

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16096

研究課題名（和文）ヒト脂肪幹細胞における膜動輸送特性解析と細胞医薬・薬物キャリアとしての最適化

研究課題名（英文）Characterization of endocytosis in human adipose-derived stem cells and optimization as cell medicine and drug carrier

研究代表者

孫 紅キン（Sun, Hongxin）

大阪医科薬科大学・薬学部・特任研究員

研究者番号：20773542

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）：本研究ではヒト脂肪幹細胞におけるエンドサイトーシス輸送を解析した。脂肪幹細胞におけるFITC-albumin取り込みは温度/時間依存性を示し、代謝阻害剤、微小管・アクチン重合阻害剤、クラスリン/カベオリン依存性阻害剤、クラスリン重鎖/カベオリン-1ノックダウンによって低下したことから、脂肪幹細胞はアルブミンをクラスリンとカベオリンの両方に依存したエンドサイトーシス経路によって取り込むことが示された。PLGAナノ粒子取り込み効率は添加量の39%に達した。アドリアマイシン誘発腎障害マウスにおける脂肪幹細胞投与の影響を調べた結果、アドリアマイシン投与によって上昇した尿中アルブミンは低下傾向を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪幹細胞は組織修復作用を有するとともに、障害組織に集積する特性を有し、組織保護作用を有する薬物を搭載する薬物キャリアとしての有用性が注目されている。その一方、薬物の構造や物性に依存しない薬物封入方法の開発とその効率の向上は重要な課題である。そこで、本研究では、高分子や微粒子を細胞内に取り込むエンドサイトーシス（膜動輸送）特性を利用することが有用な薬物の封入方法になりうると思え、十分に解明されていない脂肪幹細胞における膜動輸送を明らかにし、細胞医薬と薬物キャリアの両方の役割を兼ね備えた脂肪幹細胞の最適化につなげる基礎的知見を得ることが有用な学術的意義になると考えて本研究を行うこととした。

研究成果の概要（英文）：The main purpose of this research was to investigate the characteristics of endocytosis-mediated uptake in human AdSCs. FITC-albumin, a potent marker of endocytosis, was taken up in time- and temperature-dependent manners. FITC-albumin uptake was inhibited by a metabolic inhibitor, a microtubule polymerization inhibitor, an actin polymerization inhibitor, clathrin-dependent and caveolin-dependent endocytosis inhibitors. Furthermore, the knockdown of the clathrin heavy chain and caveolin-1 reduced FITC-albumin uptake. These findings suggested that AdSCs take up albumin via clathrin- and caveolin-dependent endocytosis. In addition, we examined the uptake of PLGA nanoparticles in AdSCs. The uptake efficiency of PLGA nanoparticles amounted to 39% of PLGA nanoparticles added. Furthermore, we examined the effect of AdSCs on adriamycin-induced kidney injury in mice. The application of AdSCs had a tendency to recover the increased urinary albumin and KIM-1 in adriamycin-treated mice.

研究分野：医療系薬学

キーワード：ヒト脂肪幹細胞 エンドサイトーシス 細胞医薬 薬物キャリア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、骨髄、脂肪組織および胎盤などに由来する間葉系幹細胞は、間葉系に属する細胞への分化能を有することから、血管、骨あるいは心筋などを再構築するための再生医療分野における新規細胞医薬品としての応用が期待されている。また、最近、間葉系幹細胞である骨髄幹細胞や脂肪幹細胞が以下の2つの特徴を有することに注目が集まっている。

1) 免疫抑制作用や抗炎症作用を有する

2) 傷害組織への集積性を有する

上記の2つの特徴を検証するため、腎や肺などの組織障害モデル動物における間葉系幹細胞の効果などが検討され、実験レベルでは間葉系幹細胞が組織障害を明確に軽減させることが報告されている。しかし、それらの研究では比較的多くの幹細胞を投与する必要があるなど、臨床でより有効な細胞医薬品として利用するためには、未だ課題も多く残されている。一方、間葉系幹細胞の中でも脂肪幹細胞は生体に豊富に存在する脂肪組織から比較的簡易に一定数を調製することが可能であるため、脂肪幹細胞の臨床応用は特に注目されている。実際に臨床においてヒト脂肪幹細胞を用いた変形性関節症の治療が本邦でも既に行われている。

