

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06949

研究課題名（和文）難治性神経疾患の克服を目指した神経系血管バリアーの人為的制御手法の確立

研究課題名（英文）Establishment of the procedure to regulate artificially the neural vascular barrier function for overcoming the intractability of neural diseases

研究代表者

池田 栄二（Ikeda, Eiji）

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30232177

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：神経系血管バリアーが病的に‘開いた状態’になる過程への高マンノース型糖鎖修飾Basiginの関与機構の一端を明らかにした。そして、病的に‘開いた状態’が病態悪化の中枢にある神経疾患のモデル動物を作製し、高マンノース型糖鎖修飾Basiginの特異的阻害により、神経系血管バリアーが病的に‘開いた状態’になる現象に対する予防効果とともに治療効果が得られることを示した。一方、‘閉じた状態’の神経系血管バリアーをBasigin刺激により人為的に‘開いた状態’にする手法については、これまでマウス解析系で得られた知見がヒト解析系でも再現されることが示され、創薬に向け研究を展開している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経系血管バリアーが病的に‘開いた状態’になることが病態悪化の中枢を担う神経疾患が多く存在する。また一方では、神経系血管バリアーの存在（‘閉じた状態’）は全身投与した治療薬が神経組織実質に到達できず治療の妨げになる側面も有している。したがって、現在の医療が有していない神経系血管バリアーの人為的制御手法（‘閉じた状態’‘開いた状態’）の確立に繋がる本研究成果の臨床現場への展開により、神経疾患の治療に大きな変革がもたらされ、多くの神経疾患の難治性克服が期待される。

研究成果の概要（英文）：In the present study, an aspect of the mechanisms underlying the involvement of basigin with high-mannose-type glycan in the pathological opening of neural vascular barrier was clarified. Furthermore, with the animal models with pathological opening of neural vascular barrier, basigin with high mannose-type glycan was shown to be available as the specific target for prevention as well as treatment against the pathological opening of neural vascular barrier. As for the artificial opening of neural vascular barrier through stimulation of basigin, the findings which had been obtained by experiments with mice were reproduced with human cells, and therefore the stage of drug development was started.

研究分野：病理学

キーワード：血液脳関門 脳血管内皮細胞 Basigin 難治性神経疾患 高マンノース型糖鎖

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

様々な難治性神経疾患の病態・治療に深く関与する神経系血管バリアー(血液脳関門など)を人為的に制御する手法(‘開いた状態’⇒‘閉じた状態’、‘閉じた状態’⇒‘開いた状態’)を確立し、神経疾患の難治性を克服すべく長く研究を行ってきた。本研究課題開始時までに我々は、「病的刺激 ⇒ 血管内皮細胞の細胞膜からのタイト結合構成分子 Claudin-5 の消失 ⇒ 神経系血管バリアーが開く」というカスケードを明らかにした。そして、血管内皮細胞の細胞膜における Claudin-5 の発現・局在を指標とした独自の実験系を確立し解析を進めた結果、血管内皮細胞の細胞膜に発現・局在している ADAM12、ADAM17、Basigin を神経系血管バリアー調節分子として特定した。特に Basigin については、神経系血管バリアーの人為的制御手法のための標的分子としての有用性が示された。さらに、Basigin のなかでも高マンノース型糖鎖修飾を受けた Basigin を特異的標的とすることにより、低酸素刺激により神経系血管バリアーが病的に‘開いた状態’になる現象を予防できることが示され、副反応を最小限に抑えるための特異的標的候補として高マンノース型糖鎖修飾 Basigin の有用性の解析を開始した。一方、‘閉じた状態’の神経系血管バリアーを人為的に‘開いた状態’にする手法については、Basigin の内在性リガンドである Cyclophilin A(以下、CypA)の1回静脈内投与により、神経系血管バリアーが一過性・可逆性かつ分子サイズ選択性に開口し、全身投与した薬剤の脳実質への送達が実現されることを示す研究成果も得られた。本研究期間では、神経系血管バリアーの人為的制御手法の確立に向け、上記の成果に立脚した計画を立て研究を展開した。

