

令和元年9月4日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2014～2018

課題番号：26221308

研究課題名(和文) 骨髄異形成症候群(MDS)の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular pathogenesis in myelodysplastic syndromes (MDS).

研究代表者

小川 誠司 (OGAWA, SEISHI)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：60292900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 152,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、RNAスプライシング因子をはじめとするさまざまな遺伝子変異に関する、近年の申請者らの研究成果を踏まえて、それらが共存する場合に、どのようにして(生物学的に、また遺伝学的に)1個の細胞が分裂能・増殖能を獲得し、また造血環境と相互作用して、MDSの発症を誘導するのか、さらに、白血病への進展が生ずるのか、について、世界トップレベルのゲノム解析技術とマウスモデルを駆使した遺伝学的・機能的解析を通じて明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨髄異形成症候群(MDS)およびその関連疾患は、骨髄形成不全と急性骨髄性白血病への進展を特徴とする、高齢者に好発する慢性骨髄性腫瘍である。MDSの主な死因である骨髄不全および急性白血病に関して、本研究課題では、全研究機関を通じて、全ゲノムおよびRNAシーケンスを含む世界トップレベルの遺伝子解析技術とマウスモデルを駆使した手法を用いて、多様な遺伝子変異がMDSを発症させ、MDSを白血病へ進展させるメカニズムについて明らかにした。以上の研究成果は、学会発表をへて、現在論文化の予定である。

研究成果の概要(英文)：On the basis of our previous identification of genetic mutations, we planned to clarify pathophysiology in myelodysplastic syndromes (MDS) associated with combinations of such mutations. Using next generation sequencing technology and mouse models, we elucidated genetic and biological process of acquiring survival benefit, relating to hematopoietic environment, and initiating secondary leukemia from MDS. Of note, we comprehensively uncovered that such pathogenic process was resulted not from a single genetic event but combination of mutations and that such combination was not random and significantly associated with the order of acquiring each mutation. These findings suggest that clonal expansion in MDS is closely related to various genetic events but specific rules strictly controlled by environmental condition.

研究分野：悪性腫瘍のゲノム解析

キーワード：血液内科学 血液腫瘍学 骨髄異形成症候群

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群(MDS)およびその関連疾患は、血球の形態異常と骨髄形成不全を特徴とし、高頻度に急性骨髄性白血病(AML)への移行を呈する、高齢者に好発する慢性骨髄性腫瘍である。その病因となるゲノム異常について、本症を特徴づける変異が知られておらず、長く不明であった。しかしながら、2011年に全エクソンシーケンスによる申請者らの研究によってRNAスプライシング因子の系統的な変異が、本症に特異的かつ高頻度(45-85%)に認められることが明らかにされ、本症の病態の解明に大きな突破口が開かれた(Yoshida et al., Nature. 2011)。

### 2. 研究の目的

本研究では、同研究成果およびこれに続く近年の申請者らの研究成果を踏まえて、RNAスプライシング因子の変異、および、それらと共存する遺伝子変異が、どのようにして(生物学的に、また遺伝学的に)造血幹細胞ないし前駆細胞クローンの選択と進化をもたらし、また造血環境と相互作用して、MDSの発症を誘導するのか、さらに、白血病への進展が生ずるのか、について、世界トップレベルのゲノム解析技術とマウスモデルを駆使した遺伝学的・機能的解析を通じて明らかにすることにより、MDSの病態の理解とその克服に資することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 大量並列シーケンスによるMDSの変異の全体像とクローン進化の解明

MDSおよびその関連疾患に関して、全エクソン解析、標的シーケンスによる超高深度のシーケンスを行い、RNAスプライシング因子の変異その他の体細胞変異の挙動を網羅的かつ正確に追跡・解析することにより、MDSのクローン進化と多様性の拡大の過程を解析した。また、これらの変異とMDSの病理学的・臨床的特性との関連についても解析した。

