

令和元年5月21日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04801

研究課題名(和文) カテプシンK-Notch signal 経路 とサルコペニアに関する研究

研究課題名(英文) Cathepsin K-Notch signal pathway and sarcopenia

研究代表者

葛谷 雅文 (KUZUYA, Masafumi)

名古屋大学・未来社会創造機構(医)・教授

研究者番号：10283441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)： システインプロテアーゼであるカテプシンK(Cat K)はタンパク質分解酵素であるが、我々はCat Kが筋肉の再生に関する可能性を考え、Cardiotoxinという毒物を筋肉に注射し、筋肉障害モデルを作成しCat Kの欠損マウスや阻害剤を使用し、Cat Kの役割を検討した。この研究により、Cat Kは筋肉障害後に高発現し、炎症を惹起することにより筋肉の障害を増強し、再生を遅延させることを明らかにした。さらに癌でおこる悪液質のモデルにおいてもCat Kの骨格筋への影響を検討したところ、Cat Kが悪液質においても骨格筋障害に関与することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カヘキシアは癌や臓器不全を抱える患者の死亡やQOLの低下に強くかかわっており、今後この病態の解明と治療が望まれている。Cat Kが炎症を惹起し、骨格筋に障害を与えることが分かったことより、将来悪性腫瘍や、臓器不全に伴う骨格筋量の減少や筋力低下(サルコペニア)に対する治療のターゲット分子になる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： The cysteine protease cathepsin K (Cat K) is a proteolytic enzyme, we considered that Cat K may be involved in skeletal muscle regeneration. Muscle injury model was created by injecting cardiotoxin into muscles, and Cat K deficiency mice and inhibitors were used to investigate the role of Cat K. This study revealed that Cat K is highly expressed after muscle injury and enhances inflammation and delays regeneration by inducing inflammation. Furthermore, we also revealed that Cat K is also involved in skeletal muscle disorder in cachexia using mouse cancer-induced cachexia model.

研究分野：サルコペニア、老年医学、栄養、動脈硬化

キーワード：老化 骨格筋 動物

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

### 1. 研究開始当初の背景

高齢者の四肢骨格筋量の低下ならびに筋力低下(サルコペニア)は要介護状態に至る主要な原因であり、超高齢社会に突入した我が国において喫緊の対策が望まれる。しかしながら、サルコペニア発症機構はまだ不明な部分が多い。我々は老化促進マウス(senescence-accelerated prone 10 (SAMP10))を使用し、若い月齢の時点で野生型の骨髄を移植することにより、サルコペニアの出現を抑制することを明らかにし、サルコペニアの要因に骨髄由来幹細胞の老化が関与している可能性を明らかにした(Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle, 2017; 8,370-85.)

一方、我々はシステイン・プロテアーゼであるカテプシン(Cat) 特に細胞外に分泌され、様々な機能を有する Cat-K ならびに Cat-S を中心に血管生物学関連の研究を長年実施してきた。最近、Cat-K が Notch1 受容体の細胞内ドメインを切断し Notch1 活性化に重要な役割を果たしていることを明らかにし、その下流の Hes1-Hey-1/2 発現と VEGF/ R1-PI3K/Akt シグナル経路の活性化を介して血管新生に関与することを報告した(Nature Communication, 2014;5:3838)。

