

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17847

研究課題名（和文）静止期維持培養法による造血幹細胞加齢メカニズムの解明

研究課題名（英文）Study on the mechanism of HSC aging through quiescence maintaining culture

研究代表者

小林 央（Kobayashi, Hiroshi）

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：10749542

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：造血幹細胞（HSC）は生涯にわたる造血を維持している。私たちは最近、試験管内で造血幹細胞を静止状態に保つ培養法を開発した。しかしこの方法で培養した造血幹細胞は加齢に伴う表現型を示した。私たちは造血幹細胞の加齢マーカーの発現を抑制する因子と促進する因子を探ることで、維持培養の条件を改善した。TGF- β やレチノイン酸受容体のシグナルは加齢に伴う表現型を促進し、コレステロールは加齢に伴う表現型を抑制した。これらの要因を組み合わせることで、高TPO培養は老齢造血幹細胞のリンパ球産生を回復させ、老齢造血幹細胞よりも高い再構成能力をもたらした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

造血幹細胞は幹細胞モデルとしての基礎科学的な側面と、造血幹細胞移植による血液疾患や先天性疾患の治療という臨床的な側面から重要な細胞である。しかし造血幹細胞の未分化性維持の必要最小限の要素は何か、そしてどのような環境因子が造血幹細胞を加齢させ、その機能喪失にかかわっているかは十分理解されておらず、結果として長期にわたる造血幹細胞の体外維持培養法も未確立であった。本研究により、幹細胞が生体内で一生涯にわたり維持されるメカニズムとは何か、そしてより良い移植医療のための質の高い幹細胞に必要な条件は何かという両面について、幹細胞の機能を維持する方法論を提供することにつながる。

研究成果の概要（英文）：Hematopoietic stem cells (HSCs) maintain lifelong hematopoiesis by remaining quiescent in the bone marrow niche. I recently developed a culture method to maintain HSCs quiescent in vitro. HSCs cultured in this system, however, exhibited aging-associated phenotype with the high level expression of CD41 and P-selectin. I improved the maintenance culture condition by searching for factors inhibiting and promoting CD41 and P-selectin expression in HSCs. Among various signal molecules, TGF- β and retinoic acid receptor signals promote the aging-associated phenotype, while cholesterol inhibited the aging phenotype. Thrombopoietin was inhibitory against CD41 expression at the range of low concentration, but was promoting at the higher range of concentration. Combining these factors, high TPO culture restored lymphopoiesis in old HSCs and resulted in higher reconstitution capacity than that of freshly isolated old HSCs.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：造血幹細胞 静止期維持培養 ステムセルエイジング

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は骨髄内において、静止期に維持されることを特徴としており、生涯に渡る造血能を維持する役割を担っている。造血幹細胞は長寿命であるものの、加齢に伴い造血再構築能および正常な分化能を徐々に失う。何らかの環境因子が造血幹細胞の加齢に影響していることが示唆されるものの、造血幹細胞の未分化性維持の必要最小限の要素は何か、そしてどのような環境因子が造血幹細胞を加齢させ、その機能喪失にかかわっているかは十分理解されておらず、結果として長期にわたる造血幹細胞の体外維持培養法も未確立である。

