

令和元年5月14日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11496

研究課題名(和文) 組織特異的 non-coding RNA が制御する癌の病態形成メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of cancer pathogenesis regulated by tissue-specific non-coding RNA

研究代表者

安河内 友世(川久保友世)(Kawakubo-Yasukochi, Tomoyo)

福岡大学・薬学部・講師

研究者番号：70507813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、がん細胞が分泌するエクソソーム(細胞外小胞の一種)が、がん微小環境の構築、特に浸潤・転移能を規定する重要因子を内包している可能性を同一患者由来で転移性の異なる口腔扁平上皮癌細胞株2種(非転移株SQUU-A、高転移株SQUU-B)を用いた実験により明らかにした。さらに、エクソソーム内に存在する浸潤・転移能規定因子を同定するため、miRNA-mRNAペアリング解析を行った結果、SQUU-Bのエクソソーム内に存在する浸潤誘導因子として、miRNA(miR-200c-3p)、およびその標的mRNA(WRNおよびCHD9)を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、腫瘍組織内の多様ながん細胞が分泌するエクソソームには、それぞれ固有の発現パターンを示すmiRNAが内包されていること、さらにエクソソームによって運ばれたmiRNAは、標的細胞内で遺伝子発現を制御することでがんの微小環境を規定していることが示唆された。

生体内におけるmiRNAは細胞外でもRNA結合蛋白質複合体やエクソソームなどの膜小胞に包まれて安定な状態で体液中に存在することから、安定性が高く非侵襲的バイオマーカーとして期待されている。よって、今回同定したmiRNAや標的遺伝子の異常をがんの予後予測因子として提示することが可能である。

研究成果の概要(英文)：In this project, we demonstrated the spread of the invasive or metastatic potential between oral squamous carcinoma cell clones, SQUU-A (nonmetastatic) and SQUU-B (highly-metastatic) established from local recurrence events of a tongue cancer, derived from the same tumor mass was mediated by exosomes. We further challenged miRNA-mRNA pairing analysis by the use of exosomes originated by those cell clones, and identified the possible miRNA (miR-200c-3p) and its downstream mRNAs (WRN and CHD9) responsible for invasive potential.

Our findings offer insights that each malignant cell clone in an identical tumor mass secreted each unique exosome that encapsulates specific miRNAs, and that miRNAs could undertake crosstalk among different malignant cell clones in an identical tumor microenvironment to regulate clinical prognosis.

研究分野：生化学、薬理学

キーワード：口腔癌 エクソソーム miRNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

miRNA は、近年の大規模トランスクリプトーム解析によって、18~25 塩基程度の新しい機能性 RNA の一群として発見された非コード RNA であり、メッセンジャーRNA (mRNA) を標的として作用して、主に蛋白質の翻訳を制御する。現在までに約 2,600 種類のヒト miRNA が発見されているが、機能が既知であるものは数少ない。しかし、miRNA の転写後翻訳調節が、特に哺乳類では miRNA が遺伝子発現全体の最大 9 割程度を制御し、様々な細胞の生理機能や分子病態に関与していることが示唆されており、生命現象や病態の本質を理解する際に miRNA の存在は重要である。

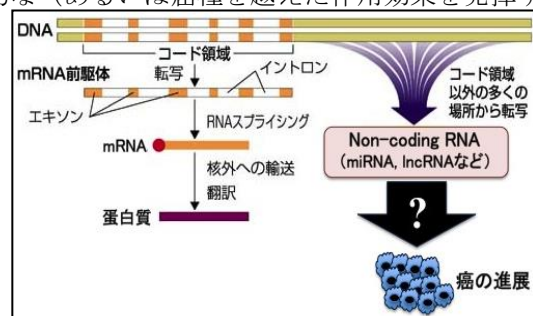
例えば、すべてのがんは、複数の遺伝子・蛋白質の発現制御ネットワークの破綻が引き起こされているため、一つの遺伝子や蛋白質を治療標的にすることには限界が生じる。一方で、miRNA は本来、生体内で複数の遺伝子を標的にその発現レベルを調節する役割を担っている。

