

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：83802

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07792

研究課題名（和文）がんゲノム解析で蓄積する機能未知遺伝子変異の臨床活用にむけた変異機能推定法の構築

研究課題名（英文）The development of a method to predict the function of variants of unknown significance that accumulate in cancer genome analysis for clinical application purposes

研究代表者

芹澤 昌邦（Serizawa, Masakuni）

静岡県立静岡がんセンター（研究所）・その他部局等・研究員

研究者番号：00569915

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）：本研究は、腫瘍特異的変異の中から機能獲得型変異を精度良くかつ効率的に抽出する「遺伝子変異機能推定法」の構築を目的としており、そのモデル構築のためKIT受容体チロシンキナーゼの変異について、統一された実験手法・判断基準による網羅的機能評価を行った。日本人消化管間質腫瘍57症例から検出されたKITの37変異について評価を行った結果、機能が不明であった15変異を含む、25変異が活性化変異であることを明らかにした。4種類のKIT阻害薬イマチニブ、スニチニブ、レゴラフェニブ、リプレチニブの37変異に対する阻害効果を検討した結果、それぞれ54%、84%、38%、そして49%の変異に対して阻害効果を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、複雑な挿入・欠失を含むあらゆる変異に関して、実験において使用する変異型遺伝子発現プラスミドの構築法を確立した。また、その発現プラスミドを用い、SREレポーターアッセイを行うことでMAPKシグナル経路の活性状態の定量を行う変異機能評価法に加えて、SREレポーターアッセイを活用した薬剤感受性試験から成る一連の機能不明変異の検討フローを確立した。また、本フローは発現プラスミドの構築からを約2週間で完了することが出来るため、ゲノム検査で検出された変異の迅速な機能評価を可能にすることが期待される。本法は機能不明変異の機能評価を促進し、ゲノム医療の実効性の向上に寄与できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The primary objective of this study is to develop a reliable method for predicting the function of variants of unknown significance, with a focus on identifying gain-of-function gene mutations among tumor-specific gene mutations. To achieve this goal, we conducted a comprehensive functional evaluation of KIT receptor tyrosine kinase mutations, utilizing consistent experimental methods and criteria. We analyzed 37 KIT mutations detected in 57 Japanese patients with gastrointestinal stromal tumors, identifying 25 mutations as activating mutations, including 15 previously unknown functions. We then assessed the inhibitory effect of four KIT inhibitors-imatinib, sunitinib, regorafenib, and repretinib-on the 37 mutations, finding that 54%, 84%, 38%, and 49% of mutations, respectively, were inhibited.

研究分野：がんゲノム医療

キーワード：がんゲノム医療 分子標的治療 VUS KIT 受容体チロシンキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

がんゲノム解析のめざましい進展は、がんの分子生物学的理解を深め、さらに検出された遺伝子変異の情報に基づき治療方針を決める「がんゲノム医療」が始まる契機となった。しかし、がんゲノム解析で検出された腫瘍特異的遺伝子変異の約 98%は、機能的意義が不明な遺伝子変異 (VUS, Variants of Unknown Significance) として放置されており、患者のゲノム情報が有効に利用されているとは言い難い状況である。そのため、この VUS の中から、増殖経路の活性化や薬剤感受性の変化を引き起こす「機能獲得型遺伝子変異」を効率的に見つけ出し、新たな治療標的の同定や薬剤の適応症例の拡大につなげるための新たな手段の確立が「がんゲノム医療」の実効性を今後さらに高める上で必要不可欠であると考え、本研究計画を立案するに至った。

2. 研究の目的

本研究は、腫瘍特異的遺伝子変異の中から「機能獲得型遺伝子変異」を精度良くかつ効率的に抽出する「遺伝子変異機能推定法」の構築を目的とした。そのためには、統一された実験手法・判断基準による腫瘍特異的遺伝子変異の網羅的機能評価を行い、そこに各遺伝子変異の情報学的検討を加え、人工知能により統合的に評価する必要がある。そこで、標的とする薬剤が開発中の薬剤も含め多数存在する受容体チロシンキナーゼ (RTK) 遺伝子を対象とし、モデル構築のため日本人の消化管間質腫瘍の症例において認められた KIT 受容体チロシンキナーゼの変異の評価を中心に実施した。

