

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07889

研究課題名(和文) 動脈管開存症の原因となる転写因子群のシグナル伝達パスウェイの研究

研究課題名(英文) Signaling pathways which affect expression of the transcription factors associated with the patent ductus arteriosus

研究代表者

羽山 恵美子 (Hayama, Emiko)

東京女子医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：00349698

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：動脈管においては、中膜平滑筋細胞の増殖・内腔側への遊走、筋収縮制御タンパク質の発達、細胞外基質の増加、内膜肥厚、酸素感受性の獲得等により「酸素感受-収縮-機能的閉鎖」機能が成熟する。本研究では、酸素刺激により、cAMPやMAPKパスウェイが活性化、血管新生や細胞増殖、筋収縮、エビジェネティック変化が促進、形質転換、細胞外マトリックスと細胞の相互作用が変化、酸化的リン酸化が活性化、アポトーシスが促進などのシグナルを検出した。動脈管におけるHspA1Bとc-FOSの発現も、これらシグナル伝達の一部と考えられる。動脈管には炎症反応に対する独自の免疫応答能が存在する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動脈管が胎生期に開存していることは生命維持に必須であり、生後は閉じないと心不全に陥る。酸素を感受して閉鎖する動脈管には、特徴的なシグナル伝達及び遺伝子制御機構が存在する。未熟児動脈管を収縮する薬は、現在プロスタグランジン生成を抑制するCOX阻害剤(インドメタシン等)のみである。酸素感受能を含む動脈管の多様なシグナル伝達システムを明らかにできれば、動脈管の成熟を促進し、収縮・機能的閉鎖へと導く方策も考案できることから、未熟児動脈管開存症を治療する創薬ターゲットの発見が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Increase of oxygen concentration in blood induces postnatal ductus arteriosus (DA) vasoconstriction, initiating functional closure. DA gets programmed for the postnatal closure as developmental maturation, involving proliferation and migration of DA smooth muscle to form neointima, increase of extracellular matrix, development of smooth muscle contraction system, and oxygen sensing ability.

In this study, rabbit full-term fetal DA was exposed to high or low oxygen circumstances, and the RNA sequencing was applied to detect difference of their mRNA expression. Oxygen modified DA signal transduction systems, including the cAMP signal and MAPK pathways, angiogenesis, cellular proliferation, smooth muscle constriction, epigenetic modification, transformation, interaction of extracellular matrix molecules with cells, oxidative phosphorylation, and apoptosis. DA also responds immunologically against the inflammation induced by the oxygen treatment.

研究分野：分子生物学

キーワード：動脈管 酸素感受性 転写因子

1. 研究開始当初の背景

神経堤細胞は、胎生期の神経管に由来する多分化能をもつ細胞集団である。その中の心臓神経堤細胞は、遊走して第三、四、六咽頭弓動脈及び心臓に分布し、正常な心臓大血管の発生に必要である。動脈管は、左側第六咽頭弓動脈から生じる、胎性期に特有な血流路の一つであり、短絡路として肺動脈と大動脈の間を結ぶ。動脈管が胎生期に開存していることは生命維持に必須であり、生後は閉じないと心不全に陥る。動脈管の生後の閉鎖には、中膜平滑筋細胞の増殖・内腔側への遊走、筋収縮制御タンパク質の発達、細胞外基質の増加、内膜肥厚、酸素感受性の獲得という動脈管リモデリングが正常に進むことが大切である。生後の動脈管の機能的閉鎖は、血中酸素濃度の上昇、プロスタグランジン濃度の低下に反応して生じる血管収縮反応に依存し、その後、解剖学的閉鎖に移行し、動脈管索となって完了する。