2. 研究の目的

静止期造血幹細胞は移植後の生着能、未分化性の維持、細胞内の代謝状態などについて、細胞周期に入った造血幹細胞とはあらゆる点で異なるため、造血幹細胞が生涯に渡って維持され、生体内で加齢変化するメカニズムを理解するためには、造血幹細胞がいかに静止期に維持されているかを理解する必要がある。従来の体外培養法では造血幹細胞は活発に細胞分裂をすることになり、生体内の造血環境を模倣しているとは言えなかった。申請者は、高脂質濃度による培養を行うことで、従来よりも低いサイトカイン濃度および酸素濃度で造血幹細胞をほぼ細胞周期を回転させることなく生存させることが可能となり、SCF および TPO の組み合わせで造血幹細胞を静止期に維持する培養法を開発した。現時点で 1 ヶ月間の培養で二次移植可能な造血幹細胞の維持が可能となっている。従来、加齢造血幹細胞の研究は、加齢した個体から造血幹細胞を採取するよりほかなかったが、既知因子のみで構成された培養条件で造血幹細胞を静止期に維持することと、適切な加齢マーカーを用いることで、造血幹細胞の加齢変化をもたらす環境因子を系統的に探索することが可能となる。本研究課題では造血幹細胞の静止期維持培養系と申請者がこれまで見出してきた加齢特異的遺伝子による評価を組み合わせ、造血幹細胞の加齢因子を特定するとともに、培養可能期間をさらに延ばした造血幹細胞の老化フリーの長期培養法の開発を行う。

3. 研究の方法

マウス

C57BL/6J マウス (8-14 週齢、日本 SLC または日本クレアから購入) をすべての実験において使用した。すべてのマウスは、特定の病原体フリー (SPF) 条件下で、国立国際医療研究センターの動物施設において、自由に飲食可能な環境で飼育された。マウスは頸椎脱臼により安楽死させた。動物実験は、国立国際医療研究センター 動物実験委員会によって承認された。雄および雌マウスの両方を実験に使用した。

ヒト骨髄細胞

Lonza より購入した成人ヒト骨髄 CD34+細胞 (1×10^6) を実験に用いた。37 °C で溶解後、購入元の指示に従い洗浄し、抗体染色した。抗体は CD34-FITC、CD90-PE-Cy7、CD45RA-PE、CD38-PerCP-Cy5.5 (いずれも BD Biosciences もしくは BioLegend) を用いた。

試薬

パルミチン酸ナトリウム (東京化成)、オレイン酸ナトリウム (東京化成)、マウス SCF (Peprotech)、ヒト TPO (Peprotech)、コレステロール (東京化成)、水溶性コレステロール (Sigma Aldrich)、LE135 (Cayman chemical)、RepSOX (Selleck)、bovine serum albumin (Sigma Aldrich)、AlbuMAX I (Thermo Fisher Scientific)、IST (Thermo Fisher Scientific)、ISTX (Thermo Fisher Scientific)、LE135 (Cayman Chemical)、RepSOX (Selleck)

細胞調製

マウス骨髄細胞を 2 本の大腿骨および脛骨から単離した。骨髄細胞を、室温で 5 分間、溶解緩衝液 ($0.17\text{M NH}_4\text{Cl}$ 、 1mM EDTA 、 10mM NaHCO_3) で溶解した。細胞を 2 倍量の PBS + 2% FBS で洗浄し、 $40\mu\text{m}$ のナイロンメッシュ (BD Biosciences) を通して濾過後、 4°C で 5 分間 Fc 受容体ブロック ($2\mu\text{L}/\text{マウス}$) の抗 CD16/32 抗体 (BD biosciences) で処理し、続いて抗 c-Kit 磁性ビーズ (Miltenyi) を 1:5 の比で 4°C で 15 分間インキュベートした。c-Kit 陽性細胞を、Possel-s モードで autoMACS Pro (Miltenyi) を用いて単離した。単離した細胞を $340\times g$ で 5 分間遠心分離し、フローサイトメトリー用の抗体で染色した。

細胞培養

DMEM/F12 培地は購入したものをを用いた (Thermo Fisher Scientific)。BSA は、各実験における指示濃度で培地に直接溶解し、0.22 μ m フィルターを用いて濾過した。SCF、TPO、および他のサイトカインまたは試薬は濾過後の培地に添加した。培養条件は、加湿インキュベーター中、37 °C で 1% O₂ + 5% CO₂ (低酸素インキュベーター APM-30DR: アステック) をを用いた。

