

令和元年5月30日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05272

研究課題名(和文) 心筋梗塞やがんなどへのDNase familyの病態遺伝・生理学的関与の解明

研究課題名(英文) Elucidation of medical-genetic and patho-physiological involvement of DNase family in myocardial infarction and cancer

研究代表者

安田 年博 (YASUDA, Toshihiro)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：80175645

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：(1) DNASE1に合計42個の活性喪失型となるgenetic variantsを同定した。これらはin vivo酵素活性レベルを減弱させるものであり、自己免疫疾患等のリスクファクターになる。(2) 関節リウマチに係るDNase 1-like 3及びDNase II遺伝子に活性喪失型を産生する、それぞれ4及び5個の非同義置換型SNPsを同定した。(3)皮膚角化に関与するDNase 1-like 2遺伝子に活性消失を惹起する32個の非同義置換型SNPs、19個のnonsense型及びframeshift変異を同定し、これらは尋常性疥癬などに見られる不全角化のリスクファクターになる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己免疫疾患や心筋梗塞などに関与するDNase I遺伝子では42個の、関節リウマチに関与するDNase 1-like 3およびDNase II遺伝子ではそれぞれ4及び5個の、尋常性乾癬における不全角化病変に係るDNase 1-like 2遺伝子では51個の不活性な酵素を産生するgenetic variantsを同定した。これらはin vivo DNase活性を減弱させるものであり、それら疾患のリスクファクターとなる。本研究の結果はDNase familyが自己免疫疾患などの遺伝的背景の一部となることの確証をもたらすものであり、もって、オーダーメイド医療の推進に寄与できる。

研究成果の概要(英文)：We could demonstrate that; (1) Total 42 genetic variants producing a loss-of-function could be identified in DNASE1. (2) In DNase 1-like 3 and DNase II genes, which have assumed to be involved in rheumatoid arthritis, 4 and 5 non-synonymous SNPs abolishing the activity, respectively, were found. Furthermore, the synonymous SNPs in the latter exhibited a significant association with rheumatoid arthritis in the Japanese populations. (3) DNase I-like 2 has been assumed to play a role in the etiology of parakeratosis through incomplete degradation of DNA in the epidermis. In DNASE1L2, 32 missense SNPs and 19 SNPs originating from frameshift/nonsense variants resulted in loss of function of the enzyme. (4) Almost all the variants producing a loss-of-function exhibited extremely low genetic heterogeneity. (5) Each of the minor alleles for these genetic variants may serve as one of genetic risk factors for various diseases, even though they lack a worldwide genetic distribution.

研究分野：法医学、病態遺伝生化学、酵素学

キーワード：DNase 遺伝的多型 一塩基多型 心筋梗塞 自己免疫疾患 遺伝的リスクファクター 遺伝的多様性

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

### 1. 研究開始当初の背景

報告者らは、従前の研究から、DNase I が消化器がんや心筋梗塞の新規な疾患感受遺伝子であること、心筋梗塞発症に際し血清 DNase I 活性レベルの急激な上昇が惹起されること等を明らかにし、その成果は高く評価された。本研究はそれらの研究成果を基盤とし、報告者らが見出した“多型性”を一つの基軸として、それら疾患の発症や診断に係る DNase I を含めた DNase family (DNase I-like 1, 2 及び 3, DNase II) の病態遺伝・生理学的関与を解明することによって、DNase family を疾患危険因子・診断マーカーとして検証することを主な研究目的としている。

従来から、DNase I を含めた DNase family は細胞死によって逸脱する高分子 DNA を排除するなどアポトーシスに関与すること、さらにそれに関連して自己免疫疾患に伴う抗核自己抗体の産生を抑制することが想定されてきた。また、自己免疫疾患患者において *in vivo* DNase family 活性の低下が報告されている。しかしながら、本研究で企画している DNase I を含めた DNase family の“多型性”を一つの基軸とした病態遺伝・生理学的関与の解明による疾患危険因子・診断マーカーとしての検証を目的とした研究は国内外でほとんどなされていない。

