

令和元年6月10日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06805

研究課題名(和文) エネルギー代謝ネットワークの鍵分子USP2の役割解析

研究課題名(英文) Roles of a novel key regulatory molecule, USP2, in energy homeostasis

研究代表者

北村 浩(Hiroshi, Kitamura)

酪農学園大学・獣医学群・教授

研究者番号：80312403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子改変マウスを用いた検証により、マクロファージのユビキチン選択的プロテアーゼ(USP)2が内臓脂肪組織の慢性炎症を抑えることで、2型糖尿病の進行を抑えることが判明した。またUSP2は炎症性サイトカインの産生を抑えるが、これは転写因子OCT1/2の発現比を変えることによることが示された。USP2はエネルギー代謝中枢である視床下部の神経核でエネルギー代謝状態により発現変動し、筋芽細胞ではミトコンドリア機能を制御しエネルギー供給を調節した。以上よりUSP2がエネルギー代謝の鍵分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

2型糖尿病は今や国民病となっており効果的な治療法を探すことは急務である。2型糖尿病は脂肪組織の炎症が引き金となるが、本研究はそのオン-オフを制御する新たな分子としてUSP2を明らかにした。またその役割は脂肪組織に限定されず、エネルギー代謝を調節する脳の視床下部においても働くことを示す知見を得た。一方、損傷した筋肉や老化した筋肉の再生時に筋芽細胞の活性化が必要であるが、筋芽細胞のエネルギー状態もUSP2により維持されるということが分かった。USP2は酵素であることから、その活性を調節する薬剤を利用すれば、生活習慣病や加齢性疾患の治療に役立つことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：By taking advantage of a macrophage-selective transgenic mouse model, we evinced that macrophage ubiquitin-specific protease (USP)2 suppressed adipose tissue inflammation resulting in attenuation of insulin resistance. USP2 inhibited inflammatory cytokine production through modulation of expression ratio of transcription factors OCT1 and OCT2. We also demonstrated that USP2 in hypothalamic nuclei is expressionally regulated by blood glucose level. Moreover, USP2 maintains mitochondrial integrity to efficiently supply ATP in myoblasts. Collectively, USP2 is a key regulatory molecule for energy homeostasis in various cells.

研究分野：分子医学、生理学、実験動物学

キーワード：ユビキチン 2型糖尿病 マクロファージ エネルギー代謝 USP 視床下部 筋芽細胞 遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

(1) 2型糖尿病は全世界で3億人近くが罹患している。2型糖尿病は脂肪組織のマクロファージが PAI-1 などの分子を分泌し慢性炎症を起こすことがトリガーとなる。研究者は研究開始時点でマクロファージの糖尿病関連分子の発現を低下させる分子としてユビキチン特異的プロテアーゼ (USP) 2 の関与の可能性を明らかにした。しかしながらこれら USP2 による遺伝子発現制御は培養細胞を用いた検証に限定しており、個体レベルでの役割が明らかでなかった。また、発現制御の分子機構についても殆ど明らかでなかった。

(2) USP2 は脂肪組織マクロファージに加え、肝臓においてもエネルギー代謝を制御するという報告がある。また、がん細胞においてもエネルギー代謝に相関し発現が変化するという報告がある。しかしながら、多くの臓器で USP2 がエネルギー代謝に果たす役割は依然明らかでなかった。

2. 研究の目的

(1) マクロファージ選択的な *Usp2* トランスジェニック(Tg)マウスを用いて、肥満症や2型糖尿病におけるマクロファージの USP2 の役割を個体レベルで明らかにする。

(2) 肥満時の脂肪組織マクロファージの応答は細菌などによる急性炎症と共通の部分が多い。そこで、グラム陰性菌のリポ多糖体(LPS)で刺激したマクロファージの遺伝子発現制御における USP2 の役割を明らかにし、これをモデルに USP2 による遺伝子発現制御の分子メカニズムに迫る。

(3) エネルギー代謝中枢である視床下部の USP2 の発現細胞を明らかにし、USP2 選択的阻害剤や脳神経選択的 *Usp2* ノックアウトを用いて USP2 の役割を調べる。