申請者は最近、同一患者由来の転移能の異なるヒト口腔扁平上皮癌細胞株 2 種（非転移株 SQUU-A/高転移株 SQUU-B）を用いた実験から、転移能を規定する成分が SQUU-B 細胞培養上清由来エクソソーム（細胞外小胞体の一種）中に存在すること、また、その転移能はエクソソームを介して非転移株 SQUU-A に移行することを報告した。このことは、単一癌巣内のそれぞれの癌細胞が各々の個性をもつエクソソームを分泌しており、それらを介した複雑な細胞間クロストークによって癌微環境が規定され、この複雑な環境が予後を規定していることを示唆していた。さらに、申請者のその後の解析によって、エクソソーム中の当該浸潤・転移規定因子が miRNA である可能性が判明した。

### 2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌患者の臨床経過は原発巣の制御はもとより、再発、頸部リンパ節転移、遠隔臓器転移の有無に左右される。なかでも、癌の浸潤・転移に対する評価は腫瘍の進展を的確に把握するために必須であり、治療方針決定に多大な影響を与えるため、可能な限り早期に把握することが理想的で、精度の高い浸潤・転移評価法の開発が望まれている。

そこで本研究課題は、口腔扁平上皮癌に特異的な（あるいは癌種を越えた作用効果を発揮する可能性もあるが）miRNA の同定を行い、口腔扁平上皮癌の浸潤・転移に関連する複数の遺伝子発現調節を理解すること、さらに、（生体内における miRNA は細胞外でも RNA 結合蛋白質複合体やエクソソームなどの膜小胞に包まれて安定な状態で唾液、血液等の体液中に存在することから、安定性が高く非侵襲的バイオマーカーとして期待されている状況下で）同定した miRNA や標的遺伝子の miRNA 結合部位配列の異常を予後予測因子としてのバイオマーカーとして医薬応用できる可能性を提示することを目的として遂行された。



### 3. 研究の方法

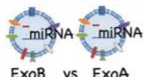
まず、網羅的 miRNA-mRNA 統合解析で得られた候補分子全てについて、SQUU-A および SQUU-B に対して遺伝子導入実験を行い、マトリゲル浸潤アッセイを行うことでヒト口腔扁平上皮癌浸潤・転移促進因子としての miRNA を同定した。SQUU-B 由来 miRNA によって引き起こされた浸潤・促進作用が、必ずしも単独の miRNA によって規定される事象ではないという可能性もふまえて、複数の組み合わせによる miRNA の導入も満遍なく試みた。

さらに、同定した miRNA が癌細胞以外の正常細胞にも影響を与えているか確かめるために、miRNA 共存下でヒトリンパ管内皮細胞およびヒト血管内皮細胞を用いた新生管腔形成実験を行うことで、癌の増殖・転移の過程で標的 miRNA がリンパ管新生や血管新生に対しても促進的に働いているか確かめた。

### 4. 研究成果

まず、SQUU-A および SQUU-B の細胞培養上清からエクソソームを精製し、それらに内包される miRNA についてマイクロアレイを行い、比較解析を行った。さらに、SQUU-A 由来エクソソーム (ExoA) および SQUU-B 由来エクソソーム (ExoB) をそれぞれ SQUU-A 細胞に添加した後に、細胞内 mRNA の発現量について、マイクロアレイを行った。それらの結果をふまえて、miRNA-mRNA 統合解析を行った (下表)。

Differential miRNA expression in ExoB vs ExoA




Upregulated	Accession No.	Fold Change
hsa-miR-191-5p	MIMAT0000440	31.78
hsa-miR-4454	MIMAT0018976	24.59
hsa-miR-221-3p	MIMAT0000278	20.97
hsa-miR-193b-3p	MIMAT0002819	10.85
hsa-miR-5100	MIMAT0022259	8.40
hsa-miR-1246	MIMAT0005898	7.41
hsa-miR-6875-5p	MIMAT0027650	6.77
hsa-miR-185-5p	MIMAT0000455	5.06
hsa-miR-200c-3p	MIMAT0000617	4.96
hsa-miR-3622a-5p	MIMAT0018003	4.08
hsa-miR-23b-3p	MIMAT0000418	3.32
hsa-miR-3195	MIMAT0015079	2.93
hsa-miR-3197	MIMAT0015082	2.89
hsa-miR-4728-5p	MIMAT0019849	2.48
hsa-miR-7150	MIMAT0028211	2.23
hsa-miR-4640-5p	MIMAT0019699	2.22
hsa-miR-1587	MIMAT0019077	2.20
hsa-miR-92b-5p	MIMAT0004792	2.16
hsa-miR-1919-5p	MIMAT0007884	2.06
hsa-miR-4443	MIMAT0018961	2.04
hsa-miR-3613-3p	MIMAT0017991	2.00