報告者らは DNase I 及び II 遺伝子内にタンパク・表現型レベルで多型部位を見出し、これら DNase が遺伝的多型形質（個人識別マーカー）であることを世界に先駆けて報告した。特に、主要対立遺伝子 *DNASE1\*1* 及び *\*2* によって支配される DNase I 多型（一塩基置換多型 SNP p.Gln244Arg に相当）における *DNASE1\*2* 対立遺伝子は消化器がんや心筋梗塞の新規な疾患感受性遺伝子であることを明らかにした (*Cancer*, 1998, **82**, 1621; *Eur Heart J*, 2006, **27**, 2081 など)。さらに、心筋梗塞（一過性心筋虚血）発症直後に血清 DNase I 活性レベルの一過的な急激な上昇が惹起され、DNase I が新たな鑑別診断マーカーになりうることを示唆した (*Circulation*, 2004, **109**, 2400 など)。また、DNase I 以外の DNase family が自己免疫疾患に関与していることが報告されてきたが、その病態遺伝学的背景は明らかでない。そこで、法医学への貢献（個人識別の高度化）を目的とした研究に端を発した DNase I を含めた DNase family について、これら疾患の発症・病態や診断に係る病態遺伝・生理学的関与を解明することができれば、DNase family が疾患危険因子・診断マーカーとして活用できる基盤を確立できるものとして本研究を着想した。

### 2. 研究の目的

本研究では、疾患危険因子としての DNase I の病態生理学的検証、心筋梗塞（一過性心筋虚血）鑑別診断マーカーとしての DNase I の検証、自己免疫疾患発症などに係る疾患感受性遺伝子としての DNase family 遺伝子多型の病態遺伝学的基盤の確立などを主な目的とした。なお、ここでは主に に関する研究成果を記載する。

具体的には、

- (1) DNase I 遺伝子における genetic variants の網羅的解析
- (2) 自己免疫疾患に係る DNase 1L3 および II 遺伝子に分布する SNPs に関する病態遺伝学的解析
- (3) DNase 1L2 遺伝子に分布する SNPs に関する病態遺伝学的解析
- (4) 心疾患患者などにおける血清中 cell-free DNA の予備的検討
- (5) 新規 CNVs (コピー数多型) 解析法の開発と DNase family 遺伝子への応用を実施した。

### 3. 研究の方法

- (1) DNase I 遺伝子における genetic variants の網羅的解析
- (2) 自己免疫疾患に係る DNase 1L3 および II 遺伝子に分布する SNPs に関する病態遺伝学的解析
- (3) DNase 1L2 遺伝子に分布する SNPs に関する病態遺伝学的解析  
それぞれの DNase について、主要 haplotype に対応する cDNA を挿入した発現ベクターを作成し、site-directed mutagenesis によってそれぞれの SNPs 等の minor-allele に相当するアミノ酸置換型 DNase 発現ベクターを構築した。次いで、それぞれの発現ベクターを導入した COS-7 細胞中に発現したそれぞれの DNase 活性を single radial enzyme diffusion 法によって定量した。  
それぞれの SNPs 等について、新たに開発した PCR-RFLP 法を利用した遺伝型判定法を用いて、アジア人、アフリカ人、白人など異なる 16 集団（計 1752 名）から採取した DNA について、それぞれ遺伝型を判定した。

- (4) 心疾患患者などにおける血清中 cell-free DNA の予備的検討

島根大学医学部救急外来の患者(51名)のおよび健康人(55名)の血清 1 mL から Maxwell® RSC ccfDNA Plasma Kit (Promega Corp.)を用いて circulating cell-free DNA の抽出を行った。なお、本研究計画は島根大学倫理委員会の承認を得ている。DNA 1000 kit を用いて、前項で抽出した cell-freeDNA の Shimadzu MultiNA による電気泳動を行った。

