

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591705

研究課題名(和文) ガンマセクレターゼ複合体新規調整分子によるアルツハイマー病治療法の開発

研究課題名(英文) Development of therapeutic agents for Alzheimer's disease focused by a new modulator of gamma-secretase complex

研究代表者

片山 泰一 (Katayama, Taiichi)

大阪大学・連合小児発達学研究所・教授

研究者番号：80333459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、アルツハイマー型認知症(AD)の原因物質として知られるAベータ産生の最終切断酵素であるガンマセクレターゼの新規調整分子をin vivo crosslink法を用いて同定を試みた。その結果、presenilin-1抗体、aph-1抗体によって共通に捉まる機能未知の分子GLが同定された。本分子は、ガンマセクレターゼ構成タンパク質に結合し、発現調節によりAベータ産生量が変化することから、新たなガンマセクレターゼ活性化調節因子であり、新たなAD予防・治療薬の開発に結びつく可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：A-beta is known as a most important molecule of Alzheimer's disease (AD) pathogenesis. We tried to identify a new modulator of gamma-secretase which is the final cutting enzyme of the A-beta production using in vivo crosslink method. As a result, unknown molecule GL was identified as a immunoprecipitant with both presenilin-1 and aph-1 antibodies. It is indicated that GL binds to other gamma-secretase components, and attenuation of GL expression by siRNA decrease A-beta production. These results suggest that regulation of GL expression might be a new therapeutic target for AD prevention or inhibition of its development.

研究分野：神経化学

キーワード：アルツハイマー病 プレセニリン ガンマセクレターゼ アミロイド 脳・神経 認知症 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎え、認知症患者数は年々増加している。なかでもアルツハイマー型認知症(AD)は増加の一途をたどっており、深刻な社会問題となってきている。AD患者は国内に50万~100万人、世界では800万人以上いるとされるが、これまで有効な治療薬はなく、約10年前、ADの病状の進行を遅らせる効果がある薬剤としてコリンエステラーゼ阻害剤「塩酸ドネペジル」が国内では初の抗AD薬として発売され、一定の効果を上げてきた。しかしながら、「塩酸ドネペジル」の効果の限界は多くの医師の感じているところであり、このような状況の中、真に有効な治療法が早急に望まれているが、効果的な診断法、根本的治療法は未だ確立されていない。この原因として、AD発症に関わる神経細胞死の分子メカニズムの解明が充分なされていないことが考えられる。ADは遺伝的背景によって分類すると、遺伝する家族性AD(FAD)と遺伝しない孤発性AD(SAD)に分けられるが、大半はSADである。しかしながら、いずれのADにおいても最終的に示される病理学的特徴はきわめて類似している。すなわち、A β の細胞外沈着による老人斑の形成、タウ蛋白質の異常なリン酸化による神経原線維変化、そしてそれら病変の周りの神経細胞の顕著な脱落である。従って、FAD発症に関わる原因遺伝子の変異がどのようにして最終的に上記病理像を引き起こすに至るのかを検討することはADの発症メカニズムに迫る糸口になるとの考えから我々は研究を行い、これまでに、「小胞体ストレス応答障害」がFAD、SADにおける共通したメカニズムの一部であることを提唱してきた(Katayama et.al. Nat.Cell Biol.,1999., Katayama et.al.,2001., Sato N, et.al. J.Biol.Chem., 2001.,Manabe et.al.Cell Death Diff., 2003. Genes Cells., 2007.etc.)。すなわち、FADでは原因遺伝子プレセニリン1(PS1)変異体が「小胞体ストレス応答障害」を引き起こし、SADでは、低酸素や、ある種の酸化ストレスにより生じる異常スプライシング変種(PS2V)が、「小胞体ストレス応答障害」を引き起こし、いずれも神経細胞死の一部に関わることを示した。さらに、最近の我々の研究によって、A β がこの「小胞体ストレス」となり、アポトーシス実行分子の一つカスプー4を活性化して、ADに見られる神経細胞死を引き起こしている可能性を明らかにした(Hitomi et.al.,J.Cell Biol., 2004.,Yukioka et al.,Neurochem Int.,2007)。一方、これまでに多くの研究者によるAD家系の遺伝学的解析により、常染色体優性の3つの遺伝子変異として第21番染色体上のアミロイド前駆体タンパク質遺伝子(APP)、第14番染色体上のプレセニリン1遺伝子(PS1)、第1番染色体上のプレセニリン2遺伝子(PS2)が発見され、これら遺伝子の変異は、いずれもA β の産生上昇、中でも極めて凝集性の高い42残基ペプチド(A β 42)の産生上