Downregulated	Accession No.	Fold Change
hsa-miR-4529-3p	MIMAT0019068	0.01
hsa-miR-6840-3p	MIMAT0027583	0.16
hsa-miR-205-5p	MIMAT0000266	0.26
hsa-miR-6790-5p	MIMAT0027480	0.33
hsa-miR-6824-5p	MIMAT0027548	0.34
hsa-miR-3188	MIMAT0015070	0.34
hsa-miR-6716-5p	MIMAT0025844	0.40
hsa-miR-4689	MIMAT0019778	0.42
hsa-miR-6776-5p	MIMAT0027452	0.42
hsa-miR-8075	MIMAT0031002	0.42
hsa-miR-455-3p	MIMAT0004784	0.44

Differential mRNA expression in SQUU-A cells treated with ExoB vs ExoA



Upregulated	Accession	Fold Change
<i>NME3</i>	NM_002513	1.66
<i>HSPA1A</i>	DQ409329	1.66
<i>ATP1A4</i>	AF459737	1.64
<i>CSF1R</i>	M25786	1.57
<i>PIP3K1I</i>	NM_001135219	1.51
<i>PRKCG</i>	NM_002739	1.50
<i>TRIB3</i>	AJ697940	1.50

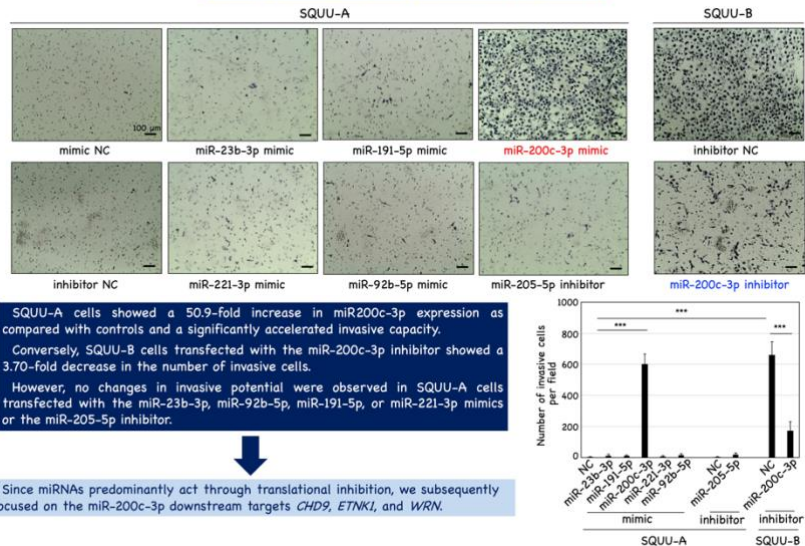
Downregulated	Accession	Fold Change
<i>AKT3</i>	AL080074	0.44
<i>HSPA1B</i>	BC001876	0.49
<i>PANK2</i>	BC008667	0.51
<i>CBWD5</i>	BC043420	0.54
<i>CAMK2D</i>	EF139846	0.59
<i>MATPK13</i>	Z25428	0.59
<i>CHD9</i>	BC027491	0.60
<i>ETNK1</i>	NM_001039481	0.61
<i>WRN</i>	NM_000553	0.61
<i>FRK</i>	NM_002031	0.62
<i>AHSA2</i>	BC050395	0.64
<i>FIGN</i>	NM_018086	0.65
<i>PIP3K1A</i>	DQ656041	0.65
<i>MYO3A</i>	NM_017433	0.66
<i>MYO9A</i>	NM_006901	0.66

ExoA and ExoB were analyzed for their miRNA expression profiles. The resulting data showed 21 significantly upregulated and 11 downregulated miRNAs in ExoB as compared to ExoA. A subsequent transcriptome array identified 7 upregulated and 15 downregulated mRNAs.

