

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07093

研究課題名（和文）コレステロールエステル化酵素阻害薬によるアルツハイマー病治療薬開発の基盤研究

研究課題名（英文）Basic research on the development of therapeutic agents for Alzheimer's disease using Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase inhibitor

研究代表者

浦野 泰臣（Urano, Yasuomi）

同志社大学・生命医科学部・准教授

研究者番号：00546674

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）：本研究では脳特異的酸化脂質である24S-hydroxycholesterol（24S-OHC）誘導性の神経細胞死は、24S-OHCのエステル化依存的に細胞ストレスによって誘導される統合的ストレス応答を活性化させることで引き起こされることを見出した。またAcyl-CoA:cholesterol acyltransferase 1（ACAT1）選択的阻害剤K-604がアミロイド（A $\beta$ ）産生酵素の基質であるC99を分解に導くことで、アルツハイマー病発症に関わるA $\beta$ 産生を減少させることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病の根本治療薬は現在でも開発は成功しておらず、世界的な問題となっている。ACAT1の選択的阻害剤であるK-604は、これまでのアプローチと全く異なる新たな視点から、アルツハイマー病態に關与するA $\beta$ 産生の抑制、さらにオキシステロール誘導性細胞死の抑制という相乗的な効果をもつことが示され、発症を予防且つ改善する治療薬の開発を目指す点において有望な治療薬となる可能性をもつことが考えられた。また、学術的な知見としてオキシステロールが統合的ストレス応答を引き起こすことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we found that the brain-specific oxysterol 24S-hydroxycholesterol (24S-OHC) activated the integrated stress response, resulting in induction of cell death in a 24S-OHC esterification-dependent manner. We also found that acyl-CoA: cholesterol acyltransferase 1 (ACAT1) selective inhibitor K-604 induced degradation of C99, which is a substrate for amyloid (A $\beta$ )-producing enzyme, thereby reducing Alzheimer's disease (AD)-related A $\beta$  production.

研究分野：生化学

キーワード：アルツハイマー病 脂質代謝 細胞死 ACAT (SOAT) ドラッグリポジショニング 24S-hydroxycholesterol 小胞体ストレス

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化が著しい日本社会において、アルツハイマー病 (AD) の増加への対策は喫緊の課題であるが、その発症機構については未だ不明な点が多く、現行の AD 治療薬はアリセプトに代表されるように記憶力の低下を遅らせる対症療法薬しか存在しない。AD の原因として支持されるアミロイド仮説に基づくアミロイド (A $\beta$ ) 産生酵素 ( $\alpha$ 、 $\gamma$  セクレターゼ) 阻害剤は Notch タンパク質等のセクレターゼが認識する多くの基質の働きを抑えることによる副作用が生じ、期待される臨床試験結果には至っていない。よって、これまでと異なる作用機構による AD 治療薬の開発が期待されている。

Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) は、コレステロールに脂肪酸をエステル結合させる酵素であり、ACAT1 と ACAT2 の 2 つのアイソザイムが存在する。ACAT は体内に過剰なコレステロールが蓄積されるのを抑制し、コレステロール代謝に重要な役割を果たす一方で、動脈硬化におけるマクロファージの泡沫化に寄与する。そのため、ACAT 阻害剤は動脈硬化治療薬として開発が試みられてきたが、様々な困難により実用化に至っていない。これまで ACAT1 と AD の関連が示唆されており、ACAT1 ノックアウトマウスでは A $\beta$  の分解亢進や老人斑の減少が起き、認知機能減退を抑制出来る可能性が報告されている。これまで我々は、ACAT1 選択的阻害剤である K-604 が濃度依存的に A $\beta$  産生を抑制する一方で、A $\beta$  産生酵素の別の基質である Notch の切断には変化がないことを明らかにした。つまり K-604 による ACAT1 選択的阻害は A $\beta$  産生酵素活性の直接的な阻害とは異なる機序により A $\beta$  産生を抑制すると考えられるが、その作用機序は不明であった。