動脈管開存症は、およそ5000出産に1回生じる比較的頻度の高い疾患である。もっとも多い先天性心疾患のひとつで、全体の5~10%を占める。早産の場合ほど多発し重症化する。遺伝子変異を伴う動脈管開存症としては、PDA1 12q24領域⁽¹⁾、PDA2 TFAP2B⁽²⁾、PDA3 PRDM6⁽³⁾、平滑筋アクチン (ACTA2)、平滑筋ミオシン (MYH11)の報告がある。神経堤細胞特異的な転写因子であるTFAP2Bや平滑筋細胞に高発現するPRDM6の異常は、いずれも平滑筋細胞の増殖を抑制する。平滑筋アクチンやミオシンの遺伝子変異による平滑筋形成不全もリモデリング不全を生じる。未熟児に多い動脈管開存症は、動脈管構成細胞の形成不全がその主要原因と考えられる。筆者らは、動脈管におけるHSP70の特徴的な発現分布(図1)とHSP70とc-FOS遺伝子との同期発現(図2-1, 2-2)を発見した。最初期転写因子の一つであるc-FOSは、細胞増殖やアポトーシス制御に関わる。c-FOS発現制御の上流には、TGF β -SMAD3/4、MAPK/ERKシグナル伝達パスウェイが知られ、遺伝子の発現を転写レベルで制御する。HSP70は、SMAD2のリン酸化を抑制して、TGF- β パスウェイの働きを抑制する(Li Y. et al, J Genetics and Genomics, 2011)ことから、HSP70がパスウェイのフィードバック機構であることも考えられる。このように、TGF β やMAPK/ERKシグナルは動脈管細胞の増殖や分化の制御に深く関与すると推定される。動脈管におけるHSP70とc-FOS遺伝子の同期発現は、平滑筋細胞増殖に関わるシグナル伝達的一端と考えられる。本研究の核心をなす学術的「問い」は、「心臓神経堤細胞が遊走した第六咽頭弓動脈由来の動脈管には、特徴的なシグナル伝達及び遺伝子制御機構が存在する。その全体像は何か」ということである。

2. 研究の目的

動脈管には、特徴的なシグナル伝達及び遺伝子制御機構が存在する。その全体像は何か。近年、TFAP2BやPRDM6の変異とPDAを関連付ける報告が相次いだが、疾患と遺伝子変異の間の複雑な関係を明らかにするには至っていない。本研究の目的は、動脈管開存症の原因遺伝子であるTFAP2B、PRDM6転写因子並びにc-fos/HSP70をターゲットとして、動脈管におけるシグナル伝達・転写制御パスウェイを検出することである。

3. 研究の方法

(1) 組織試料の採取

日本白色家兎並びにウィスターラットの妊娠動物を過剰量のペントバルビタール投与により安楽死させ、胎仔を採取し、速やかに氷冷し、組織試料を冷生理的食塩液中で顕微鏡下可及的速やかに採取した。ラット妊娠19日(未熟)、21日(成熟)胎仔、家兎21日(未熟)、27日、30日(成熟)胎仔から血管試料を得た。新生仔の組織試料を採取する場合は、腹腔内注射によるペントバルビタールの過剰量投与により安楽死させてから、組織試料を採取した。動脈管、主肺動脈、下行大動脈を冷生理的食塩水中で分別した。酸素感受性遺伝子の検討のため、一部血管試料は、窒素(95% N₂-5% CO₂)又は酸素(95% O₂-5% CO₂)又は大気飽和のKrebs-Henseleit緩衝液中で37°C30分間培養し、それぞれ高酸素、低酸素、大気曝露試料とした。RNA発現の検討のための試料の場合、処理後速やかにRNA later液に浸し-20°Cにて保存した。免疫染色用試料は、4%パラホルムアルデヒド-リン酸緩衝液(Wako)で固定し、冷蔵保存した。RNAを抽出する前に、保存血管試料から血液などの付着成分や不要な組織を、RNA later液中で実態顕微鏡下除去し、動脈管、主肺動脈、下行大動脈に切り分け、それぞれまとめてプール試料とした。

(2) トランスクリプトーム解析と定量PCR

① Total RNAの調製とRNA-seq解析

RNAeasy kit (Qiagen)を用いてtotal RNAを抽出し、DNaseI処理を行った。その一部をSMART-SEQ V4 Ultra Low Input RNA Kit for SequencingによりPCR増幅してcDNA試料を調製してRNA-seq用試料とし、次世代シーケンサーによるRNA-seq解析(NovaSeq)をタカラバイオ株式会社に委託した。残りのtotal RNAは逆転写反応してcDNAとし、定量PCR用とした。