脂肪酸とコレステロールの再構成

脂肪酸ナトリウム塩 (パルミチン酸塩、オレイン酸塩) またはコレステロールまたはそれらの組み合わせをそれぞれガラスチューブ内で 4-20mg/mL および 4mg/mL の濃度でメタノール (Wako) に溶解した。脂肪酸およびコレステロール溶液は、窒素ガスを用いて空気を吹き付けて完全に乾燥させた。4%BSA を含む培地をガラスチューブに直接添加し、脂肪酸塩またはコレステロールが溶解するまで超音波処理した。培地は、0.22 μ m フィルター (Millipore) をを用いて最終的に濾過した。

フローサイトメトリーおよび細胞ソート

磁気ビーズを用いた c-Kit +細胞選択の後、以下の抗体パネルを用いてマウス造血幹および前駆細胞画分を標識した。C57BL/6J マウスの染色のために、分化抗原マーカー (CD4、CD8a、Gr-1、Mac-1、Ter-119、B220)-PerCP-Cy5.5、c-Kit-APC-Cy7、Sca-Cy7、CD150-BV421、CD48-FITC、Flt3-APC、を用いた。使用したすべての抗体はマウスあたり 0.5 μ L であった。細胞を 0.5-2mL の PBS+2%FBS+0.1%PI に再懸濁し、4%BSA を含有する DMEM / F12 に FACS AriaIIIu によってソートした。

MACS Quant による培養細胞分析

96 ウェルプレートの各ウェルの培地を吸引し、続いて抗体カクテルで 4 \times で 30 分間染色した。分化抗原マーカー (CD4、CD8a、Gr-1、Mac-1、B220、Ter-119)-PerCP-Cy5.5、抗 c-Kit-APC-Cy7、抗 Sca-1-PE-Cy7、抗 CD150-BV421、抗 CD48-FITC、抗 CD41-APC である。使用した全ての抗体は 0.1 μ L/ウェルであったインキュベーション後、1 回洗浄し 200 μ L PBS + 2%FBS + 0.1%PI + 0.25%Flow-Check Fluorespheres (Beckman Coulter) に再懸濁して MACS Quant で解析した。ヒト細胞は CD34-FITC、CD38-PerCP-Cy5.5、CD90-PE-Cy7、CD45RA-PE をを用いて染色した。

統計分析

他に記載がない限り、データは平均 \pm 標準偏差として示す。

4. 研究成果

造血幹細胞エイジングを促進する因子および抑制する因子の同定

アルブミンのロットによって造血幹細胞の培養の成否が異なることが知られており(1)、各種の通常の Corn's fraction V に由来するウシ血清アルブミン (native BSA: nBSA) ロットに加え脂質リッチアルブミンである AlbuMAX の存在下で造血幹細胞の静止期維持培養を行い、加齢マーカーである CD41 および P-selectin を誘導するアルブミンを探索した。その結果、AlbuMAX は強い P-selectin および CD41 の発現誘導作用があり、培養下の加齢因子が AlbuMAX に結合していることが示唆された (図 1)。

続いて、培養下での造血幹細胞の加齢変化を抑制するために、AlbuMAX の P-selectin および CD41 の発現誘導を指標としてそれを抑制する因子を探索した。その結果 TGF β 阻害剤である RepSOX を加えることで CD41 の発現が AlbuMAX の添加時に減少することが示された (図 2)。