コレステロールは血液脳関門を通過できないため、過剰なコレステロールの大部分は神経細胞特異的に発現している cholesterol 24-hydroxylase (CYP46A1) によって血液脳関門を通過可能な 24S-hydroxycholesterol (24S-OHC) に変換されて脳内から排出される。一方で過剰な 24S-OHC は細胞毒性を示すことや、脳脊髄液中の 24S-OHC 濃度が健常者群と比較して AD 患者群では約 2.7 倍に、軽度認知症患者群では約 2 倍に増加しているという報告がある。また、AD 患者の脳内において、老人斑周辺で CYP46A1 が高発現していることや、CYP46A1 をコードする CYP46A1 遺伝子の多型が AD 発症の危険因子として働く可能性も報告されており、24S-OHC が神経変性疾患の発症や神経細胞死と関連することが示唆されている。これまで我々は、24S-OHC の神経細胞障害機構について解析を行い、過剰な 24S-OHC はカスパーゼ非依存的な制御された細胞死を誘導することを明らかにした。さらにその原因として ACAT1 により 24S-OHC がエステル化され、小胞体構造が変化することが細胞死誘導の重要なイベントであることを見出した。また K-604 や ACAT1 siRNA は、24S-OHC 誘導性の神経細胞死を完全に抑制することを明らかにし、ACAT 阻害剤が神経細胞死の抑制剤として有用であることを示してきた。このように ACAT1 は様々な点で AD の創薬標的として有望であるが、治療薬開発という点では進んでいなかった。そこで我々は ACAT 阻害剤のドラッグリポジショニングによる AD 治療薬の開発を目指した。

## 2. 研究の目的

我々は ACAT1 の選択的な抑制が A $\beta$  産生や神経細胞死を抑制することを明らかにしたが、その作用機序の詳細は不明である。また、他のオキシステロールが誘導する細胞死や疾患も多くあり、ACAT の関与を証明できれば治療薬としての適用が広がると期待される。そこで本研究では以下の項目について明らかにすることを目標とする。

- I) 24S-OHC による神経細胞死誘導機構と K-604 による阻害機構を明らかにする。
- II) 他のオキシステロール誘導性細胞死に対する K-604 の効果や阻害機構を明らかにする。
- III) K-604 による A $\beta$  産生抑制の抑制機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 細胞としてヒト神経芽細胞腫である SH-SY5Y 細胞、ヒト肝がん細胞株 HepG2 細胞、ヒトケラチノサイト細胞株である HaCaT 細胞、運動ニューロン細胞であるマウス NSC34 細胞を用いた。またヒト野生型 APP と Notch の  $\gamma$  セクレターゼ基質部分 (Notch $\Delta E$ ) が安定的に発現している CHO 細胞株 (CHO-APP/Notch $\Delta E$ ) と APP の  $\gamma$  セクレターゼ基質部分 (C99) が発現誘導可能な CHO 細胞株 (C99/wtPS1) を用いた。細胞死判定法は WST-8 法を用いた。

(2) A $\beta$  の測定は、Tris-Tricine PAGE および特異的抗体 (82E1) により行った。

(3) タンパク質発現は Immunoblot 法により解析した。新生タンパク質の合成について Puromycin を用いた SUnSET 法により評価した。RNA 発現量は real-time PCR 法により定量した。

(4) 小胞体膜破綻は、digitonin と NP-40 を用いた 2 段階細胞破砕による細胞分画法により解析した。また電子顕微鏡を用いた構造解析も行った。

## 4. 研究成果

(1) 目的 I について、SH-SY5Y 細胞を用いて 24S-OHC を処理した際の小胞体ストレスマーカーの活性化を評価したところ、24S-OHC のエステル化依存的に PERK や IRE1 などの小胞体ストレスマーカーが活性化することを明らかにした。ところが、GRP78 や Calreticulin などの小胞体シャペロンの発現誘導は認められず、むしろ顕著に減少していることが確認された。また PERK 経路の細胞死誘導シグナルである CHOP の発現誘導はわずかであり、CHOP siRNA による発現抑制は細胞死を抑制しなかったことから、CHOP は 24S-OHC 誘導性細胞死に関与しないことが明らかとなった。さらに IRE1 経路の下流として、小胞体に局在する mRNA の網羅的な分解 (regulated IRE1-dependent decay, RIDD) が起きていることが確認された。さらに IRE1 の阻害剤は mRNA の分解を抑制するとともに細胞死も有意に抑制することを明らかにした。一方で、ATF6 の活性化や IRE1 の下流に存在する Xbp-1 の発現誘導が認められないことから、細胞生存に向かわせる適応反応は正常に作動しておらず、RIDD など細胞死に誘導する反応の一部が亢進していることが示された。