3. 研究の方法

変異がキナーゼ活性を含む酵素活性、関連シグナル経路の活性、転写制御活性、増殖能、質転換活性、そして薬剤感受性に与える影響を評価する。その評価項目に応じて、哺乳類培養細胞株における実験条件を、一過性発現条件もしくは安定発現条件から選択し実施した。

(1) 解析対象変異を発現するためのプラスミドの構築

機能評価に必要な解析対象変異を培養細胞株において一過性に発現するためのプラスミドの構築には、哺乳類細胞用発現プラスミド pEZ-M02 に解析対象遺伝子の野生型の cDNA 配列が挿入されたプラスミドを準備し、そこにポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) もしくは合成核酸を用いて解析対象の変異を導入することで、変異を導入した遺伝子 (以下「変異型遺伝子」と記載) の発現プラスミドを構築する。研究開始当初有していた技術では、繰り返し配列領域における数十塩基の挿入・欠失などを複雑な塩基変化に対応できていなかった。そこで、変異導入に用いる PCR 酵素の種類、PCR プログラムの条件検討、そしてリン酸化プライマーの活用により、新たに 5 種類の変異導入方法を確立した。この 6 種類の構築方法から適宜選択することでほぼ全ての変異を有する発現プラスミドの構築が可能となった (変異導入方法の詳細については記載省略)。変異型遺伝子発現プラスミドは、日本人患者において検出された、EGFR 遺伝子変異 78 種類、KIT 遺伝子変異 42 種類、そして NTRK1 遺伝子変異 18 種類について構築した。

(2) MAPK シグナル経路の活性状態の定量

RTK の下流に位置する MAPK シグナル経路の活性状態は、MAPK シグナル経路における ERK からのシグナルを受けて活性化する転写制御因子 ELK 1 の転写制御活性をレポーターアッセイにより定量化することで評価した。レポータープラスミドは、発光強度と安定性が高い NanoLuc ルシフェラーゼを含む pNL2.2 [NlucP/Hygro] プラスミド (Promega) に、写制御因子 ELK 1 の認識配列 serum response element (SRE) を導入したプラスミド pNL (NlucP/SRE/Hygro) を用いた。上記の pEZ-M02 を基に作られた野生型および変異型遺伝子発現プラスミドプラスミドを SRE のレポータープラスミドと共にリポフェクション法を用いて共導入し、30 時間培養後測定を行う一過性発現の条件において行った (SRE レポーターアッセイ)。使用する細胞株は、その細胞株が有している野生型遺伝子の影響を排除し、バックグラウンドの活性を低減するために、ゲノム編集により HEK-293 細胞の対象遺伝子をノックアウトした細胞株を構築し使用した。また、並行してウエスタンブロッティングを実施し、KIT および ERK のリン酸化状態の検討を行った。

(3) SRE レポーターアッセイによるキナーゼ阻害薬に対する応答性の検討

野生型および変異型遺伝子発現プラスミドプラスミドを、SRE のレポータープラスミド NL (NlucP/SRE/Hygro) と共にリポフェクション法を用いて共導入し 24 時間培養後、薬剤を添加を行いさらに 6 時間培養した後に測定を行った。

(4) コロニー形成試験による形質転換活性

コロニー形成試験、野生型および変異型遺伝子の安定発現細胞株を用いて行った。安定発現細胞株の構築は、ゲノム上の特定標的領域に相同組み換えで遺伝子 1 コピーを導入可能な Flp-In

システム (Invitrogen) を用いた。その際に用いる専用のプラスミド pcDNA5/FRT/T0 への野生型および変異型 cDNA 配列の挿入は、一過性発現で用いた pEZ-M02 を基に作られたプラスミドからサブクローニングにより行った。野生型または変異型遺伝子の発現プラスミドおよび、相同組み換え反応を行うための組み換え遺伝子をコードする改変 Flp 遺伝子を発現するための pOG44 プラスミドをエレクトロポレーション法により同時にマウス線維芽細胞 NIH-3T3 へ導入し、その後薬剤選択により目的細胞株を取得した。コロニー形成試験は、0.5% の DMEM 寒天培地の上に 0.3% の DMEM 寒天培地に懸濁した細胞を重層し 28 日間培養した。検出は MTT 試薬でコロニーを染色し、Cell3iMager で画像取得後、コロニー径、面積、コロニー数を Cell3iMager Launcher により測定した。