続いて、この統合解析で絞られた6個のmiRNAについて、miRNA mimicあるいはmiRNA inhibitorの細胞内導入実験とマトリゲル浸潤アッセイを行い、SQUU-Bの浸潤能に影響を及ぼしているmiRNAをmiR200c-3pと同定した(右図)。

さらに、その後の解析からmiR200c-3pの下流でSQUU-Aの浸潤能獲得に寄与していた遺伝子として、*CHD9* (Chromodomain helicase DNA binding protein 9)と*WRN* (Werner syndrome RecQ like helicase)を同定した。

Matrigel invasion assays using miRNA mimics and inhibitors



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

- (1) Yasukochi A<sup>†</sup>, Kawakubo-Yasukochi T<sup>†</sup> (corresponding author), Morioka M, Hazekawa M, Nishinakagawa T, Ono K, Nakashima M, Nakamura S. (2019) Regulation of collagen type XVII expression by miR203a-3p in oral squamous cell carcinoma cells. *J Biochem* (in press) <sup>†</sup>equivalent authors
- (2) Kawakubo-Yasukochi T (corresponding author), Morioka M, Ohe K, Yasukochi A, Ozaki Y, Hazekawa M, Nishinakagawa T, Ono K, Nakamura S, Nakashima M. (2019) Maternal folic acid depletion during early pregnancy increases sensitivity to squamous tumor formation in the offspring in mice. *J Dev Orig Health Dis* (in press)
- (3) Kawakubo-Yasukochi T (corresponding author), Morioka M, Hazekawa M, Yasukochi A, Nishinakagawa T, Ono K, Kawano S, Nakamura S, Nakashima M. (2018) miR-200c-3p spreads invasive capacity in human oral squamous cell carcinoma microenvironment. *Mol Carcinog* 57: 295-302.
- (4) Hayashi Y, Kawakubo-Yasukochi T (corresponding author), Mizokami A, Hazekawa M, Yakura T, Naito M, Takeuchi H, Nakamura S, Hirata M. (2017) Uncarboxylated osteocalcin induces antitumor immunity against mouse melanoma cell growth. *J Cancer* 8(13): 2478-2486.
- (5) Hazekawa M, Hideshima Y, Ono K, Nishinakagawa T, Kawakubo-Yasukochi T, Takatani-Nakase T,

- Nakashima M. (2017) Anti-inflammatory effects of water extract from bell pepper (*Capsicum Annuum* L. var. *grossum*) leaves in vitro. *Ex Ther Med* 14: 4349-4355.
- (6) Hazekawa M, Morioka M, Nishinakagawa T, Kawakubo-Yasukochi T, Nakamura S, Nakashima M. (2017) Assessment of cytotoxicity of imatinib for oral squamous cell carcinoma by real-time analysis system. *eJBio* 13: 56-62.
- (7) Kondo A, Kawakubo-Yasukochi T (corresponding author), Mizokami A, Chishaki S, Takeuchi H, Hirata M. (2016) Uncarboxylated osteocalcin increases serum nitric oxide levels and ameliorates hypercholesterolemia in mice fed an atherogenic diet. *eJBio* 13(1): 22-28.
- (8) Morioka M, Hazekawa M, Kawakubo-Yasukochi T, Nishinakagawa T, Nakamura S, Nakashima M. (2016) Effect of collagen type I or human fibronectin on imatinib cytotoxicity in oral squamous cell carcinoma. *Pharmacology & Pharmacy* 7: 255-263.
- (9) Morioka M, Kawakubo-Yasukochi T (corresponding author), Hayashi Y, Hazekawa M, Nishinakagawa T, Ono K, Kawano S, Nakamura S, Nakashima M. (2016) Exosomes from oral squamous carcinoma cell lines, SQUU-A and SQUU-B, define the tropism of lymphatic dissemination. *J Oral Biosci* 58: 180-184.
- (10) Kawakubo-Yasukochi T, Kondo A, Mizokami A, Hayashi Y, Chishaki S, Nakamura S, Takeuchi H, Hirata M. (2016) Maternal oral administration of osteocalcin protects offspring from metabolic impairment in adulthood. *Obesity* 24: 895-907.
- (11) Kawakubo-Yasukochi T, Morioka M, Hayashi Y, Nishinakagawa T, Hazekawa M, Kawano S, Nakamura S, Nakashima M. (2016) SQUU-B cell line spreads its metastatic properties to nonmetastatic clone SQUU-A from the same patient through exosomes. *J Oral Biosci* 58: 33-38.
- (12) Yasutake Y, Mizokami A, Kawakubo-Yasukochi T, Chishaki S, Takahashi I, Takeuchi H, Hirata M. (2016) Long-term oral administration of osteocalcin induces insulin resistance in male mice fed a high-fat, high-sucrose diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 310: E662-E675.