また、24S-OHC 処理後の初期段階の細胞を電子顕微鏡を用いて観察したところ、24S-OHC のエステル化依存的に膜構造が部分的に壊れている小胞体像が観察された。さらに細胞分画法により、小胞体内腔に存在する PDI や Calreticulin などのシャペロンタンパク質が、24S-OHC 処理した細胞では細胞質画分に回収されることを確認し、24S-OHC のエステル体の蓄積が小胞体の膜構造の破綻を引き起こし、内腔タンパク質が流出されることを見出した。CHOP や Xbp-1 タンパク質の発現誘導が低かったことや、小胞体構造の変化から、タンパク質翻訳に対する影響があるのではと考え、SUnSET 法により新生タンパク質の翻訳を解析したところ、24S-OHC で処理した細胞では新生タンパク質の合成が顕著に減少していることを明らかにした。これらの結果から 24S-OHC のエステル体の蓄積が小胞体膜破綻を引き起こし、細胞死誘導性の小胞体ストレスが亢進するとともに、新生タンパク質の翻訳も抑制されることで細胞死が起きていることが示された。以上の結果をまとめ論文報告を行った (図 1, CDDiscovery, 2019)。

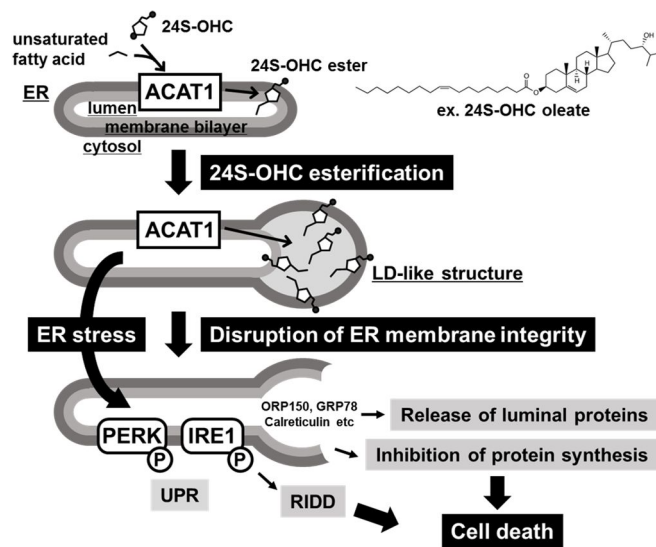


図1 24S-OHC誘導性細胞死誘導機構

さらに新生タンパク質の翻訳抑制について解析を進めたところ、液-液相分離により形成される膜をもたない構造体であるストレス顆粒の形成を誘導されることを見出した。ストレス顆粒は翻訳停止中の mRNA の一時的な保管場所であることから、ストレス顆粒形成を促すシグナル分子である eIF2 $\alpha$ に着目した。eIF2 は PERK 経路の下流であることから、PERK 阻害剤である GSK2606414 の効果を検証したところ、24S-OHC 誘導性新生タンパク質の翻訳抑制が減弱し、ストレス顆粒形成も抑制された。一方、eIF2 のリン酸化も抑制されたが、その効果は部分的であった。そこで、別の eIF2 リン酸化酵素である GCN2 に着目し活性化を確認したところ、24S-OHC 処理によって GCN2 の自己リン酸化が亢進することが確認された。また GCN2 阻害剤である GCN2iB 処理は、eIF2 のリン酸化を一部減弱した。さらに GSK2606414 や GCN2iB は細胞死を部分的に抑制した。これらの結果から、PERK 経路と GCN2 経路の協調的な活性化、すなわち統合的ストレス応答 (ISR) が起きていることが示唆された。そこで ISR 阻害剤である ISRIB の効果を検証したところ、24S-OHC 誘導性のタンパク質翻訳抑制が顕著に緩和し、ストレス顆粒形成も完全に抑制された。また細胞死も有意に抑制されたことから、ACAT1 を介した 24S-OHC のエステル化による ISR 経路の亢進が細胞死を引き起こす重要な役割を果たすことが示された。以上の結果をまとめ論文投稿を行っている (図 2)。

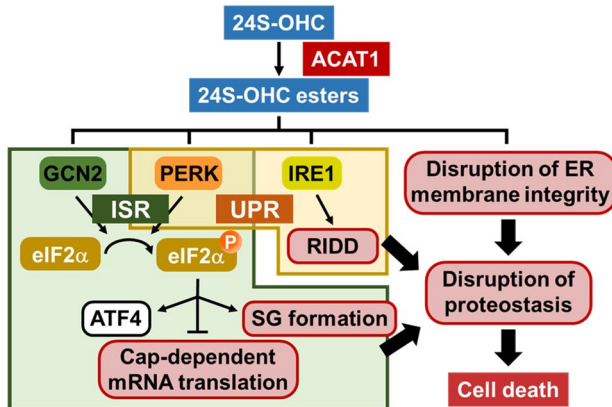


図2 24S-OHC誘導性細胞死誘導機構

(2) 目的 II について SH-SY5Y と HepG2 細胞における 25-OHC の細胞毒性を検討した。その結果、どちらの細胞についても濃度依存的に細胞死が誘導された。そこで ACAT 阻害剤の効