② RNA-seq解析

発現量の指標であるFPKM値(Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped reads, ある転写物上にmappingされたfragments数とその転写物の長さの合計と全ゲノムにmappingされた全fragments数で正規化したもの)を用いて、異なる発達段階の動脈管や高酸素・低酸素・大気処理間の遺伝子の発現の違いを検討した。遺伝子オンロジー解析を

The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.8 を用いて実施した。

③ 定量PCR 試料の調製と検出

各血管部位のプール試料から total RNA を抽出、RNA 濃度を測定し、逆転写酵素 (PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time), Takara) により cDNA を調製し、適宜希釈して、定量PCR用のテンプレートとした。

目的遺伝子 mRNA の発現を測定するための定量PCRには、SYBR 蛍光色素を含むPCR酵素ミックス (Thunderbird SYBR qPCR mix, Toyobo 等) を用いた。各遺伝子 mRNA の発現は GAPDH mRNA の発現量に対して補正し、DA30 (妊娠30日家兎胎仔動脈管) を1とした相対値 (PA 肺動脈, Ao 大動脈, NB 新生仔) として表示した。

④ 組織試料の免疫染色

4%パラホルムアルデヒド-リン酸緩衝液で固定した血管試料をパラフィン包埋し、薄切切片 (4μm) を作製した。脱パラフィン後、98°C45分間賦活化 (イムノセイバー) し、内在性のペルオキシダーゼ活性を阻害するために0.3%過酸化水素液処理を30分間行った。馬血清を含むリン酸緩衝生理的食塩水 (PBS) を用いてブロッキング後、各種抗体に対して、VECTASTAIN Elite ABC Mouse IgG Kit を用いたペルオキシダーゼ (DAB) 染色を行った。その後、ヘマトキシリンカウンター染色し、脱水・透徹、封入した。

⑤ 組織試料のアポトーシスの検出

アポトーシスを起こした細胞の特徴の一つ、クロマチンDNAのヌクレオソーム単位 (185 bp) での断片化を、標識核酸の取り込みを利用したTUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 法で、組織学的な局在を検出するキット (In situ Apoptosis Detection kit, Takara) を用いて実施した。

4. 研究成果

1) ヒートショックタンパク質72 (Hsp72)

周産期動脈管に特異的に発現するHSP70種は、Hsp72 (*HspA1B* 遺伝子) であることは、平成27年度基盤研究(C)で明らかにした。Hsp72は、胎仔・新生仔の動脈管に周産期の中膜に局在する (図1aウサギ, 1bラット)。動脈管は形質的閉鎖に伴い中膜にアポトーシスを生じる。新生仔の動脈管では閉鎖した管腔に沿って中膜のほぼ半ばまでアポトーシスがあり (図1b右図 生後1日のウサギ動脈管, 茶色部分)、Hsp72はそのすぐ外側から外膜に到る中膜に発現していた (図1b左図 茶色部分)。よってHsp72は、アポトーシスを生じていない中膜細胞に発現する。ウサギ胎仔・新生仔動脈管を試料として *HspA1* mRNA の発現を定量PCRで調べたところ、妊娠27日と30日動脈管で高発現し、新生仔 (生後1日) で大きく低下した (図2a)。Hsp72のmRNAの発現は、タンパク質の発現に一步先んじているようだ。

2) c-FOS

HSP70 関連の遺伝子の発現を検討した際、HspA1B と同期的に発現する c-FOS を見つけた (図2b)。c-FOS は最初期転写因子の一つであり、細胞増殖やアポトーシス制御に関わる。c-FOS は、転写因子 AP-1 転写因子群に属し、他の AP-1 とヘテロ複合体を形成する。そこで他の AP-1 の発現を検討すると、MafB (図2c) が肺動脈などに比べて動脈管に高発現し、その発現パターンが c-FOS とよく一致することを見つけた。c-JUN (図2d) は、動脈管では発現が低かった。ATF2 (図2e) は、妊娠27日や30日の動脈管に発現するが、同時期の肺動脈や大動脈でも同程度の発現があり、動脈管特異的ではない。ATF3 (図2f) も動脈管における発現は低かった。検討した AP-1 転写因子群の中では、MafB や ATF2 が、動脈管における c-FOS の複合体メンバーの候補と考えられた。