昇につながることで遺伝子改変動物や細胞を用いた研究により明らかとなった。加えて、これら遺伝子改変動物は、AD患者脳に観察されるようなアミロイドプラークを再現できることから、遺伝学的解析から病理学的知見をうまく説明できている。これらの事実は、A β がAD発症に関わる最も重要な原因物質であるというA β 仮説を科学的に裏付けるものであり、A β 産生を制御することがAD治療への最も近道であると考えられる。A β 産生制御方法に関しては、A β 産生に必要な切断酵素の制御が最も有力である。A β はアミロイド前駆体蛋白質(APP)が2段階切断を受けることにより産生される。すなわち、まずAPPがBACEと呼ばれる β セクレターゼによって膜近傍で切断を受け、切断され生じた(細胞膜側に残った)APPのカルボキシ末端側の中間産物(β -CTF)が基質となって γ セクレターゼによって膜内分解を受け、最終的にA β が産生される。我々は γ セクレターゼがA β 産生のための最終段階であることに注目し、 γ セクレターゼの活性制御を目指した研究を開始した。

2. 研究の目的

γ セクレターゼはプレセニリンタンパク質(PS1、PS2)を中心とした少なくとも4種類の膜蛋白質からなる高分子量膜タンパク質複合体であることが知られている。実際、PS1,2と複合体を作ることが知られているNicastrin、Aph-1、Pen-2とPSタンパク質を、酵母や昆虫細胞内で再構築すると確かにAPP切断活性が得られる。しかしながらその切断活性はあまり高くない。また γ セクレターゼの生物学的性質に関しては、基質特異性や γ セクレターゼ依存的な新たな切断「g切断」について、 γ セクレターゼがどのように調節されているかという重要な問題が未解決である。そこで最近では γ セクレターゼ複合体中には既存4種以外のタンパク質があり、この調節機能を担っているのではないかと考えられてきた。実際、4種類のタンパク質が1:1:1:1の比率で結合しているとしたとしても複合体の大きさは約220kDa程度に留まり、Blue Native gelなどによって得られた高い酵素活性を示す複合体の分子量(430kDa、670kDa)に比べはるかに小さい。この事実は、PS複合体に他のタンパク質が存在するという仮説を裏づけるものである。そこで、我々は新規 γ セクレターゼ結合分子をin vivoクロスリンク法という新たな技術を用いて取得し、A β 産生調節を可能にしたいと考えた。in vivoクロスリンク法はyeast two-hybrid法と同様、ある蛋白質に結合する蛋白質を検索する方法の一つで、マウスなど小動物を適当なクロスリンカーを用いて還流し、複合体蛋白質を固定して、これを適当な抗体を用いて免疫沈降し、沈降物の中に含まれる蛋白質を同定する方法である。この方法では、yeast two-hybrid法などで見つかる擬陽性を減らす事が出来