果を検証したところ、SH-SY5Y 細胞では有意に細胞死が抑制されたのに対し、HepG2 細胞では阻害効果が認められなかった。またどちらの細胞もカスパーゼ 3 の活性化が認められず、さらに全カスパーゼ阻害剤 ZVAD が細胞死抑制効果を示さなかったことから、カスパーゼ非依存的な細胞死を誘導することが明らかとなった。また、HepG2 細胞では抗酸化剤であるビタミン E 等により細胞死抑制効果が見られ、脂質過酸化物の増加が認められたことからフェロトーシスを誘導している可能性が考えられたが、ferrostatin-1 等のフェロトーシス阻害剤は細胞死抑制効果を示さなかったことから、フェロトーシス様の細胞死であると考えられた。また HaCaT 細胞における 25-OHC 誘導性細胞死では、K-604 等の ACAT 阻害剤は細胞死抑制効果を示さなかった。またカスパーゼ 3 の活性化が認められ、ZVAD により有意に細胞死が抑制されたことから、アポトーシスが誘導されたと考えられた。すなわち同じ 25-OHC でも、細胞の種類によって異なる細胞死誘導機構により異なる細胞死形態で細胞死が引き起こされることが示された。以上の結果をまとめ論文報告を行った (FRBM, 2021)。

また NSC34 細胞を用い、25-OHC の細胞毒性を検討したところ、HepG2 細胞と同様、カスパーゼ非依存的な細胞死を誘導し、ACAT 阻害剤が細胞死抑制効果を示さないことが明らかとなった。

(3) 目的 III について C99/wtPS1 を用いて A $\beta$  産生に対する効果を確認したところ、K-604 処理は濃度依存的に A $\beta$  産生を抑制し、さらに C99 の量を減少させる効果があることを明らかにした。また CHO-APP/Notch $\Delta$ E 細胞を用いて K-604 の A $\beta$  産生抑制機構の解析を進めたところ、K-604 は濃度依存的に A $\beta$  産生を抑制し、同様に C99 の量を減少させる効果があることを明らかにした。C99 は $\beta$ -セクレターゼの切断産物であることから、 $\beta$ -セクレターゼの基質である St6Gal1 を安定発現させた CHO 細胞を用いて、K-604 処理による $\beta$ 切断に対する影響を検討したところ、 $\beta$ -セクレターゼ活性には直接影響を与えていないことが確認された。C99 の減少が分解による可能性を考え、リソソームに存在するプロテアーゼの阻害剤で共処理したところ、その減少が抑制されたことから、リソソームにおける C99 の分解亢進が A $\beta$  産生を抑制に導く可能性を明らかにした。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kazama Miku, Kato Yoichiro, Kakita Akiyoshi, Noguchi Noriko, Urano Yasuomi, Masui Kenta, Niida Kawaguchi Motoko, Yamamoto Tomoko, Watabe Kazuhiko, Kitagawa Kazuo, Shibata Noriyuki	4. 巻 40
2. 論文標題 Astrocytes release glutamate via cystine/glutamate antiporter upregulated in response to increased oxidative stress related to sporadic amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuropathology	6. 最初と最後の頁 587 ~ 598
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/neup.12716	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 -
1. 著者名 Urano Yasuomi, Takahachi Mina, Higashiura Ryo, Fujiwara Hitomi, Funamoto Satoru, Imai So, Futai Eugene, Okuda Michiaki, Sugimoto Hachiro, Noguchi Noriko	4. 巻 9
2. 論文標題 Curcumin Derivative GT863 Inhibits Amyloid-Beta Production via Inhibition of Protein N-Glycosylation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 349 ~ 349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9020349	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 -
1. 著者名 Urano Yasuomi, Ho Vo Diep-Khanh, Hirofumi Araki, Noguchi Noriko	4. 巻 5
2. 論文標題 24(S)-Hydroxycholesterol induces ER dysfunction-mediated unconventional cell death	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Death Discovery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41420-019-0192-4	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 -
1. 著者名 Shibuya Kimiyuki, Morikawa Shigeru, Miyamoto Masayoshi, Ogawa Shin-ichiro, Tsunenari Yoshihiko, Urano Yasuomi, Noguchi Noriko	4. 巻 4
2. 論文標題 Brain Targeting of Acyl-CoA:Cholesterol O-Acyltransferase-1 Inhibitor K-604 via the Intranasal Route Using a Hydroxycarboxylic Acid Solution	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 16943 ~ 16955
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.9b02307	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 -