#### (2) 変異の機能的・生物学的意義の解明

214症例のMDS患者骨髄単核球あるいはCD34陽性細胞検体から抽出したRNA検体を用いてRNAシーケンスを行い、各スプライシング因子の変異によってスプライス異常を生ずる標的遺伝子の同定を行った。さらに、遺伝子発現プロファイルによるMDSのクラスタリングや予後予測を行った。また、RNAスプライシング因子変異(Yoshida et al., Nature. 2011)およびコヒーシン複合体変異(Kon et al. Nat Genet. 2013; Yoshida et al., Nat Genet. 2013)について、変異アレルないし欠失アレルを導入したマウスモデルを作成し、造血系の表現型を解析した。造血幹前駆細胞RNAシーケンス、ChIPシーケンス、HiC解析を行い、スプライシング異常、発現変化やエピジェネシスの異常を検討した。さらに、MLL-AF9白血病マウスモデルを用いて、MDSのクローン進化のメカニズムを検討した。

### 4. 研究成果

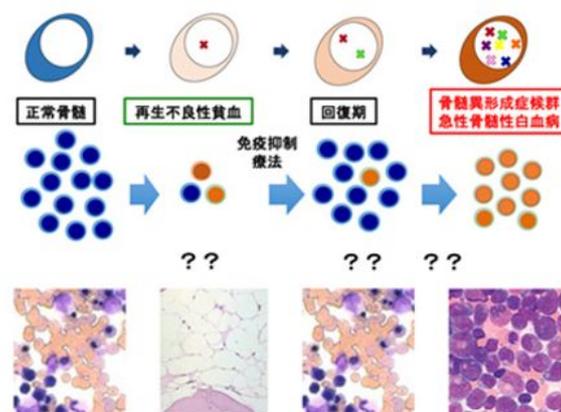
骨髄異形成症候群(MDS)およびその関連疾患は、骨髄形成不全と急性骨髄性白血病への進展を特徴とする、高齢者に好発する慢性骨髄性腫瘍である。MDSの主な死因である骨髄不全および急性白血病に関して、本研究課題では、全研究機関を通じて、全ゲノムおよびRNAシーケンスを含む世界トップレベルの遺伝子解析技術とマウスモデルを駆使した手法を用いて、多様な遺伝子変異がMDSを発症させ、MDSを白血病へ進展させるメカニズムについて明らかにした。

#### (1) 大量並列シーケンスによるMDSの変異の全体像とクローン進化の解明

##### 再生不良性貧血からMDSへのクローン進化の解明

後天性再生不良性貧血(AA)は特発性骨髄不全の主要な原因であり、その病態としては疫学を介した造血幹細胞の破壊、これに基づく汎血球減少・造血不全が挙げられている。AAには免疫抑制療法が有効であるが、通常、約15%の患者がMDSやAMLに移行する(図1)。AAからMDSに至る過程で生じるクローン進化について明らかにするために、計439症例・668末梢血DNA検体についての網羅的遺伝子変異解析を行った。その結果、約1/3の症例に体細胞変異を認め、このうちの約1/3は複数の変異をもっていた。ただし、その変異のアレル頻度は一般的に低く、別コホートのMDS患者では30.4%であったが、AA患者では9.3%であった。経時的に追跡できたケースでは、約70%の変異は診断時から存在していた。変異スペクトラムは特定の遺伝子に限られ(主にBCOR/BCORL1, PIGA, DNMT3A, ASXL1)、MDSと比較すると、DNMT3AとASXL1変異は共通していたが、BCOR/BCORL1とPIGA変異はAAに偏っていた。MDSやAMLで多くみられるTET2・スプライシング因子の変異はAAでは少なかった。変異の頻度は年齢とともに増加し、その変異の増加パターンには加齢に関

図1. 再生不良性貧血の自然経過



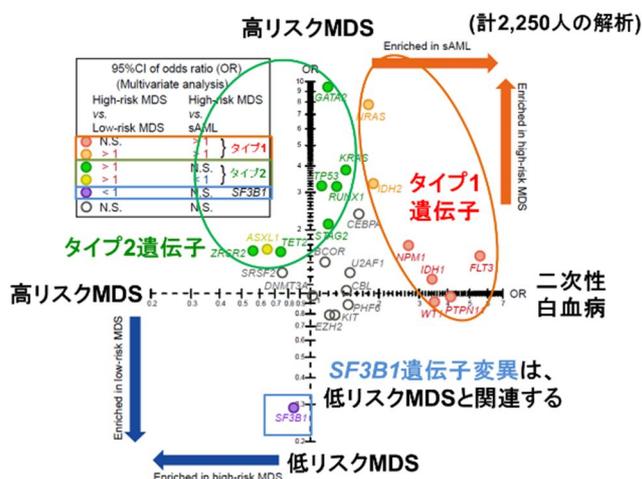
連した特徴を認めた。変異またはコピー数異常いずれかのクローナル造血は 47% で検出された。経時的には、DNMT3A と ASXL1 変異クローンは拡大したが、BCOR/BCORL1 と PIGA 変異クローンは不変または縮小傾向を示し、また予後良好な傾向にあった。ただし、経時変化は多くの場合予測不能で、主要な変異クローンの存在は必ずしも MDS/AML への進展と関連しなかった。以上、AA に関する包括的遺伝子解析のデータが今後、AA の分子病態・進展機序の解明につながるとともに、クローナル造血のモニタリングが臨床的有用性を発揮する可能性が期待された。(Yoshizato et al., N Engl J Med. 2015)