(4) 骨格筋選択的 *Usp2* ノックアウトマウスを樹立し、骨格筋のエネルギー代謝における USP2 の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マクロファージ選択的に活性化する *FIRE* プロモーター制御下で 69kDa の USP2 バリエーション(USP2A)を安定発現する *Usp2aTg* マウスを作製し、60%kcal の高脂肪餌を給餌後、食欲、体重、空腹時と摂餌時の血中インスリン濃度や血液生化学試験を実施した。また組織炎症の指標として肝臓や骨格筋、脂肪組織での M1 及び M2 マクロファージの割合を測定した。さらにインスリン抵抗性試験を実施し、全身でのインスリン感受性を調べるとともに、インスリン投与後の脂肪組織や骨格筋、肝臓でのインスリン反応性を Akt やインスリン受容体 サブユニットのリン酸化状態から評価した。また、USP2 cDNA または USP2 選択的な shRNA をコードしたレンチウイルスを導入することで USP2 を過剰発現または発現低下させた培養マクロファージ様細胞 (それぞれ USP2OE HL-60 細胞 USP2KD HL-60 細胞) を樹立し、これらと脂肪細胞 (3T3-L1 細胞) や筋細胞 (C2C12 細胞) を用いて、マクロファージの USP2 によるインスリン感受性制御の仕組みを調べた。

(2) LPS 刺激時にコントロール細胞と比べ、USP2KD HL-60 細胞で発現量が変わるサイトカインを網羅的に探索した。またこれらの発現はマクロファージ選択的 *Usp2aTg* マウスからの分離マクロファージでも調べた。さらに USP2KD HL-60 細胞において USP2 と共沈降する核内タンパク質を探索し、活性の変わる転写因子を転写因子活性アレイで調べた。またこれら転写因子の LPS 刺激後の核内タンパク質レベルを USP2KD HL-60 細胞とコントロール細胞で調べると共に、USP2 が制御するサイトカインの遺伝子プロモーター・エンハンサーへの結合を評価した。またこれら転写因子のユビキチン化に対する USP2 の効果の有無も調べた。

(3) マウスにインスリンを投与し、低血糖にしたときの視床下部での USP2 の発現レベルの変化を qRT-PCR 法で調べると共に、発現細胞や発現変動細胞の局在を *in situ* ハイブリダイゼーション法で調べた。また USP2 の選択的阻害剤を視床下部に投与し、摂餌量を測定した。

(4) USP2 遺伝子を欠損した培養筋細胞を作製し、エネルギー代謝能や関連遺伝子の発現、ミトコンドリア機能に対する影響を調べた。

(5) *Usp2^{fl/fl}* マウスを基に骨格筋や神経選択的 *Usp2* ノックアウトマウスを樹立し、通常飼育時の摂餌量や体重を評価した。

(6) これまでにブラジル産プロポリスエタノール抽出物 (PEE) が脂肪組織の炎症を抑えることで糖尿病を抑えることを見出している。そこで PEE がマクロファージの USP2 の発現に与える効果を RT-PCR 法で調べると共に、PEE の抗糖尿病作用に関わる脂肪組織内の他の免疫細胞を FACS 解析で探索した。また、この細胞の誘導に関わる成分を探索した。さらに、PEE が脂肪細胞のレプチン産生能や筋芽細胞のサイトカイン産生能に対する効果も評価した。

4. 研究成果

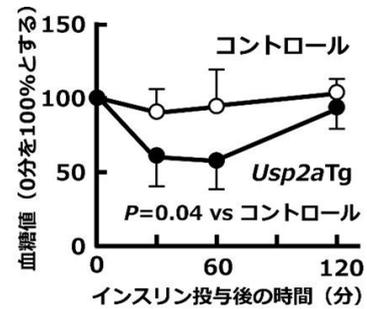


図1 高脂肪餌を長期給餌したマクロファージ選択的 *Usp2aTg* マウスとコントロールマウスのインスリン応答性

(1) *Usp2aTg* マウスは野生型マウスと比べて12週間の高脂肪餌給餌では体重、摂餌量、内臓脂肪重量、血液中中性脂肪量、遊離脂肪酸量、総コレステロール量、血糖値、血中インスリン量に変化はみられず、インスリン抵抗性試験でもインスリン反応性には変化がみられなかった。肝臓や骨格筋、皮下脂肪組織ではマクロファージの集簇に差はみられなかったが、腸間膜脂肪組織においてはM1マクロファージ、M2マクロファージ共に*Usp2aTg*マウスで野生型マウスと比べて減少した。一方で、高脂肪餌の給餌期間を50週間まで延長すると、*Usp2aTg*マウスでは体重の増加や腸間膜脂肪組織の増加が抑えられた。このとき、血液中中性脂肪量や遊離脂肪酸量、総コレステロール量、血糖値は野生型マウスと比べ変化が認められなかったが、空腹時の血中インスリンレベルは有意に低下した。さらにインスリン抵抗性試験では、*Usp2aTg*マウスは肥満に伴うインスリンの感受性の低下が抑えられた(図1)。即ち、マクロファージのUSP2が重度の肥満による糖尿病の進行を抑えることが明らかになった。2型糖尿病の進行を制御する分子はこれまでに複数報告があるが、マクロファージのタンパク質ユビキチン化が2型糖尿病の進行を制御することを示した初の報告となった。USP2は酵素であり、その選択的阻害剤が開発されているので、今後はこれらの抗糖尿病治療への適用性について吟味する必要がある。