〔学会発表〕（計 31 件）

- (1) Kawakubo-Yasukochi T, Morioka M, Hazekawa M, Nishinakagawa T, Yasukochi A, Nakamura S, Nakashima M. 「miR-200c-3p spreads invasive capacity in human oral squamous cell carcinoma microenvironment」 第 92 回日本薬理学会年会、2019 年 3 月
- (2) 安河内 (川久保) 友世 「妊娠母体が飲用する胎盤通過性オステオカルシンが胎児の糖脂質代謝関連臓器のエピジェネティックな変化に及ぼす影響」 DIJF カンファレンス、2018 年 10 月
- (3) 小野和彦、櫛川舞、西中川拓也、安河内 (川久保) 友世、中島学 「PBA 投与後血清中に誘導される抗炎症活性本体の解明」 日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月
- (4) 櫛川舞、小野和彦、西中川拓也、安河内 (川久保) 友世、中島学 「抗炎症作用を有するピーマン葉水抽出エキス中の成分探索」 日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月
- (5) Morioka M, Kawakubo-Yasukochi T, Hazekawa M, Nishinakagawa T, Ono K, Kawano S, Nakamura S, Nakashima M. 「Microenvironmental communication within oral squamous cell carcinoma defined by exosomes」 第 65 回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会、2017 年 11 月
- (6) 森岡政彦、安河内 (川久保) 友世、中村誠司、中島学 「口腔扁平上皮癌における AT1 受容体拮抗薬の影響」 第 59 回歯科基礎医学会学術大会、2017 年 9 月
- (7) 安河内篤、森岡政彦、安河内 (川久保) 友世、中島学、中村誠司 「口腔扁平上皮癌における BP180 の局在」 第 59 回歯科基礎医学会学術大会、2017 年 9 月
- (8) 安河内 (川久保) 友世、森岡政彦、安河内篤、中村誠司、中島学 「非コード RNA による口腔癌の進展制御」 第 59 回歯科基礎医学会学術大会、2017 年 9 月
- (9) Hazekawa M, Morioka M, Nishinakagawa T, Kawakubo-Yasukochi T, Nakamura S, Nakashima M. 「Therapeutic effects of self-assembled siRNA-PLGA hybrid conjugate micelles for ovarian cancer」 第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年 9 月
- (10) 安河内 (川久保) 友世、近藤皓彦、溝上颯子、平田雅人 「妊娠母体が摂取したオステオカルシンが次世代に及ぼす影響」 第 6 回日本 DOHaD 学会学術集会、2017 年 8 月
- (11) Hazekawa M, Morioka M, Nishinakagawa T, Kawakubo-Yasukochi T, Nakamura S, Nakashima M. 「Preparation of self-assembled siRNA-PLGA hybrid conjugate micelles as GPC-3 gene silencing therapy for ovarian cancer」 The 6<sup>th</sup> Pharmaceutical Science World Congress 2017, 2017 年 8 月
- (12) 森岡政彦、安河内 (川久保) 友世、中村誠司 「口腔扁平上皮癌細胞由来エクソソームによるがん微小環境制御とリンパ行性転移の規定」 第 71 回日本口腔科学学会学術集会、2017 年 4 月