こうした背景を踏まえ、今後、炎症性疾患などに対するヒト脂肪幹細胞の臨床応用が進むものと考えられるが、ヒト脂肪幹細胞が有する細胞医薬品としての有用性をより高めるための研究が必要である。その手段の一つとして、脂肪幹細胞に細胞保護作用のある医薬品や一般に安全性が高いとされる抗酸化物質などを搭載することで、より効率的な治療効果を引き出すことがある。上記に示した2つ目の特性である傷害組織への集積性は、脂肪幹細胞自体が薬物を患部選択的に運ぶことが出来る薬物送達のキャリアとしての可能性を保持していることを示唆するものである。したがって、脂肪幹細胞に抗炎症あるいは抗酸化作用を有する薬物を事前に負荷した上で、生体に投与することで、脂肪幹細胞が患部に集積し、それ自身が有する組織保護作用とともに、脂肪幹細胞内に封入された薬物が患部で放出されることで相乗的な薬効が期待される。

2. 研究の目的

本研究で用いる脂肪幹細胞は、再生医療の素材としてだけでなく、その細胞が有する細胞賦活化作用などの多様な生理活性を持つ細胞医薬品としても大いに注目されている。さらに、今回、組織障害部位選択的な特性を利用した薬物キャリアとしての最適化条件が示されれば、脂肪幹細胞の医療において貢献しうる可能性や発展性は飛躍的に向上するものと考えられる。

本研究の目的は、再生医療および細胞医薬品としても、その大きな可能性を秘めている間葉系幹細胞の一つである脂肪幹細胞を用い、これまでに本細胞では十分に解析がなされていないエンドサイトーシス特性を詳細に解析し、その特性を利活用してより最適な薬物キャリア開発に資する点にある。これまでにヒト脂肪幹細胞におけるエンドサイトーシス特性を詳細かつ系統的に解析された研究は知る限り報告されていない。また、そのエンドサイトーシス特性を利用し、制御することで、脂肪幹細胞に搭載する薬物の封入率を高めるとともに、細胞内滞留性を向上させることも期待できると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト脂肪幹細胞(PromoCell社)は、5%FBSおよび抗生物質(1%ストレプトマイシン/ペニシリン)を含むBKM ADSC-2培地を用い、CO₂インキュベーター内(37℃、5%CO₂-95%air)で培養した。細胞の継代は7日ごとにKBM Trypsin AOFを用いて細胞を剥離し100 mm culture dishに播種した。培地交換は2~3日ごとに行った。実験にはpassage #8-11の範囲の細胞を用いた。

(2) 細胞内取り込み解析

取り込み実験には細胞を24-wellプレートに培養したものをを用いた。播種後4日目に血清を含まない培地に交換し、さらに24時間培養した。培地を除去後、細胞をphosphate-buffered saline (PBS)で洗浄した。基質濃度を固定した実験では、FITC-albumin(100 µg/ml)およびGreen Fluorescent PLGA ナノ粒子(FL-PLGA) (100 µg/ml)を含む溶液を添加し、37℃あるいは4℃条件下において30、60および120分間インキュベーションした。基質濃度を変化させる実験では、FITC-albumin(30~500 µg/ml)あるいはFL-PLGA(5~100 µg/ml)を含む溶液を添加した。一定時間インキュベーション後、基質溶液を除去し、氷冷したPBSで洗浄した。細胞をセルスクレーパーでかき集めた後、10,000 rpmで5分間遠心した。上清を除去後、0.1%TritonX-100を含むPBS