また、AA 症例における HLA 欠失を介した免疫回避メカニズムの背景にあるゲノム異常についても明らかにした。(Imi et al, Blood Adv. 2018 など)

### MDS におけるクローン進化の解明

MDS およびその関連疾患を有するこれまでの世界最大コホートの経時的サンプル計 2,250 例を対象として、全エクソン解析および標的遺伝子シーケンス解析を行った。その結果、高リスク MDS 例から二次性 AML に進展する際に高頻度に獲得されるタイプ 1 異常 (FLT3, PTPN11, WT1, IDH1, NPM1, IDH2, NRAS 変異) と、低リスク MDS から高リスク MDS へ進行する際に獲得されるタイプ 2 異常 (TP53, GATA2, KRAS, RUNX1, STAG2, ASXL1, ZRSR2, TET2 変異) を明らかにした(図 2)。さらに、タイプ 1 の異常は、有意に白血病化に関連し、タイプ 2 の異常陽性の症例は、MDS の進行に関わると考えられる。一方、SF3B1 遺伝子の変異をもつ症例は、タイプ 1 およびタイプ 2 の異常を持たなければ、まれにしか白血病にならず、最も予後が良好であった。このように、これらの遺伝子変異が病期進展の予測に役立つ可能性を提唱した。(Makishima et al, Nat Genet. 2017)

**タイプ1遺伝子は、より二次性白血病と関連し  
タイプ2遺伝子は、より高リスクMDSと関連する(図2)**



### MDS 造血幹細胞移植症例における網羅的ゲノム解析

MDS における唯一の根治的治療は同種造血幹細胞移植であるが、MDS 移植症例におけるゲノム異常の意義に関する知見は少ないことから、日本骨髄バンクより提供を受けた約 800 例の MDS の末梢血 DNA を対象として、69 遺伝子を標的とした標的シーケンスを実施した。コピー数異常を評価するためにゲノム全体に 1158 の SNP に対するプローブも設計し併せてシーケンスをした。75% の症例に変異を、40% の症例にコピー数異常・アレル不均衡を同定した。変異は、U2AF1、RUNX1、ASXL1、TP53 に高頻度に認め、コピー数異常に関しては、-7/del(7q)、del(5q)、17p LOH を高頻度に認めた。これらのゲノム異常は高リスク MDS で高頻度に認められることが知られていることから、移植症例で高リスク群が濃縮されていることが示唆された。詳細な臨床因子とともにゲノム異常の予後に与える影響を多変量解析で評価したところ、TP53、NRAS、CBL 変異、複雑核型が独立した予後不良因子として同定された。特に複雑核型を呈する TP53 変異陽性例の予後は極めて不良であった。全ハザードの 70% を臨床因子が占める一方、残りの 30% をゲノム因子が占めることが明らかになった。本研究により MDS 移植症例におけるゲノム異常の重要性が明らかになった。一方で、臨床因子も依然として非常に重要であり、複雑核型かつ TP53 変異陽性例に対する移植適応は、臨床因子とともに慎重に判断する必要があると考えられた。(Yoshizato et al., Blood. 2017)