(2) マクロファージのUSP2による抗糖尿病効果のメカニズムについても検証した。マクロファージ選択的*Usp2aTg*マウスと野生型マウスに50週間まで高脂肪餌を給餌したあと、インスリンを投与し、インスリン応答性をAktやインスリン受容体鎖のリン酸化で評価した。脂肪組織では*Usp2aTg*マウスと野生型マウスではリン酸化の程度は変わらなかったが、肝臓や骨格筋のこれらタンパク質のリン酸化は*Usp2aTg*マウスで向上した。つまり、マクロファージのUSP2が骨格筋や肝臓のインスリン応答性を制御していることが分かった。次にそのメカニズムを明らかにするためにUSP2OE HL-60細胞やUSP2KD HL-60細胞の培養上清を直接C2C12細胞に添加した場合と、一旦、3T3-L1細胞を刺激し、その培地をさらにC2C12細胞に添加した場合で比較すると、一旦、3T3-L1細胞を刺激した場合のみでC2C12細胞のインスリン応答性が変化した。以上のことからマクロファージのUSP2は何らかのサイトカインの分泌を制御することで、近接する脂肪細胞からのアディポサイトカインの産生を調節し、結果的に遠方にある骨格筋や肝臓でのエネルギー代謝を調節するという一連の反応軸の存在を明らかにできた(図2)。

マクロファージにより惹起される脂肪組織の炎症が2型糖尿病のトリガーとなることはすでに確立されたコンセプトであるが、マクロファージ、脂肪細胞、筋肉細胞の連関を明確に示した実例は少ない。本研究は、マクロファージの制御下により、脂肪細胞が自らのインスリン感受性が変化しない段階で、骨格筋や肝臓のインスリン応答性を調節することを示す例となった。今後はUSP2の制御下でマクロファージから分泌され脂肪細胞に働く因子、脂肪細胞から分泌され骨格筋や肝臓に働く因子の同定が望まれる。

(3) HL-60細胞と比べUSP2KD HL-60細胞で発現が変動するサイトカインを探索した。これまでの検討で、無刺激状態ではUSP2KD HL-60細胞でCCL2などのケモカインの発現が増加することが判明しているが、本研究ではLPS刺激後、104種のサイトカインの発現を調べた。USP2KD HL-60細胞ではコントロール細胞と比べて、25のサイトカインで発現が高まった。これらの多くはUSP2の強制発現により発現低下がみられた。一方で、マクロファージ選択的*Usp2aTg*マウスと野生型マウスから分離した腹腔マクロファージを用いた検討では、TNFやIL-6を含む9つのサイトカインはUSP2により発現が抑制された。以上のことから、USP2は活性化マクロファージが産生する特定のサイトカインの発現を負に制御することが判明した。さらに、マクロファージでのUSP2によるサイトカイン発現制御の分子メカニズムも調べた。RIPやTRAF6、NF- κ BはUSP2の遺伝子ノックダウンにより影響を受けなかった。一方、免疫沈降法や網羅的な転写因子活性アレイによるスクリーニングによりOCTタンパク質がUSP2の制御を受けることが示唆された。タンパク質解析により、USP2はOCT1やOCT2のタンパク質量やユビキチン化を制御することが分かった。さらに活性化マクロファージにおいて、USP2はサイトカインのプロモーター・エンハンサー領域のOCT1/OCT2結合比変化させることが分かった。以上のことから、USP2はマクロファージのOCT1とOCT2の量比を変えることでサイトカインの発現を制御することが示唆された。これまで、マクロファージの炎症時のサイトカインの発現制御といえば、NF- κ Bを中心に調べられているが、本研究ではUSP2がOCTタンパク質というこれまで殆ど想定されていなかった標的分子を制御することでサイトカイン遺伝子の発現を制御することを明らかにした。本研究では脂肪組織炎症に似た反応ということでLPS刺激時の応答を調べたが、脂肪組織炎症でもOCTタンパク質が同様にUSP2の下流で遺伝子発現制御を担うかの検証は今後必要であろう。