- (5) 新規 CNVs 解析法の開発と DNase family 遺伝子への応用

ゲノム DNA を鋳型として増幅した *ZNF80*、*DNASE* 遺伝子特異的な各配列を、pCR II vector

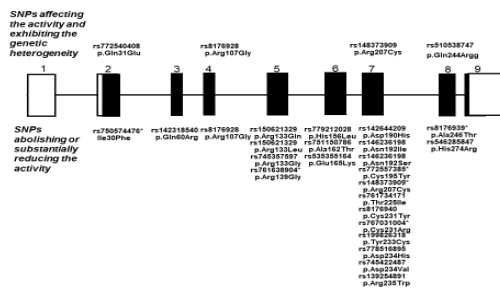
(Invitrogen) に挿入した。さらに、ZNF80 特異的配列および目的とする DNase CNV に特異的な配列をそれぞれ 1 コピーずつ含むキメラプラスミドを作製した。DNase CNV の解析に用いる ZNF80 および DNase の検量線は、キメラプラスミドの希釈列を鋳型とした real-time PCR (Q-PCR) により作成した。2 倍体あたりの CNV コピー数は式 [目的 CNV の増幅産物量/ ZNF80 の増幅産物量] × 2 によって算出した。当該解析法を利用して、DNase1、DNase1L3 および DNase2 に分布する CNVs について、日本人(265 名)およびドイツ人(80 名)集団における CNV コピー数を調査した。

#### 4. 研究成果

##### (1) DNase I 遺伝子における genetic variants の網羅的解析

内在性または外来 DNA を分解・除去する DNase I を含めた DNase family は生体内の恒常性維持に寄与しており、その活性減弱・消失は自己免疫疾患発症等に関与することが示唆されてきた。そこで、本研究では、DNase I を含めた DNase family の病態遺伝学的関与を明らかにするための一助として、活性減弱・消失を惹起する可能性がある遺伝子内の非同義置換型 SNPs やその他の genetic variants に着目し、その遺伝型 - 活性相関等を解析した。

報告者らは、これまで疾患の遺伝的リスクファクター となり得る loss-of-function 型を産生する非同義置換型 SNPs を網羅的に同定してきた。本研究では従来の研究で解析した 61 SNPs



に加え、あらたに NCBI SNP database に登録された 70 SNPs についてアミノ酸置換による酵素活性への影響を精査した。その結果、これら SNPs は 57 SNPs not affecting the activity, 36 SNPs reducing it, 21 SNPs elevating it および 18 SNPs abolishing it に分類できた。特に、後者の minor allele は loss-of-function 型を産生し、さらに wild-type に比して活性を 20% 以下に減弱させる 6 SNPs reducing it も同定され、これら SNPs は *in vivo* DNase I 活性を減弱させるものであることが明らかとなった (図 1)。

図 1 DNase1 に分布する loss-of-function 型 SNPs、多型性および活性変動を示す SNPs

病態と関連する SNPs を予測するため、従来から様々な prediction tools が *in silico* 解析に利用されている。本研究の結果は単一遺伝子における百数十のアミノ酸置換による機能への効果を網羅的に解析したものであり、このデータを基にこれら tool の予測の正確性を検証した。その結果、Polyphen-2 など六つのツールはいずれも活性に影響あるものをある程度正確に予測でき、中でも PredictSNP が最も高い正確性を示した。しかしながら、活性に影響ないものについては予測が必ずしも十分ではなく、病態への関与を明らかにするためには *in silico* 解析だけではなく、タンパクレベルの解析も必須であると考えられた。

DNase1 には 15 nonsense SNPs および 15 indels (inframe) が分布しており、本研究でそれらの酵素活性への影響を精査した。解析した全ての nonsense SNPs では酵素活性は検出できず、全て loss-of-function 型であった。さらに、DNase I タンパクの分子表面のループ領域に位置する 3 indels を除いて、13 indels (inframe) は酵素活性を示さない loss-of-function 型であった。また、これら genetic variants の相当するアミノ酸配列上の位置を鑑みると、DNase1 に分布する 15 indel (frameshift) は全て酵素活性を示さないものと容易に推定された。