るだけでなく、*in vivo* で取得することから、 γ セクレターゼの活性や輸送に關与している蛋白質群を実際に脳内で機能している単位として取得することが出来る可能性がある。以上、本研究を行うことによって、これまで進められてきたADの診断、予防、治療に新たな選択肢の提供が期待できる。すなわち、診断への応用として、得られた新規蛋白質を新たなマーカーとしてAD確定診断に応用できる可能性がある。これまで用いられてきたA β やタウを脳脊髄液中から検出する方法やADNIなどの画像診断と併用することでこれまでにない精度の高いAD確定診断方法を確立できる。予防・治療的観点からは、単なるgセクレターゼの非選択的阻害剤は、NotchやCD44のような重要なシグナル伝達に影響を与え、重篤な副作用につながるおそれが充分考えられるが、我々の目指す新たなgセクレターゼ活性化調節因子の探索、 β 切断と γ 切断の調節機構の解析を進めることによって、ターゲットを明確にした、副作用のないADの予防・治療薬の開発が期待できる。また、画像診断で見つかる脳萎縮があるが、まだ臨床症状の現れていない患者に、予防薬として投与して、AD患者を減らすことに貢献できる。更に、根本的治療であるから発症しているAD患者の進行はそれ以上進まないの、重症AD患者であつてもリハビリやその他の失われた脳機能を改善する薬剤との併用で社会復帰できるまで期待できる。更に波及効果として、AD患者が介護者なしに日常生活をおくれるまでに回復すれば患者にかかる介護費用の軽減が期待できる。最終的に高齢化社会を迎えるにあたって国全体の介護に要する費用を大幅に削減することが可能になる。本研究がもたらすその他の付加価値：AD治療法の開発と言う点は無論、 γ セクレターゼがAPPの他にもNotchやCD44など多くのI型膜タンパク質を基質として細胞膜内切断を行うことから、 γ セクレターゼ複合体の生理的役割を明らかにする「膜内蛋白質分解機構」という研究テーマにも発展し、発生・分化に關連した研究と合流させることが出来る。そして、これら γ セクレターゼに関する分子レベルでの詳細な解析は、I型膜タンパク質切断を介して働く機構が障害された際に起きる全ての疾患の新たな薬剤開発のターゲットと成り得るものと考えられる。また、*in vivo* クロスリンク法は、ポストゲノム時代の分子解析技術としても大変期待できる方法であり、複合体構成蛋白質の同定に本法が強力なツールとなることを示すことが出来ると思われる。

3. 研究の方法

1) 新規 γ セクレターゼ結合たんぱく質の探索
新規 γ セクレターゼ結合分子を*in vivo* クロスリンク法という技術を用いて取得し(マウスなど小動物を適当なクロスリンカーを用いて還流し、複合体蛋白質を固定して、これを

適当な抗体を用いて免疫沈降し、沈降物の中に含まれる蛋白質を同定する) A β 産生に關わる種々の factor について同定を目指した。

in vivo クロスリンク法

Schmit-Ulmas, G らが考案した方法(Nat. Biotech., 2004)を一部修飾して行った。マウスをクロスリンカーで灌流固定し、複合体が可溶化剤(NP-40やTriton, SDS, Digitonin等で結合が失われないように一時的に固定する。例えば膜タンパク質 Aph-1, NCT, Pen-2はPS1抗体で免疫沈降すると、PS1と複合体を作っているの免疫沈降物の中から検出される。この時、Aph-1やNCT等と共に未知蛋白質 X, Y... が取得できる。アームの長さの異なる数種類のクロスリンカーを用いて検討し、どのクロスリンカーが最も適当か(クロスリンカーの種類: DTSSP, AEDP等)予備検討を行い、以下に述べる条件の短時間ホルムアルデヒドによるクロスリンクを選択した。具体的には、

- ddY系またはC57BL/B6系マウス(体重25g)にペントバルビタール50mg/kg, i.p. 麻酔(ヘパリン100U同時処置)を施し、正向反射、痛覚反射が消失したことを確認後、剣状突起付近を開胸し、経左心室に灌流固定用カニューレを挿入、直ちに右心房に切り目を入れ、25ml/minの流速で0.1MPBSにて正確に2分間血液をflashする。続いて、灌流固定液(2%ホルムアルデヒド)に置換し、正確に4分間同速度で灌流固定を行う。(液体窒素に保存するまで、全ての操作は室温で行う。)
- 上記6分経過後、直ちに断頭し、脳を摘出し、用意しておいた灌流固定液の入ったファルコンチューブに摘出した脳を移し外固定する(対照脳は全ての操作をPBSで行う。)
- 9分後(都合15分後)外固定した脳を固定液を良く除いて1.5ml血清チューブに移し、直ちに液体窒素により凍結する。
- 凍結した脳を、ダウンス型ホモジナイザーで30ストローク、各10秒間ホモジネート用バッファー(50mM NH₄Cl, 40mM Tris pH8.0)5mlでホモジネートする。(これらの操作および以下の操作は全て氷中で行う)次いで、抽出用バッファー(20mM NaCl, 0.6%デオキシコロール酸, 0.6% NP-40, 20mM Tris pH8.0)25ml添加し、水浴式ソニケータで5分間抽出する。
- これら抽出バッファー入りホモジネート液を大きなファルコンチューブに集めて、1000g×10min遠心分離し、夾雑物を除き、100000g×1時間超遠心し、上清を回収する。
- カップリングバッファー(50mM CaCl₂, 100mM MOPS, pH7.2)中で抗体とアフィニティゲルビーズ(Affi-Gel 10; Bio-Rad)を十分に共有結合させる(抗体1mgにつきAffi-Gel200 μ l, 4時間以上反応させる)
- エタノールアミン/塩酸でAffi-Gelを不活化。免疫沈降(IP)用バッファーで十分に洗浄した後、上記灌流固定後抽出された膜蛋白質分画と抗体-ビーズ複合体を24時間以上0