を加えて細胞を溶解し、再度 10,000 rpm で 5 分間遠心した。その上清の蛍光強度をマイクロプレートリーダー Enspire 2300 で測定した。また、その上清のタンパク濃度を Lowry 法により定量した。

各種阻害剤の 50% 阻害濃度 (IC_{50}) 値は、下記の Hill 式により算出した。

$$A = 100 / [1 + ([I]/IC_{50})^n]$$

ここで、 $[I]$ は阻害剤濃度、 A は阻害剤非存在下における取り込みに対する阻害剤存在下の取り込みの割合 (%)、 n は Hill 係数を示す。

また、速度論パラメータは以下の Michaelis-Menten 式により算出した。

$$V = V_{max} [\text{FITC-albumin}] / (K_m + [\text{FITC-albumin}]) + K_d [\text{FITC-albumin}]$$

ここで、 V は取り込み速度、 $[\text{FITC-albumin}]$ は FITC-albumin の初濃度、 V_{max} は飽和過程における最大輸送速度、 K_m はミカエリス定数、 K_d は非飽和過程における拡散係数を示す。

上記の式に対する曲線の当てはめ計算は、KaleidaGraph program を用いた。

(3) 細胞処理

FITC-albumin 取り込みに及ぼす阻害剤の影響を調べるため、ヒト脂肪幹細胞は 37 °C において阻害剤非存在下あるいは存在下においてインキュベーションした。対照細胞には、阻害剤の溶解に供した dimethyl sulfoxide (DMSO) の同濃度条件下で処理した。阻害剤濃度は、以下のとおりとした。2,4-dinitrophenol (1 mM)、colchicine (50 μM with 0.5% DMSO)、cytochalasin D (5 μM with 0.5% DMSO)、chloroquine (100 μM)、bafilomycin A1 (1.6 μM with 0.5% DMSO)、chlorpromazine (50 μM)、phenylarsine oxide (10 μM with 0.5% DMSO)、Pitstop2 (30 μM with 0.5% DMSO)、nystatin (50 $\mu\text{g/ml}$ in 0.5% DMSO)、methyl- β -cyclodextrin (10 mM)、dynasore (80 μM with 0.5% DMSO)。

(4) 共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析

細胞は 35-mm glass-bottom ディッシュを用いた。細胞は FITC-albumin (300 $\mu\text{g/mL}$) を含む溶液を添加し、37 °C あるいは 4 °C 条件下において 120 分間インキュベーションした。また、その最後の 60 分間は Hoechst 33342 (10 μM) を加えてインキュベーションした。氷冷した PBS で 3 回洗浄し、蛍光を共焦点レーザー顕微鏡システム LSM700 により観察した。クラスリン重鎖およびカベオリン-1 の発現解析については、細胞は室温下において 4% パラホルムアルデヒドで 20 分間固定化し、続けて 0.25% Triton X-100 を 15 分間インキュベーションすることで透過処理を行った。PBS で洗浄後、細胞は 3% ヤギ血清で 1 時間軽度振盪しながらブロッキングした。その後、mouse monoclonal anti-clathrin heavy chain antibody (BD 610499) (1:1,000) あるいは rabbit polyclonal anti-caveolin-1 antibody (ab18199) (1:500) を添加し、4 条件下オーバーナイトでインキュベーションした。次に、細胞は Alexa Fluor® 488-labeled goat anti-mouse polyclonal antibody (1:1,000) あるいは Alexa Fluor® 546-labeled goat anti-rabbit polyclonal antibody (1:1,000) を添加し、室温下で 1 時間インキュベーションした。PBS で洗浄後、Hoechst 33342 (10 μM) を添加し、1 時間室温下で処理することで核染色を行った。蛍光は、共焦点レーザー顕微鏡システム LSM700 により可視化された。