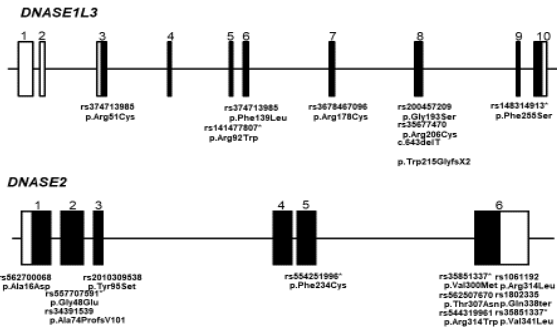
以上のことから、nonsense 型およびほとんどの indel 型は酵素活性を消失する loss-of-function 型であることが明らかとなり、自己免疫疾患等のリスクファクターになるものと考えられた。

非同義置換型 SNPs を含めた、これら genetic variants の分布を異なる多集団で明らかにするとともに 1000 genome project による population data を参照・調査した。その結果、global minor allele frequency が 0.01 以上のものが 14 個同定された。このうち、酵素活性を変動するものとして SNPs p.Gln31Glu、p.Arg107Gly、p.Arg207Cys および p.Gln244Arg が見出された (図 1)。中でも p.Gln244Arg は酵素活性が wild-type に比して約半分となる低活性型であり全ての集団で、他方 p.Arg107Gly は loss-of-function 型でありアフリカ人集団で、それぞれ多型レベルで分布した。特に、前者は酵素活性を減弱させるとともに広く多型性を示す SNP として様々な疾患の発症や病態に係る遺伝的背景を構成する一つになるものと考えられた。

報告者らは、SNPs p.Gln244Arg における低活性型の Arg 型 DNase I は心筋梗塞と有意な関連があることを報告した。近年、自然免疫応答の一つとして、好中球が核内のゲノム DNA などから構成される網目状構造体、neutrophil extracellular traps NETs を放出するが知られ、他方過度に誘発されると心筋梗塞など様々な疾患の発症・病態の進行を引き起こすことが報告されている。DNase I は過剰に形成された NETs の除去に関与する NETs の内因性制御因子として機能することが想定され、低活性型の Arg 型 DNase I が心筋梗塞のリスクファクターとなるのは、Gln 型 DNase I に比較し活性が低く、このため過剰に誘導された NETs の除去効果の低下に基づくものと考えられた。また、心筋梗塞発症直後の DNase I の一過的動員 (血清 DNase I 活性の上昇) は NETs の除去を促す病態生理学的な応答であることが示唆された。

(2) 自己免疫疾患に係る DNase 1L3 および II 遺伝子に分布する SNPs に関する病態遺伝学的解析

自己免疫疾患発症に係るヒト DNase family として DNase II および I-like 3 (1L3) 遺伝子



について、活性の減弱・消失をきたす functional SNPs を検索するため、これら遺伝子内に座する全ての非同義置換型 SNPs (35 及び 41 座位) について functionality および遺伝的多様性を精査した。その結果、アミノ酸置換による活性への影響の観点から、上述のように、SNPs を四つのタイプに分類できた。中でも “SNPs abolishing the activity” は loss-of-function 型酵素を産生する functional SNPs であり、それぞれ 4 及び 5 座位の SNPs が同定された(図2)。

図2 DNASE1L3 および DNASE2 に分布する functional SNPs

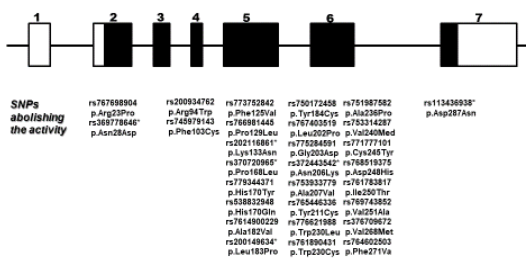
アスタリスクを付した SNPs は酵素活性を大幅に減弱させるものを示す。

これら functional SNPs について、3 大人種を含む異なる 16 集団において、loss-of-function 型酵素を産生する minor allele は見出せず、すべて mono-allelic な遺伝型分布を示した。従って、これら loss-of-function 型酵素を産生する functional SNPs は、遺伝的多様性は極めて乏しいものの、自己免疫疾患の遺伝的リスクファクターとなることが明らかとなった。