2. 研究の目的

Basigin を標的分子とした神経系血管バリアーの人為的制御手法を確立し、難治性神経疾患の難治性克服を目指す。本研究期間では、神経系血管バリアーが病的に‘開いた状態’になり病態悪化をきたす神経疾患に対し、高マンノース型糖鎖修飾 Basigin が特異的治療標的として有用であるかについて詳細な解析を行った。具体的には、これまでの低酸素刺激下での解析に加え、神経疾患の病変部に存在する低酸素刺激以外の種々の病的刺激下での解析を行った。また、Basigin 刺激により‘閉じた状態’の神経系血管バリアーを人為的に‘開いた状態’にする手法については、これまで我々がマウス解析系にて得た知見をヒト解析系へと展開し、創薬へと歩を進める。

3. 研究の方法

(1)細胞培養

マウス脳血管内皮細胞 bEnd.3 細胞(ATCC より購入)およびヒト近位尿細管上皮細胞 HK2(ATCC より購入)を正常酸素濃度下(20%O₂, 5%CO₂)あるいは低酸素濃度下(1%O₂, 5%CO₂, 30 min)に培養した。低酸素濃度下での培養には Oxygen-regulated incubator (ASTEC)を用いた。培養条件は、bEnd.3 細胞は DMEM/10%FBS、HK2 細胞は DMEM/10%FBS/Insulin-Transferrin-Selenium-A Supplement (Gibco; 51300-044)/human EGF (Recombinant, Animal Free) (Funakoshi; AF100-15) (5 ng/ml)とした。Endoglycosidase H (Endo H) 処理(500 units/ml)、Peptide-N-Glycosidase F (PNGase F) 処理(500 units/ml)、Cyclophilin A (CypA) 処理(300 ng/ml)、TNF- α (50 ng/ml)、kifunensine (20 μ /ml)を行った。

(2)Western blot 解析

タンパク質 sample を Laemmli sample buffer (2-mercaptoethanol を含む)にて処理後、SDS-PAGE (12.5%)にて展開し、polyvinylidene difluoride membrane に転写した。Membrane を、1次抗体 rabbit polyclonal antibody against Basigin (1 μ g/ml; Scrum)と反応させた。2次抗体は、horseradish peroxidase (HRP) conjugated goat anti-rabbit IgG (1/1000 dilution; Dako)を用いた。そして、Amersham ECL prime (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) と反応させ、chemiluminescence signal を Amersham Imager AI600 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)にて検出した。

(3)細胞表面分子の biotin 標識

培養細胞を 0.5 mg/ml EZ-LinkTM Sulfo-NHS-SS-Biotin (0.5 mg/ml; Thermo Fisher Scientific)と反応させた後、タンパク質抽出液を作製し、MagnaBind Streptavidin beads (Thermo Fisher Scientific)にてビオチン化タンパク質を得た。

(4)培養 bEnd.3 細胞および HK2 細胞の蛍光免疫染色

bEnd.3 細胞、HK2 細胞を PBS で洗浄後、100% methanol で 5 分間、室温にて固定した。続いて、10% normal goat serum で 30 分間、室温にて前処理を行った。Claudin-5 単染色には、1次抗体 rabbit polyclonal antibody against Claudin-5 (1/25 dilution; Thermo Fisher Scientific)と一晩、4℃にて反応させた。その後、2次抗体 Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (1/200; Thermo Fisher Scientific)と遮光下で 1 時間、室温にて反応させた。染色結果は、細胞膜における Claudin-5 発現レベルの定量解析も含め、焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss)にて評価した。

(5)bEnd.3 単層培養層および HK2 単層培養層の電気抵抗値 (TEER 値)測定

bEnd.3 単層培養層、HK2 単層培養層のバリアー機能の指標として電気抵抗値 (TEER 値)を測定した。細胞を 0.4 mm 孔を有する cell insert 上にて培養し、単層細胞層の TEER を Millicell ERS

Voltohmmeter (Millipore) を用いて測定した。

(6) 遺伝子導入

Basigin 特異的 small interfering RNA (siRNA) および Caveolin-1 特異的 siRNA の導入には、Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) を用いた。培養 bEnd.3 細胞への siRNA 導入では、confluent 状態の bEnd.3 細胞の培養液に、siRNA の最終濃度が 10 nM となるように、混合液を添加した。

(7) 動物実験 (図6A, D) (図7A, B)