動脈管における c-FOS タンパク質の発現を免疫染色法により検出した (図3a ウサギ, 3b ラット)。C-FOS タンパク質は新生仔の動脈管の閉鎖した管腔に近い中膜部に主に検出された。アポトーシス部位との境界にやや高濃度に分布しているように見えるが、アポトーシス細胞を染色してみる必要がある。MafB は、どの AP-1 転写因子と結合してヘテロ二量体を形成するかによって、四肢の細胞が死ぬか、生きるかの運命が決められ、パートナーが c-Jun の場合には、細胞は死ぬ運命へ、パートナーが c-FOS の場合には、細胞は生存する運命へと導かれるという⁽⁴⁾。C-FOS と MafB mRNA は、満期胎仔までは高発現しており、細胞は生存 (増殖)、新生仔期には発現は低下し、c-FOS は異なるパートナーとの結合が増え、アポトーシスのきっかけとなるのかも

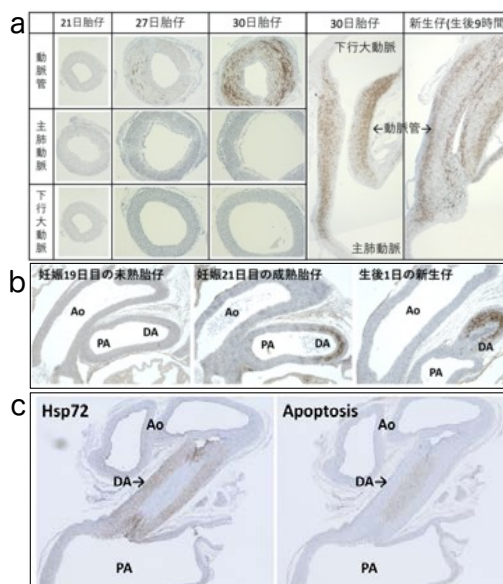


図1 動脈管におけるHsp72の発現

1a ウサギ胎仔・新生仔におけるHsp72の分布 妊娠30日胎仔の動脈管中膜において高発現し、新生仔の動脈管の中膜の中央部分から発現が低下する。
1bラット胎仔・新生仔におけるHsp72の分布
1cウサギ新生仔 (生後1日) におけるHsp72の分布とアポトーシス細胞の局在 (動脈管 DA, 大動脈 Ao, 肺動脈 PA)

しれない。このように動脈管における HspA1B と c-FOS の発現は、平滑筋細胞増殖・アポトーシスに関わるシグナル伝達的一端と考えられる。

3) TFAP2B

神経堤由来細胞の分化増殖に関与する転写因子である TFAP2B の変異は、動脈管開存症 (PDA2) を生じる。TFAP2B は、AP-2 転写因子 (TFAP2A, TFAP2B, TFAP2C, TFAP2D, TFAP2E) のメンバーであり、他の AP-2 メンバーとホモまたはヘテロ二量体を形成する。心臓神経堤細胞は、遊走して第三、四、六咽頭弓動脈に分布し、動脈管は左側第六咽頭弓動脈から生じることから、TFAP2B の高発現は予測されていた。実際 TFAP2B mRNA の発現を、肺動脈や大動脈と比較すると、動脈管に極めて特異的であった (図 4a)。なお、TFAP2B には、ウサギでは転写バリエントが v1-v3, v5-v12 と 11 既知である。mRNA の測定に用いたプライマーセットは、これらのバリエントに共通する塩基配列から調製したため、全バリエントを検出する。ウサギ 27 日と 30 日胎仔の動脈管に高発現する傾向は、HSPA1B や c-FOS と一致しており、興味深い。動脈管開存症 PDA3 の原因遺伝子 PRDM6 の発現を検討した (図 4b)。PRDM6 も同様に 27 日と 30 日胎仔動脈管で高発現したが、肺動脈や大動脈にも同レベルの発現がみられた。