ドイツ人集団において、DNASE2 に分布する SNPs が関節リウマチに関連することが報告されており、報告者らは関連するそれぞれの遺伝型では血清 DNase II 活性が有意に低値であることを明らかにした。本研究では、日本人集団において、関節リウマチ患者群(200 名)と健常者群(200 名)DNA を用いたケースコントロール解析を行った。その結果、SNPs4840209 および 11085823 に、ドイツ人集団と同様な関節リウマチとの有意な関連( $P=0.015$  および  $0.0047$ ) が認められた。これらおよび従前の結果から、これら SNPs は DNase II 遺伝子の転写活性の低下を惹起し、その結果 DNase II 産生量が低下し、それによって関節リウマチの易罹患に繋がったものと考えられた。

(3) DNase 1L2 遺伝子に分布する SNPs に関する病態遺伝学的解析

角化細胞の最終分化過程に關する DNase I-like 2 (1L2) の活性低下が尋常性乾癬などに見られる不全角化病変を惹起することが示唆されている。そこで、DNase 1L2 の *in vivo* 活性の低下を引き起こす functional SNPs は不全角化病変発症の遺伝的背景になると想定される。本研究では、DNase 1L2 について、機能に影響する可能性のある全非同義置換型 SNPs に着目し、酵素学的性状および多集団における SNP 分布を解析した。



特に、リスクファクターとなる loss-of-function 型を効率よく同定するため、DNASE において当該タイプを予想するのに有用であることが検証された Polyphen-2 によって予測された 28SNPs を解析した。その結果、そのうち 23SNPs が loss-of-function 型として同定でき、従前の研究と合わせ、DNASE1L2 に活性消失を惹起する 32 SNPs が分布することが明らかとなった(図3)。

図3 DNASE1L2 に分布する loss-of-function 型 SNPs

アスタリスクを付した SNPs は酵素活性を大幅に減弱させるものを示す。

3 大人種を含む 16 集団において、これらの SNPs の遺伝型分布は全て mono-allelic であり、loss-of-function 型を起こす SNPs には顕著な遺伝的多様性は見られなかった。

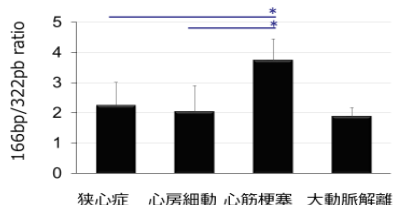
DNASE1L2 には 13 frameshift および 6 nonsense variants が分布している。これらはすべて酵素活性を示さず、loss-of-function 型であり、また多集団において相当する minor allele は認められなかった。特に、他の DNase I family には見られない 19 アミノ酸残基から成る C 末端延長領域における frameshift も酵素活性消失を惹起し、C 末端延長領域が DNase 1L2 の酵素活性には不可欠であることが明らかとなった。さらに、従前から分子中央の Pro-rich 領域を欠損した short-type DNase 1L2 の存在が報告されたが、wild-type に比して高活性型であった。しかしながら、皮膚上皮細胞では相当する mRNA は検出されず、少なくとも高活性な short-type は角化に

伴う DNA 除去には関与しないことが明らかとなった。

以上のことから、loss-of-function 型酵素を産生する非同義置換型 SNPs、frameshift および nonsense variants について、*in vivo* 活性が保持されるようにヒト集団において分布が著しく偏っているが、これら minor allele は不全角化病変のリスクファクターになることが明らかとなった