Endo H 投与では、マウス (C57BL/6J, 7 週齢, オス) の尾静脈内に 187,500 units/kg を投与した。低酸素刺激実験 (4-7%, 36 時間) および CypA 刺激実験 (200 μ g/kg body weight) では、刺激1時間前に Endo H を投与した。糖尿病網膜症モデルマウスは streptozotocin (STZ) (50 mg/kg body weight) 3回腹腔内投与にて作製した。

網膜血管の透過性は、tetramethylrhodamine-conjugated lysine-fixable dextran (10 kDa) (Molecular Probes) および Hoechst stain H33258 (534 Da) (Sigma-Aldrich) をトレーサーとして、マウスの左心室内に投与後、網膜の進展標本を作製し、焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss) で観察評価した。低酸素濃度下の飼育には、酸素濃度調節機能付き動物飼育装置 (DEUCE, Co., LTD.) を用いた。山口大学動物使用委員会の承認を得て行った。

(8) 抗ヒト Basigin (= CD147) 機能性抗体の作製

動物免疫法およびファージディスプレイ法により抗ヒト Basigin (= CD147) 抗体を作製した。

4. 研究成果

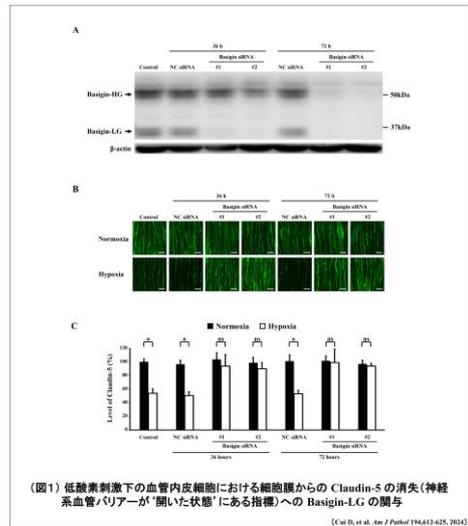
(1) ‘開いた状態’の神経系血管バリアーを人為的に‘閉じた状態’にする手法

神経疾患の病変部では種々の病的刺激が混在して神経系血管バリアーを病的に‘開いた状態’にし病態悪化をきたす。そこで本研究期間では、神経疾患に対する治療標的分子としての高マンノース型糖鎖修飾 Basigin の有用性を評価するため、これまでの低酸素刺激下での解析に加え複数の刺激下での *in vitro* 解析とともに疾患モデル動物を用いた *in vivo* 解析を行った。疾患モデルマウスとしては、神経系血管バリアーが病的に‘開いた状態’になることが病態悪化の中核にある糖尿病網膜症マウスを用いた。

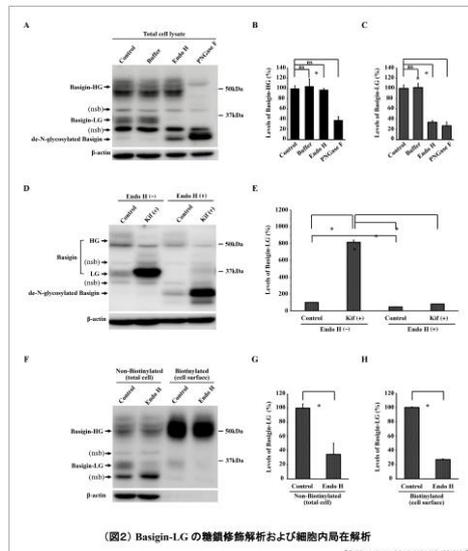
① 低酸素刺激下において神経系血管バリアーが‘開いた状態’になる現象への高マンノース型糖鎖修飾 Basigin の関与 [*in vitro* 解析]