(5) ウエスタンブロッティング

クラスリン重鎖およびカベオリン-1 のイムノプロット解析において、細胞溶解液を播種後 7 日に調整した。すなわち、培地を除去後、細胞を洗浄し、セルスクレーパーでかき集められた。細胞懸濁液は 4 条件において 3,000 rpm で 5 分間遠心した。上清を除去後、細胞を溶解液 [1% (v/v) Triton X-100, 0.1% (w/v) SDS, and 1% (w/v) deoxycholic acid in PBS] で溶解した。細胞溶解液をボルテックスし、30 分間氷上でインキュベーションした。その上清は 10,000 rpm で 5 分間遠心し、イムノブロッティングのサンプルとして供した。サンプルは 10% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE によって分離し、ニトロセルロース膜に転写した。その膜を 3% ウシ血清アルブミンと 0.1% Tween-20 を含む PBS (3% BSA-PBST) を用いて室温下で 1 時間ブロッキングした。その後、mouse monoclonal anti-clathrin heavy chain antibody (610499; BD Biosciences) (1:1,000)、rabbit polyclonal anti-caveolin-1 antibody (ab18199; Abcam) (1:500)、mouse monoclonal anti-actin antibody (A2228; Sigma) (1:5,000) を添加し、室温 1 時間あるいは 4 条件オーバーナイトでインキュベーションした。膜を PBST により 5 分間 3 回行うことで洗浄し、horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit あるいは mouse IgG antibody を添加し、室温 1 時間でインキュベーションした。PBST で 3 回洗浄後、免疫反応活性を有するバンドを Amersham ECL chemiluminescent reagent により化学発光させ、それを Amersham Imager 600 により検出した。得られたバンドは ImageJ software により定量解析を行った。

(6) siRNA ノックダウン解析

細胞は 6-well プレートに播種し、60-80% コンフルエントに達したものをを用いた。siRNA 溶液は、Opti-MEM に各 siRNA (clathrin heavy chain siRNA, 100 nM; caveolin-1 siRNA, 50 nM) と Lipofectamine 2000 を加え、各 well に加えた。プレートを緩やかに振盪し、CO₂ インキュベ

ータ内で4時間インキュベーションした。その後、無血清のKBM ADSC培地に置換し、48時間後取り込み実験とウエスタンブロッティングに使用した。

(7) アドリアマイシン誘発アルブミン発症マウスを用いた解析

実験動物としてBALB/c雄性マウス(6週齢)を使用し、アドリアマシ(ADR)投与前日をDay0、ADR投与日をDay1、ADR投与7日後、14日後、21日後をそれぞれDay7、Day14、Day21とした。Day0、Day7、Day14、Day21の24時間尿サンプルを代謝ケージを用いて回収した。最終回の尿サンプル回収後、心採血と腎摘出を行った。心採血により得られた血液サンプルは10,000 rpmで10分間遠心分離後、上清を回収した。なお、実験動物は、明期:暗期=12:12の明暗サイクル、自由飲水・自由摂食下で実験前に1週間馴化させ、同条件で飼育した。ADR投与に際して、PBSを用いて2.0 mg/mLの濃度のADR溶液を調製し、10 mg/kgの用量で尾静脈投与を行った。ヒト脂肪幹細胞の投与は、ADR投与後7日において尾静脈よりPBS懸濁液として投与した(1x10⁵ cells/mL, 100 μ L/mice)。対照として、等容量のPBSを投与した。尿・血液サンプルにおいて、クレアチニンはクレアチニン測定キットを用いてJaffe法により測定し、アルブミンは免疫学的測定法(ELISA法)により定量した。Kidney injury molecule-1 (KIM-1)の定量は市販のキットを用いて行った。

(8) 統計解析

統計処理は、2群間の平均値の比較にはStudent t-test (有意水準5%)を用い、3群以上の平均値の比較にはTukey's HSD test (有意水準5%)を用いて行った。

4. 研究成果

(1) ヒト脂肪幹細胞におけるFITC-albumin取り込みにおける温度の影響

最初にヒト脂肪幹細胞におけるFITC-albumin取り込みの温度依存性について検討した。その結果、37°CにおけるFITC-albumin取り込みは、経時的に増加したが、4°Cにおいてはその上昇の程度は37°Cに比べて低いものであった。検討したすべてのインキュベーション時間において、37°C条件のFITC-albumin取り込みは4°Cのそれに比べて有意に高かった。