免疫染色法により、ウサギ胎仔・新生仔の動脈管における TFAP2B の分布を検出した (図 5)。TFAP2B は、動脈管中膜全体の細胞の核に発現しており、未熟胎仔 (21 日) の細胞核に強く発現し、満期胎仔、新生仔と次第に発現が低下した。この免疫染色に用いた抗体の抗原ペプチドは全バリエントに共通しており、すべての TFAP2B タンパク質を検出する。新生仔動脈管は、閉鎖した管腔に沿って中膜のほぼ半ばまではアポトーシスしていると考えられ、Hsp72 の場合と同様に TFAP2B もそのすぐ外側から外膜に到る中膜に発現が見られた (図 5 右図)。

6) 酸素刺激により変動する動脈管遺伝子

動脈管における酸素刺激により変動する遺伝子の探索のため、酸素 (95% O₂-5% CO₂) ガス又は窒素 (95% N₂-5% CO₂) ガス又は大気飽和 Krebs-Henseleit 緩衝液中 37°C で 30 分間、ウサギ 30 日 (成熟) 動脈管・肺動脈を培養し、total RNA 抽出し、次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析を実施した。試料の一覧を表 1 に示した。発現量の指標である FPKM 値を用いて、酸素ガス処理動脈管 (DA30-O2) 群並びに大気処理動脈管 (DA30-Air) 群と窒素ガス処理動脈管 (DA30-N2) 群を比較した。FPKM 値に 0 を含む遺伝子は除いたため、計 13942 遺伝子を解析対象とした。DA30-O2 群、DA30-Air 群と DA30-N2 群を比較し、2 倍以上高発現の遺伝子 (図 6a 酸素処理: 赤色, 500 遺伝子, 図 6b 大気処理: 橙色, 562 遺伝子)、変動が小さい遺伝子 (灰色)、2 倍以上低発現の遺伝子 (青色, 酸素処理 276 遺伝子, 大気処理 299 遺伝子) をプロットした。全解析遺伝子 13942 に対して、酸素、大気処理で誘導された遺伝子はそれぞれ 4%、2% であった。次に DA30-N2 群より 2 倍以上の高発現を示した DA30-O2 群と DA30-Air 群の全遺伝子 (酸素処理 500 遺伝子+大気処理 562 遺伝子、重複有) について DAVID を用いたパスウェイ解析を行った。その結果、酸素、大気処理により、成熟動脈管では、細胞膜の受容体・チャネルに刺激が伝わり、cAMP シグナルパスウェイや MAPK パスウェイの遺伝子群が活性化し、血管新生や細胞増殖、筋収縮のシグナルが発生、エピジェネティックな変化が促進、酸化リン酸化の活性化によるアポトーシスが促進するなどのシグナル伝達を検出された。

酸素・大気処理により発現が大きく変動する遺伝子を見つけるために、1) DA30-N2 群より 2 倍以上の高発現を示した DA30-O2 群と DA30-Air 群に属し、2) 動脈管/肺動脈の比は 1 以上、3) 発現量は FPKM 値で 1 以上の遺伝子を選別したところ、DA30-O2 群で 89 遺伝子、DA30-Air 群で 75 遺伝子、内 16 遺伝子は両群で共通であった。全 12 群のウサギ動脈管・肺動脈試料 (表 1 参