bEnd.3 細胞における Basigin の発現を Western blot にて解析した結果、糖鎖修飾が異なる2種類の Basigin 分子 (Basigin-HG, Basigin-LG) の発現を認めた (図1 A)。そして、Basigin 発現阻害のため bEnd.3 細胞に Basigin 特異的 siRNA (#1 と #2 の2種) を導入し、36 時間後と 72 時間後に阻害効果を検索した結果、72 時間後では Basigin-HG, Basigin-LG ともに発現が消失しているのに対し、36 時間後では Basigin-LG の発現は消失しているのに対し Basigin-HG の発現は維持されていた (図1A)。これは、Basigin-HG と Basigin-LG の半減期が異なるためと考えられるが、siRNA 導入 36 時間後には Basigin-LG のみ発現を欠いた bEnd.3 細胞、72 時間後には Basigin-HG と Basigin-LG の両方の発現を欠いた bEnd.3 細胞が得られることを示している。そこで、それらの bEnd.3 細胞に低酸素刺激を加え細胞膜における Claudin-5 発現局在レベル (血管バリアー機能の指標) を解析した。低酸素刺激により、Basigin 発現阻害のない bEnd.3 細胞 (Basigin siRNA 導入なし) では細胞膜から Claudin-5 が消失するのに対し、Basigin-LG のみ発現を欠いた bEnd.3 細胞 (Basigin siRNA 導入 36 時間後) および Basigin-HG と Basigin-LG の両方の発現を欠いた bEnd.3 細胞 (Basigin siRNA 導入 72 時間後) では細胞膜からの Claudin-5 消失は見られなかった (図 1B, C)。したがって、低酸素刺激による細胞膜からの Claudin-5 消失には Basigin-LG が必須であることが示された。

bEnd.3 細胞に発現する Basigin-HG, Basigin-LG の生化学的解析および細胞内動態解析を行った (図 2)。bEnd.3 細胞の全タンパク質抽出液を、N-結合型糖鎖の全て (複合型糖鎖と高マンノース型糖鎖) を分解する酵素 peptide-N-Glycosidase F (PNGase F) あるいは N-結合型糖鎖のうち高マンノース型糖鎖のみを分解する酵素 endo- β -N-acetylglucosaminidase H



(図1) 低酸素刺激下の血管内皮細胞における細胞膜からの Claudin-5 の消失 (神経系血管バリアーが‘開いた状態’にある指標) への Basigin-LG の関与



(図2) Basigin-LG の糖鎖修飾解析および細胞内局在解析

(Endo H)と反応させ、Western blot にて解析した(図2A, B, C)。また、bEnd.3 細胞を kifunensine (小胞体・ゴルジ装置内において高マンノース型糖鎖が複合型糖鎖に変換する過程の阻害剤)にて処理、全タンパク質抽出液を作製、Endo H 非処理あるいは処理後に Western blot にて解析した(図2D, E)。その結果、Basigin-HG が複合型糖鎖修飾を受けた Basigin 分子、Basigin-LG が高マンノース型糖鎖修飾を受けた Basigin 分子であることが示された。高マンノース型糖鎖修飾を受けたタンパク質分子は、小胞体・ゴルジ装置における最終産物である複合型糖鎖修飾タンパク質分子産生への中間反応産物であり、稀な例外を除き細胞膜へと移動・局在することはないとされている。そこで、bEnd.3 細胞において高マンノース型糖鎖修飾 Basigin が細胞膜に発現局在しているかの探索を行った。Endo H 非処理あるいは処理後のbEnd.3 細胞の細胞膜表面分子をビオチンで標識した後、全タンパク質抽出液およびビオチン化タンパク質(Streptavidin beads にて沈降)を Western blot にて解析したところ、bEnd.3 細胞では高マンノース型糖鎖修飾を受けた Basigin が細胞膜表面に移動・局在していることが確認された(図2F, G, H)。

以上の解析結果から、低酸素刺激下において内皮細胞の細胞膜から Claudin-5 が消失する現象(神経系血管バリアーが‘開いた状態’になる現象)には、細胞膜に局在する高マンノース型糖鎖修飾 Basigin が必須分子として働くことが示された。また、細胞表面から高マンノース型糖鎖修飾 Basigin を除去する手法として、細胞の Endo H 処理が有用であることも示された。

②種々の刺激下において神経系血管バリアーが‘開いた状態’になる現象への共通した高マンノース型糖鎖修飾 Basigin の関与[in vitro 解析]

