

令和 2 年 4 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H06233

研究課題名（和文）炎症組織Th17細胞を起点とした炎症ネットワーク形成の分子基盤

研究課題名（英文）A molecular basis of inflammatory Th17 cells in autoimmune diseases

研究代表者

廣田 圭司 (Hirota, Keiji)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：90631250

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、炎症組織中Th17細胞が自己抗原を認識、活性化後にどのような炎症性カスケードを発動するのか、また、Th17細胞を起点とした炎症ネットワーク形成とその構成因子の詳細について解析した。特に、GM-CSFを産生する細胞サブセットの炎症疾患における意義と制御機構を明らかにし、新しい関節炎惹起性サブセットの一つとして滑膜組織に常在するGM-CSFを高産生する自然リンパ球を同定した。また、自己免疫性Th17細胞のエフェクター遺伝子発現ネットワーク制御に関わる分子としてSatb1を同定した。これらの成果により、免疫系細胞と間葉系細胞による炎症維持機構についての包括的な理解が深まった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、炎症性Th17細胞を起点とした炎症局所における細胞間相互作用とその制御因子を明らかにした。今後、これらの成果を標的とした次世代の予防法・治療法開発にも研究展開が可能である。GM-CSF阻害剤を用いた治験では関節リウマチに対する高い有効性が報告されており、今後、GM-CSFを産生する自然リンパ球を標的とした治療薬開発も期待できる。また、Satb1を標的とした炎症性Th17細胞の制御法の確立は、Th17細胞が起こす自己免疫疾患に対する免疫学的な新規治療法になりうる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated an inflammatory cascade mediated by autoimmune Th17 cells and analyzed inflammatory networks starting from Th17 cells and their constituent factors. In particular, we elucidated the significance and regulatory mechanism of GM-CSF-producing inflammatory subsets in autoimmune arthritis, and identified synovial innate lymphoid cells that highly produced GM-CSF, a novel arthritogenic inflammatory subset. We also identified Satb1 as a molecule involved in the regulation of an effector gene expression network in autoimmune Th17 cells. These results advanced our understanding of how chronic inflammation is maintained by the interaction between immune cells and mesenchymal cells.

研究分野：免疫学

キーワード：Th17細胞 自己免疫疾患モデル

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチは全身性の慢性炎症性疾患であり、自己反応性 T 細胞が関節炎の惹起に中心的役割を果たす。それら T 細胞がどのように産生され、自己抗原を認識し活性化されるのか、また関節炎組織中において他の炎症性細胞とどのような細胞間相互作用をおこなっているのかなど不明のところが多い。

私たちは、ヒト関節リウマチに酷似した CD4+ T (Th) 細胞依存性関節炎を自然発症する SKG マウスを用いてインターロイキン (IL) -17 産生 Th17 細胞の関節炎惹起能と制御機構について、これまで研究を展開してきた。

本研究では、炎症組織中 Th17 細胞が自己抗原を認識、活性化後にどのような炎症性カスケードを発動するのか、また、Th17 細胞を起点とした炎症ネットワーク形成とその構成因子の詳細について解析した。これら炎症局所における細胞間相互作用と制御因子の解明は、関節炎の炎症維持機構の包括的理解と次世代の予防法・治療法開発にも重要と考える。

2. 研究の目的

自己免疫疾患の炎症維持機構の包括的な分子基盤の理解は、次世代の予防法、治療法開発の基礎となり医学研究の重要課題である。しかしながら、炎症標的組織中で起こっている複雑な炎症ネットワークを形成する構成因子に関しては不明な点が多い。

本研究では、自己免疫性関節炎の炎症組織局所に存在する炎症性 T ヘルパー (Th17) 細胞、滑膜細胞、自然免疫細胞による病態発症・慢性化機構を、細胞、分子レベルで明らかにすることを目的とした。特に、組織中の炎症性 Th 細胞のエフェクタープロファイル、炎症環境に反応した滑膜細胞の動態と機能、自然免疫細胞の遊走と活性化機構の各階層を詳細に調べ、細胞間相互作用の鍵となる新規分子の同定、これら免疫系細胞と間葉系細胞間の炎症性クロストークによる炎症維持機構についての包括的な理解を目指した。