#### (4) 心疾患患者などにおける血清中 cell-free DNA の予備的検討

Cell-free DNA の多くは、血球系細胞の死滅に由来する DNA といわれており、健常人にも存在する。妊婦の血液中には胎児由来の cell-free DNA が含まれ出生前診断に用いられている。



cell-free DNA は心筋梗塞でも増加すると報告があるが、その他疾患と cell-free DNA の関連については明らかになっていない。

そこで、本研究では心疾患など様々な疾患罹患患者の cfDNA について、その断片化等に注目した。心筋梗塞以外の心疾患罹患患者にも cfDNA が検出されたが、特に心筋梗塞罹患患者では nucleosomal DNA に相当する 166 bp DNA 断片の有意な増加が認められ、cell-free DNA の断片化が亢進していることが明らかとなった (図 4)。

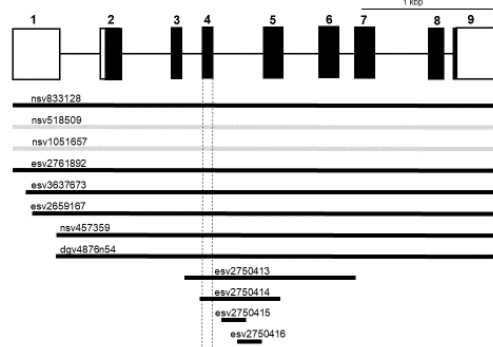
図 4 心疾患患者における cell-free DNA の断片化

血清 DNase I は DNase 1L3 と協働して DNA の断片化に関与しており、従前の研究で報告者らが明らかにした「急性心筋梗塞発症に伴う血清 DNase I 活性の一過的な上昇」に関連することが示唆された。現在、症例数を増やすなど、詳細を検討することとしている。

なお、本研究は島根大学医学部藤原純子博士との共同研究である。また、本成果には平成 29 年度第 19 回日本 DNA 多型学会優秀研究賞が授与された。

#### (5) 新規 CNVs 解析法の開発と DNase family 遺伝子への応用

近年、様々な病態や身体的特徴と関連する CNVs が多数報告されている。そこで、従来からの解析方法で必要とされていたコピー数既知のサンプルを使用することなく、Q-PCR による簡便な CNV 解析を開発した。本法の特徴は、目的とする CNV を有する遺伝子および単一コピー



が可能であり、調製したプラスミド混合物を用いて CNV の模擬分析をおこなったところ、正確なコピー数の算出が可能であることが確認できた。

自己免疫疾患に係る DNASE1、DNASE1L3 および DNASE2 には多数の CNV が分布しており (図 5) 特に関与していることが明らかとなった。

図 5 DNASE1 に分布する CNVs

点線に相当する exon4 を全ての CNVs を網羅的に検出する目的 CNV 領域とした。

活性を大幅に減弱させ、疾患のリスクファクターになると考えられる。そこで、それぞれの DNASE について、活性変動を惹起する全ての loss of copy または gain of copy を一括して網羅できる共通領域をそれぞれの目的 CNV 領域として、日本人集団およびドイツ人集団についてそれぞれの copy 数を算定した。その結果、両集団において、三つの DNASE について diploid あたり 2 copies のみが観察された。このように、自己免疫疾患関連の DNASE には活性減弱を起こす loss of copy は認められなかった。従って、*in vivo* DNase 活性の変動を惹起する CNVs に関して、これら DNase 遺伝子は極めて遺伝低多様性に乏しいことが明らかとなった。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 17 件)

M. Ueki, H. Takeshita, T. Yasuda 他、 Low genetic heterogeneity of copy number variations (CNVs) in the genes encoding the human deoxyribonucleases 1-like 3 and II potentially relevant to autoimmunity、PLOS ONE、査読有、14、2019、e0215479  
DOI:10.1371/journal.pone.0215479