神経系血管バリアーが病的に‘開いた状態’になることが病態悪化の主因となる難治性神経疾患では、病変部に存在する複数の病的刺激が混在し血管バリアーを‘開いた状態’にしていると考えられる。神経疾患の難治性克服を目指す本研究では、種々の病的刺激により血管バリアーが‘開いた状態’になる現象に共通して関与する分子の特定が必要となる。そこで、高マンノース型糖鎖修飾 Basigin が、低酸素以外の刺激により血管バリアーが‘開いた状態’に現象の必須分子であるかの解析を行った。CypA 刺激あるいは TNF- α 刺激により、単層培養した Endo H 非処理 bEnd.3 細胞の細胞膜から Claudin-5 が消失し、単層の電気抵抗値(TEER 値: 単層バリアー機能の直接的指標)が低下する。一方、Endo H 処理 bEnd.3 細胞(細胞表面の高マンノース型糖鎖修飾 Basigin が除去された bEnd.3 細胞)では、CypA 刺激あるいは TNF- α 刺激下においても細胞膜からの Claudin-5 の有意な消失、単層の TEER 値の有意な低下は検出されなかった(図3)。

以上の解析結果から、細胞膜に局在する高マンノース型糖鎖修飾 Basigin が複数の病的刺激により神経系血管バリアーが‘開いた状態’になる現象に共通した必須分子であることが強く示唆され、病的に‘開いた状態’の血管バリアーを人為的に‘閉じた状態’にするための標的候補となると考えられた。

③高マンノース型糖鎖修飾 Basigin の血管内皮細胞の細胞膜への局在機構とその血管バリアー機能への関与[in vitro 解析]

我々は、bEnd.3 細胞において Basigin が Caveolin-1 と結合すること、Caveolin-1 発現を阻害された bEnd.3 細胞は病的刺激下においてもバリアー形成性格を喪失しないことを報告した。そこで本研究計画では、Caveolin-1 が高マンノース型糖鎖修飾 Basigin の細胞膜局在を調節する因子である可能性を検討した。Caveolin-1 特異的 siRNA の導入により Caveolin-1 発現が阻害された bEnd.3 細胞では、高マンノース型糖鎖修飾 Basigin の細胞膜への局在がみられず(図4A, B)、低酸素刺激、CypA 刺激あるいは TNF- α 刺激下においても細胞膜における Claudin-5 発現レベルと単層の TEER 値に有意な変化がみられなかった(図4C, D, E)。高マンノース型糖鎖修飾 Basigin の血管内皮細胞の細胞膜への細胞内移動・局在が、病的刺激下において神経系血管バリアーが‘開いた状態’になる現象に必須であること、その細胞膜への移動・局在に