- (13) Hazekawa M, Nishinakagawa T, Kawakubo-Yasukochi T, Nakashima M. 「卵巣がんにおける siRNA-PLGA ハイブリッドミセル製剤の遺伝子抑制による治療効果」 第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月
- (14) Morioka M, Kawakubo-Yasukochi T, Hazekawa M, Nishinakagawa T, Ono K, Kawano S, Nakamura S, Nakashima M. 「Exosome-mediated crosstalk determines invasiveness and organotropic metastasis in oral squamous carcinoma」 The 5<sup>th</sup> ASHNO Congress 2017, Congress of Asian Society of Head and Neck Oncology, 2017 年 3 月
- (15) Yasukochi A, Morioka M, Kawakubo-Yasukochi T, Nakashima M, Nakamura S. 「The significance of BP180 expression in oral squamous carcinoma cell invasion」 The 5<sup>th</sup> ASHNO Congress 2017, Congress of Asian Society of Head and Neck Oncology, 2017 年 3 月
- (16) Morioka M, Kawakubo-Yasukochi T, Nakamura S, Nakashima M. 「Exosome from oral squamous carcinoma cells define the tropism of invasiveness and lymphatic dissemination」 Kyudai Oral Bioscience 2017, 2017 年 2 月
- (17) Hayashi Y, Kawakubo-Yasukochi T, Mizokami A, Nakamura S, Hirata M. 「Uncarboxylated osteocalcin prevents cancer progression through multiple mechanisms including immune system」 Kyudai Oral Bioscience 2017, 2017 年 2 月
- (18) 安河内 (川久保) 友世、近藤皓彦、溝上颯子、竹内弘、平田雅人 「オステオカルシンを用いた次世代生活習慣病改善へのアプローチ」 第 37 回日本肥満学会 (招待講演)、2016 年 10 月
- (19) Nishinakagawa T, Hazekawa M, Kawakubo-Yasukochi T, Nakashima M. 「Identification of the cytotoxic factor secreted by tumor cell line」 第 75 回日本癌学会学術大会、2016 年 10 月
- (20) Hazekawa M, Morioka M, Nishinakagawa T, Kawakubo-Yasukochi T, Nakashima M. 「Application of real-time cell monitoring device in evaluation the IC50 levels of anticancer reagents」 第 75 回日本癌学会学術大会、2016 年 10 月
- (21) Hayashi Y, Kawakubo-Yasukochi T, Mizokami A, Nakamura S, Hirata M. 「Differential functions of carboxylated and uncarboxylated osteocalcin on cancer growth」 ANZHNCS Annual Scientific Meeting and the IFHNOS 2016 World Tour, 2016 年 10 月
- (22) Hazekawa M, Morioka M, Nishinakagawa T, Kawakubo-Yasukochi T, Nakashima M. 「Assessment of cytotoxicity of anticancer reagents for oral squamous cell carcinoma using a real-time cell monitoring analysis system」 ANZHNCS Annual Scientific Meeting and the IFHNOS 2016 World Tour, 2016 年 10 月
- (23) Morioka M, Kawakubo-Yasukochi T, Hazekawa M, Nishinakagawa T, Ono K, Kawano S, Nakamura S, Nakashima M. 「Intercellular crosstalk defined by exosomes from oral squamous carcinoma cells determines its pathological process」 ANZHNCS Annual Scientific Meeting and the IFHNOS 2016 World Tour, 2016 年 10 月
- (24) Yasukochi A, Morioka M, Kawakubo-Yasukochi T, Obayashi K, Nakashima M, Nakamura S. 「Link of BP180 bullous pemphigoid autoantigen to invasive of oral squamous carcinoma cell」 ANZHNCS Annual Scientific Meeting and the IFHNOS 2016 World Tour, 2016 年 10 月
- (25) 森岡政彦、安河内 (川久保) 友世、中村誠司 「口腔扁平上皮癌細胞由来エクソソームによる細胞間クロストークと病態形成」 第 58 回歯科基礎医学会学術大会、2016 年 8 月
- (26) 林慶和、安河内 (川久保) 友世、溝上颯子、中村誠司、竹内弘、平田雅人 「癌の増殖における非 (低) カルボキシル化オステオカルシンの機能」 第 58 回歯科基礎医学会学術大会、2016 年 8 月
- (27) 西中川拓也、櫛川舞、安河内 (川久保) 友世、中島学 「ヒトがん細胞株培養上清中に含まれる細胞障害活性因子の同定」 第 20 回日本がん免疫学会総会、2016 年 7 月
- (28) Kondo A, Kawakubo-Yasukochi T, Mizokami A, Takeuchi H, Hirata M. 「The role of uncarboxylated osteocalcin in prevention of early atherosclerosis」 The 9<sup>th</sup> Korea-Japan conference on cellular signaling for young scientists, 2016 年 7 月
- (29) Hayashi Y, Kawakubo-Yasukochi T, Mizokami A, Nakamura S, Takeuchi H, Hirata M. 「The effect of uncarboxylated osteocalcin on cancer growth」 The 9<sup>th</sup> Korea-Japan conference on cellular signaling for young scientists, 2016 年 7 月
- (30) 林慶和、安河内 (川久保) 友世、中村誠司、平田雅人 「非 (低) カルボキシル化オステオカルシンの癌進展抑制効果とその作用機序」 第 70 回日本口腔科学会学術集会、2016 年 4 月
- (31) Hayashi Y, Kawakubo-Yasukochi T, Nakamura S, Hirata M. 「New functions of osteocalcin in cancer progression」 The 57<sup>th</sup> Congress of the Korean Association of Oral Maxillofacial Surgeons (KAOMS), 2016 年 4 月

〔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

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：森岡政彦

ローマ字氏名：Masahiko Morioka

※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。