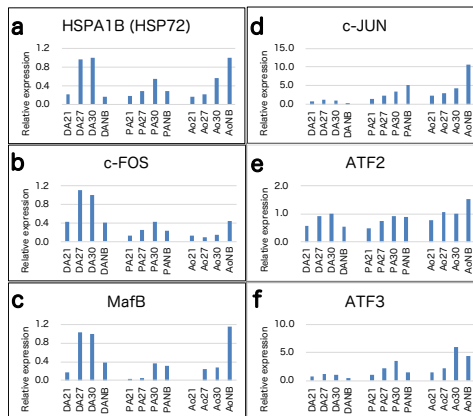


図2 ウサギ胎仔・新生仔動脈管における HSPA1 と AP-1 転写因子の mRNA 発現

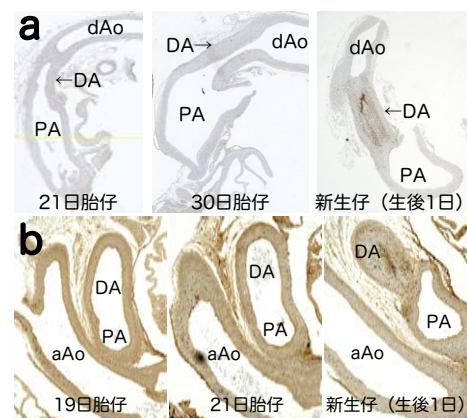


図3 胎仔・新生仔動脈管における c-FOS の分布 a ウサギ, b ラット

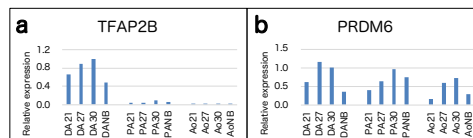


図4 ウサギ胎仔・新生仔動脈管における TFAP2B と PRDM6 の mRNA 発現

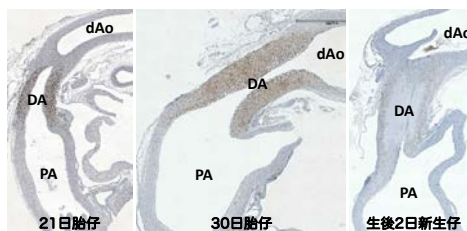


図5 ウサギ胎仔・新生仔動脈管における TFAP2B の分布

TFAP2B は胎仔動脈管の中膜細胞の主に核に発現、新生仔動脈管では、閉鎖した管腔から遠い側の中膜細胞に薄らした分布が見られた。

照) に対して各遺伝子の FPKM 値をプロットしたグラフを作成した。発現のパターンにより 2 種類の特徴的な遺伝子群 (遺伝子 X, Y と仮称) を見いだした。図 7a に示した遺伝子 X 型は、未処理の動脈管では発現が低く、酸素・窒素・大気ガスで処理すると発現量が増加するが、窒素処理に比べて大気と酸素処理でより高発現するタイプである。酸素処理群では、7 遺伝子、大気処理群では、5 遺伝子、共通する遺伝子が 3、計 9 遺伝子であった。このタイプの遺伝子の機能を文献等から調査したところ、「刺激に対して炎症関連の遺伝子を誘導、細胞増殖・分化・形質転換・細胞外マトリックスとの細胞の相互作用の変化に関与し、アポトーシスの誘導を促す」と概括された。一方、図 7b の遺伝子 Y 型は、肺動脈に比べて動脈管で特徴的に高発現、加えて窒素処理に比べて大気又は酸素処理でより高発現するタイプである。酸素処理群では、4 遺伝子、大気処理群では、1 遺伝子、共通する遺伝子はなく、計 5 遺伝子であった。このタイプの 5 遺伝子では、① 発生における細胞の運命を決める。② オートファジー反応の制御を通して、生来の免疫応答反応を行う。炎症後のサイトカインの生産や内毒素血症から守る。③ G タンパク質共役受容体であり、炎症反応を媒介する可能性がある。④ アポトーシス反応に関与する。⑤ 炎症に対する免疫反応に関与する、という機能が判明している。これら 5 遺伝子の内 3 遺伝子が、炎症に対する免疫応答に関係していた。これらの遺伝子の発現は、生後の酸素刺激によって生じる炎症に反応するため動脈管に備わる特別な機能の一端ではないかと考えられた。