(4) 短時間の絶食後、インスリンを腹腔投与し一過性の低血糖状態を生み出したマウスでは、

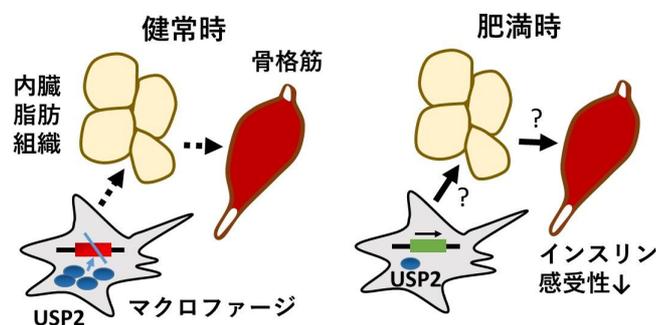


図2 健康時と肥満時のUSP2を起点としたマクロファージ-脂肪組織-骨格筋制御軸

間脳視床下部の USP2 の発現が僅かに増加した。視床下部での USP2 の発現はエネルギー代謝の制御に関わる複数の神経核のニューロンで顕著に認められ、一部は低血糖時に発現が変動した。以上のことから視床下部において USP2 はエネルギー代謝制御に関わることが示唆された。一方で、USP2 の選択的阻害剤を視床下部に投与するとわずかに摂餌量が減少する傾向がみられた。従来検討では視床下部の神経におけるタンパク質ユビキチン化を進めると細胞死に伴う食欲制御不全が生ずるといった報告があるが、生理的状況における視床下部のユビキチン化の役割はほとんど知られていない。本研究では食欲制御にユビキチン化に関わることと、その調節を担う候補分子として USP2 の存在を明らかにしたことになる。今後は光遺伝学的などの手法を駆使し、より領域選択的な USP2 の役割を解明する必要がある。

(7) *Usp2^{fl/fl}* マウスを基に神経選択的 *Usp2* ノックアウトマウスと骨格筋選択的 *Usp2* ノックアウトマウスを樹立した。これらマウスは通常飼育下では摂餌量や生育に伴う体重増加には変化が認められなかった。つまり USP2 は個体の通常の成育において必要不可欠ではないと考えられた。しかしながら、肥満などの病的状態における神経や骨格筋における USP2 の役割を調べるツールは整備できたといえる。

(8) 骨格筋における USP2 の役割を調べるために C2C12 細胞の *Usp2* 遺伝子をゲノム編集法でノックアウトした。*Usp2* ノックアウト C2C12 細胞は分化刺激を加えても分化マーカーである *MyoG* の誘導やミオシン重鎖の蓄積が認められなかった。一方で増殖速度も著しく低下した。*Usp2* ノックアウト C2C12 細胞は細胞内 ATP 量が大幅に減少していたことから分化や増殖に必要なエネルギー供給が充分でない可能性が考えられた。一方、*Usp2* ノックアウト C2C12 細胞はミトコンドリアの電子伝達系酵素の活性には変化が無かったが、膜電位の有意な低下や形態の異常が認められた。以上のことから USP2 は筋芽細胞において、ミトコンドリアによる酸化的リン酸化の維持に関わることが示唆された。これまでに老化に伴うザルコペニアやミオパシーにミトコンドリア機能不全を示唆する報告は国内外に複数あるが、その責任分子は明らかでなかった。またタンパク質ユビキチン化が筋芽細胞の機能異常に繋がるという知見も乏しかった。本研究ではこれの制御を担う新たな酵素を明らかにしたものである。ザルコペニアやミオパシーは糖尿病に並び患者数も多く、今後の高齢化社会においてさらに大きな増加が見込まれるなか、新たな治療標的候補分子を明らかにできたことは大きな意義がある。