4. 研究成果

本研究は、腫瘍特異的変異の中から機能獲得型変異を精度良くかつ効率的に抽出する「遺伝子変異機能推定法」の構築を目的としており、そのモデル構築のため KIT 受容体チロシンキナーゼの変異について、統一された実験手法・判断基準による網羅的機能評価を行った。

KIT は PDGFRA や CSF1R と共にクラス III に分類される受容体型チロシンキナーゼであり、リガンドである Stem cell factor (SCF) および Mast cell growth factor (MGF) の結合により二量体を形成し、細胞質内ドメインにおいて自己リン酸化が起きることで活性化状態となる。そして、下流の MAPK および PI3K/Akt/mTOR シグナル経路などの細胞増殖に関連するシグナル経路の活性化を引き起こすことで、細胞増殖および分化を促進する (PMID: 17546049, 11896121, 22089421)。KIT はカハール間質細胞、生殖細胞系列、骨髄幹細胞、メラノサイト、そして肥満細胞に発現している (PMID: 33096693, 9438854, 23073628)。カハール間質細胞は消化管間質層に存在し、蠕動運動のリズムを作る緩徐波を発生させ、消化管の自発的な収縮活動に関与している (PMID: 7853230, 7530333)。KIT はそのカハール間質細胞の生存と増殖に関与しており、カハール間質細胞に由来し消化管筋層において発生する肉腫である消化管間質腫瘍 (GIST) においては、80~85% の症例において KIT の変異が認められる (PMID: 33737510)。KIT 変異の大部分にあたる 66~71% が細胞外ドメインと細胞質ドメインの膜近傍領域 (juxtamembrane 領域) であるエクソン 11 に、13% が細胞外ドメインに、そしてキナーゼドメインであるエクソン 13 とエクソン 17 にそれぞれ 1~3% 程度が認められる (PMID: 23623056, 33737510)。KIT の変異は GIST をはじめ急性骨髄性白血病や黒色腫において認められ、OncoKB (<https://www.oncokb.org/>) などのがんゲノム医療のデータベースにおいて数多く登録されている。しかしながら、登録されている全ての変異が実験的な検討に基づき活性化変異として扱われているのではなく、単に GIST 症例において認められ、ホットスポットであるエクソン 11 に位置しているということを根拠にした変異も多く含まれる。そこで、本研究では、日本人消化管間質腫瘍 57 症例において検出された KIT 受容体チロシンキナーゼの変異に対し、統一された実験手法・判断基準による網羅的機能評価を行った。

(1) 検討対象の変異

日本人消化管間質腫瘍 57 症例からは、31 種類の単独変異と 5 種類の複合変異 (1 症例で複数の KIT 変異を有する) が検出されており、5 種類の複合変異についてもそれぞれわけて変異の種類を集計すると 37 種類の変異となった。その 37 変異の内訳は、27 変異は単独で存在しており、4 変異は単独・複合変異の両方で認められ、残りの 6 変異は複合変異としてのみ検出された (図 1)。尚、37 変異のうち、21 変異については、実験的検討による機能評価が行われていない VUS であった。検出された 37 変異のうち 32 変異 (86%) は膜近傍領域のエクソン 11 に位置し、細胞外ドメインのエクソン 9 に 1 変異、そしてキナーゼドメインには 4 変異が認められた (図 2)。

31 single mutations

p.A502_Y503dup	p.V559D	p.Y578_D579insATQLPY
p.K550_V555delinsL	p.V559A	p.Q575_L576insPQ
p.K550_K558del	p.V559G	p.L576_P585dup
p.P551_K558delinsQ	p.V560D	p.L576P
p.E554_V559del	p.V560del	p.L576del
p.W557G	p.I563_D572del	p.L576_D579dup
p.W557_K558delinsE	p.G565_P573delinsA	p.Y578_D579dup
p.W557_K558del	p.G565_P573delinsET	p.D579del
p.W557_E561del	p.V569_L576del	p.K642E
p.W557_V559delinsC	p.Y570_L576del	
p.K558_E562del	p.D572_P573dup	

5 compound mutations

p.W557_V559delinsF	p.V654A	
p.K558Q	p.L576P	
p.K558_E562del	p.T670I	
p.V559D	p.V654A	p.N822Y
p.Q575_D579del	p.K642E	

