

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07495

研究課題名（和文）A群レンサ球菌が産生する細胞外小胞の病原性発揮機構の解明

研究課題名（英文）Involvement in the pathogenic mechanism of Streptococcus pyogenes-derived extracellular vesicles

研究代表者

村瀬 一典（Murase, Kazunori）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：40710869

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）：本研究では、A群レンサ球菌（GAS）由来の細胞外小胞（EV）におけるプロテオーム解析から、GASのEVには種々の病原関連タンパク質が多く内包されており、宿主への病原性を促進すること、また、それらは侵襲性のGAS EVにおいて多く内包されていることがわかった。また、侵襲性GAS EVは細胞傷害活性を示す一方、非侵襲性GAS由来のEVは細胞毒性活性を示さず、菌の宿主細胞侵入時におけるオートファジーなどの抗菌機構を阻止する手段として活用され、感染後の細胞内環境での自身の生存戦略に寄与すると考えられる。本研究結果から、EVがGASの感染戦略及び病原性発揮機構において重要な因子であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EVsは多様な病原因子のデリバリーシステムとして機能し、細菌の感染戦略や病原性発揮の観点からも非常に重要な因子であると考えられているものの、その産生機構や宿主側との相互作用については、未だ不明な点が多い。そのため、EVsが直接的な病原性発揮機構の一つであることが明らかになれば、本研究の学術的意義は非常に大きい。さらに、EVsはワクチンとして利用することも可能である。近年、抗生物質耐性菌の増加など、細菌感染症に対する治療法の開発が急務であり、本研究による成果は、EVのワクチン応用のための効果的な利用法につながり、ワクチン開発における発展的な研究の一端になりうるため、社会的意義は高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Most bacteria naturally release spherical lipid-bilayered extracellular vesicles (EVs) containing proteins, nucleic acids, and virulence-related molecules, thus contributing to diverse biological functions including transport of virulence factors. The proteome profile in this study revealed that GAS EVs enclosed many virulence-related proteins such as streptolysin O and NAD-glycohydrolase, facilitating their pathogenicity, and invasive GAS EVs were more abundant than non-invasive counterparts. Also, invasive GAS EVs showed slow-dependent cytotoxic activity and the induction of cytokine expression, contributing to GAS pathogenicity directly. Although non-invasive GAS EVs did not show cytotoxic activity, they may be utilized as a means to prevent antibacterial mechanisms such as autophagy, leading to enhancement of their own survival in the intracellular environment after the infection. Our findings indicate that EVs could be a key factor for GAS pathogenicity in GAS-host interactions.

研究分野：細菌学

キーワード：細胞外小胞 A群レンサ球菌

1. 研究開始当初の背景

■ 細胞外小胞 (Extracellular Vesicles; EVs) とその役割

細胞外小胞は、真核および原核生物が細胞外に放出する球状の構造体である。真核生物においては、すでにエクソソームやマイクロベジクルなどが知られており (50-1000 nm)、寄生性の線虫では、内包する small RNA が宿主の免疫関連遺伝子の発現を抑制することで寄生戦略の一端を担うことが報告されている (Nat Commun, 2014)。一方、細菌において、大腸菌をはじめとする多くのグラム陰性菌が、20-250 nm の細胞外膜由来の小胞 (Membrane Vesicle; MV) を産生することが知られており (Fig. 1)、申請者自身も腸管外病原性大腸菌における細胞外小胞とその産生機構について報告している (Murase et al., J Infect Dis, 2016)。また、近年では、黄色ブドウ球菌やクロストリジウム・ディフィシルなどのグラム陽性菌からも MV の産生が確認されている (Nat Rev Microbiol, 2019)。