- ータにて免疫沈降させる。
- h) 免疫沈降物を十分に洗浄し、ウェスタンブロットにて陽性蛋白質の有無を確認。
- i) 2次元電気泳動後、期待されるスポットを切り出し、質量分析を行う。
- j) 得られた配列から分子を同定する。

2) 新規 γ セクレターゼ結合たんぱく質の機能解析

得られた蛋白質の発現解析

・得られた結合たんぱく質の基本的情報をバイオフィーマティクスにより得る。
ヒトおよびその他の動物におけるゲノム情報、トランスクリプト、モチーフ検索などによる機能予測、膜貫通領域の予測、リン酸化部位、糖鎖付加部位、等の蛋白質修飾の可能性の予測を行う。

・得られた遺伝子配列を適当なタグ (HA-, Myc-, Flag- etc.) をつけた発現ベクターにサブクローニングして、細胞内に発現させ、強制発現による基本的プロフィール (ウェスタンブロット、免疫組織化学により) を明らかにする。上記配列情報から得られる分子量予測と、実際にウェスタンブロット上での分子量を比較して、考察し、修飾の有無を確認した。
・抗体作成：上記発現情報やタグ付き強制発現系の結果を整理し、エピトープ検索を行い、アミノ末端、カルボキシ末端側を認識する抗体を作成した。

得られたタンパク質と他の γ セクレターゼ複合体構成タンパク質との相互作用

・上記特異的抗体を利用して、強制発現、内因性とも同蛋白質の細胞内局在プロフィールを明らかにした。具体的には、免疫組織化学的検討、遠心分離、Iodixanol gradient 等による密度勾配オルガネラ分画による細胞内局在の検討、他の γ セクレターゼ各サブユニット (PS1、NCT、Aph1、PEN2) の局在との比較を行った。

・各分子の特異的抗体を用いて免疫沈降を行い各 γ セクレターゼ構成蛋白質の結合状態を検討した。NP-40、CHAPSO、Digitonin 等、各種 detergent による膜分画を作成し、各サブユニットの結合状態が変化するか否かを調べた。

γ セクレターゼ複合体の modulator としての検討。

・Blue Native ゲルと二次元電気泳動法を組み合わせた高分子蛋白質の解析方法あるいは Glycerol gradient 密度勾配法による高分子蛋白質の分離を行った。

・ $A\beta$ 産生に及ぼす影響について同蛋白質を強制発現した APP 発現細胞を用いて $A\beta$ 量を測定し、次いで RNAi により、同タンパク質の内因性発現レベルを減少あるいは欠失させ、上記同様 $A\beta$ 産生に及ぼす影響を検討し、 γ セクレターゼ複合体の modulator としての機能を確認した。

分子メカニズムの検討

・細胞内局在の結果から、本来 γ セクレターゼ

複合体の機能を測定する小胞体、ゴルジ体のみならず、ミトコンドリアでの機能について着目して、ミトコンドリアの形態について観察を行った。

4. 研究成果

1) 新規 γ セクレターゼ結合たんぱく質の探索 *in vivo* クロスリンク法

マウス脳を、2%ホルムアルデヒドによる短時間 (6 分間内固定、9 分間外固定) クロスリンク (還流固定) または、クロスリンクなし (生理食塩水での還流) 後、脳を前述の方法でホモジネートし、それぞれ粗タンパク質を得、PS1 抗体、NCT 抗体、Aph1 抗体、pen2 抗体で免疫沈降を行い、アフィニティゲルにより精製し、質量分析装置により配列を確定した。すなわち、ガンマセクレターゼ構成タンパク質として知られる 4 種類の蛋白質のうち、プレセニン 1 (PS1) 抗体と Aph-1 抗体のいずれの抗体を用いても共通して免疫沈降される新規蛋白質 GL (暫定名) を得た。