(9) ブラジル産プロポリスエタノール抽出物は腹腔や脂肪組織マクロファージの USP2 の発現を変化させなかった。一方で骨髄球由来免疫抑制細胞 (MDSC) を誘導し、脂肪組織の炎症を抑えることを見出した。またその誘導成分の一つにケンフェロールが含まれることを明らかにした。また、プロポリス成分は脂肪組織からレプチンの分泌を促進し、食欲を抑える他、筋芽細胞に働き、組織再生に関わるサイトカインの分泌を促すことを見出した。USP2 とは直接関わらないデータであったが、未だプロポリスによる抗糖尿病効果に中心的な役割を果たす細胞が分かっていなかったなか、MDSC という全く新しい候補細胞を示せた。一方で安価な化合物で人為的に MDSC を誘導する方法を示せたことは、2 型糖尿病のみならず他の炎症関連疾患への応用も期待できる。

< 引用文献 >

Hiroshi Kitamura, Shunsuke Kimura, Yoshinori Shimamoto 他、Ubiquitin-specific protease2-69 in macrophages potentially modulates metainflammation、*The FASEB Journal*、Vol. 27、2013、pp.4940-4953

Hiroshi Kitamura, Yoshinori Naoe, Shunsuke Kimura 他、Beneficial effects of Brazilian propolis on type2 diabetes in ob/ob mice、*Adipocyte*、Vol. 2、2013、pp. 227-236

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

Hiroshi Kitamura, Takeshi Ishino, Yoshinori Shimamoto 他 (7 名中 1 番目)、Ubiquitin-specific protease 2 modulates lipopolysaccharide-elicited expression of proinflammatory cytokines in macrophage-like HL-60 cells、*Mediators of Inflammation*、査読あり、 Vol. 2017、pp.6909415
DOI: 10.1155/2017/6909415

Natsuko Saito, Shunsuke Kimura, Hiroshi Kitamura 他 (14 名中 14 番目)、Macrophage ubiquitin-specific protease 2 modifies insulin sensitivity in obese mice、*Biochemistry and Biophysics Reports*、査読あり、Vol. 9、2017、pp.322-329
DOI: 10.1016/j.bbrep.2017.01.009

Kenta Kikuchi, Mayumi Iida, Hiroshi Kitamura 他 (17 名中 7 番目)、Macrophages switch their phenotype by regulating Maf expression during different phases of inflammation、*The Journal of Immunology*、査読あり、Vol.201、2018、pp.635-651

DOI: 10.4049/jimmunol.1800040

Hiroshi Kitamura, Natsuko Saito, Junpei Fujimoto, Ken-ichi Nakashima, Daisuke Fujikura, Brazilian propolis ethanol extract and its component kaempferol induce myeloid-derived suppressor cells from macrophages of mice *in vivo* and *in vitro*, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 査読あり、Vol. 18、2018、pp.138

DOI: 10.1186/s12906-018-2198-5

Takeshi Ishino, Mayuko Hashimoto, Hiroshi Kitamura 他(7名中7番目)、Establishment of protocol for preparation of gene-edited bovine ear-derived fibroblasts for somatic cell nuclear transplantation, *Biomedical Research*, 査読あり、Vol.39、2018、pp.95-104

DOI: 10.2220/biomedres.39.95.

Yoshinori Shimamoto, Junko Nio-Kobayashi, Hiroshi Kitamura 他(10名中10番目)、Generation and validation of novel anti-bovine CD163 monoclonal antibodies ABM-1A9 and ABM-2D6, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 査読あり、Vol. 198、2018、pp.6-13

DOI: 10.2220/biomedres.36.323

Yoshinori Shimamoto, Hiroshi Kitamura, Eiki Takahashi 他(5名中3番目)、*In situ* hybridization study of CYP2D mRNA in the common marmoset brain. *Experimental Animal*, 査読あり、Vol. 65、2016、pp.465-471

DOI: 10.1538/expanim.16-0045

Kohei Washio, Mao Kobayashi, Natsuko Saito, Misato Amagasa, Hiroshi Kitamura, Propolis ethanol extract stimulates cytokine and chemokine production through NF- κ B activation in C2C12 myoblasts, *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 査読あり、Vol. 2015、2015、pp.249751

DOI: 10.1155/2015/349751

Kohei Washio, Yoshinori Shimamoto, Hiroshi Kitamura, Brazilian propolis extract increases leptin expression in mouse adipocytes, *Biomedical Research*, 査読あり、Vol. 36、2015、pp.343-346

Kenichi Asano, Naomichi Takahashi, Hiroshi Kitamura 他(12名中9番目) Intestinal CD169+ macrophages initiate mucosal inflammation by secreting CCL8 that recruits inflammatory monocytes, *Nature Communications*, 査読あり、Vol. 6、2015、pp. 7802