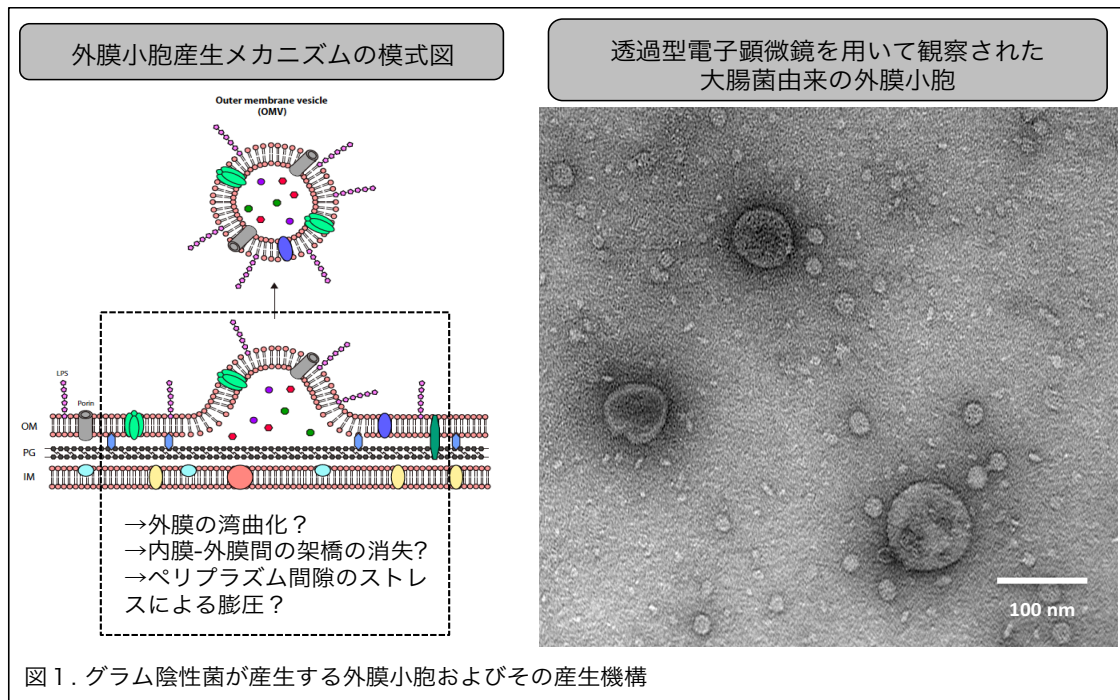


図1. グラム陰性菌が産生する外膜小胞およびその産生機構

これら MV は、細菌の恒常性に関与する一方、内包する様々な細菌由来分子 (核酸、タンパク質、細胞膜成分、種々のシグナル物質など) を宿主細胞へと輸送することが知られている。さらに、内包する細菌由来分子による宿主の免疫機構からの回避・不活化や宿主細胞への不可逆的な破壊など、多様な環境下に存在する細菌にとっては、その生存戦略における一種の飛び道具となり得る。一方、MV は、肺炎球菌のワクチン製造過程にも利用されており、他の細菌感染症に対するワクチン開発への応用面からも注目が集まっている。

■ A群レンサ球菌感染症およびその病態機序

本研究で解析対象とする A 群レンサ球菌 (Group A Streptococcus; GAS) は、上気道炎や化膿性皮膚感染症などの原因菌として知られるグラム陽性菌である。GAS は、2Mbp と比較的小さなゲノムサイズであるにも関わらず、溶血毒素や宿主細胞への付着、抗食作用などの多様な病原因子を有する (Science, 2004)。また、本菌による感染症は咽頭炎などの軽微な症状から、時に多臓器不全に進行し敗血症性のショック病態などの重篤な症状を引き起こし、国内では毎年 100-200 人の患者が報告されている。さらに、有症患者の約 30% が死亡していることから極めて致死率が高く、臨床的にも非常に重要な病原細菌である。

これまで、GAS が有する二成分制御因子の一つである CovR/CovS が、種々の病原遺伝子群の発現制御・パターンに直接的もしくは間接的に影響を及ぼす事が知られている (PNAS, 2002)。さらに、劇症型を呈した患者由来分離株の約半数で、CovR/S の変異が確認されており、本症の重症化に寄与すると考えられている。しかしながら、残りの半数は CovR/S の変異だけでは説明できず、未だ詳細な病原性発揮メカニズムと多様な病態傾向との関連は明らかになっていない。

2. 研究の目的

申請者のこれまでの研究成果から、黄色ブドウ球菌など他のグラム陽性菌同様、GAS もまた EVs を産生することを明らかにした。また、劇症型株由来の EVs は非劇症型株由来の EVs に比べ、約 4 倍量多く産生していることが分かった。

そこで、本研究では、1) GAS によって引き起こされる多様な病態および病原性発揮機構において EVs がどのように関与しているのかを明らかにすること、2) EVs による宿主側の免疫システムの解明、さらに、3) ワクチン開発のための理論的基盤の構築を目的とする。