2) 新規 γ セクレターゼ結合たんぱく質の機能解析

得られた蛋白質の発現解析

得られた結合たんぱく質の基本的情報をバイオフィーマティクスの手法により、2 番染色体に存在し、ゲノム上の推定配列から 4 種類のアイソフォームを持つと考えられる (図 1A)。カルボキシ末端領域に一回膜貫通領域を持つ (図 1B)。その他、明確な機能ドメイン、保持シグナル等の機能を類推するためのモチーフは得られなかった。

Genome structure and transcripts

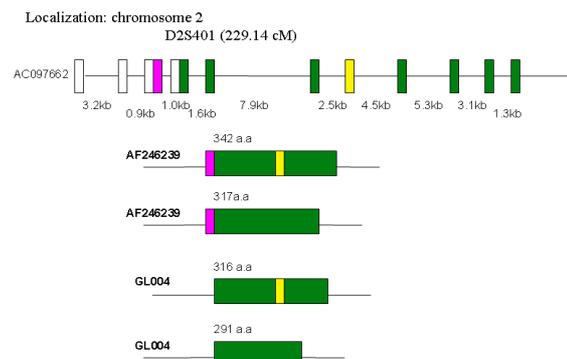
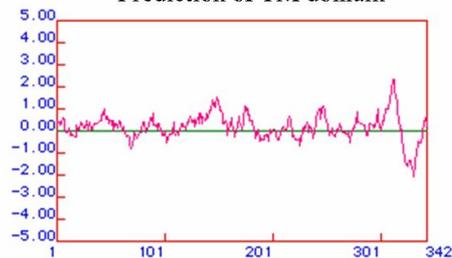


図 1A

Prediction of TM domain



TM domain at the C-terminal ?

図 1B

・特異的抗体を作成し、同蛋白質のプロフィールを明らかにする目的で発現解析、細胞内局在等を検討した。すなわち、GL 特異的抗体を用いて各種細胞における発現をマウス脳における発現と比較した。その結果、GL は4つのアイソフォームのうち291 アミノ酸からなる蛋白質が最も豊富に生体内に発現していること、マウス脳における発現では291 アミノ酸に次いで342 アミノ酸からなるアイソフォームが多いことが分かった。さらに、どのセルラインよりも GL は生体脳において発現が高いこと、セルラインの中では神経系の細胞に発現の高いことが明らかになった(図2)

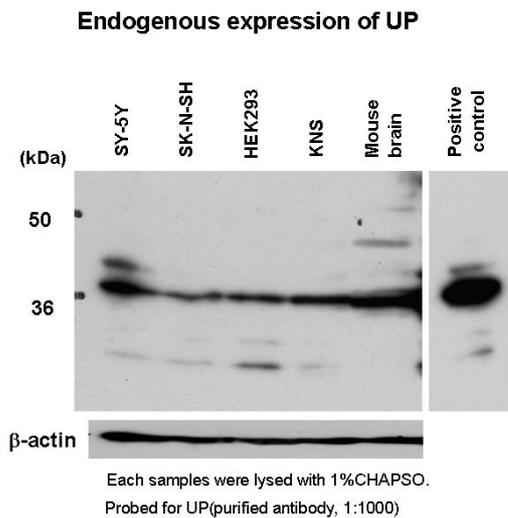
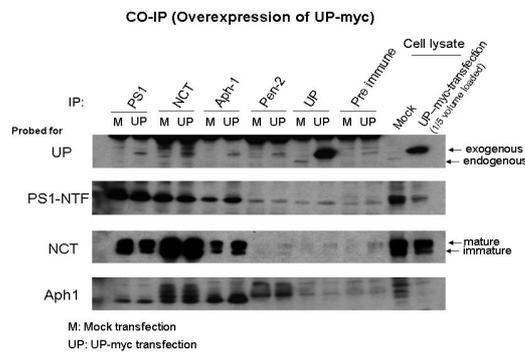