3. 研究の方法

炎症組織 Th17 細胞を起点とする炎症ネットワークを解明するために、各階層の細胞間相互作用とその構成因子に焦点を絞った研究を展開した。下記の各項目について分子、細胞、個体レベルで実験し、自己免疫疾患発症と炎症の慢性化に関わる機能分子の同定をおこなった。(1) フローサイトメトリー、次世代シーケンサーを用いた炎症組織 Th17 細胞のエフェクタープロファイルの解析。(2) 遺伝子転写制御因子である Satb1 を Th17 細胞特異的に欠損させた遺伝子改変マウスを用いて、Th17 細胞のエフェクタープロファイルと自己免疫疾患の惹起能解析。(3) マイクロアレイ、定量的 RT-PCR を用いて、Th17 エフェクターサイトカインによって誘導される滑膜組織の Fibroblast-like Synoviocytes (FLSs) の炎症制御因子の解析。(4) フローサイトメトリーを用いて、滑膜 Innate lymphoid cells (ILCs) の表現型解析と Damage-associated molecular patterns (DAMPs) を中心とした機能制御因子の同定。

4. 研究成果

(1) GM-CSF 産生細胞と関節炎惹起能

高い関節炎惹起能を有する Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) 産生細胞の詳細な細胞分画解析をおこない、関節炎局所では T ヘルパー細胞、滑膜細胞、自然免疫細胞が主要な産生細胞であることを同定した。次に、関節炎惹起性 SKG CD4 T 細胞移植モデルを用いて、GM-CSF 産生細胞分画の病態惹起能について解析をおこない、興味深い知見として、他の自己免疫病モデルでは定説になりつつある病態惹起性 GM-CSF 産生 T ヘルパー細胞が、SKG 自己免疫性関節炎モデルでは必須の役割を果たさないことを明らかにした。逆に、非 T 細胞系列細胞が産生する GM-CSF が自己免疫性関節炎発症に重要な役割を果たすことを明らかにした。これらの結果は、自己免疫性関節炎の新しい慢性炎症機構を示唆する重要な知見である。

(2) 関節炎を起す滑膜に常在する自然リンパ球同定

関節炎疾患モデルマウスにおける非 T 細胞系列の GM-CSF 産生細胞群および滑膜自然リンパ球 (Innate lymphoid cells, ILCs) の役割を調べるため、骨髄キメラマウスおよび自然リンパ球を抗体投与によって除去する実験システムを作製した。炎症関節滑膜に常在する ILCs は炎症反応により増殖し、ILCs の産生する GM-CSF が Th17 細胞依存的関節炎発症に必須の因子であることを見いだした。また、滑膜 ILCs の試験管内培養系を確立し、ILCs の GM-CSF 産生刺激因子の一つとして DAMPs を同定した。滑膜 ILCs は、IL-2 受容体、IL-33 受容体、TLR (Toll-like receptor) 9 を高発現しており、IL-33 と IL-2 の共刺激または IL-33 と TLR9 リガンドの共刺激によって、ILCs の GM-CSF 産生が増大した。同様に、骨髄キメラマウスを用いた実験から放射線に抵抗性のある滑膜細胞の産生する GM-CSF も関節炎の発症、重症化に重要な炎症メディエーターであった。その制御機構として、関節炎発症初期、Th17 細胞の産生する IL-17 が IL-17 受容体を高発現する滑膜細胞に作用し、炎症性サイトカイン (GM-CSF, IL-6, LIF, etc) ・ケモカイン (CCL20,

CXCL1, CXCL5, etc) を誘導する。特に、この時に産生する CCL20 が関節炎惹起性 Th17 細胞の滑膜組織への遊走に必要であり、GM-CSF が関節炎発症、重症化に必須の因子であることを明らかに示唆された。自己抗原による Th17 細胞への刺激、様々な炎症性サイトカインと DAMPs による FLSs および ILCs への刺激によって、滑膜組織における炎症細胞からの GM-CSF 産生が制御され、関節炎の発症と慢性化に寄与することが明らかになった。