27	only detected as single mutation
4	overlapped between single and compound mutations
6	only detected as component of compound mutation
37	

図 1 検討対象の KIT 変異の分類

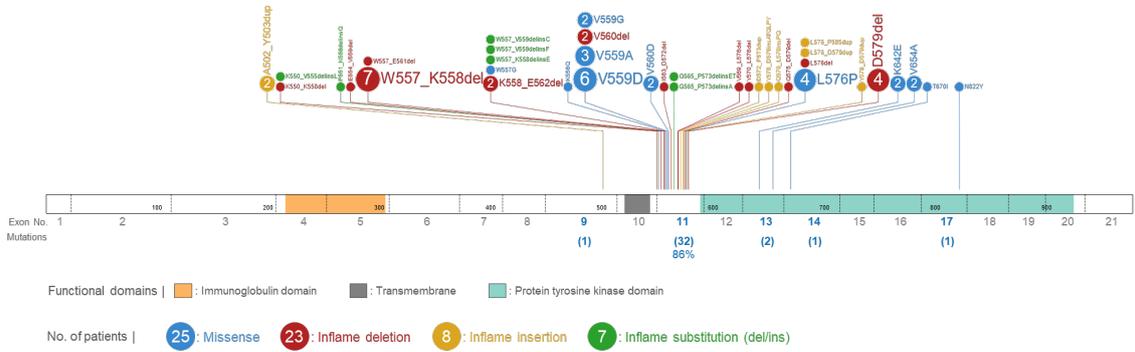


図2 検討対象のKIT変異のアミノ酸配列上の分布

(2) 各変異のMAPKシグナル経路の活性に与える影響の評価

評価に用いる変異発現プラスミドは、37種類の変異を有すそれぞれのプラスミドに加えて、5種類の複合変異を発現するプラスミド合計42種類を構築した。各変異の機能的評価には、発現プラスミドをKITノックアウトHEK293派生細胞株に一過性導入し、SREレポーターアッセイもしくはウエスタンブロッティングによりKITの下流に位置するMAPKシグナル経路の活性状態を評価する手法を用いた(図3)。SREレポーターアッセイの結果、野生型に比べ2倍以上のMAPKシグナル経路の活性亢進を示す変異は35変異で認められた。その中でも特に強い10倍以上の活性亢進を示す変異は17変異で認められ、その大部分がKIT変異のホットスポットであるエクソン11の550~560番目のアミノ酸に位置していた(図4)。同様の結果は、ウエスタンブロッティングによるERK1/2のリン酸化状態の検討からも示唆された。また、5種類の複合変異については、構成するそれぞれの変異単独の際と複合変異でのMAPKシグナル経路の活性状態を比較した結果、複合変異における有意な活性亢進が検出されたのは、p. K558_E562delとp. T670Iの組み合わせのみであった。

