocalcin in lipid metabolism in adipose tissue and liver	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Advances in Biological Regulation	6. 最初と最後の頁 100752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbior.2020.100752	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 Mizuguchi Mineyuki, Yokoyama Takeshi, Otani Takahito, Kuribara Shiori, Nabeshima Yuko, Obita Takayuki, Hirata Masato, Kawano Keiichi	4. 巻 597
2. 論文標題 Structural and mutational analyses of decarboxylated osteocalcin provide insight into its adiponectin inducing activity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 1479 ~ 1488
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14618	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 Kawakubo-Yasukochi Tomoyo, Hayashi Yoshikazu, Hirata Masato	4. 巻 10
2. 論文標題 Effects of Maternal Nutrition on Oral Health in Offspring	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Current Oral Health Reports	6. 最初と最後の頁 69 ~ 74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s40496-023-00338-z	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12件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 平田雅人
2. 発表標題 骨はホルモンを分泌して健康長寿に役立つー若返り物質『オステオカルシン』の働きー
3. 学会等名 特定非営利活動法人・科学技術者フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安河内（川久保）友世、矢野恵奈、木村宗維、溝上顕子、林 慶和、安河内篤、中村誠司、自見英治郎、平田雅人
2. 発表標題 妊娠母体栄養がもたらす産子の肝グリコーゲン分解異常とオステオカルシンによる回避
3. 学会等名 第9回 日本DOHaD学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mizokami, A., Otani, T., Kanematsu, T., Jimi, E. and Hirata, M.
2. 発表標題 Role of G-protein coupled receptor GPRC6A in regulating adipose tissue metabolism
3. 学会等名 第63回 歯科基礎医学会学術大会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshimoto, S., Hirata, M. and Hashimoto, S.
2. 発表標題 NFAT5 promotes OSCC progression in the hyper-osmotic condition through the EGFR subcellular translocation
3. 学会等名 第63回 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東 泉、安藤瑛香、溝上顕子、渡邊誠之、平田雅人、竹内 弘
2. 発表標題 骨基質タンパク質オステオカルシンによるPC12の形態的・機能的修飾
3. 学会等名 第95回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安河内（川久保）友世、矢野恵奈、木村宗維、溝上顕子、林 慶和、安河内篤、中村誠司、自見英治郎、平田雅人
2. 発表標題 妊娠母体の高カロリー食摂取による産仔の肝グリコーゲン分解異常とオステオカルシンによる改善機構の解析
3. 学会等名 第95回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平田雅人
2. 発表標題 歯学研究の多様性
3. 学会等名 第62回 歯科基礎医学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平田雅人
2. 発表標題 骨ホルモン・オステオカルシンによるアンチエイジング
3. 学会等名 ifia/HFE JAPAN2023（国際食品素材 / 添加物会議並びに健康 / 機能性食品素材会議）（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Rongzhong Zhu, Yoshikazu Hayashi, Soi Kimura, Yuji Hatakeyama, Masato Hirata, Eijiro Jimi, Tomoyo Kawakubo-Yasukochi
2. 発表標題 The role of Id4 on energy metabolism in adipose tissue and liver
3. 学会等名 第65回 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐伯彩華、林慶和、吉本尚平、畠山雄次、平田雅人、自見英治郎、安河内（川久保）友世
2. 発表標題 イタコン酸によるがん細胞抗酸化システムの制御
3. 学会等名 第65回 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Rongzhong Zhu, Yoshikazu Hayashi, Soi Kimura, Ena Yano, Yuji Hatakeyama, Masato Hirata, Eijiro Jimi, Lo Yi-Chen, Tomoyo Kawakubo-Yasukochi
2. 発表標題 Regulation of hepatic fatty acid metabolism by Id4
3. 学会等名 第96回 日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐伯彩華、林慶和、吉本尚平、畠山雄次、平田雅人、自見英治郎、安河内（川久保）友世
2. 発表標題 がん細胞増殖におけるイタコン酸の役割
3. 学会等名 第96回 日本生化学会大会
4. 発表年 2023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
研究 分担者	安河内 友世 (川久保友世)  (Kawakubo-Yasukochi Tomoyo)  (70507813)	九州大学・歯学研究院・准教授    (17102)	
研究 分担者	溝上 顕子  (Mizokami Akiko)  (70722487)	九州大学・歯学研究院・准教授    (17102)	

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