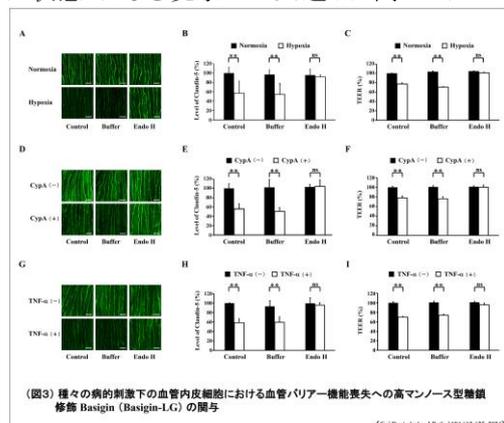


図3 種々の病的刺激下の血管内皮細胞における血管バリアー機能喪失への高マンノース型糖鎖修飾 Basigin (Basigin-LG) の関与

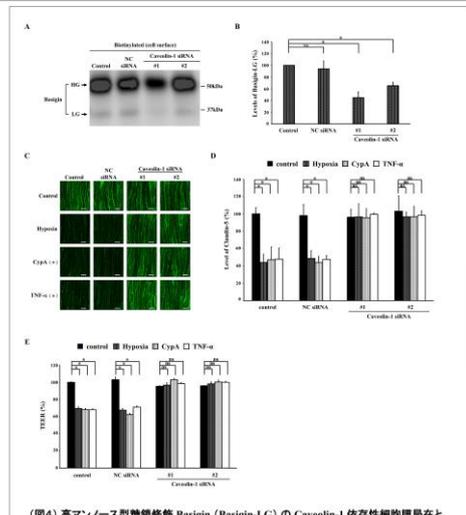


図4 高マンノース型糖鎖修飾 Basigin (Basigin-LG) の Caveolin-1 依存性細胞膜局在とその血管バリアー機能への関与

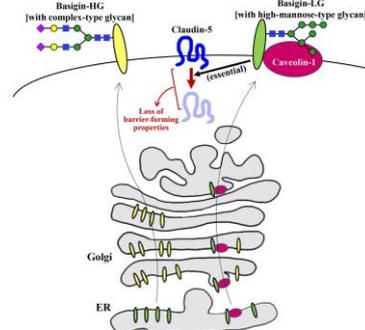
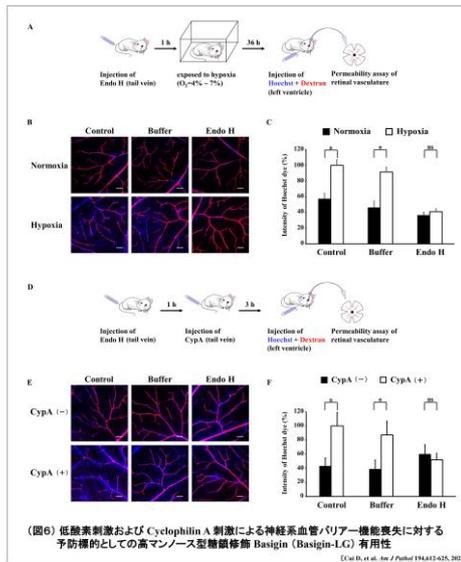


図5 高マンノース型糖鎖修飾 Basigin (Basigin-LG) の細胞膜局在および神経系血管バリアー機能調節への関与

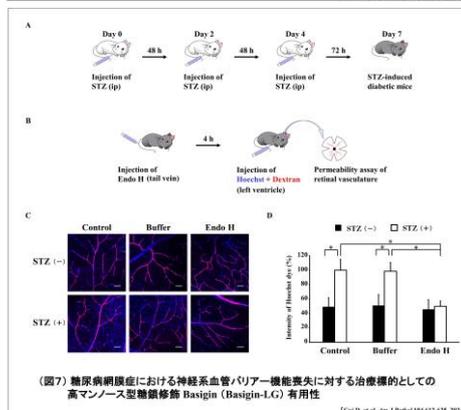
は Caveolin-1 が必須であることを示す興味深い知見と考えられる(図5)。

④神経疾患に対する治療標的分子としての高マンノース型糖鎖修飾 Basigin の有用性〔*in vivo* 解析〕

網膜組織は中枢神経組織の一部であり網膜血管は血管バリアーを形成しているが、低酸素環境下に飼育(図6A)あるいは静脈内に CypA を投与(図6D)されたマウスでは、網膜血管の透過性亢進(血管バリアーが‘開いた状態’)する現象が観察された。そして、事前に Endo H の静脈内投与が行われたマウスでは、低酸素環境下での飼育あるいは CypA 投与によっても網膜血管の透過性亢進は検出されなかった(図6B, C, E, F)。Endo H 静脈内投与により網膜血管内皮細胞膜の高マンノース型糖鎖修飾 Basigin が除去された結果と解釈され、神経系血管バリアーが病的刺激により‘開いた状態’になる現象を予防するための標的として、高マンノース型糖鎖修飾 Basigin が有用であることを示していると考えられる。続いて、病的に‘開いた状態’にある神経系血管バリアーを‘閉じた状態’にする治療標的としての高マンノース型糖鎖修飾 Basigin の有用性を検討した。モデルとしては、streptozotocin (STZ) 投与による糖尿病網膜症を用いた(図7A)。STZ の腹腔内投与により高血糖状態が誘導されたマウスでは、網膜血管の透過性が亢進した状態(血管バリアーが‘開いた状態’)となった。その網膜血管バリアーが‘開いた状態’にあるマウスの静脈内に Endo H を投与したところ、網膜血管の透過性が正常に戻った(‘開いた状態’にあった血管バリアーが‘閉じた状態’になった)(図7B, C, D)。この知見は、複数の病的刺激が混在し‘開いた状態’にある神経系血管バリアーを‘閉じた状態’に戻すための治療標的として、高マンノース型糖鎖修飾 Basigin の有用性を示していると考えられる。なお、Endo H の静脈内投与による有意な副反応は観察されていない。