### 脱メチル化剤治療下での TP53 変異陽性 MDS のクローン進化の解明

MDS の治療反応性マーカーの探索として脱メチル化剤の有効性と相関する因子を探索し、TP53 変異が短期的な奏功と有意に相関し、その場合には変異クローンの減少と造血能の回復を伴うこと、さらにその反応は短期間に喪失し長期成績の向上には結びつかないことを示した。さらに、TP53 変異が片アレルのみに生じた症例と両アレルが変異した症例を解析し、ゲノム不安定性・共存変異のパターン・予後への影響が全く異なることを示し、臨床的に異なる対応が必要な疾患であることを示した。(Nannya et al., 論文作成中)

### (2) 変異の機能的・生物学的意義の解明

#### MDS 症例のトランスクリプトーム解析

214 症例の MDS 患者骨髄単核球あるいは CD34 陽性細胞検体から抽出した高品質な RNA 検体を用いて RNA シーケンスを行い、スプライシング因子の変異が RNA スプライシング及ぼす効果を解析した。214 症例中、これまでに MDS で変異が報告されている SF3B1、SRSF2、

U2AF1、ZRSR2 遺伝子の変異はそれぞれ 28%、18%、5%、7%に認められ、それぞれの遺伝子について変異の有無によるスプライシングパターンの違いを検討した。SF3B1 変異例では、特徴的に 3' スプライス部位の誤認識が生じ、3' 側の新たなスプライス部位が認識されることによって異常なトランスクリプトが生ずること(図3)、一方、SRSF2 変異例では、エキソンの脱落や挿入が多数の遺伝子で生ずることが明らかとなった(図4)。また、U2AF1 遺伝子の変異はオルタナティブエキソンの利用と関係していた。また SF3B1 変異例ではヘム合成に関わる複数の遺伝子にミスプライシングが生じ、これらがこれらの変異に特徴的な環状鉄芽球の生成に重要な役割を担う可能性が示唆された。また、SRSF2 変異例でスプライシング異常が見られる遺伝子には、MDS で機能喪失型の変異が認められる EZH2 が含まれており、SRSF2 変異で高頻度にみられるスプライシングバリエーションでは早期に終止コドンが出現し、変異と同様に最終的に蛋白量が低下して MDS 発症に関わっていると考えられた。(Shiozawa et.al., Nat Commun. 2018)

さらに、MDS 症例は、遺伝子発現プロファイルの観点から白血病進展と密接に関連した 2 つの病型に分類可能であること、またこれを分類するために必要な 9 遺伝子を同定し、予後予測に有用であることも明らかにした(Shiozawa et.al., Blood 2017)。

図3 SF3B1 変異とスプライシング異常

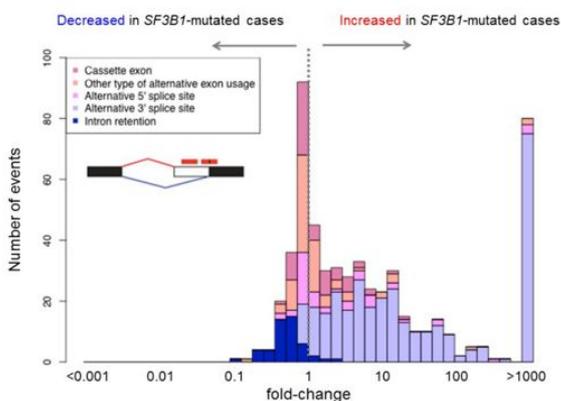
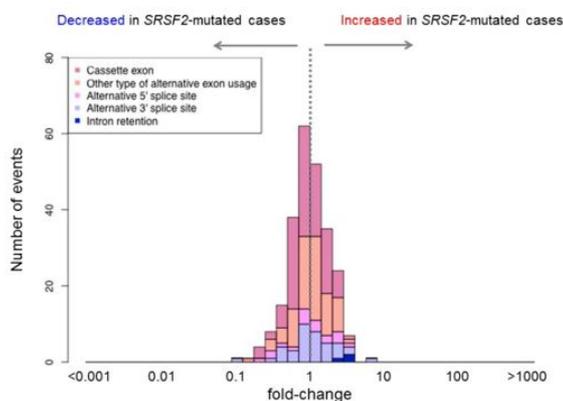