J. Fujihara, T. Yasuda、 H. Takeshita 他、 Association of SNPs in transferrin and transferrin

- receptor genes with blood iron levels in human、 *Legal Med.*、 査読有、 **36**、 2018、 17-20  
DOI:10.1016/j.legalmed.2018.09.022
- R. Iida、 M. Ueki、 T. Yasuda、 Knockout of Mpv17-like protein (M-LPH) gene in human hepatoma cells results in impairment of mtDNA integrity through reduction of TFAM, OGG1 and LIG3 at the protein levels、 *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*、 査読有、 2018、 Article ID 6956414  
DOI:10.1155/2018/6956414
- J. Fujihara、 T. Yasuda、 H. Takeshita 他、 Association of SNPs in genes encoding zinc transporters on blood zinc levels in humans、 *Legal Med.*、 査読有、 **30**、 2018、 28–33  
DOI: 10.1016/j.legalmed.2017.10.009
- K. Hiramatsu、 H. Matsuda、 T. Yasuda 他、 Identification of novel variants in the HLA class II region relate to HLA DPB1 expression and disease progression in patients with chronic hepatitis C、 *J. Med. Virology*、 査読有、 **89**、 2017、 1574–1583  
DOI; 10.1002/jmv.24814
- M. Ueki、 H. Takeshita、 T. Yasuda 他、 Survey of single-nucleotide polymorphisms in the gene encoding human deoxyribonuclease I-like 2 producing loss of function potentially implicated in the pathogenesis of parakeratosis、 *PLOS ONE*、 査読有、 **12**、 2017、 e0175083  
DOI; 10.1371/journal.pone.0175083
- M. Ueki、 H. Takeshita、 T. Yasuda 他、 Simple screening method for CNV copy number variations associated with physical feature、 *Legal Med.*、 査読有、 **25**、 2017、 71–74  
DOI:10.1016/j.legmed.2017.01.006
- J. Fujihara、 T. Yasuda、 H. Takeshita 他、 Blood identification and discrimination of human and nonhuman using portable Raman spectroscopy、 *Int. J. Legal Med.*、 査読有、 **131**、 2017、 319–322  
DOI; 10.1007/s00414-016-1396-2
- M. Ueki、 H. Takeshita、 T. Yasuda 他、 Functional single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genes encoding the human deoxyribonuclease (DNase) family potentially relevant to autoimmunity. *Immunol. Invest.*、 査読有、 **45**、 2016、 406–419  
DOI; 10.31009/08820139.2016.1157813
- J. Fujihara、 T. Yasuda、 H. Takeshita 他、 Association of XRCC1 polymorphisms with arsenic methylation、 *Arch. Toxicol.*、 査読有、 **90**、 2016、 1009–1012  
DOI; 10.1007/s00204-015-1490-0
- J. Fujihara、 T. Yasuda、 Y. Kominato 他、 Association of a single nucleotide polymorphism (rs6180) in *GHR* gene with plural tissue weight、 *J. Genetics*、 査読有、 **95**、 2016、 189–192、  
DOI; 10.1007/s12041-016-0615-4

〔学会発表〕(計 26 件)

安田 年博、DNA 多型からタンパク多型へ DNase 遺伝子を中心に (招待講演)、第 27 回日本 DNA 多型学会学術集会、2018

木村かおり、植木美鈴、安田 年博 他、DNase family の遺伝的多型および酵素活性解析、第 27 回日本 DNA 多型学会学術集会、2018

T. Yasuda、R. Iida、M. Ueki 他、Survey of copy number variations (CNVs) associated with body height、24th Congress of the International Academy of Legal Medicine、2018

K. Kimura、M. Ueki、T. Yasuda 他、Interleukin8-251A>T polymorphism (rs4073) in Japanese populations and its correlation with smoking rates、24th Congress of the International Academy of Legal Medicine、2018

## 6 . 研究組織

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：飯田 礼子

ローマ字氏名：IIDA Reiko

研究協力者氏名：植木 美鈴

ローマ字氏名：UEKI Misuzu

研究協力者氏名：小湊 慶彦

ローマ字氏名：KOMINATO Yoshihiko

研究協力者氏名：竹下 治男

ローマ字氏名：TAKESHITA Haruo

研究協力者氏名：小林 基弘

ローマ字氏名：KOBAYASHI Motohiro

研究協力者氏名：河合 康幸

ローマ字氏名：KAWAI Yasuyuki

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。