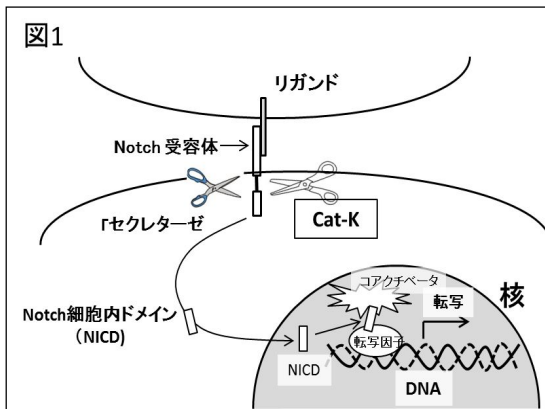
Notch シグナルは細胞の分化・増殖を制御するために細胞間でやり取りされるシグナルで、受容体である Notch (Notch1 ~4 のファミリーの中で血管、筋肉細胞とも Notch1 が存在)の細胞外ドメインと隣接する細胞に発現したリガンド(Delta/Serrate/Jagged)が細胞の表面で結合することにより、蛋白質切断酵素の作用を介し Notch は活性化される。最終的には Notch 細胞内ドメイン(NICD)が $\gamma$ セクレターゼにより切断され、切り離された NICD が核へと移行し、コアクチベーターや転写因子(Hes-1, Hey-1)と相互作用することにより標的遺伝子の転写を促進する(図1)。

上で述べたように我々は $\gamma$ セクレターゼ以外に Cat-K にも NICD 切り出しの役割があることを初めて明らかにした(図1)。

実際、Cat-K 欠損マウスでは Notch1 の切り出しが抑制され、また Cat-K 阻害剤と $\gamma$ セクレターゼ阻害剤は NICD の切り出しを相加的に抑制した。

骨格筋における Notch シグナルは以前より衛星細胞(筋幹細胞)の活性化、筋芽細胞の増殖、骨格筋形成、障害後の再生に関与していることが知られている。衛星細胞に Notch シグナルを欠損させると、筋衛星細胞の活性化、筋芽細胞の増殖が消失する(Stem Cells. 2013;31:823-8) また老化マウスでは障害後の筋肉再生不全が起こるが、その要因としても Notch シグナル系の関与が指摘されている。実際、老化マウスでは骨格筋の衛星細胞で Notch1 受容体や Delta1 リガンド自体が減少しており、強制的に Notch シグナルを活性化することによりこの老化マウスの筋肉再生が亢進する。(Nature. 2005;433:760-4.)

以上の背景より、我々は Cat-K は Notch 活性化を介して骨格筋の再生を促し、老化マウスにおける障害後の筋肉再生に関与するのみならず、サルコペニアに対しても保護的に働くのではないかと、この仮説を立て、その仮説を検証するために以下の実験を行った。



### 2. 研究の目的

サルコペニア(加齢に伴う筋量ならびに筋力低下)は高齢者の日常生活動作の制限、転倒骨折、フレイルなどと密接に関連し、介護予防の観点からも予防ならびに治療介入が望まれるところであるが、なおその病態は不明な部分が多い。Notch シグナルは骨格筋発生、分化、再生に重要な役割を果たし、老化に伴いそのシグナル障害が起こることが報告されている。我々は近年システイン・プロテアーゼであるカテプシンK (Cat-K) が Notch1 の細胞内ドメインを切断し、その活性化に関与することを明らかにした(Nat Commun, 2014)。当該研究は Cat-K の Notch シグナル活性化を介するサルコペニア形成、骨格筋再生への関与を明らかにし、今後 Cat-K Notch 経路がそれらの病態の治療・予防に対する分子標的となり得ることを検証する。

### 3. 研究の方法

我々はカテプシンK (Cat-K) が Notch シグナル活性化を介して、障害後の骨格筋再生を促進させるのではないかとこの仮説に基づき以下の実験を実施した。

#### (1) 実験1 骨格筋障害後の再生過程への Cat-K、Notch シグナルの関与に関する研究

野生型マウス(9-12 週齢、雄、C57BL/6J)の片側下肢骨格筋に心臓毒(Cardiotoxin; CTX, 20 $\mu$ m/0.2ml)を注入し、筋肉障害を誘導した。その後、0日(CTX投与前)、3日、7日、14日目にマウスの運動量(握力、トレッドミル走行時間・距離・仕事量)を測定し、下肢の血流測定とともに筋肉を取り出し、以下のA)~C)の組織学的また生化学的検討を実施した。