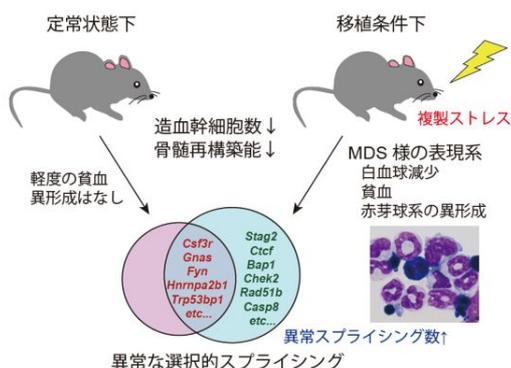
図4 SRSF2 変異とスプライシング異常



#### マウスモデルを用いた機能解析

1. RNA スプライシング因子の機能獲得型変異 SRSF2 変異に関する条件的ノックインマウスの作成および機能解析を行った。1) *Srsf2* P95H 変異マウスは大球性貧血を示すものの長期観察 (~2 年)にて MDS を発症しない、2) *Srsf2* 変異マウスは造血幹前駆細胞数の減少と骨髄再構築能の低下を示す、3) 致死量放射線照射したマウスに *Srsf2* 変異骨髄細胞を移植すると、レシピエントマウスは MDS 様の表現型、および造血不全による生存率低下を示す、4) *Srsf2* 変異造血幹前駆細胞は、多数の標的遺伝子(*Csf3r*, *Fyn*, *Gnas*, *Hnrnpa2b1*, *Trp53bp1* など)において、異常カセットエキソンを代表とするスプライシング異常を示す、5) *Srsf2* 変異造血幹前駆細胞は、移植のストレス下において MDS 症例に特徴的な発現異常を示し、スプライシング異常をもつ遺伝子数の増加を伴う、ことを明らかにした(図5)。*Srsf2* 変異の単一の効果では MDS を発症しないものの、移植による造血ストレス下で MDS 発症が促進されるという観察結果からは、加齢による遺伝子異常の蓄積や造血環境が病態に重要な役割を果たすことが示唆された。(Kon et. al., Blood 2018)

図5. *Srsf2* 条件的ノックインマウスの解析

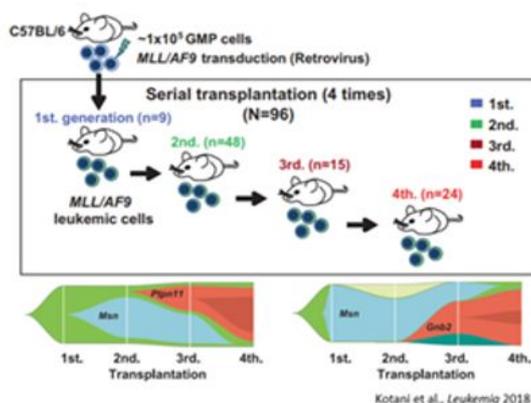


2. MDS で高頻度に変異を認めるコヒーシ複合体 STAG2 遺伝子に関する条件的欠失マウスの解析を行った。Stag2 変異造血幹細胞は、自己複製能亢進および分化異常を呈すること、Hi-C 解析を通じて、Stag2 欠失によりコヒーシを介したエンハンサーとプロモーター間の短距離ループの形成が阻害されることを見出した。MDS において高頻度に合併する RUNX1 変異との協調による MDS 発症の分子メカニズムを明らかにするために、Stag2 と Runx1 に関するダブルノックアウト(DKO)マウスの機能解析を行った。DKO マウスは HSPC 分画の増加をもたらし、大部分が致死性の MDS を発症した。RNA-seq, ChIP-seq, Hi-C による網羅的遺伝子解析により、主要な標的遺伝子候補を同定し、エピジェネティックな機序により MDS から急性白血病への進展に関与する遺伝子発現に異常を起こし、臨床経過と関連することを明らかにした。(Ochi et al., 論文投稿中)

3. 白血病融合遺伝子 MLL-AF9 を遺伝子導入したマウス造血前駆細胞を骨髄移植したマウス

モデルを作成し、白血病細胞を繰り返し経代移植を行う各時点で、白血病細胞の有する遺伝子異常を全エクソン解析により網羅的に検出することを通じて、クローン構成の変化を追跡した。継代移植を重ねるのにしたがって、白血病発症に至る期間の短縮と病勢の進行が認められ、その背景では、白血病細胞が、Ptpn11, Braf, Gnb2 をはじめとする複数の遺伝子変異を生じ、各クローン集団における遺伝的多様性の獲得に寄与したことを明らかとした (図6)。(Kotani et. al., Leukemia 2019)