DOI: 10.1038/ncomms8802

Shunsuke Kimura, Megumi Yamakami-Kimura, Hiroshi Kitamura 他(7名中5番目) Visualization of the entire differentiation process of murine M cells: suppression of their maturation in cecal patches, *Mucosal Immunology*, 査読あり、Vol. 8、2015、650-660

DOI: 10.1038/mi.2014.99

[学会発表](計20件)

橋本菜由子、北村浩、視床下部ユビキチンプロテアーゼ2の発現と血糖調節に対する役割、第41回日本分子生物学会年会、2018

北村浩、マクロファージ選択的ユビキチン特異的プロテアーゼ2欠損マウスの精巣機能の評価、第41回日本分子生物学会年会、2018

橋本菜由子、北村浩、視床下部ユビキチン特異的プロテアーゼ2の血糖値に対するフィードバック制御、第161回日本獣医学会学術集会、2018

天笠美聡、北村浩、マクロファージ選択的ユビキチン特異的プロテアーゼ2欠損マウスの精巣機能の評価、第161回日本獣医学会学術集会、2018

北村浩、マクロファージの USP2 は OCT を修飾し、炎症性サイトカインの産生を抑制する、第40回日本分子生物学会年会、2017

橋本菜由子、北村浩、インスリン誘導性低血糖時のマウス視床下部における Usp2 の発現局

在、第 40 回日本分子生物学会年会、2017
北村浩、ゲノミクスの最近の流れ-動物実験に如何に使用するか-、第 28 回東北動物実験研究会、2017
橋本茉由子、北村浩、IARS 異常にゲノム編集治療を施した黒毛和種耳朶組織由来線維芽細胞の作成、第 160 回日本獣医学会学術集会、2016
齊藤奈津子、北村浩、抗ウシ CD163 モノクローナル抗体の樹立、第 160 回日本獣医学会学術集会、2016
天笠美聡、北村浩、MAIL/IKB ζ が局在する核内顆粒構造の評価、第 160 回日本獣医学会学術集会、2016
北村浩、マクロファージで発現するユビキチン特異的プロテアーゼ 2 による抗糖尿病効果のメカニズム、第 39 回日本分子生物学会年会、2016
鷲尾浩平、北村浩、プロポリスエタノール抽出物による MDSC(myeloid-derived suppressor cell)の誘導、第 159 回日本獣医学会学術集会、2016
齊藤奈津子、北村浩、高脂肪餌長期給餌モデルを用いたマクロファージで発現する USP2 の抗糖尿病効果の検討、第 159 回日本獣医学会学術集会、2016
馬場海陸、北村浩、視床下部摂食調節経路におけるユビキチン特異的イソペプチダーゼ 2 の発現、第 159 回日本獣医学会学術集会、2016
浅野謙一、北村浩、組織マクロファージによる炎症制御、第 159 回日本獣医学会学術集会、2016
田代あすか、北村浩、Ubiquitin-specific protease2 A inhibits adipose tissue inflammation、第 38 回日本分子生物学会年会、2015
鷲尾浩平、北村浩、ブラジル産グリーンプロポリスの抗 2 型糖尿病効果についての検討、第 38 回日本分子生物学会年会、2015
鷲尾浩平、北村浩、プロポリスの脂肪内免疫細胞を介した抗 2 型糖尿病効果-遺伝性肥満マウスを用いた検討-、第 158 回日本獣医学会学術集会、2015
澤尚樹、北村浩、マクロファージの炎症応答におけるユビキチン特異的プロテアーゼ(USP) 2 の役割、第 158 回日本獣医学会学術集会、2015
北村浩、脂肪組織内免疫細胞を標的とした糖尿病予防・治療法の開発-プロポリスと USP2 を例に-、第 29 回北海道薬物作用談話会、2015

〔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〕

ホームページ等

<https://www.facebook.com/RakunoGakuVetPhysiol/>

<https://www.rakuno.ac.jp/article-60915.html>

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：木村 俊介

ローマ字氏名：(KIMURA, shunsuke)

研究協力者氏名：岡本 士毅

ローマ字氏名：(OKAMOTO, shiki)

研究協力者氏名：高橋 英機

ローマ字氏名：(TAKAHASHI, eiki)

研究協力者氏名：岡部 潤

ローマ字氏名：(OKABE, jun)

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。