図 2. GL の発現の強さをウェスタンブロットにより確認。291 アミノ酸からなるアイソフォームを発現するプラスミドを構築し、positive control として GL を強制発現させた際に特異的 GL 抗体によって検出されるバンドに一致するサイズ約 36kDa に強いバンドが検出された。中でもマウス脳ホモジネートにおいて最も強い発現が認められた。UP:Unknown Protein(GL004)、beta-actin: internal standard

得られたタンパク質と他の γ セクレターゼ複合体構成タンパク質との相互作用
GL 蛋白質を強制発現させ、 γ セクレターゼ構成タンパク質の特異的抗体を用いて免疫沈降を行い、互いの結合状態を検討した(図3)



Co-IP performed in 1% CHAPSO, using membrane prep from HEK293 expressing UP-myc.
図 3.

GL に myc タグを施したコンストラクトを構築し、HEK293 細胞に強制発現させ、 γ セクレターゼ構成タンパク質 PS1、NCT、Aph-1、Pen-2 のそれぞれ特異的抗体によって免疫沈降を行い、空ベクター (Mock) 導入細胞と比較を行った。いずれの抗体で免疫沈降を行っても、Mock 導入細胞 (M) より GL 導入細胞 (UP) における免疫沈降物の GL 抗体陽性バンドが明確に認識された(図3)

γ セクレターゼ複合体の modulator としての検討。

・ $A\beta$ 産生に及ぼす影響について同蛋白質を強制発現した APP 発現細胞を用いて $A\beta$ 量を測定し、検討した。RNAi により、内因性発現レベルを減少あるいは欠失させ、上記同様 $A\beta$ 産生に及ぼす影響を検討した(図4)

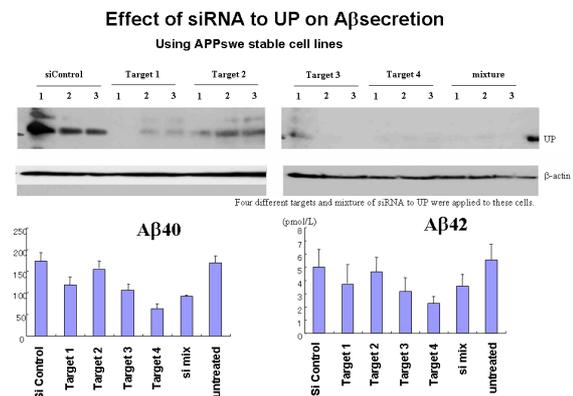


図 4. 4 種類の異なるターゲットをデザインした GL の siRNA オリゴを作成した。この siRNA オリゴを APP スウェーデン型変異を持つ stableHEK293 細胞に導入し、ウェスタンブロット解析により GL 発現の確認を行い、同時に培養上清中の $A\beta$ 含量をサンドウィッチ ELISA 法によって測定した。いずれのターゲットも内因性の GL 発現を抑制することができた。また4つのターゲットを等量配合した si mix によってもほぼ完全に GL 発現を抑制することができた。それぞれのターゲットにつき n=3 とし、上記ウェスタンブロットの結果を示した。また、同時に回収した培養上清の $A\beta$ 量はほぼ GL 発現量に依存していた。すなわち、GL 発現減弱は $A\beta$ 産生量を減少させることが明らかになった。

分子メカニズムの検討

Iodixanol gradient による密度勾配オルガネラ分画による細胞内局在の検討、他の γ セクレターゼ各サブユニット (PS1、NCT、Aph1、PEN2) の局在との比較を行った。ER マーカーとして BiP 抗体を、ゴルジ体マーカーとして GM130 を用い、Iodixanol gradient による密度勾配オルガネラ分画で他の γ セクレターゼ各サブユニットと比較したが、GL は、軽い分画 (細胞膜近辺、一部 ER-Golgi) と最も重い分画 (ミトコンドリア) に局在した(図5)

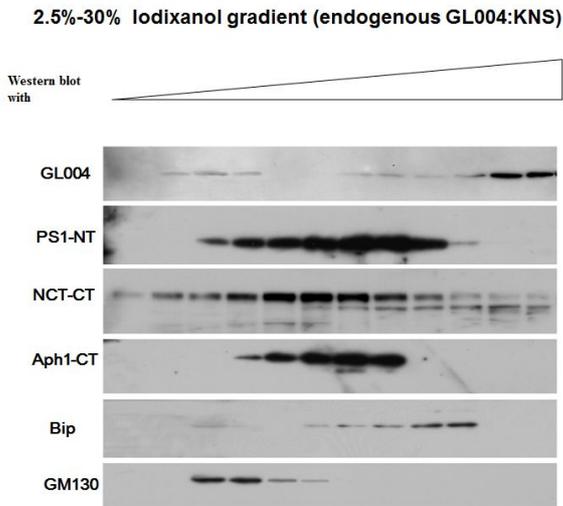


図 5.