図6. 白血病マウスモデルを用いたクローン進化過程の解明



## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 84 件)

1. [Ogawa S](#). Genetics of MDS. *Blood*. 2019 Mar 7;133(10):1049-1059. doi: 10.1182/blood-2018-10-844621. 査読あり
2. Kotani S, Yoda A, Kon A, [Kataoka K](#), Ochi Y, Shiozawa Y, Hirsch C, Takeda J, Ueno H, Yoshizato T, Yoshida K, Nakagawa MM, Nannya Y, Kakiuchi N, Yamauchi T, Aoki K, Shiraishi Y, Miyano S, Maeda T, Maciejewski JP, Takaori-Kondo A, [Ogawa S](#), [Makishima H](#). Molecular pathogenesis of disease progression in MLL-rearranged AML. *Leukemia*. 2019 Mar;33(3):612-624. doi: 10.1038/s41375-018-0253-3. 査読あり
3. Shiozawa Y, Malcovati L, Gallì A, [Sato-Otsubo A](#), [Kataoka K](#), Sato Y, Watatani Y, Suzuki H, Yoshizato T, Yoshida K, [Sanada M](#), [Makishima H](#), Shiraishi Y, Chiba K, Hellström-Lindberg E, Miyano S, [Ogawa S](#), Cazzola M. Aberrant splicing and defective mRNA production induced by somatic spliceosome mutations in myelodysplasia. *Nat Commun*. 2018 Sep 7;9(1):3649. doi: 10.1038/s41467-018-06063-x. 査読あり
4. Imi T, Katagiri T, Hosomichi K, Zaimoku Y, Hoang Nguyen V, Nakagawa N, Tajima A, Yoshizato T, [Ogawa S](#), [Nakao S](#). Sustained clonal hematopoiesis by HLA-lacking hematopoietic stem cells without driver mutations in aplastic anemia. *Blood Adv*. 2018 May 8;2(9):1000-1012. doi: 10.1182/bloodadvances.2017013953. 査読あり
5. Kon A, Yamazaki S, Nannya Y, [Kataoka K](#), Ota Y, Nakagawa MM, Yoshida K, Shiozawa Y, Morita M, Yoshizato T, [Sanada M](#), [Nakayama M](#), [Koseki H](#), [Nakauchi H](#), [Ogawa S](#). Physiological Srsf2 P95H expression causes impaired hematopoietic stem cell functions and aberrant RNA splicing in mice. *Blood*. 131(6), 621-635, 2018 DOI: 10.1182/blood-2017-01-762393. 査読あり
6. Shiozawa Y, Malcovati L, Gallì A, Pellagatti A, Karimi M, [Sato-Otsubo A](#), Sato Y, Suzuki H, Yoshizato T, Yoshida K, Shiraishi Y, Chiba K, [Makishima H](#), Boulwood J, Hellström-Lindberg E, Miyano S, Cazzola M, [Ogawa S](#). Gene expression and risk of leukemic transformation in myelodysplasia. *Blood*. 2017 Dec 14;130(24):2642-2653. doi: 10.1182/blood-2017-05-783050. 査読あり
7. Yoshizato T, Nannya Y, Atsuta Y, Shiozawa Y, Iijima-Yamashita Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Suzuki H, Nagata Y, Sato Y, Kakiuchi N, Matsuo K, Onizuka M, [Kataoka K](#), Chiba K, Tanaka H, Ueno H, Nakagawa MM, Przychodzen B, Haferlach C, Kern W, Aoki K, Itonaga H, Kanda Y, Sekeres MA, Maciejewski JP, Haferlach T, [Miyazaki Y](#), Horibe K, [Sanada M](#), Miyano S, [Makishima H](#), [Ogawa S](#). Genetic abnormalities in myelodysplasia and secondary acute myeloid leukemia: impact on outcome of stem cell transplantation. *Blood*. 2017 Apr 27;129(17):2347-2358. doi: 10.1182/blood-2016-12-754796. 査読あり
8. [Makishima H](#), Yoshizato T, Yoshida K, Sekeres MA, Radivoyevitch T, Suzuki H, Przychodzen B, Nagata Y, Meggendorfer M, [Sanada M](#), Okuno Y, Hirsch C, Kuzmanovic T, Sato Y, [Sato-Otsubo A](#), LaFramboise T, Hosono N, Shiraishi Y, Chiba K, Haferlach C, Kern W, Tanaka H, Shiozawa Y, Gomez-Segui I, Husseinzadeh HD, Thota S, Quinta KM, Dienes B, Nakamaki T, Miyawaki S, Saunthararajah Y, [Chiba S](#), Miyano S, Shih LY, Haferlach T, [Ogawa S](#), Maciejewski JP. Dynamics of clonal evolution in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*. 2017;49(2):204-212. doi: 10.1038/ng.3742. 査読あり
9. Yoshizato T, Dumitriu B, Hosokawa K, [Makishima H](#), Yoshida K, Townsley D, [Sato-Otsubo A](#), Sato Y, Liu D, Suzuki H, Wu CO, Shiraishi Y, Clemente MJ, [Kataoka K](#), Shiozawa Y, Okuno Y, Chiba K, Tanaka H, Nagata Y, Katagiri T, Kon A, [Sanada M](#), Scheinberg P, Miyano S, Maciejewski JP, [Nakao S](#), Young NS, [Ogawa S](#). Somatic Mutations and Clonal Hematopoiesis in Aplastic Anemia. *N Engl J Med*. 2015;373(1):35-39. doi: 10.1056/NEJMoa1414799. 査読あり