A) 化学的解析および形態学的解析:筋細胞の修復ならびに炎症細胞の浸潤を評価(H/E); 腓腹筋の損傷ならびに修復観察(dMHC); 骨格筋の構造観察(抗ミオシン抗体、抗デスミン抗体); 増殖細胞(抗PCNA抗体); アポトーシス評価(TUNAL染色)

B) RNA 発現解析：mRNA を抽出し RT-PCR による Cat-K, Cat-S, Cat-L, Cat-B, Pax7, MyoD, Miogenin, IGF-1mRNA の定量を行った。

C) タンパク質解析 (western blotting)：Notch, NICD (cleaved Notch1), Hes-1, Hey-1, Hey-2, Deltal, Jagged1 などの測定を行った。

Cat-K 遺伝子欠損変異マウス (以下 Cat-K<sup>-/-</sup>) を使用し、と同様なプロトコールで実験を実施した。

阻害実験系として野生型マウスに、Cat-K の選択的阻害剤 (ONO-KK1-300-01) を使用して、CTX 投与の 3 日前より隔日に腹腔内投与し、実験終了まで継続した。その後、上記と同様な解析を実施した。

C2C12 細胞 (マウス筋芽細胞) を使用し、Notch シグナルと Cat-K との関連性を明らかにした。

A) 培養 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> または CTX を加えることにより障害を誘導し、Cat-K の発現さらに Notch シグナルの活性化を検討した。

B) Cat-K 定量：mRNA、タンパク、ザイモグラフィー (Cat 活性) で解析、Cat-K の関与を明確にするため作成済みの Cat-K siRNA を用い、Notch シグナルの活性化を検討した。

## (2) 実験 2 癌悪液質モデルの確立ならびに悪液質過程における Cat-K の動向、ならびに悪液質における炎症反応の動向に関する研究

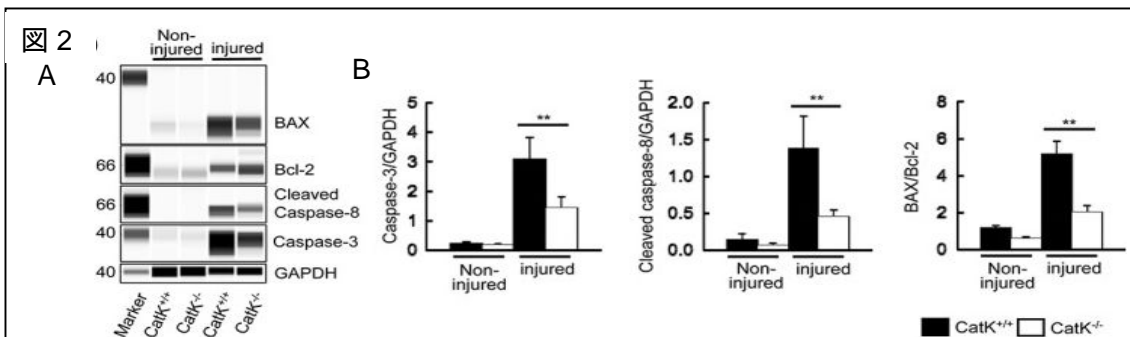
癌悪液質モデルの確立：6 週齢の C57BL/6J マウスにマウス肺癌細胞株 (Lewis lung carcinoma, LLC, 1×10<sup>6</sup> 個) を背側皮下に移植し、移植 28 日後にサンプリングを実施した。マウス身体機能評価：経過中、マウス運動量を定量化するため、マウス握力計を使用して評価した。