(図6) 低酸素刺激および Cyclophilin A 刺激による神経系血管バリアー機能喪失に対する予防標的としての高マンノース型糖鎖修飾 Basigin (Basigin-LG) の有用性



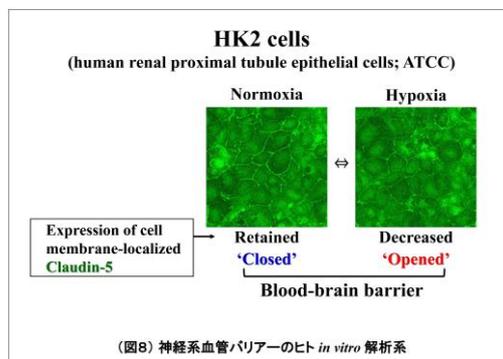
(図7) 糖尿病網膜症における神経系血管バリアー機能喪失に対する治療標的としての高マンノース型糖鎖修飾 Basigin (Basigin-LG) の有用性

上記①～④の解析結果からは、神経系血管バリアーが病的に‘開いた状態’になることが病態悪化の中枢にある神経疾患において、高マンノース型糖鎖修飾 Basigin が神経系血管バリアーを人為的に‘閉じた状態’に維持するための標的候補であることを示している。Basigin そのものではなく、Basigin の高マンノース型糖鎖を特異的標的とすることにより、副反応を最小限に抑えた新規治療法開発が期待される。

(2) ‘閉じた状態’の神経系血管バリアーを人為的に‘開いた状態’にする手法

これまで我々はマウス *in vitro* および *in vivo* 解析系を用いて、CypA 一回投与による Basigin 刺激により‘閉じた状態’の神経系血管バリアーを一過性・可逆性かつ分子サイズ選択的に‘開いた状態’にすることで、それにより全身投与された水溶性薬剤の神経組織実質への送達が実現されることを報告してきた。本研究期間では、マウス解析系で得た知見をヒト実験系へと展開し、創薬へと歩を進めた。

神経系血管バリアーのヒト *in vitro* 解析系の確立から開始した。まず、ヒト脳血管内皮細胞を用いたヒト実験系の確立を試みたが、安定した実験系は得られなかった。そこで、ヒト腎近位尿細管上皮細胞を用いる方針に変更した。腎近位尿細管上皮細胞は、バリアー形成血管内皮細胞と同様に Basigin (ヒトでは CD147) を発現し上皮バリアーを形成する。そして、我々自身の解析結果も含め、イヌ尿管上皮細胞 MDCK では、病的刺激への反応性を含め bEnd.3 細胞と同質のバリアー形成を有していることが示されている。今回、ヒト腎近位尿細管上皮細胞株 HK2 を用いたところ、bEnd.3 細胞と同じく、単層培養した HK2 細胞が CD147 を発現していること、Claudin-5 が細胞膜に発現・局在していること、低酸素刺激により細胞膜から Claudin-5 が消失し単層の TEER 値が低下することが確認された(図8)。この結果は、マウス解析系で得られている知見がヒト解析系でも再現されたことを意味しており、創薬に向けた大きな一歩と考えている。続いて、抗ヒト CD147 機能性抗体の作製に進み、抗体製剤候補を得るべく研究を進めている。



(図8) 神経系血管バリアーのヒト *in vitro* 解析系

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Cui D, Yamamoto K, Ikeda E	4. 巻 194
2. 論文標題 High-mannose-type glycan of basigin in endothelial cells is essential for the opening of blood-brain barrier induced by hypoxia, cyclophilin A or TNF-	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 612-625
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajpath.2023.11.007	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 崔 丹、森重 拓士、池田 栄二
2. 発表標題 血液脳関門の人為的制御手法確立に向けた基礎研究
3. 学会等名 第113回日本病理学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 崔 丹、森重拓士、池田栄二
2. 発表標題 高マンノース型basigin は血液脳関門の開口に関与する
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 崔 丹、池田 栄二
2. 発表標題 中枢神経系疾患における高マンノース型basigin の役割について
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
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
研究 分担 者	崔 丹 (Cui Dan) (40346549)	山口大学・大学院医学系研究科・准教授 (15501)	

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