EVs は多様な病原因子のデリバリーシステムとして機能し、細菌の感染戦略や病原性発揮の観点からも非常に重要な因子であると考えられているものの、その産生機構や宿主側との相互作用については、未だ不明な点が多い。そのため、EVs が直接的な病原性発揮機構の一つであることが明らかになれば、本研究の学術的意義は非常に大きい。また、これまで EV に内包される病原因子のみにしか着目されていなかったが、本研究では EVs による宿主側の免疫機構への干渉も考慮し、宿主側の遺伝子発現変動や small RNA (特に micro RNA) の挙動についても関連して検討するため、学術的独自性は高いといえる。さらに、EVs はワクチンとして利用することも可能である。近年、抗生物質耐性菌の増加など、細菌感染症に対する治療法の開発が急務であり、本研究による成果は、EV のワクチン応用のための効果的な利用法につながり、また、ワクチン開発における発展的な研究の一端になりうるため、学術的創造性は高いと考えられる。

3. 研究の方法

本研究では、「GAS 由来の EV と宿主とのインタラクションの解明」という目的を達成するため、以下の 4 項目について実施する。

① 臨床分離株 (劇症型・非劇症型) における EV 産生量の把握 (1 年目: 研究代表者)

劇症型群・非劇症型群由来の臨床分離株 (各 10 株) から EV を回収し、Nano Tracking Analyzer を用いて定量およびサイズ分布を確認する。その際、各群の病態と EV 産生量もしくはサイズ等に関連があるか否かを比較検討する。

② EV に内包されるタンパクの網羅的な同定 (1-2 年目: 研究代表者)

劇症型・非劇症型由来の臨床分離株 (各 4 株) について、ショットガンプロテオーム解析を行い、EV に内包されるタンパクを網羅的に同定する。また、劇症型群および非劇症型群における共通もしくは特異的なタンパクの同定を試みる。さらに、同定された各タンパク (特に、Streptolysin O や NAD-glycohydrolase などの病原性関連因子について) の定量結果および Gene Ontology エンリッチメント解析から、各群に有意に存在するタンパクとレパトリーを明らかにする。

③ In vitro での EV の細胞傷害性と免疫応答の検討 (2 年目: 研究代表者・研究分担者)

ヒト単球様 THP-1 細胞をマクロファージに分化させた後、劇症型群・非劇症型群株から回収・精製した EV を添加する。添加後、1h、2h、4h 後の LDH 活性を測定して細胞毒性・細胞傷害性を確認する。同時に、各種炎症性サイトカイン (IL-6、IL-8、IL-18、IL-1 β 、TNF α 、INF- γ など) についてリアルタイム PCR による遺伝子発現の動態解析を行う。上記関連遺伝子で発現が顕著に認められたものについてはその活性を経時的に ELISA 法により測定し、OMV によって惹起・誘導される免疫応答の仕組みを明らかにする。

④ In vivo での EV 活性と宿主側との相互作用 (2-3 年目: 研究代表者・研究分担者)

EV 活性による生体への直接的な病原性の影響を検証するため、劇症型由来株および非劇症型由来株から回収・精製してきた EV 溶液をマウスの腹腔内に投与し、投与後、24h、48h 後に生体内において惹起される免疫応答 (項目③で挙げた種々の炎症性サイトカインの誘導) を評価する。さらに、EV 投与による宿主側の遺伝子発現パターンへの影響を確認するため、血液および腹腔内細胞から RNA を回収し、マイクロアレイおよび small RNA 解析 (特に microRNA) を行う。

EV による生体への直接的な影響を及ぼす一方で、EV が GAS の感染成立に寄与 (易感染性への誘導) することも考えられる。そのため、EV を投与したマウスに劇症型由来株および非劇症型由来株を感染させ、マウスの生存率および宿主細胞内の生菌数を測定し、生体内における EV の感染戦略における間接的な役割を検証する。