AlbuMAX と nBSA の混合比率によって、AlbuMAX の比率の高い群のみ

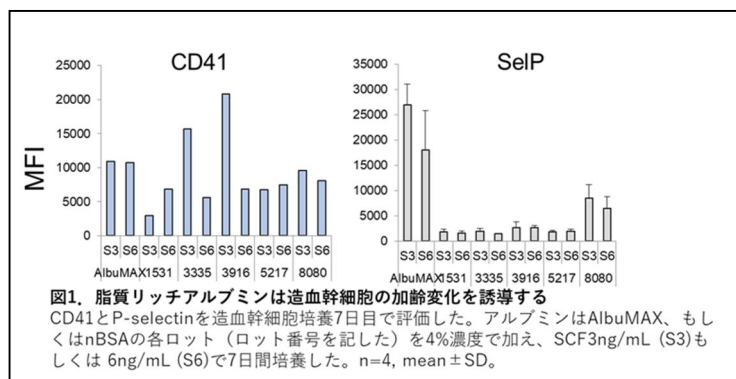


図1. 脂質リッチアルブミンは造血幹細胞の加齢変化を誘導する
CD41とP-selectinを造血幹細胞培養7日目で評価した。アルブミンはAlbuMAX、もしくはnBSAの各ロット (ロット番号を記した) を4%濃度で加え、SCF3ng/mL (S3) もしくは6ng/mL (S6) で7日間培養した。n=4, mean \pm SD.

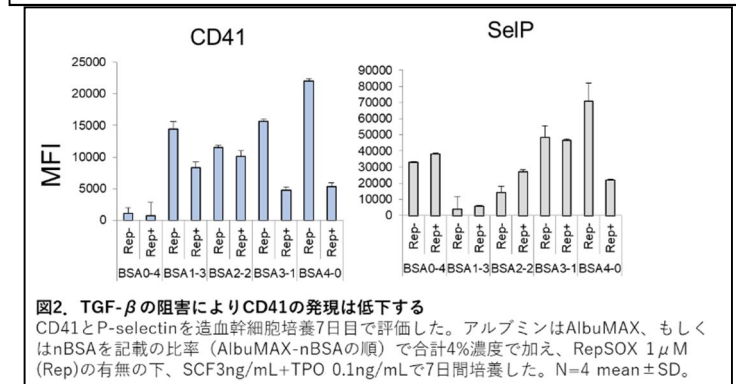


図2. TGF- β の阻害によりCD41の発現は低下する
CD41とP-selectinを造血幹細胞培養7日目で評価した。アルブミンはAlbuMAX、もしくはnBSAを記載の比率 (AlbuMAX-nBSAの順) で合計4%濃度で加え、RepSOX 1 μ M (Rep)の有無の下、SCF3ng/mL+TPO 0.1ng/mLで7日間培養した。N=4 mean \pm SD.

P-selectin および CD41 の発現上昇が認められており、nBSA に加齢抑制的な因子が含まれているのではなく AlbuMAX に加齢促進的な因子が含まれていることも示唆している。

次に P-selectin を抑制する因子の同定を試みた。インスリン混合物 (IST)、レチノイン酸受容体 β 阻害薬 LE135、およびコレステロールの有無で造血幹細胞を静止期維持条件で培養した。コレステロールについてはシクロデキストリンに溶解した水溶性コレステロール 10 μ g/mL もしくは溶解性のためオレイン酸ナトリウム塩と混合した合成コレステロールのいずれかを添加した。その結果 LE135、IST、コレステロールの添加は相加的に P-selectin の発現誘導を抑制した (図 3)。これらからレチノイン酸受容体 の刺激因子が造血幹細胞の加齢変化の一部を担っていると同時にコレステロールは加齢抑制因子として作用することが明らかとなった。