サンプリング：両側下肢筋肉を採取し、重量を測定後腓腹筋 (gastrocnemius) とヒラメ筋 (soleus) に分割し、一部を組織学的検討用に液体窒素にて凍結包埋した後、残りを生化学的評価、タンパク質解析用に凍結保存するとともに、mRNA 解析用に RNAlater solution (RNA 安定化液) で保存した。採血サンプルは血清を分離し、生化学検査用に凍結保存した。血液生化学検査/mRNA 解析/タンパク質定量：血清中の LDH, CK, CRP, IL-1β, TNF-α, IL-6, IGF-1, myostatin を ELISA で定量化する。筋肉組織より抽出した mRNA の定量を RT-PCR 法にて実施した。ターゲットは以下の遺伝子とする。Cat-K, Cat-S, Cat-L, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, 2, TLR-2, 4, MCP-1, TNF-α, GAPDH。骨格筋よりタンパク質を抽出し、Western blotting 法にて以下のタンパク質を定量した。(cleaved caspase-8, caspase-3, BAX, Bcl-2, p-Akt, p-mTOR, FoxO1-3, MuRF1, Atrogin, p65, p-ikBα, MAP kinase p38, GAPDH)

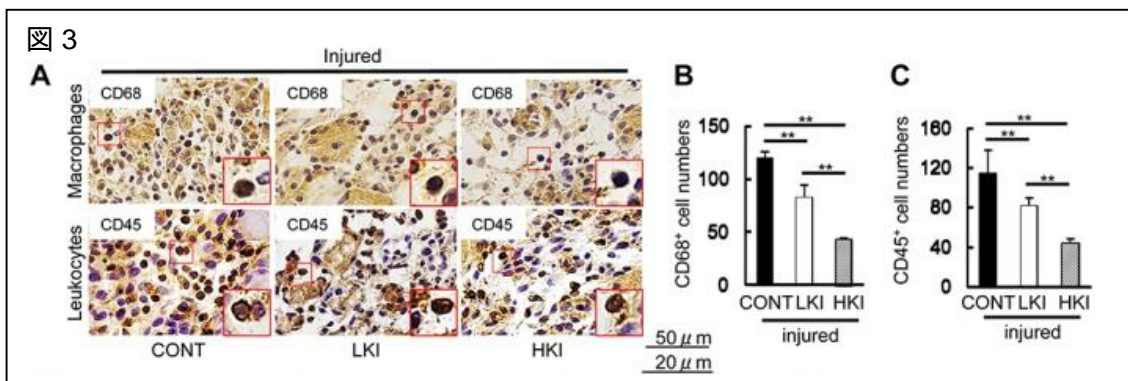
## 4. 研究成果

### (1) 骨格筋障害後の再生過程への Cat-K、Notch シグナルの関与に関して

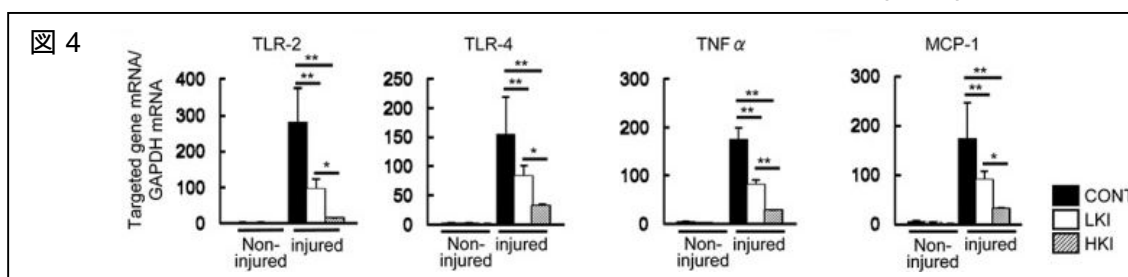
9-12 週齢の野生型マウスに CTX を下肢に注射したところ、筋肉の障害に伴い筋肉での Cat-K mRNA の著しい上昇を認めた。Cat-K の筋肉障害再生への影響を明らかにする目的で野生型ならびに Cat-K 遺伝子欠損マウス (Cat-K<sup>-/-</sup> マウス) を使用し、CTX による片側下肢骨格筋障害モデルで運動機能評価のため、小動物握力測定装置にて四肢握力測定し、トレッドミル運動能力テストで垂直方向への仕事量の測定を行ったところ、障害後 3 日目と 14 日目において仕事量と四肢握力の有意な改善が Cat-K<sup>-/-</sup> マウスで認められた。