(3) 滑膜 ILCs の表現型解析と関節炎の炎症ネットワークメカニズム

新規に見出した非炎症滑膜に常在する ILCs サブセットの表現型解析と、これら ILCs の性状が系統間の遺伝的背景によって影響を受けるかどうか、関節炎モデルを用いて解析した。加えて、滑膜の炎症、ILCs の維持機構、増殖マーカーの解析をおこなった。関節炎発症に伴い滑膜常在 ILCs が炎症環境に反応して活性化・増殖し、細胞表面マーカーの IL-7Ra, CD25, c-kit, IL-33Ra, CD44 を高発現し、転写因子 Gata3, Bhlhe40、タイプ 2 サイトカインである IL-13 を発現した。これら滑膜 ILCs の表現型に系統間の差は見られず、これら解析から、滑膜 ILCs はグループ 2 ILCs と類似性が高い。また、ILCs サブセットを欠損する遺伝子改変マウスを用いて実験的に関節炎を誘導することで、関節炎の重症度と慢性化には滑膜 ILCs が関わっていることを確立した。

次に、生体内での炎症性 Th 細胞と滑膜細胞の相互作用と炎症ネットワークのイニシエーション機構を解析するため、IL-17 欠損 Th 細胞を免疫不全マウスに養子移入し関節炎の惹起および滑膜細胞の炎症プロファイルの解析をおこなった。肉眼的に関節炎がおこる前に生体内から滑膜細胞を細胞表面マーカーの一つ Podoplanin を用いて純化し、産生する炎症メディエーターの発現解析をおこなった。滑膜炎の初期では、Th17 細胞から産生される IL-17 によって滑膜細胞からの GM-CSF、IL-6、CCL20 などの（関節炎に関与する）遺伝子発現を上昇させた。これらの結果から、炎症性 Th 細胞、滑膜細胞、自然免疫細胞による関節炎初期と慢性炎症期の炎症細胞間相互作用と炎症増悪機構の一端を明らかにした。

(4) ヒト関節リウマチの滑膜液中 ILCs サブセットの解析

京都大学医学部附属病院リウマチセンターと共同研究をおこない、関節リウマチ、変形性関節症の患者検体を用いて、末梢血および滑膜液中の ILCs サブセットの頻度、表現型を解析した。マウス関節炎モデルと同様に、関節リウマチの滑膜液中 ILCs は頻度、絶対数ともに患者末梢血および変形性関節症の滑膜液に比べ有意に増加していた。滑膜液中の ILCs サブセットの表現型については、末梢血に比べ、IFN- γ , IL-17, GM-CSF の産生は増加し、IL-13 の産生は減少していた。マウス滑膜 ILCs との表現型の差は、関節リウマチ患者の罹病期間、治療歴など複数の要因が影響している可能性があり、今後、発症初期の臨床検体を比較解析する予定である。しかし、滑膜液中の ILCs の GM-CSF 産生能は保たれており、炎症の慢性化に寄与していることが示唆される。さらに、GM-CSF 阻害剤を用いた治療で関節リウマチに対する高い有効性が報告されており、今後、ILCs を標的とした治療薬開発が期待される。

(5) Satb1 による Th17 細胞の機能制御

Satb1 は多くの未分化細胞の遺伝子発現ネットワーク制御に関わる分子である。しかし、細胞分化を終えた Th 細胞に対する役割については不明であった。そこで、Satb1 を分化後の Th17 細胞特異的に欠損させた遺伝子改変マウス (IL-17^{cre} Satb1^{fllox}) を作製し、Th17 細胞のエフェクタープロファイルと自己免疫疾患の惹起能を解析した。In vitro, in vivo の実験モデルにおいて、Satb1 は Th17 細胞への初期分化および IL-17 産生能に影響を与えなかった。一方、ヒト多発性硬化症の実験モデルでは、Th17 細胞特異的に Satb1 を欠損させたマウスの自己免疫疾患発症、重症度は有意に低く、Satb1 は Th17 細胞の疾患惹起能を制御する可能性を示唆した。

次に、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 解析により、Satb1 によって制御をうける炎症性 Th17 細胞特異的な機能分子として、Bhlhe40, GM-CSF, PD-1 を同定した。逆に、大部分のエフェクターサイトカインおよび T 細胞の活性化、生存に関わる遺伝子群に変化は認められなかった。レトロウイルスベクターによって Bhlhe40 を強発現させる実験および PD-1 阻害抗体を投与する実験をおこなったところ、Satb1 欠損 Th17 細胞の GM-CSF 産生能および疾患惹起能を回復させた。また、抗 Satb1 抗体と抗 H3K27ac 抗体を用いて Th17 細胞のゲノムに対する ChIP-seq をおこない、Satb1 が Bhlhe40 のエンハンサー領域に結合することを示唆する結果を得た。したがって、組織炎症の環境下において、Satb1 は炎症性 Th17 細胞の Bhlhe40 の発現上昇を介した GM-CSF 産生増強とチェックポイント分子である PD-1 の発現低下を誘導し、Th17 細胞の疾患惹起性エフェクター機能を強化することが示唆された。