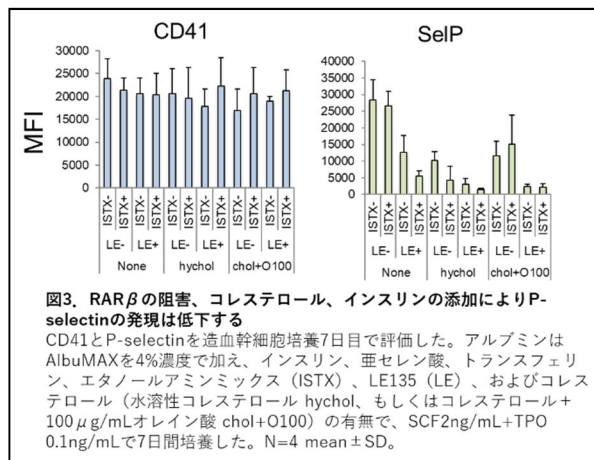


図3. RAR β の阻害、コレステロール、インスリンの添加によりP-selectinの発現は低下する
CD41とP-selectinを造血幹細胞培養7日目で評価した。アルブミンはAlbuMAXを4%濃度で加え、インスリン、亜セレン酸、トランスフェリン、エタノールアミンミックス (ISTX)、LE135 (LE)、およびコレステロール (水溶性コレステロール hychol、もしくはコレステロール+100 μ g/mLオレイン酸 chol+O100)の有無で、SCF2ng/mL+TPO 0.1ng/mLで7日間培養した。N=4 mean \pm SD。

造血幹細胞の長期培養法の改善

上述の通り AlbuMAX に加齢促進作用があることから、造血幹細胞の老化フリー培養には nBSA が適していると考えられた。一方、nBSA も CD41 の発現と P-selectin の発現をある程度誘導することがわかっており、nBSA を使用した場合のより良い条件を検討するためコレステロールと脂肪酸の追加と nBSA の濃度の最適化を検討した。アルブミンはより高濃度で CD41 の発現を抑制し、コレステロールとパルミチン酸、オレイン酸の添加は図 3 で示した結果と同様に P-selectin の発現を抑制した (図 4)。TPO は in vivo において造血幹細胞に必須の維持因子であることから、その濃度の最適化は造血幹細胞の培養下での維持にも重要と考えられた。nBSA、脂肪酸、コレステロールを添加した上で、ISTX の有無と TPO の濃度による P-selectin と CD41 の発現を検討した。TPO は 1ng/mL 以上で CD41 の低下を示し、この濃度はマウスにおける TPO の生理的濃度域と一致する。一方 TPO は 2ng/mL 以上の高濃度域で P-selectin の上昇を示したことから TPO には加齢抑制的な作用と加齢促進的な作用の両面があることが示唆された (図 5)。これらに加えて造血幹細胞を維持する最適な条件として新たに、培養容器の底面形状 (平底細胞接着プレート)、培地の pH (7.6) および至適な脂質の混合比 (パルミチン酸 100 μ g/mL、オレイン酸 100 μ g/mL およびコレステロール 20 μ g/mL) を決定し、その上で改めてサイトカイン条件として SCF 1.5ng/mL、TPO 1.0 ng/mL により表面マーカー上の造血幹細胞を、培養開始時と同程度以上に維持可能となった (図 6)。この結果は (Kobayashi H, Takubo K, STAR Protocols. 2020) に発表した。

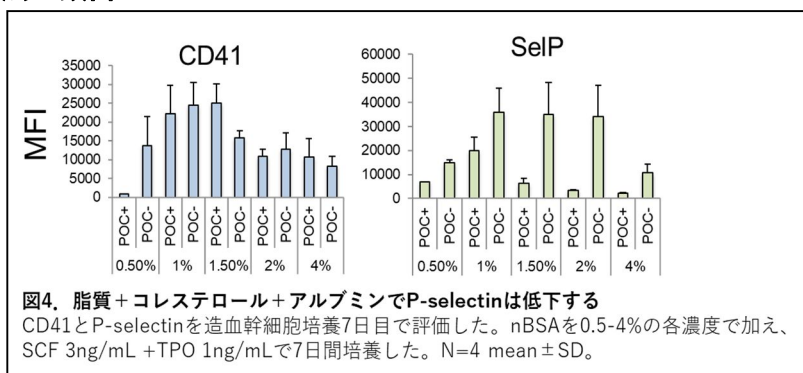


図4. 脂質+コレステロール+アルブミンでP-selectinは低下する
CD41とP-selectinを造血幹細胞培養7日目で評価した。nBSAを0.5-4%の各濃度で加え、SCF 3ng/mL +TPO 1ng/mLで7日間培養した。N=4 mean \pm SD。