組織学的解析および形態学的解析では、障害後 3 日目の組織学的解析の結果、Cat-K<sup>-/-</sup> において損傷した腓腹筋における浸潤マクロファージ (CD68<sup>+</sup> 細胞) と白血球 (CD45<sup>+</sup> 細胞) の数が有意に低下し、マクロファージの浸潤と炎症性白血球の著明な低下とアポトーシスの抑制を認めた。骨格筋の構造変化の評価のためのラミニン、デスミンの蛍光二重染色では障害後 14 日目の組織学的解析において Cat-K KO による障害された骨格筋間質線維化の有意な低下とラミニン構造の有意な保持が明らかになった。そして、障害後 3 日目の骨格筋組織を採集し、定量 PCR と Western Blotting 法にて解析を行った結果 (図 2) Cat-K<sup>-/-</sup> マウス骨格筋組織における cleaved-caspase-8, cleaved-Notch1, Akt, Hes-1, Hey-1, ならびに Hey-2 蛋白発現ならびに BAX/Bcl-2 比の低下、腫瘍壊死因子 (TNF-α)、単球走化性タンパク質-1 (MCP-1) や Toll 様受容体-2/-4 (TLR-2/-4) の遺伝子発現が低下し、マトリックス・メタロプロテイナーゼ-2/-9 (MMP-2/-9) の遺伝子発現と活性の低下を認めた。



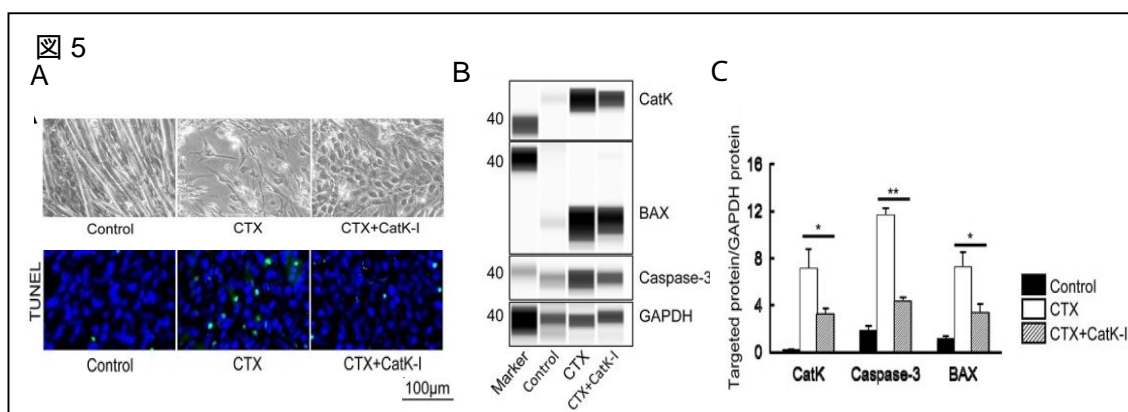
次に、選択的カテプシン K 阻害剤により、障害後 3 日目の骨格筋の組織学的解析の結果、LKI (低用量 Cat-K 阻害剤, 6mg/day) および HKI (高用量 Cat-K 阻害剤, 60mg/day) 投与群において容量依存的に Cat-K<sup>-/-</sup> マウスで認めたと同様な炎症性白血球とマクロファージの浸潤の著明な低下と、炎症作用の改善を認めた (図 3)。



また、RT-PCR 解析の結果、LKI、および HKI 群において、損傷筋肉群で高発現している TLR-2、TLR-4、TNF- $\alpha$ 、および MCP-1 のレベルの有意な低下を認めた (図 4)。