中膜平滑筋細胞の増殖・内腔側への遊走、筋収縮制御タンパク質の発達、細胞外基質の増加、内膜肥厚、酸素感受性の獲得などにより動脈管における「酸素感受-収縮-機能的閉鎖」機能が成熟する。酸素刺激により変動する遺伝子群を検出した本研究から、酸素刺激を細胞膜にある受容体・チャネルが受け取り、cAMP や MAPK パスウェイが活性化、血管新生や細胞増殖、筋収縮、エピジェネティック変化が促進、形質転換、細胞外マトリックスと細胞の相互作用が変化、酸化的リン酸化が活性化、アポトーシスが促進などの多くのシグナルの変化を検出した。動脈管における HspA1B と c-FOS の発現も、平滑筋細胞増殖・アポトーシスに関わるシグナル伝達の一部と考えられる。酸素刺激に対して炎症反応が誘導されるが、動脈管には炎症反応に対する独自の免疫応答能が備わっていることが今回判明した。

<引用文献>

1. Mani, A., Meraji, S. M., Houshyar, R., Radhakrishnan, J., Mani, A., Ahangar, M., Rezaie, T. M., Taghavinejad, M. A., Broumand, B., Zhao, H., Nelson-Williams, C., and Lifton, R. P. (2002) Finding genetic contributions to sporadic disease: a recessive locus at 12q24 commonly contributes to patent ductus arteriosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15054-15059
2. Satoda, M., Pierpont, M. E., Diaz, G. A., Bornemeier, R. A., and Gelb, B. D. (1999) Char syndrome, an inherited disorder with patent ductus arteriosus, maps to chromosome 6p12-p21. *Circulation* 99, 3036-3042
3. Li, N., Subrahmanyam, L., Smith, E., Yu, X., Zaidi, S., Choi, M., Mane, S., Nelson-Williams, C., Behjati, M., Kazemi, M., Hashemi, M., Fathzadeh, M., Narayanan, A., Tian, L., Montazeri, F., Mani, M., Begleiter, M. L., Coon, B. G., Lynch, H. T., Olson, E. N., Zhao, H., Ruland, J., Lifton, R. P., and Mani, A. (2016) Mutations in the Histone Modifier PRDM6 Are Associated with Isolated Nonsyndromic Patent Ductus Arteriosus. *Am J Hum Genet* 99, 1000
4. Suda, N., Itoh, T., Nakato, R., Shirakawa, D., Bando, M., Katou, Y., Kataoka, K., Shirahige, K., Tickle, C., and Tanaka, M. (2014) Dimeric combinations of MafB, cFos and cJun control the apoptosis-survival balance in limb morphogenesis. *Development* 141, 2885-2894

試料名	DA21 C	PA21 C	DA30 C	PA30 C	DA30 O2	PA30 O2	DA30 N2	PA30 N2	DA30 Air	PA30 Air
胎仔日齢	21日		30日							
血管	DA	PA	DA	PA	DA	PA	DA	PA	DA	PA
処理	なし		なし		95% O2		95% N2		大気	

表1 ウサギ動脈管・肺動脈トランスクリプトーム試料

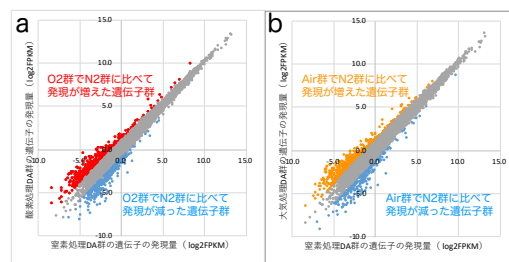


図6 酸素又は大気ガスにより発現が変動した動脈管遺伝子
a 酸素処理と窒素処理を比較した。 b 大気処理と窒素処理を比較した。

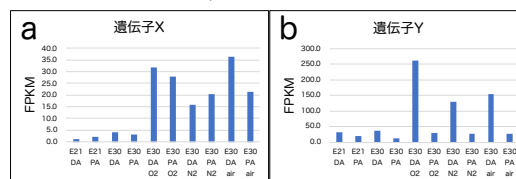


図7 酸素・大気処理した動脈管・肺動脈のRNA-seq から見いだされた特徴的な遺伝子の発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------