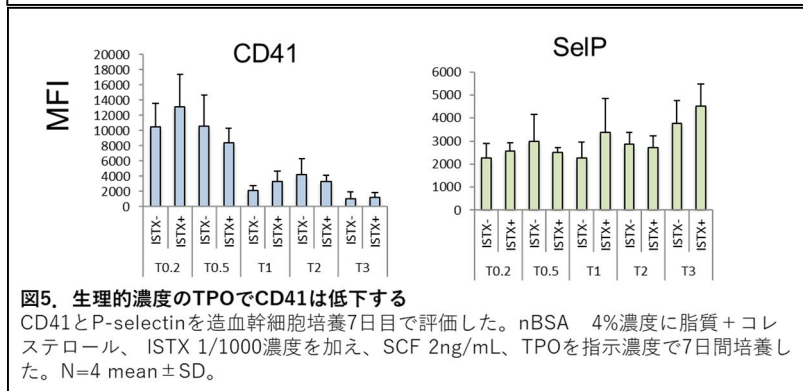


図5. 生理的濃度のTPOでCD41は低下する
CD41とP-selectinを造血幹細胞培養7日目で評価した。nBSA 4%濃度に脂質+コレステロール、ISTX 1/1000濃度を加え、SCF 2ng/mL、TPOを指示濃度で7日間培養した。N=4 mean \pm SD。

ヒト造血幹細胞の培養法の改善

で検討したマウス造血幹細胞の培養法をヒト造血幹細胞に適用することで、ヒト造血幹細胞の表面マーカーもより安定して維持されるようになった(図7)。同培養法については (Journal of Visualized Experiment. 2021) に報告した。