さらに、C2C12 筋芽細胞を培養し、骨格筋細胞へ分化させた後 CTX を投与した群と、CTX 添加前に選択的カテプシン K 阻害剤を添加した CTX+CatK-I 群を比較したところ、選択的カテプシン阻害剤使用にてアポトーシスは有意に減少した (図 5)。また、蛋白定量においてカテプシン K の活性の低下、アポトーシス関連タンパクである Caspase-3 と BAX の発現低下を認め、細胞実験においても選択的カテプシン K 阻害剤によりアポトーシスが抑制されることが示された。



## (2) カヘキシアにおける Cat-K の関与に関して

当該研究の最初の仮説は Cat-K により Notch の活性化を介して筋肉再生が促進されるというものであったが、結果は逆であり、障害後骨格筋での Cat-K 発現の上昇がむしろ筋肉再生を阻害する要因であることを明らかにした。この点を利用し、現在多くの疾患で臨床的にも問題となっているカヘキシアによる骨格筋萎縮 (サルコペニア) と Cat-K との関係性をマウスのカヘキシアモデル (C57BL/6J にマウス肺癌細胞株 (Lewis lung carcinoma, LLC,  $1 \times 10^6$  個) を背部皮下に移植し、移植 28 日後にサンプリングする) を作成し、パイロット的に下肢筋肉の評価、ならびに運動機能評価を行った。移植 28 日後に摘出した腫瘍組織重量は両群で有意差を認めず、腫瘍組織重量を除いた体重の変化率はコントロール群 (C57BL/6J) に比較し、LLC を移植したカヘキシアモデル群で有意に低下し、下肢筋重量も有意に減少した。筋線維サイズはコントロール群に比較し有意に減少し、さらにカヘキシアモデル群で握力の有意な低下を認めた。

また、サンプリングした筋細胞 (腓腹筋) の生化学的検査を実施したところ、ユビキチンプロテアソーム系の遺伝子発現がカヘキシアモデル群で有意に高くなっていった。同様に、LLC を Cat-K<sup>-/-</sup> マウスに移植し、下肢筋肉の評価ならびに運動機能評価を行ったところ、Cat-K<sup>-/-</sup>



+カヘキシアモデル群では野生型カヘキシアモデル群で認めた体重減少および筋重量の低下を認めず、筋線維サイズの有意な増加を認めた。運動機能評価についても Cat-K<sup>-/-</sup>+カヘキシアモデル群では握力低下を認めなかった。Cat-K<sup>-/-</sup>+カヘキシアモデル群においてユビキチンプロテアソーム系の遺伝子発現は低下していた。以上より、カヘキシアモデルにおいて Cat-K のサルコペニア抑制効果が示唆された。

### (3) 考察

Cat-K が Notch1 活性化を介して骨格筋のリモデリングと再生を促進するとの仮説を立てた。しかしながら今回の一連の研究より、仮説とは逆の結果が導かれた。すなわち、cardiotoxin (CTX) による急性骨格筋障害の後に Cat-K は著しく障害筋肉で高発現し、炎症を惹起することによりむしろ筋肉再生を抑制することが明らかとなった (雑誌論文 ; J Cachexia Sarcopenia Muscle. 2018; 9(1):160-175)。この結果は Cat-K が生体内で炎症を調節する役割を担い、骨格筋障害、再生をレギュレートしている可能性を示唆している。そこで、視点を変え、我々は炎症によりサルコペニアを誘導することが知られるカヘキシアにターゲットを変更し解析した。結果に示したとおり、なお研究半ばではあるが、我々の仮説通りマウスの悪性腫瘍によるカヘキシアモデルで Cat-K は骨格筋での炎症に関わり、サルコペニアの誘導に関与していることが明らかになりつつある。今後、Cat-K は、高齢者のフレイル、ADL、QOL、生命予後に悪影響をもたらすカヘキシアの予防・治療のための新たな分子標的になることの可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文](計8件)