次に、37°Cと4°C条件下におけるFITC-albuminの細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。FITC-albuminを含む溶液でヒト脂肪幹細胞を37°C、60分間インキュベーションした際には、蛍光が細胞内に観察されるとともに、粒子状に集積している様子が観察された。一方、4°C条件下においては、細胞内にほとんど蛍光は観察されなかった。

(2) FITC-albumin取り込みの濃度依存性

ヒト脂肪幹細胞におけるFITC-albumin取り込みにレセプター分子の関与を調べるため、FITC-albumin取り込みに及ぼす非標識ヒト血清アルブミンの影響を調べた。非標識ヒトアルブミンはヒト脂肪幹細胞におけるFITC-albumin取り込みを濃度依存的に阻害した。ヒト血清アルブミンによるFITC-albumin取り込みに対するIC₅₀値は、3.39 mg/mlと算出された。

次に、ヒト脂肪幹細胞におけるFITC-albumin取り込みの基質濃度依存性について検討した。その結果、FITC-albumin取り込み速度は非線形性を示し、FITC-albumin取り込みに飽和過程が関与することが示唆された。速度論的パラメータを算出したところ、K_m、V_{max}およびK_d値はそれぞれ85.1 μ g/mL、24.8 μ g/mg protein/2 hおよび0.0112 mL/mg protein/2 hと見積もられた。

(3) FITC-albumin取り込みに及ぼす種々のエンドサイトーシス阻害剤の影響

ヒト脂肪幹細胞におけるFITC-albumin内在化における分子機構を明らかにするため、FITC-albumin取り込み及ぼす種々のエンドサイトーシス阻害剤の影響を調べた。代謝阻害剤2,4-dinitrophenolは有意にFITC-albumin取り込みを阻害したことから、FITC-albuminの内在化は代謝エネルギーに依存的な過程であることが示唆された。微小管重合阻害剤colchicineやアクチン重合阻害剤cytochalasin Dはいずれも有意にFITC-albumin取り込みを阻害した。2種類のエンドソーム酸性化阻害剤であるbafilomycin A₁とchloroquineによってもFITC-albumin取り込みは低下した。次に、クラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤(chlorpromazine, phenylarsine oxide, and Pitstop2)およびカベオリン依存性エンドサイトーシス阻害剤(nystatin and methyl- β -cyclodextrin)に及ぼすFITC-albumin取り込みに及ぼす影響について検討した結果、これらの阻害剤は有意にFITC-albumin取り込みを低下させた。さらに、クラスリン被覆ピット形成を阻害するとされる高浸透圧条件下の影響を調べた。高スクロース濃度(400 mM)を含む溶液でFITC-albumin取り込みを行った結果、通常浸透圧条件下に比べて、その取り込みは有意に低下した。さらに、エンドサイトーシス過程における細胞膜のfission(切断)に必須であるダイナミンを阻害するdynasoreによってもFITC-albumin取り込みは低下し

た。

(4) ヒト脂肪幹細胞におけるクラスリンおよびカベオリンの発現と細胞内局在

ヒト脂肪幹細胞における FITC-albumin の内在化におけるクラスリンおよびカベオリンの関与をさらに明確にするため、クラスリン重鎖とカベオリン-1 のタンパク発現についてウエスタンブロット解析により検討した。その結果、ヒト脂肪幹細胞から得られた細胞溶解液を SDS-PAGE で分離後に転写した膜において、クラスリン重鎖(約 180 kDa)およびカベオリン-1(約 21 kDa) で予想される分子サイズの位置にバンドが観察された。

次に、クラスリン重鎖およびカベオリン-1 の細胞内局在について蛍光免疫共焦点顕微鏡法によって解析した。クラスリン重鎖は細胞質に粒子状に見いだされた、一方、カベオリン-1 は細胞膜に強い発現が認められた。さらに、カベオリン-1 は核にも観察された。