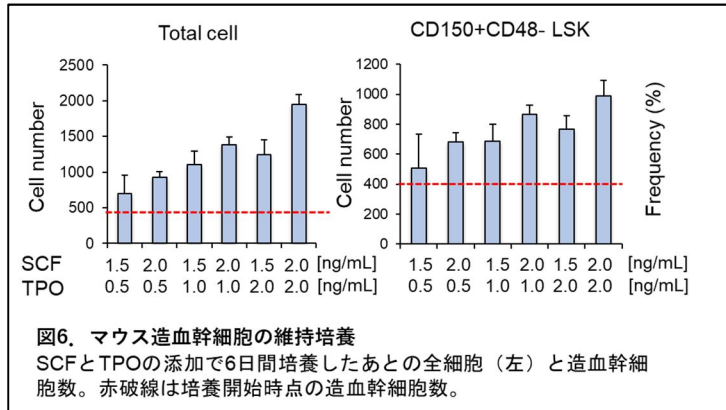


図6. マウス造血幹細胞の維持培養
SCFとTPOの添加で6日間培養したあとの全細胞(左)と造血幹細胞数。赤破線は培養開始時点の造血幹細胞数。

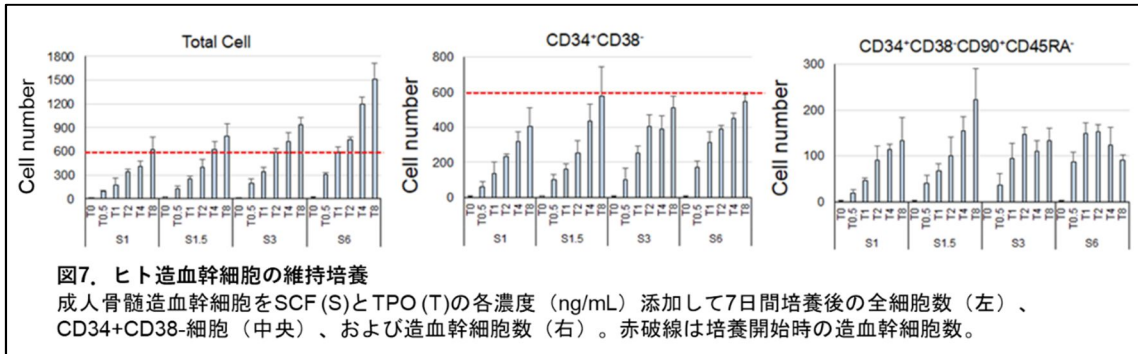


図7. ヒト造血幹細胞の維持培養
成人骨髄造血幹細胞をSCF(S)とTPO(T)の各濃度 (ng/mL) 添加して7日間培養後の全細胞数(左)、CD34+CD38-細胞(中央)、および造血幹細胞数(右)。赤破線は培養開始時の造血幹細胞数。

TPOによる加齢造血幹細胞の若返り

TPOは加齢抑制的な作用を有することから、TPOにより加齢造血幹細胞の低い骨髄再構築能が改善するかどうか造血幹細胞移植により検討した。若齢造血幹細胞と加齢造血幹細胞をそれぞれ高濃度TPOによる培養を11日間行った群と採取直後に移植した群とにわけ、造血幹細胞移植を行った。若齢造血幹細胞はTPO刺激の有無にかかわらず高い末梢血分化細胞への寄与(図8A)と骨髄の造血幹細胞の再構築を認めた(図6B)を認めた一方、加齢造血幹細胞は採取直後の細胞はほとんど生着を認めなかった一方、TPO刺激した群は全血球の末梢血キメリズムの改善を認め、特に採取直後では少なかったB細胞の出現が移植後早期から促された(図8A)。同様に骨髄の造血幹細胞のキメリズムもTPO刺激により加齢造血幹細胞は改善した(図8B)。しかし、移植1、2か月時点でTPO刺激後の加齢造血幹細胞のキメリズムは高かったが3、4か月時点で採取直後の加齢造血幹細胞と差が少なくなっており、加齢形質が不可逆的に若返りしているわけではないと考えられる。TPO以上の結果からTPOには部分的に加齢造血幹細胞を若返らせる作用があることが示された。