さらに、パイエル板と炎症組織の Th17 細胞を比較することにより、Satb1 によって特異的に制御を受ける遺伝子群の大部分は別組織からの Th17 細胞ではオーバーラップしないことを見いだした。これらの結果から、生体内の特異的な環境因子によって Satb1 の機能が制御を受けることで全く異なる遺伝子発現ネットワークが構築されることが示唆された。

今後、Satb1 を標的とした炎症性 Th17 細胞の制御法の確立は、Th17 細胞が起こす自己免疫疾患に対する免疫学的な新規治療法になりうる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yasuda Keiko, Takeuchi Yusuke, Hirota Keiji	4. 巻 41
2. 論文標題 Correction to: The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Seminars in Immunopathology	6. 最初と最後の頁 299 ~ 299
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00281-019-00746-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yasuda Keiko, Kitagawa Yohko, Kawakami Ryoji, Isaka Yoshitaka, Watanabe Hitomi, Kondoh Gen, Kohwi-Shigematsu Terumi, Sakaguchi Shimon, Hirota Keiji	4. 巻 10
2. 論文標題 Satb1 regulates the effector program of encephalitogenic tissue Th17 cells in chronic inflammation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 549
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-08404-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Hirota Keiji, Hashimoto Motomu, Ito Yoshinaga, Matsuura Mayumi, Ito Hiromu, Tanaka Masao, Watanabe Hitomi, Kondoh Gen, Tanaka Atsushi, Yasuda Keiko, Kopf Manfred, Potocnik Alexandre J., Stockinger Brigitta, Sakaguchi Noriko, Sakaguchi Shimon	4. 巻 48
2. 論文標題 Autoimmune Th17 Cells Induced Synovial Stromal and Innate Lymphoid Cell Secretion of the Cytokine GM-CSF to Initiate and Augment Autoimmune Arthritis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Immunity	6. 最初と最後の頁 1220 ~ 1232.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.immuni.2018.04.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 廣田 圭司	4. 巻 71
2. 論文標題 自己免疫性関節炎を惹起するTh17細胞を起点とした炎症カスケード	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miralles Marta, Eixarch Herena, Tejero Marcos, Costa Carme, Hirota Keiji, Castaño A. Raul, Puig Meritxell, Stockinger Gitta, Montalban Xavier, Bosch Assumpci?, Espejo Carmen, Chillon Miguel	4. 巻 14
2. 論文標題 Clinical and Histopathological Amelioration of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by AAV Vectors Expressing a Soluble Interleukin-23 Receptor	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neurotherapeutics	6. 最初と最後の頁 1095 ~ 1106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13311-017-0545-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 1)Kitagawa Y, Ohkura N, Kidani Y, Vandenbon A, Hirota K, Kawakami R, Yasuda K, Motooka D, Nakamura S, Kondo M, Taniuchi I, Kohwi-Shigematsu T, Sakaguchi S.	4. 巻 18
2. 論文標題 Guidance of regulatory T cell development by Satb1-dependent super-enhancer establishment.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nat Immunol.	6. 最初と最後の頁 173-183
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/ni.3646.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 2)Maeda Y, Kurakawa T, Umemoto E, Motooka D, Ito Y, Gotoh K, Hirota K, Matsushita M, Furuta Y, Narazaki M, Sakaguchi N, Kayama H, Nakamura S, Iida T, Saeki Y, Kumanogoh A, Sakaguchi S, Takeda K.	4. 巻 68
2. 論文標題 Dysbiosis contributes to arthritis development via activation of autoreactive T cells in the intestine.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Arthritis Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 2646-2661
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/art.39783.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 廣田圭司	4. 巻 71
2. 論文標題 自己免疫性関節炎を惹起するヘルパーTサブセットと認識自己抗原	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 最新医学	6. 最初と最後の頁 2320-2325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 11件）