1. 著者名 Suzuki Atsuki, Urano Yasuomi, Ishida Tomohisa, Noguchi Noriko	4. 巻 176
2. 論文標題 Different functions of vitamin E homologues in the various types of cell death induced by oxysterols	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 356 ~ 365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2021.10.008	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 -

1. 著者名 Kato Hajime, Sato Hiroyasu, Okuda Michiaki, Wu Jun, Koyama Shingo, Izumi Yasuhiko, Waku Tomonori, Iino Mitsuyoshi, Aoki Masashi, Arawaka Shigeki, Ohta Yasuyuki, Ishizawa Kenichi, Kawasaki Kanan, Urano Yasuomi, Miyasaka Tomohiro, Noguchi Noriko, Kume Toshiaki, Akaike Akinori, Sugimoto Hachiro, Kato Takeo	4. 巻 12
2. 論文標題 Therapeutic effect of a novel curcumin derivative GT863 on a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration	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) 10.1080/21678421.2021.2012699	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 -

[学会発表] 計14件(うち招待講演 0件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 石田智久、浦野泰臣、野口範子
2. 発表標題 運動ニューロン様細胞NSC-34における25-OHC誘導性細胞死機構の解明
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木淳生、浦野泰臣、野口範子
2. 発表標題 ヒト肝癌細胞HepG2とヒト表皮角化細胞HaCaTにおける 25-hydroxycholesterol 誘導性細胞死機構の解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石田智久、浦野泰臣、野口範子
2. 発表標題 Induction of cell death by 25-hydroxycholesterol is dependent on activity of ACAT1
3. 学会等名 60th International Conference on the Bioscience of Lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 敷田和生、浦野泰臣、野口範子
2. 発表標題 Accumulation of 24(S)-hydroxycholesterol esters causes disruption of endoplasmic reticulum membrane integrity
3. 学会等名 60th International Conference on the Bioscience of Lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木淳生、浦野泰臣、野口範子
2. 発表標題 25-hydroxycholesterol-induced cell death mechanism in HepG2 cells and HaCaT cells
3. 学会等名 60th International Conference on the Bioscience of Lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浦野泰臣
2. 発表標題 Oxysterol-induced unconventional cell death mechanism
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高八美菜, 浦野泰臣, 奥田充顕, 杉本八郎, 野口範子
2. 発表標題 Curcumin誘導体GT863の基質選択的なA 産生抑制機構の解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野口範子, 浦野泰臣, 石田智久, 鈴木淳生
2. 発表標題 Effects of 24(S)-hydroxycholesterol and 25-hydroxycholesterol in different cell types
3. 学会等名 9th The European Network for Oxysterol Research Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木淳生, 木村勇輝, 浦野泰臣, 野口範子
2. 発表標題 ビタミンEによる24S-OHC誘導性細胞死抑制機構の解析
3. 学会等名 第31回ビタミンE研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中谷祐将, 下川直史, 浦野泰臣, 野口範子, 高木昌宏
2. 発表標題 ビタミンE疎水部構造の違いと膜相分離
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 岩垣あなん、浦野 泰臣、野口 範子
2. 発表標題 25-Hydroxycholesterol induces ferroptosis via downregulation of mevalonate pathway in Schwann cells
3. 学会等名 第74回日本酸化ストレス学会・第21回日本N0学会合同学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 スウ ショウゲツ、浦野 泰臣、野口 範子
2. 発表標題 ACAT1選択的阻害剤によるA 産生抑制メカニズムの解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩垣あなん、浦野 泰臣、野口 範子
2. 発表標題 マウスシュワン細胞 IMS32における25-hydroxycholesterolによるFerroptosis誘導機構の解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浦野 泰臣、岩垣あなん、野口 範子
2. 発表標題 25-Hydroxycholesterol induces ferroptosis via downregulation of mevalonate pathway in Schwann cells
3. 学会等名 10th ENOR SYMPOSIUM (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計4件

産業財産権の名称 胆道がん又は皮膚がんの予防又は治療剤	発明者 浦野泰臣、野口範子、岩田実姫	権利者 学校法人同志社
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-185817	出願年 2020年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 25-OHC誘導性グリア細胞死の抑制剤	発明者 浦野泰臣、野口範子、岩垣あなん	権利者 学校法人同志社
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-022287	出願年 2021年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 25-OHC誘導性細胞死の抑制剤、並びに、神経原性疾患の予防及び/又は治療のための薬剤	発明者 浦野泰臣、野口範子、石田智久	権利者 学校法人同志社
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-105214	出願年 2019年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 A 産生抑制剤	発明者 浦野泰臣、野口範子、高八美菜	権利者 学校法人同志社
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-205225	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------