4. 研究成果

① EV に内包されるタンパクの網羅的な同定

SSI-1 株と JRS4 株の EV におけるプロテオーム解析をした結果、それぞれ 56 個と 43 個のタンパク質が同定された (Fig. 1 A)。GAS の EV には、病原性関連タンパク質 (streptolysin O, NAD-glycohydrolase, C5a peptidase, exotoxin type A/C, and streptokinase)、細胞表面関連タンパク質 (D-alanyl-lipoteichoic acid biosynthesis protein, LPXTG cell wall anchor domain-containing protein, efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit protein, and ABC transporter-related protein)、代謝系関連タンパク質 (リボヌクレアーゼ Y、エンドペプチダーゼ、ヒドロラーゼ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ、) を含む酵素タンパク質、およびリボソームタンパク質等の種々の機能性タンパク質が含まれていた。このうち、38 個のタンパク質は両方の株で共通であり、SSI-1 株と JRS4 株に特異的に存在するタンパク質はそれぞれ 18 個と 5 個であった (Fig. 1 B)。共通に同定されたタンパク質を比較すると、SSI-1 株では 4 種類、JRS4 株では 15 種類のタンパク質がそれぞれ 2 倍以上多く存在していた (Fig. 1 C, D)。さらに、2 つの主要な病原性因子であるストレプトライシン O と NAD-グリコヒドロラーゼは、SSI-1 の方が約 4 倍も多く存在していた (Fig. 1 D)。また、表面抗原関連の mitogenic factor やいくつかの酵素タンパク質は、JRS4 でより多く (約 2~5 倍) 確認された。一方、他の病原性因子である C5a ペプチダーゼとエキソトキシタイプ C/ストレプトキナーゼは、それぞれ SSI-1 EV と JRS4 EV にのみ特異的に存在した。

さらに、同定されたそれぞれの EV 由来タンパクに関して Gene ontology (GO) 解析を行った結果、有意に異なる機能が確認された (Bonferroni 補正 P 値、 $P < 0.01$) (Fig. 2)。2 株の共通タンパク質は、3 カテゴリー (biological process, cellular components, and molecular function) で同様のエンリッチメントパターンを示す一方、SSI-1 では carbohydrate metabolic process (GO:0005975)、cell wall (GO:0005618)、external encapsulating structure (GO:0030312) がエンリッチされ、JRS4 では plasma membrane (GO:0005886)、membrane (GO:0016020) などに関係するタンパク質群が有意に存在することが明らかとなった。また、それぞれの株由来の EV に特異的に存在するタンパク質において、JRS4 では extracellular region (GO:0005576) のみがエンリッチされていたのに対し、SSI-1 では proteolysis (GO:0006508) や「ペプチダーゼを含む酵素活性に関わる 8 つの GO カテゴリーにおいてエンリッチされている傾向を示した。これらの結果は、両株における EV の産生機構は同じであると考えられるが、それぞれ異なる生物活性を持つ可能性があることを示唆している。

② エンドサイトーシス経路を介した EV の宿主細胞への取り込み
 これまで、EV が宿主細胞内に取り込まれ、EV に内包された細菌由来活性によって宿主細胞の生理機能を変化させることが報告されている (O'Donoghue and Krachler, 2016)。我々は、まず、精製した GAS 由来の EV と THP-1 細胞を用いて、その相互作用を確認した。共焦点レーザー走査型顕微鏡による観察から、培養 2 時間後において、dTHP-1 細胞の細胞質内に EV (DiI で標識) が取り込まれることが明らかとなった (Fig. 3A)。一方、4°C で培養した THP-1 細胞では、EV の取り込みは観察されなかった。EV の取り込みを定量化するために、DiI 標識 EV で処理した dTHP-1 細胞、または DiI 溶液のみで処理した dTHP-1 細胞を用いてフローサイトメトリーアッセイを行った。その結果、DiI 溶液のみで処理したコントロールと比較して、SSI-1 または JRS4 EVs を添加した dTHP-1 細胞では、より高い蛍光強度で異なるピークを示した (Fig. 3B)。また、SSI-1 および JRS4 EV を添加した細胞における取り込み比率は、それぞれ 53.1% および 50.3% であった。これらの結果から、GAS 由来の EV はエンドサイトーシス経路を經由して dTHP-1 細胞に