1. 発表者名 Hirota K, Hashimoto M, Ito Y, Matsuura M, Ito H, Tanaka M, Watanabe H, Kondoh G, Tanaka A, Yasuda K, Kopf M, Potocnik AJ, Stockinger B, Sakaguchi N, Sakaguchi S
2. 発表標題 An inflammatory cellular cascade of autoimmune Th17 cells, GM-CSF-producing synovial ILCs and stromal cells in the development of autoimmune arthritis
3. 学会等名 Kyoto T cell Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keiji Hirota
2. 発表標題 Autoimmune arthritis mediated by inflammatory Th17 cells
3. 学会等名 25th East Asia Joint Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasuda K, Kitagawa Y, Kawakami R, Isaka Y, Watanabe H, Kondoh G, Kohwi-Shigematsu T, Sakaguchi S, Hirota K
2. 発表標題 Satb1-mediated regulation of GM-CSF and PD-1 in pathogenic Th17 cells
3. 学会等名 6th Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kawakami R, Kitagawa Y, Hirota K, Watanabe H, Kondoh G, Ohkura N, Sakaguchi S
2. 発表標題 Epigenetic landscape of FOXP3 enhancer sites during thymic FOXP3+ TREG development of CNS0- and CNS3-deficient mice
3. 学会等名 6th Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hirota K, Hashimoto M, Ito Y, Matsuura M, Ito H, Tanaka M, Watanabe H, Kondoh G, Tanaka A, Yasuda K, Kopf M, Potocnik AJ, Stockinger B, Sakaguchi N, Sakaguchi S
2. 発表標題 GM-CSF-producing synovial ILCs exacerbate Th17-mediated autoimmune arthritis
3. 学会等名 The 3rd International Conference on Innate Lymphoid Cells (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keiji Hirota
2. 発表標題 Autoimmune Th17 cells instruct ILC secretion of inflammatory GM-CSF to initiate and augment autoimmune arthritis
3. 学会等名 第47回 日本免疫学会学術集会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasuda K, Kitagawa Y, Kawakami R, Watanabe H, Kondoh G, Kohwi-Shigematsu T, Sakaguchi S, Hirota K
2. 発表標題 Satb1-mediated regulation of GM-CSF and PD-1 in effector Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis
3. 学会等名 第47回 日本免疫学会学術集会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeuchi Y, Watanabe H, Kondoh G, Sakaguchi N, Sakaguchi S, Mimori T, Hirota K
2. 発表標題 A role of Ripk3 and Gsdmd in the development of autoimmune arthritis in SKG mice
3. 学会等名 第47回 日本免疫学会学術集会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hirota K, Hashimoto M, Ito Y, Matsuura M, Ito H, Tanaka M, Watanabe H, Kondoh G, Tanaka A, Yasuda K, Kopf M, Potocnik AJ, Stockinger B, Sakaguchi N, Sakaguchi S
2. 発表標題 Inflammatory cascade of autoimmune arthritis by Th17 cells and GM-CSF-producing ILCs
3. 学会等名 Keystone symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiko Yasuda, Yohko Kitagawa, Shimon Sakaguchi, Keiji Hirota
2. 発表標題 Satb1 controls the differentiation and terminal effector function of Th17 cells
3. 学会等名 第46回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ryoki Kobayashi, Yohei Watanabe, Noriko M Tsuji, Keiji Hirota, Tomoko Kurita-Ochiai
2. 発表標題 Characterization of Innate lymphoid cells in gingiva of mice infected with Porphyromonas gingivalis
3. 学会等名 第46回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Keiji Hirota
2. 発表標題 An inflammatory cellular network of autoimmune Th17 cells, GM-CSF-producing ILCs and synoviocytes in the development of autoimmune arthritis
3. 学会等名 Keystone symposia, Immune Regulation in Autoimmunity and Cancer (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Keiji Hirota
2. 発表標題 Inflammatory circuit of Th17 cells, GM-CSF-producing fibroblast-like synoviocytes, and ILCs in the development of autoimmune arthritis
3. 学会等名 第16回 国際免疫学会(国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	坂口 志文 (Sakaguchi Shimon)		
研究協力者	橋本 求 (Hashimoto Motomu)		
研究協力者	近藤 玄 (Kondoh Gen)		
研究協力者	渡邊 仁美 (Watanabe Hitomi)		