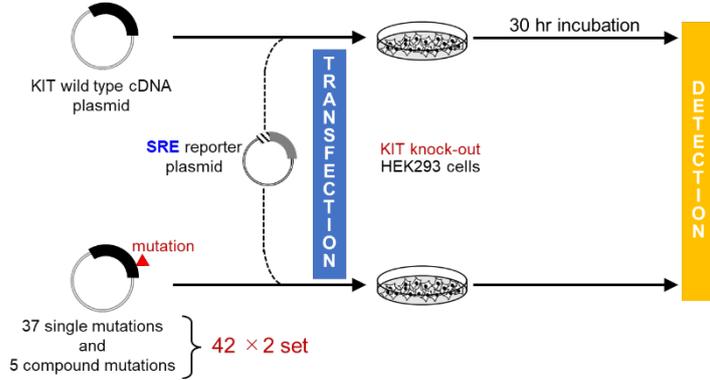


図3 SREレポーターアッセイの流れ

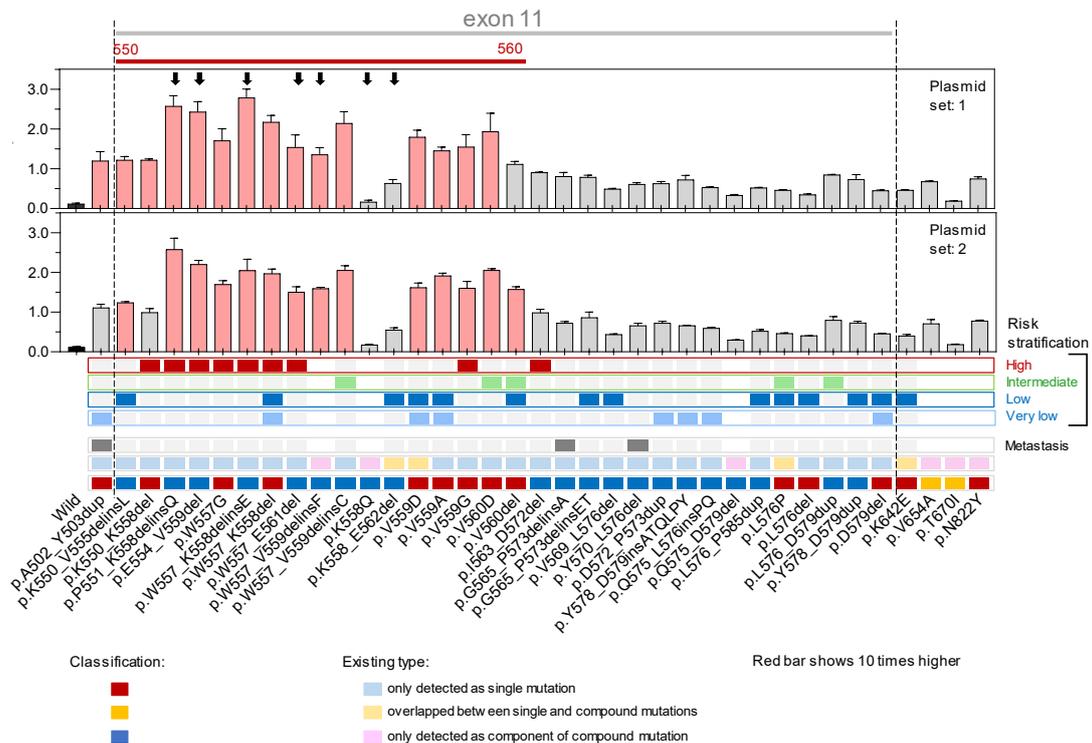


図4 各変異のMAPKシグナル経路の活性に与える影響の評価結果

(3) 各変異の形質転換活性に与える影響の評価

各 37 変異の安定発現細胞株を用いて、コロニー形成試験により形質転換活性の検討を行った結果、27 種類の変異において野生型に比べて有意なコロニー形成が認められた。MAPK シグナル経路の活性化と共に形質転換活性の亢進が認められた 25 変異が KIT における有意な活性バリエーションと考えられる。その 25 変異のうち、15 バリエーションは VUS であり、新たな活性化変異である可能性が示唆された。

(4) KIT 阻害薬に対する感受性に各変異が与える影響についての評価

各変異の KIT 阻害薬に対する感受性への影響に関する評価は、本邦承認薬イマチニブ、スニチニブ、レゴラフェニブの 3 薬剤に加えて、既に米国において承認されているリプレチニブについても対象として実施した。評価には、SRE レポーターアッセイによる MAPK シグナル経路の活性状態を評価する手法を用い、発現プラスミドを KIT ノックアウト HEK293 派生細胞株に一過性導入したのち、24 時間後に KIT 阻害剤による処理を行い、その 6 時間後に検出を行った (図 4)。

まず本法が、KIT 変異の薬剤感受性への影響を推察するための評価系として利用可能か検討を行うために、イマチニブ濃度を 0.01, 0.1, 1, 10 $\mu\text{mol/L}$ で検討した結果、イマチニブへの感受性を示すことが報告されている変異については、MAPK シグナル経路の活性低下が濃度依存的に認められた一方で、野生型 KIT、そして既知のイマチニブ耐性変異 p. T670I および p. V654A については MAPK シグナル経路の活性が維持されていた。この結果より、KIT 変異の薬剤感受性への影響を推察するための評価系として本法が利用可能であることを明らかにした。また、野生型 KIT および既知のイマチニブ耐性変異と他の感受性変異の間で最も MAPK シグナル経路の活性に差が認められた 1 $\mu\text{mol/L}$ をスクリーニングに使用する薬剤濃度と設定した。