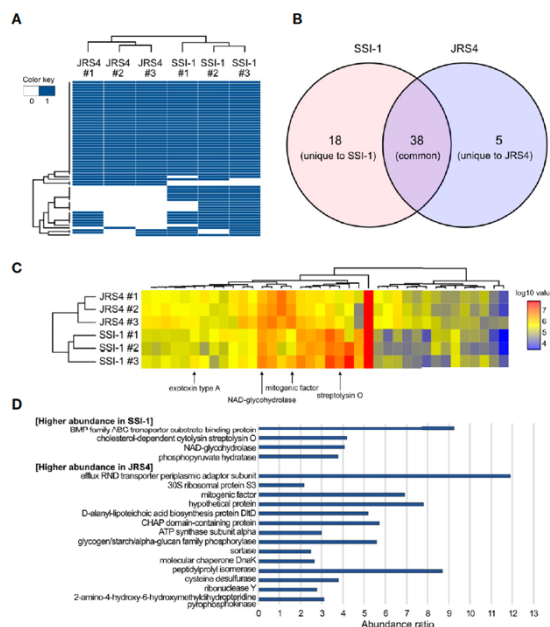


Fig. 1. Comparison of proteome profiles of EVs from *S. pyogenes* str. SSI-1 and JRS4. (A) Heatmap representation of clustering according to presence and absence of proteins in EV from SSI-1 and JRS4, with biological triplicates. (B) Venn diagram of EVs-derived proteins identified in SSI-1 and JRS4. (C) Heatmap representation of clustering according to log₁₀-transformed abundance values of common proteins identified in two strains. Arrows indicate well-known virulence factors in GAS. (D) Abundance ratio significantly higher (> 2.0) in SSI-1 or JRS4 that are shown in bar-chart.

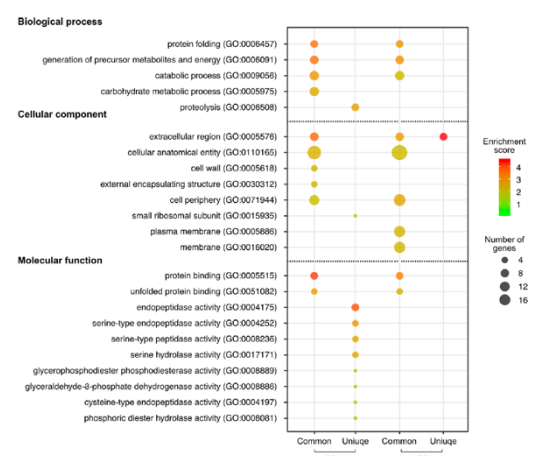


Fig. 2. GO enrichment analysis of proteins identified in EVs from SSI-1 and JRS4. GO enrichment analyses were performed with the whole SSI-1 and JRS4 proteins as references by using Fisher's exact test with p-value. Enrichment scores are calculated by $-\log_{10}$ -transformed p-value ($P < 0.01$), and the scores and the number of genes corresponding to each GO term are represented by color key and circle size, respectively. The numbers shown in the parentheses indicate GO number corresponding to the GO terms.

② エンドサイトーシス経路を介した EV の宿主細胞への取り込み

これまで、EV が宿主細胞内に取り込まれ、EV に内包された細菌由来活性によって宿主細胞の生理機能を変化させることが報告されている (O'Donoghue and Krachler, 2016)。我々は、まず、精製した GAS 由来の EV と THP-1 細胞を用いて、その相互作用を確認した。共焦点レーザー走査型顕微鏡による観察から、培養 2 時間後において、dTHP-1 細胞の細胞質内に EV (DiI で標識) が取り込まれることが明らかとなった (Fig. 3A)。一方、4°C で培養した THP-1 細胞では、EV の取り込みは観察されなかった。EV の取り込みを定量化するために、DiI 標識 EV で処理した dTHP-1 細胞、または DiI 溶液のみで処理した dTHP-1 細胞を用いてフローサイトメトリーアッセイを行った。その結果、DiI 溶液のみで処理したコントロールと比較して、SSI-1 または JRS4 EVs を添加した dTHP-1 細胞では、より高い蛍光強度で異なるピークを示した (Fig. 3B)。また、SSI-1 および JRS4 EV を添加した細胞における取り込み比率は、それぞれ 53.1% および 50.3% であった。これらの結果から、GAS 由来の EV はエンドサイトーシス経路を經由して dTHP-1 細胞に