[学会発表](計 153 件)

1. Seishi Ogawa. Clonal evolution in myelodysplastic syndrome. 2018.6th TSH International Symposium. (招待講演)(国際学会)
2. Seishi Ogawa. A Novel Genetic Mechanism of Evading Anti-tumor Immunity In Multiple Human Cancers.2017 AACR Annual Meeting. (招待講演)(国際学会)
3. Seishi Ogawa. A novel mechanism of antitumor immunity in multiple human cancers. 2017 AACR Annual Meeting. (招待講演)(国際学会)
4. Seishi Ogawa. A plastic anemia and clonal evolution: risk factors.2017. International Meeting on Childhood MDS and SAA (招待講演)(国際学会)
5. Seishi Ogawa. NGS-driven decisions in transplant for MDS.2017. 44th Annual Meeting of the EBMT (招待講演)(国際学会)
6. Seishi Ogawa. Aplastic anemia and preleukemia. 2016 Justen Passwell Symposium. (招待講演)(国際学会)
7. Seishi Ogawa. Cohesin mutations and their functional implications.2016. 第21回欧州血液学会(招待講演)(国際学会)
8. Seishi Ogawa. Aberrant RNA Splicing in splicing facto-mutated Myelodysplastic Syndromes.2016.mRNA Processing and Human Disease (招待講演)(国際学会)
9. Seishi Ogawa. Integrated molecular analysis of adult T-cell leukemia lymphoma. Tenth AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: From Biology to Therapeutics.2015. (招待講演)(国際学会)

〔図書〕(計0件)〔産業財産権〕 出願状況(計 0 件)

〔その他〕ホームページ等

[https://www.med.kyoto-u.ac.jp/organization-staff/research/doctoral\\_course/r-006/](https://www.med.kyoto-u.ac.jp/organization-staff/research/doctoral_course/r-006/)

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：古関 明彦

ローマ字氏名：Koseki Haruhiko

所属研究機関名：国立研究開発法人理化学研究所

部局名：生命医科学研究センター

職名：チームリーダー

研究者番号(8桁)：40225446

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：真田 昌

ローマ字氏名：(Sanada Masashi)

研究協力者氏名：佐藤 亜以子

ローマ字氏名：(Sato Aiko)

研究協力者氏名：牧島 秀樹

ローマ字氏名：(Makishima Hideki)

研究協力者氏名：片岡 圭亮

ローマ字氏名：(Kataoka Keisuke)

研究協力者氏名：宮崎 泰司

ローマ字氏名：(Miyazaki Yasushi)

研究協力者氏名：千葉 滋

ローマ字氏名：(Chiba Shigeru)

研究協力者氏名：中尾 眞二

ローマ字氏名：(Nakao Shinji)

研究協力者氏名：中内 啓光

ローマ字氏名：(Nakauchi Hiromitsu)

研究協力者氏名：中山 学

ローマ字氏名：(Nakayama Manabu)

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、研究者個人に帰属されます。