50%以上の MAPK シグナル経路の活性低下が示す変異を感受性変異と定義し、4 種類の KIT 阻害剤に関して評価を行った。イマチニブでは 54%、スニチニブでは 84%、レゴラフェニブでは 38%、そしてリプレチニブでは 49%の変異において、50%以上の MAPK シグナル経路の活性低下が認められた (図 5)。4 薬剤共 MAPK シグナル経路の活性を強く亢進させるエクソン 11 の 550~560 番目のアミノ酸に位置する変異に対しては安定的な阻害効果を示した。一方で、エクソン 11 の 560 番目以降のアミノ酸に位置する変異に対しては、スニチニブおよびリプレチニブは安定的な阻害効果を示す傾向が認められた。一方で、リプレチニブは他の薬剤とは異なり、野生型 KIT に対しても阻害効果を示すため、治療にあたり正常組織に対する影響を考慮する必要のある薬剤である可能性が示唆された。複合変異の検討において、p. Q575_D579del と p. K642E の組み合わせでは、p. K642E 単独ではイマチニブ、スニチニブ、レゴラフェニブにおいて阻害効果が弱いながらも認められたが、両変異が共存する場合は、その阻害効果が認められなかったため、p. Q575_D579del は新たな KIT 阻害剤耐性変異である可能性が示唆された。その一方で、リプレチニブは他の 3 薬剤と異なる傾向を示し、p. Q575_D579del に対し最も強い阻害効果を示した。

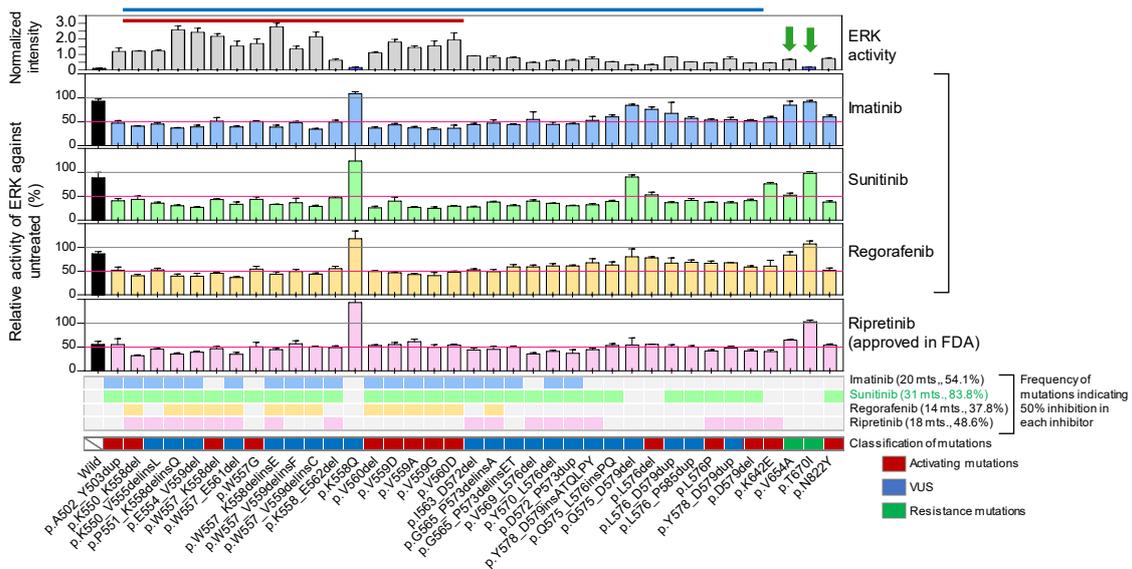


図 5 KIT 阻害薬に対する感受性に各変異が与える影響についての評価結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Masakuni Serizawa, Maki Mizuguchi, Kenichi Urakami, Takeshi Nagashima, Keiichi Ohshima, Keiichi Hatakeyama, Sumiko Ohnami, Shumpei Ohnami, Koji Maruyama, Tadashi Ashizawa, Akira Iizuka, Yasuo Horiuchi, Akane Naruoka, Hirotsugu Kenmotsu, Yasuto Akiyama, Ken Yamaguchi	4. 巻 8
2. 論文標題 JCGA: The Japanese version of the Cancer Genome Atlas and its contribution to the interpretation of gene alterations detected in clinical cancer genome sequencing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Genome Variation	6. 最初と最後の頁 38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41439-021-00170-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 -