取り込まれると考えられる。

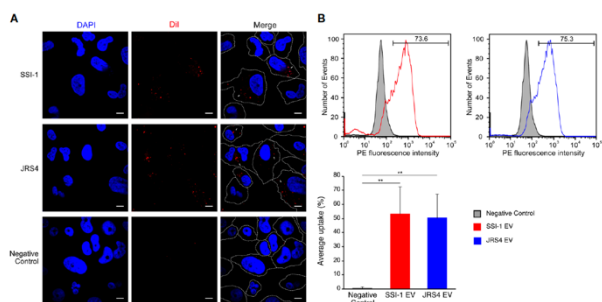


Fig. 3. Uptake of Dil-labeled EVs and the efficiency in dTHP-1 cells. (A) The dTHP-1 cells were co-incubated with 10 μ g of Dil-labeled EVs (red) solution for 2 h at 37°C and observed by confocal fluorescence microscopy. Cellular DNA was stained with DAPI (blue). Scale bar, 5 μ m. Dot lines indicate the border of individual cells. (B) Flow cytometric analysis of the fluorescence transferred by EVs into dTHP-1 cells. The staining of directly labeled cells and the negative control (cells treated with 4 μ M Dil solution) are shown as overlays. The PE fluorescence intensity was measured after 2 h incubation period. Average percentage uptake of Dil-labeled EVs into dTHP-1 cells was represented by bar chart with standard deviation of independent experiments. * $P < 0.01$.

③ GAS EV による宿主細胞への炎症応答の惹起と細胞障害性

宿主の免疫細胞に対する EV の取り込みによる影響を詳細に調べるため、まず dTHP-1 細胞における 4 つの主要な炎症性サイトカイン (IL-8、TNF- α 、IL-1 β 、および IL-18) の発現を転写レベルで評価した。37°C で 4 時間インキュベートした細胞において、SSI-1 と JRS4 の両方からの EV は、IL-8 の発現を著しく上昇させた (それぞれ 107.5 倍と 84.4 倍) (Fig. 4A)。また、TNF- α と IL-1 β においても、コントロールと比較して、SSI-1 と JRS4 の両方の処理サンプルで有意に高い発現を示したが、IL-18 の発現に有意な変化は見られなかった (Fig. 4A)。一方、4°C で培養した dTHP-1 細胞では、EV と共培養しても、転写レベルでサイトカインが誘導されることはなかったことから、これらの結果は EV の取り込みによってサイトカインの発現が上昇することを示唆している。

さらに、ELISA を用いて IL-8、TNF- α 、IL-1 β の産生量を検討した (Fig. 4B)。

TNF- α 及び IL-1 β の産生は、それらの転写プロファイルと一致し、SSI-1 または JRS4 の EV と共培養した細胞において誘導されていた。しかし、SSI-1 の EV で処理した細胞では、転写発現が強く上昇していたにもかかわらず、IL-8 の産生は見られなかった。

プロテオーム解析の結果、GAS の EV には SLO や Nga といった特定の病原性関連タンパク質が内包されていることが明らかとなっており、GAS の病原性に EV が関与していることが示唆された。GAS の病原性に対する EV の関与を調べるため、dTHP-1 細胞を GAS の野生株または slo 変異株由来の EV で処理し、細胞毒性を測定するとともに、形態変化を観察した。

SSI-1 野生型由来の EV を用いた dTHP-1 細胞では、形態変化を伴う大きな細胞障害性が認められたが、slo 変異体由来の EV で培養した細胞では認められなかった (Fig. 5A)。さらに、SSI-1 野生型の EV は dTHP-1 細胞で 16.1% の細胞毒性を示したが、slo 変異体ではこの活性が著しく低下した (3.1%) (Fig. 5B)。この結果は形態的な観察結果と一致し、SSI-1 由来の EV が dTHP-1 細胞において slo 依存的な細胞毒性を誘導していることを示している。一方、JRS4 野生型 EV は、SSI-1 野生型 EV に比べて、dTHP-1 細胞における形態変化が少なく、細胞毒性も低い (3.9%) ことがわかった。さらに、JRS4 Δ slo EVs についても、野生型 JRS4 と同様の低毒性を示す結果となった。また、ELISA によるサイトカインプロファイルでは、TNF- α について、SSI-1 および JRS4 Δ slo EV とともに野生株と同様の産生量あったが、IL-8 の産生量は JRS4 Δ slo EV においてのみ増加した (Fig. 5C)。これらの結果から、SSI-1 EV で処理した細胞では、SLO 非依存的に IL-8 合成経路または IL-8 分泌が抑制されていると考えられる。一方、野生型 EV で処理した場合と比較して、SSI-1 および JRS4 Δ slo の両方の EV で処理した細胞では、IL-1 β 産生量が減少したことから、SLO 依存的に IL-1 β の合成経路またはその分泌が抑制されたことが示された。