- Kuzuya M. Aging-related frailty and sarcopenia. The concepts and diagnostic criteria of frailty. Clin Calcium. 28(9), 1171-1176. 2018. doi: CliCa180911711176. 査読無
- Inoue A, Kuzuya M, Cheng XW. Aging-related frailty and sarcopenia. Frailty - Sarcopenia and biomarker. Clin Calcium. 28(9), 1191-1200. 2018. doi: CliCa180911911200. 査読無
- Piao L, Yu C, Xu W, Inoue A, Shibata R, Li X, Nan Y, Zhao G, Wang H, Meng X, Lei Y, Goto H, Ouchi N, Murohara T, Kuzuya M, Cheng XW. Adiponectin/AdiponR1 signal inactivation contributes to impaired angiogenesis in mice of advanced age. Int J Cardiol. 267, 150-155. 2018. doi: 10.1016/j.ijcard.2018.05.089. 査読有
- Jiang H, Sasaki T, Jin E, Kuzuya M, Cheng XW. Inflammatory Cells and Proteases in Abdominal Aortic Aneurysm and its Complications. Curr Drug Targets. 19(11), 1289-1296. 2018. doi: 10.2174/1389450119666180531103458. 査読有
- Ogasawara S, Cheng XW, Inoue A, Hu L, Piao L, Yu C, Goto H, Xu W, Zhao G, Lei Y, Yang G, Kimura K, Umegaki H, Shi GP, Kuzuya M. Cathepsin K activity controls cardiotoxin-induced skeletal muscle repair in mice. J Cachexia Sarcopenia Muscle. 9, 160-175. 2018. doi: 10.1002/jcsm.12248. 査読有
- Inoue A, Cheng XW, Huang Z, Hu L, Kikuchi R, Jiang H, Piao L, Sasaki T, Itakura K, Wu H, Zhao G, Lei Y, Yang G, Li X, Sato K, Koike T, Kuzuya M. Exercise restores muscle stem cell mobilization and regenerative capacity and muscle metabolic alterations via adiponectin/AdipoR1 activation in SAMP10 mice. Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle. 8, 370-385. 2017. doi: 10.1002/jcsm.12166. 査読有
- Yang G, Lei Y, Inoue A, Piao L, Hu L, Jiang H, Sasaki T, Wu H, Xu W, Yu C, Zhao G, Ogasawara S, Okumura K, Kuzuya M, Cheng XW. Exenatide mitigated diet-induced vascular aging and atherosclerotic plaque growth in ApoE deficient mice under chronic stress. Atherosclerosis. 264, 1-10. 2017. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.07.014. 査読有
- Zhu E, Hu L, Wu H, Piao L, Zhao G, Inoue A, Kim W, Yu C, Xu W, Bando YK, Li X, Lei Y, Hao CN, Takeshita K, Kim WS, Okumura K, Murohara T, Kuzuya M, Cheng XW. Dipeptidyl Peptidase-4 Regulates Hematopoietic Stem Cell Activation in Response to Chronic Stress. J Am Heart Assoc. 6, pii: e006394. 2017. doi: 10.1161/JAHA.117.006394. 査読有

### [学会発表](計14件)

- 葛谷雅文. シンポジウム 2 サルコペニア・フレイルの基礎研究はここまで来た サルコペニアに対する運動介入効果の機構ならびに骨髄幹細胞の役割に関する研究. 第5回日本サルコペニア・フレイル学会大会 (招待講演). 2018.
- Piao L, Cheng XW, Inoue A, Kuzuya M. DPP4 Negatively Modulates Neovascularization in Mice under Chronic Stress. 第50回日本動脈硬化学会総会・学術集会. 2018.
- Cheng XW, Piao L, Inoue A, Kuzuya M. Exenatide Mitigated Diet-induced Vascular Aging and Atherosclerotic Plaque Growth in ApoE-Deficient Mice under Chronic Stress. 第50回日本動脈硬化学会総会・学術集会. 2018.
- 井上愛子、成憲武、朴麗梅、五藤大貴、小笠原真雄、葛谷雅文. 老化促進マウス (SAMP10) における若齢骨髄移植による加齢性筋萎縮の予防効果. 第4回日本サルコペニア・フレイル

学会大会. 2017.