(5) FITC-albumin 取り込みに及ぼすクラスリン重鎖およびカベオリン-1 ノックダウンの影響

次に、RNA 干渉依存性のノックダウン法により、ヒト脂肪幹細胞における FITC-albumin 取り込みに及ぼすクラスリンおよびカベオリン-1 の役割をより明確にする検討を行った。まず、それぞれの標的 mRNA に対する siRNA のトランスフェクションはクラスリン重鎖およびカベオリン-1 のタンパク発現を低下させることを示した。

そこで、ノックダウンした細胞における FITC-albumin 取り込み解析を行ったところ、クラスリン重鎖およびカベオリン-1 のいずれのノックダウンによっても、FITC-albumin 取り込みは有意に低下することを認めた。

以上より、ヒト脂肪幹細胞における FITC-albumin 取り込みには、何らかの受容体を介したエンドサイトーシス過程が関与しており、そのエンドサイトーシス過程にはクラスリン及びカベオリンが重要な役割を果たしていることが示された。

(6) ヒト脂肪幹細胞における PLGA ナノ粒子の取り込み特性

ヒト脂肪幹細胞における FL-PLGA の取り込みは、明確な温度依存性を示した。また、基質濃度が 5~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ において基質濃度の上昇とともに FL-PLGA 取り込みは増加した。また、取り込み効率は非常に高く、基質として添加した FL-PLGA の約 39%が細胞内に取り込まれることが示された。さらに、代謝阻害剤 2,4-dinitrophenol や微小管阻害剤 colchicine 処理は、FL-PLGA のいずれの取り込みも有意に阻害した。一方、クラスリン介在性エンドサイトーシス阻害剤 phenylarsine oxide 処理では、FITC-albumin 取り込みは明確に阻害されたが、FL-PLGA 取り込みは有意な変化は見られなかった。以上、ヒト脂肪幹細胞において、FL-PLGA は高効率で取り込まれ、その取り込みに少なくとも一部エンドサイトーシスの関与が示唆された。

(7) アドリアマシンの誘発アルブミン尿発症マウスにおけるヒト脂肪幹細胞投与の影響

BALB/c 雄性マウス(6 週齢)にアドリアマシ(ADR)投与した結果、対照群に比べて、ADR 投与群ではクレアチニンクリアランスの明確な変化は観察されなかったが、尿中アルブミンは有意に上昇した。また、尿中 KIM-1 量も増加する傾向が認められた。したがって、ADR 投与によってアルブミン尿発症モデルマウスが作製できていることを確認した。次に、ADR 投与後 7 日目においてヒト脂肪幹細胞の懸濁液を尾静脈投与した結果、ADR 投与によって認められた尿中アルブミンや KIM-1 排泄量の上昇はいずれも、ADR 非投与群同等レベルにまで回復する傾向が認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hongxin Sun, Yumiko Urakami-Takebayashi, Hideyuki Motohashi, Junya Nagai	4. 巻 -
2. 論文標題 Internalization of FITC-albumin in human adipose-derived stem cells: Involvement of clathrin and caveolin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmazie	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） 10.1691/ph.2022.2340	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hongxin Sun; Yumiko Takebayashi; Hideyuki Motohashi; Junya Nagai
2. 発表標題 Highly efficient uptake of poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles in human adipose-derived stem cells
3. 学会等名 日本薬剤学会 第35年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 孫 紅昕、水田朱梨、坪井崇洋、竹林裕美子、本橋秀之、永井純也
2. 発表標題 ヒト脂肪幹細胞におけるアルブミンとPLGAナノ粒子取り込み特性の比較解析
3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hongxin Sun; Yumiko Takebayashi; Hideyuki Motohashi; Junya Nagai
2. 発表標題 Uptake characterization of poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles in human adipose-derived stem cells
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<https://www.ompu.ac.jp/class/pharm/pharmaceutical.html>

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