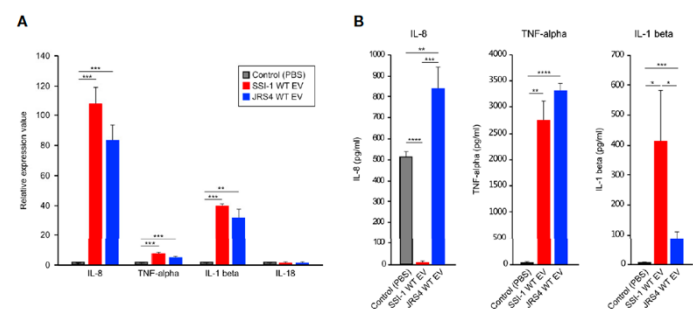


Fig. 4. Induction of cytokine expression in dTHP-1 cells treated with GAS EVs. 10 μ g of EVs solution was treated with dTHP-1 cells and incubated for 4 h at 37°C. Total RNA extracted from the cells were used for transcriptional level of IL-8, TNF- α , IL-1 β , and IL-18 by using real-time PCR assay (A), and the supernatants were directly used for ELISA assays of IL-8, TNF- α , IL-1 β (B). PBS-treated dTHP-1 cells were used as a control for the experiments, and all experiments were performed in triplicate. Data in this analysis represent the mean \pm SEM of independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

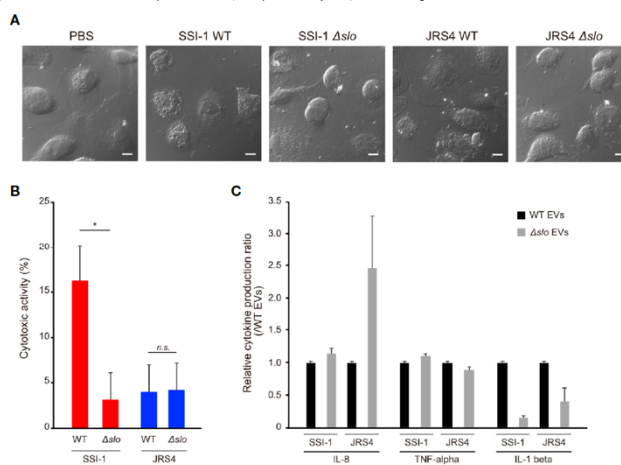


Fig. 5. Induction of cytotoxic activity and cytokine expression in dTHP-1 cells by EVs-mediated SLO. The dTHP-1 cells were co-incubated with 10 μ g of Dil-labeled EVs isolated from two GAS wild-type (WT) and the slo mutants (Δ slo) and incubated for 4 h at 37°C. After incubation period, the cells were observed by confocal microscopy (A), and the supernatants were used for cytotoxic activity assay (B) and cytokine production assay (C). Scale bar, 5 μ m. All experiments were performed in triplicate and data in B and C represent the mean \pm SEM of independent experiments. * $P < 0.05$; ns, not significant.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Murase Kazunori, Aikawa Chihiro, Nozawa Takashi, Nakatake Ayako, Sakamoto Kuniyo, Kikuchi Taisei, Nakagawa Ichiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Biological Effect of Streptococcus pyogenes-Released Extracellular Vesicles on Human Monocytic Cells, Induction of Cytotoxicity, and Inflammatory Response	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2021.711144	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 Murase Kazunori	4. 巻 14
2. 論文標題 Cytolysin A (ClyA): A Bacterial Virulence Factor with Potential Applications in Nanopore Technology, Vaccine Development, and Tumor Therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxins14020078	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村瀬一典
2. 発表標題 A群レンサ球菌が産生する細胞外小胞の病原性への関与
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021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	菊地 泰生 (Kikuchi Taisei) (20353659)	宮崎大学・医学部・准教授 (17601)	

6. 研究組織（つづき）

	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	相川 知宏 (Aikawa Chihiro) (70725499)	京都大学・医学研究科・助教 (14301)	

	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	オズワルド エリック (Oswald Eric)		

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