従って、で明らかにした $A\beta$ 産生に関わる modulator としては、ほんの一部、 γ セクレターゼ複合体と関わっているが、大半は、ミトコンドリア分画に局在することが明らかになった。そこで、ミトコンドリアの分裂因子、融合因子の可能性に着目し、細胞内局在を強制発現、siRNA によるノックダウンと比較したところ、強制発現ではドット状の断片化したミトコンドリアが増加し、ノックダウン細胞では、tubular (細長い) ミトコンドリア形態が観察されたため、GL は、ミトコンドリア分裂因子である可能性が示唆された (data not shown)。

結論：

以上の結果より、我々は、これまで知られていた 4 つの γ セクレターゼを構成する蛋白質とは異なる新たな構成タンパク質 GL を in vivo crosslink 法という方法で取得することに成功した。この方法によって、 γ セクレターゼのみならず、他の複合体蛋白質取得のための可能性を開いた。また、GL はノックダウンによって、発現抑制を行うと $A\beta$ 産生が減少したことから、 $A\beta$ 産生を制御するための新たなターゲットを提供する。しかしながら、この抑制は多く見積もっても 50%程度の減少にとどまることから、 γ セクレターゼ構成タンパク質と考えるよりむしろ modulator (調整分子) と考えられた。その制御メカニズムについては、本研究では明らかにするには至らなかったが、少なくとも本分子 GL がミトコンドリア分裂因子である可能性を見出した。以上のことから、本研究で得られた蛋白質 GL は、新たな γ セクレターゼ活性化調節因子であり、新たな AD 予防・治療薬の開発に結びつく可能性が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

1. Iwata K, Matsuzaki H, Tachibana T, Ohno K, Yoshimura S, Takamura H, Yamada K, Matsuzaki S, Nakamura K, Tsuchiya KJ, Matsumoto K, Tsujii M, Sugiyama T, Katayama T, Mori N. N-ethylmaleimide-sensitive factor interacts with the serotonin transporter and modulates its trafficking: implications for pathophysiology in autism. *Mol Autism*. 5:33. doi: 10.1186/2040-2392-5-33. 2014.
2. Miyoshi K, Kasahara K, Murakami S, Takeshima M, Kumamoto N, Sato A, Miyazaki I, Matsuzaki S, Sasaoka T, Katayama T, Asanuma M. Lack of dopaminergic inputs elongates the primary cilia of striatal neurons. *PLoS ONE*. 9(5):e97918, 2014
3. Magome T, Hattori T, Taniguchi M, Ishikawa T, Miyata S, Yamada K, Takamura H, Matsuzaki S, Ito A, Tohyama M, Katayama T. XLMR protein related to neurite extension (Xpn/KIAA2022) regulates cell-cell and cell-matrix adhesion and migration. *Neurochem Int*. 63(6):561-569., 2013
4. Miyata S, Mizuno T, Koyama Y, Katayama T, Tohyama M. The endoplasmic reticulum-resident chaperone heat shock protein 47 protects the Golgi apparatus from the effects of o-glycosylation inhibition. *PLoS ONE*. 8(7):e69732., 2013
5. Takamura H, Koyama Y, Matsuzaki S, Yamada K, Hattori T, Miyata S, Takemoto ., Tohyama M, Katayama T. TRAP1 controls mitochondrial fusion/fission balance through Drp1 and Mff expression. *PLoS ONE*, 7(12):e51912, 2012

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1)研究代表者

片山泰一 (KATAYAMA, Taiichi)

大阪大学大学院・連合小児発達学研究所・教授

研究者番号：80333459

(2)研究分担者

山田浩平 (YAMADA, Kohei)

浜松医科大学・子どものこころの発達研究センター・講師

研究者番号：50588879