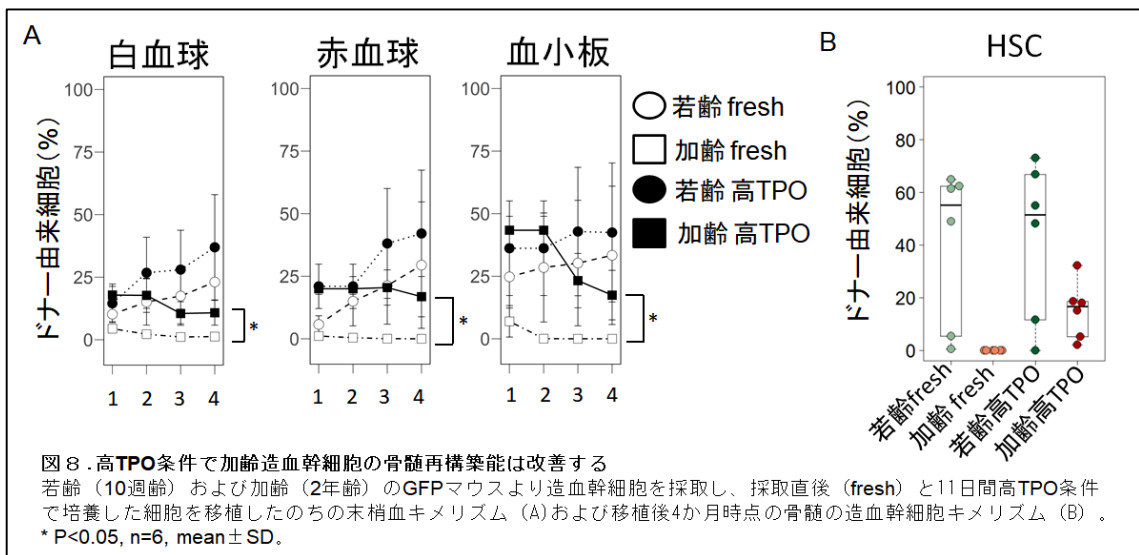


図8. 高TPO条件で加齢造血幹細胞の骨髄再構築能は改善する
若齢(10週齢)および加齢(2年齢)のGFPマウスより造血幹細胞を採取し、採取直後(fresh)と11日間高TPO条件で培養した細胞を移植したのちの末梢血キメリズム(A)および移植後4か月時点の骨髄の造血幹細胞キメリズム(B)。* P<0.05, n=6, mean ± SD.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7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 Watanuki Shintaro, Kobayashi Hiroshi, Sorimachi Yuriko, Yamamoto Masamichi, Okamoto Shinichiro, Takubo Keiyo	4. 巻 514
2. 論文標題 ATP turnover and glucose dependency in hematopoietic stem/progenitor cells are increased by proliferation and differentiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 287 ~ 294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.04.123	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 Kobayashi Hiroshi, Morikawa Takayuki, Okinaga Ayumi, Hamano Fumie, Hashidate-Yoshida Tomomi, Watanuki Shintaro, Hishikawa Daisuke, Shindou Hideo, Arai Fumio, Kabe Yasuaki, Suematsu Makoto, Shimizu Takao, Takubo Keiyo	4. 巻 28
2. 論文標題 Environmental Optimization Enables Maintenance of Quiescent Hematopoietic Stem Cells Ex Vivo	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 145 ~ 158.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.06.008	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 Kobayashi Hiroshi, Takubo Keiyo	4. 巻 1
2. 論文標題 Protocol for the Maintenance of Quiescent Murine Hematopoietic Stem Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100078 ~ 100078
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2020.100078	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 Sera Yasuyuki, Kobayashi Hiroshi (#6), Takubo Keiyo, Honda Hiroaki	4. 巻 137
2. 論文標題 UTX maintains the functional integrity of the murine hematopoietic system by globally regulating aging-associated genes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 908 ~ 922
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2019001044	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 Hiroshi、Takubo Keiyo	4. 巻 NA
2. 論文標題 A Culture Method to Maintain Quiescent Human Hematopoietic Stem Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/61938	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 Sorimachi Yuriko, Karigane Daiki, Ootomo Yukako, Kobayashi Hiroshi, Morikawa Takayuki, Otsu Kinya, Kubota Yoshiaki, Okamoto Shinichiro, Goda Nobuhito, Takubo Keiyo	4. 巻 296
2. 論文標題 p38 plays differential roles in hematopoietic stem cell activity dependent on aging contexts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100563 ~ 100563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100563	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 Murakami Koichi, Kobayashi Hiroshi (#15), Nakajima Hideaki	4. 巻 34
2. 論文標題 OGT Regulates Hematopoietic Stem Cell Maintenance via PINK1-Dependent Mitophagy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108579 ~ 108579
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.108579	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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 小林 央
2. 発表標題 Maintenance of quiescent hematopoietic stem cells ex vivo
3. 学会等名 第17回幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Kobayashi, Keiyo Takubo
2. 発表標題 Environmental Optimization Enables Maintenance of Quiescent Hematopoietic Stem Cells Ex Vivo
3. 学会等名 48th Annual Scientific Meeting, International Society of Experimental Hematology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林 央、田久保 圭誉
2. 発表標題 造血幹細胞の休眠状態を体外で誘導する
3. 学会等名 第92回日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林 央、田久保 圭誉
2. 発表標題 造血幹細胞の静止期維持培養法
3. 学会等名 第81回日本血液学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 綿貫慎太郎
2. 発表標題 統合的代謝解析による加齢造血幹細胞特異的なエネルギー代謝制御とその意義の解明
3. 学会等名 第82回日本血液学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国立国際医療研究センター研究所 生体恒常性プロジェクト
<https://takubolab.com/>

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
---------	---------