五藤大貴、成憲武、井上愛子、小笠原真雄、葛谷雅文. Cardiotoxinによる骨格筋障害後の修復・再生におけるGFXの役割に関して. 第4回日本サルコペニア・フレイル学会大会. 2017.

小笠原真雄、成憲武、井上愛子、五藤大貴、葛谷雅文. 骨格筋障害後のカテプシンKの役割及びその機序に関して. 第4回日本サルコペニア・フレイル学会大会. 2017.

Cheng XW, Inoue A, Hu L, Piao L, Kuzuya M. Prevention of Muscle Wasting with Aging in SAMP10 Mice by a Combination of Exercise and Intrabone Young Bone Marrow Injection. The 2nd Asian Conference for Frailty and Sarcopenia. 2016.

Inoue A, Cheng XW, Hu L, Piao L, Kuzuya M. Exercise Restores Muscle Stem Cell Mobilization and Regenerative Capacity and Muscle Metabolic Alterations via Adiponectin/ AdipoR1 Activation in SAMP10 mice. The 2nd Asian Conference for Frailty and Sarcopenia. 2016.

井上愛子、成憲武、胡麗娜、朴麗梅、葛谷雅文. 老化促進モデルマウスにおける運動介入のサルコペニア予防効果. 第3回日本サルコペニア・フレイル研究会. 2016.

成憲武、井上愛子、胡麗娜、朴麗梅、葛谷雅文. SAMP10マウスにおける運動と若齢マウス骨髄移植併用による加齢による筋萎縮の防止. 第3回日本サルコペニア・フレイル研究会. 2016.

井上愛子、成憲武、小笠原真雄、葛谷雅文. サルコペニアに対する骨髄細胞療法の効果及びその機序に関して. サルコペニアに対する骨髄細胞療法の効果及びその機序に関して. 第57回日本老年医学会・第38回日本基礎老化学会共催. 2015.

Zhao G, Cheng XW, Piao L, Jiang H, Inoue A, Sasaki T, Toyoaki M, Kuzuya M. Cathepsin K-Mediated Notch 1 Activation Contributes to Ischemia induced Neovascularisation in Aged Mice. 第47回日本動脈硬化学会総会・学術集会. 2015.

小笠原真雄、成憲武、井上愛子、五藤大貴、葛谷雅文. Cardiotoxinによる骨格筋障害モデル作成および解析. 第2回 日本サルコペニア・フレイル研究会. 2015.

井上愛子、成憲武、黄哲、佐々木健、胡麗娜、姜海英、木村薫、小笠原真雄、五藤大貴、朴麗梅、葛谷雅文. サルコペニアに対する骨髄細胞療法の効果及びその機序に関して. 第2回日本サルコペニア・フレイル研究会. 2015.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: カテプシン K 阻害剤を含んでなる骨格筋疾患の予防および/または治療のための医薬組成物

発明者: 成憲武、葛谷雅文、小笠原真雄、越智保夫、西川聡

権利者: 名古屋大学

種類: 特許

番号: 2016-214335

出願年月日: 2016年11月1日

国内外の別: 国内

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

## 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: 小笠原 真雄

ローマ字氏名: (OGASAWARA, shinyu)

研究協力者氏名: 井上 愛子

ローマ字氏名: (INOUE, aiko)

研究協力者氏名: 木村 薫

ローマ字氏名: (KIMURA, kaoru)

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。