1. 著者名 Iida Y, Serizawa M, Mukaigawa T, Kamijo T, Nakajima T, Asakura K, Kusahara M, Yamaguchi K, Onitsuka T.	4. 巻 99
2. 論文標題 Molecular profile of a pleomorphic adenoma of the hard palate: A case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medicine (Baltimore).	6. 最初と最後の頁 e21207
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MD.00000000000021207	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 Kobayashi H, Serizawa M, Naito T, Konno H, Kojima H, Mizuno T, Isaka M, Endo M, Nagashima T, Kusahara M, Urakami K, Ohshima K, Yamaguchi K, Ohde Y, Takahashi T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Characterization of Tumour Mutation Burden in Patients With Non-Small Cell Lung Cancer and Interstitial Lung Disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Respirology	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） 10.1111/resp.13726	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 芹澤昌邦、長嶋剛史、水口魔己、豆鞆伸昭、鋤持広知、大石琢磨、河田卓也、杉野隆、松林宏行、畠山慶一、大島啓一、戸高明子、寺島雅典、山口建、秋山靖人、浦上研一
2. 発表標題 がん全ゲノム解析の臨床導入に向けた静岡がんセンターにおける実現 可能性試験
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 芹澤昌邦、武井健介、豆鞘伸昭、河田卓也、井坂光宏、鋤持広知、杉野隆、今野隼人、前田光喜、勝又信哉、長嶋剛史、大島啓一、浦上研一、山口建、秋山靖人、高橋利明、大出泰久
2. 発表標題 肺癌における全ゲノム解析の臨床実装にむけた実現可能性試験
3. 学会等名 第64回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 芹澤 昌邦、長嶋 剛史、水口 魔己、豆鞘 伸昭、鋤持 広知、大石 琢磨、河田 卓也、杉野 隆、松林 宏行、畠山 慶一、大島 啓一、戸高 明子、寺島 雅典、山口 建、秋山 靖人、浦上 研一
2. 発表標題 がん全ゲノム解析の臨床活用に向けた静岡がんセンターにおける解析およびエキスパートパネル実施体制の構築
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Serizawa Masakuni, Miyashita Junko, Umehara Rina, Ishikawa Yoshinobu, Mori Keita, Kenmotsu Hirotsugu, Ohshima Keiichi, Yamaguchi Ken
2. 発表標題 Functional evaluation of 42 KIT mutations identified in 57 Japanese patients with gastrointestinal stromal tumors
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hirotsugu Kenmotsu, Masakuni Serizawa, Maki Mizuguchi, Nobuaki Mamesaya, Hiromichi Shirasu, Eriko Miyawaki, Kunihiro Fushiki, Nobuhiro Kado, Ryo Ko, Hiroyuki Matsubayashi, Takashi Sugino, Keiichi Ohshima, Kenichi Urakami, Yasuto Akiyama, Ken Yamaguchi
2. 発表標題 Utilization of Japanese cancer genome database JCGA in the interpretation of results in cancer gene panel tests
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 芹澤昌邦、長嶋剛史、川端孝典、盛 啓太、釘持広知、杉野 隆、丸山宏二、大島啓一、浦上研一、秋山靖人、山口 建
2. 発表標題 主要8がん種における日本人と白人のがんゲノム比較解析
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井坂光宏、芹澤昌邦、長嶋剛史、児嶋秀晃、今野隼人、水野鉄也、小野 哲、大島啓一、秋山靖人、浦上研一、遠藤正浩、杉野 隆、山口建、高橋利明、大出泰久
2. 発表標題 遺伝子変異総量は非置換型肺腺癌における独立した予後規定因子である
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

JCGA : Japanese version of the Cancer Genome Atlas https://www.jcga-scc.jp/

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
研究分担者	石川 吉伸 (Ishikawa Yoshinobu) (00305004)	湘南医療大学・薬学部医療薬学科・教授 (32728)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	大島 啓一 (Ohshima Keiich) (10399587)	静岡県立静岡がんセンター（研究所）・その他部局等・研究員 (83802)	
研究分担者	鈿持 広知 (Kenmotsu Hirotsugu) (50602637)	静岡県立静岡がんセンター（研究所）・その他部局等・研究員 (83802)	
研究分担者	盛 啓太 (Mori Keita) (50727534)	静岡県立静岡がんセンター（研究所）・その他部局等・研究員 (83802)	

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