

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591045

研究課題名（和文）多発性骨髄腫における *IG* 転座, *PVT1*, *DCC* の分子遺伝学的解析と臨床応用研究課題名（英文）Molecular studies of *IG* translocation and *PVT1* and *DCC* gene rearrangements in multiple myeloma

研究代表者

谷脇 雅史 (TANIWAKI MASAFUMI)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：80163640

研究成果の概要（和文）：

多発性骨髄腫（MM）の病型診断，予後推定，治療薬開発に寄与する遺伝子異常を同定することを目的として今回の研究を行った．蛍光 *in situ* 分子雑種（FISH）法，多色蛍光染色体解析（SKY）法，高密度 SNP アレイ解析，PCR を用いて MM 症例と MM 細胞株を解析した．MM における *PVT1* 再構成の頻度は，臨床例で 7/54 例（13.0%），細胞株で 5/11 株（45.5%）であった．MM 細胞株から新規のキメラ遺伝子として，*PVT1* exon 1-*NBEA* exon 3 と *PVT1* exon 1-*WWOX* exon 9 を同定し，これらの異常 *NBEA* と異常 *WWOX* は N 末端を欠いていると考えられた．MM における 8q24 染色体異常では従来から *MYC* 遺伝子の関与が議論されていたが，今回の研究から，*PVT1* が高頻度に再構成し，*PVT1* との融合により相手遺伝子の発現が変化することによって，MM の進展に関与することが示唆された．一方，18q21.1-q21.3 領域の解析から，*DCC* のエクソン 2 とイントロン 1 の 5' 側の一部が融合し，エクソン 1 のみを欠く異常 mRNA を検出した．免疫沈降法による解析では，*DCC* 蛋白は検出できなかった．従って，異常 *DCC* mRNA が正常 *DCC* の発現を抑制する long non-coding RNA として機能している可能性が考えられた．

研究成果の概要（英文）：

To elucidate pathophysiology of multiple myeloma (MM), we performed molecular dissection of the breakpoints at chromosomal 8q24 and 18q21 rearrangements using FISH, SKY, oligonucleotide array, and RT-PCR procedures. *PVT1* rearrangements were detected in 7 (13.0%) of 54 MM patients and 5 (45.5%) of 11 MM cell lines. Two novel chimeric genes were identified, *PVT1-NBEA* and *PVT1-WWOX*. The *PVT1-NBEA* chimera in which *PVT1* exon 1 was fused to *NBEA* exon 2 and the *PVT1-WWOX* in which *PVT1* exon 1 was fused to *WWOX* exon 9 were associated with the expression of abnormal *NBEA* and *WWOX* lacking their N-terminus, respectively. These findings suggest that *PVT1* rearrangements may represent a novel molecular paradigm underlying the pathology of 8q24 rearrangement-positive multiple myeloma. On the other hand, our studies focusing on 18q21 identified abnormal *DCC* transcripts in which *DCC* exon 2 was fused to part of *DCC* intron 1 hence lacking exon 1 in 15 cell lines using bubble PCR for cDNA. Putative abnormal *DCC* protein lacks a part of N-terminus, suggesting that structural abnormalities of *DCC* play some roles in the development and progression of MM.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000

年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：多発性骨髄腫，SKY，FISH，ゲノムアレイ，遺伝子再構成

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫 (MM) では、約 60% の症例で免疫グロブリン H 鎖遺伝子 (*IGH*) の染色体再構成により、B 細胞の分化や増殖、細胞死に関する遺伝子が脱制御される。*IGH* 転座の相手遺伝子には、*FGFR3/MMSET*、*MUM1(IRF4)*、*MAF*、*CCND1* などがあり、予後推定や分子標的薬の開発に寄与することが期待される。

一方、治療抵抗性の指標とされる 8q24 異常の解析は遅れており、*MYC* の過剰発現に関連するとされているが、*MYC* の約 54Kb 下流に存在する非コード遺伝子である *PVT1* 再構成が MM の約 20% に認められる。*PVT1* 内にはマイクロ RNA をコードする領域が同定されており、研究が新たに展開している。このような観点から、臨床応用を目標として、MM の腫瘍化と進展に関与する遺伝子の単離同定への応用に取り組んできた (Blood 1997, Cancer Genet Cytogenet, 2000, Immunity 2001, Jap J Cancer Res 2001, Leukemia 2003)。

2. 研究の目的

MM の腫瘍化と進展には多数の遺伝子異常が関与しており、最近では、DNA アレイ解析により新知見が得られている (Cancer Cell 9:313, 2006)。我々は、高密度 SNP アレイ解析に多色蛍光染色体解析 (Spectral Karyotyping, SKY) を併用し、染色体構造異常の DNA 切断点を詳細に解析しており、18q21 に存在する *DCC* の異常発現を報告した (第 68 回日本癌学会)。*DCC* はネトリン 1 受容体遺伝子である。

一方、MM の治療成績は、ボルテゾミブやレナリドマイドが開発されてから着実に向上しているが、特有の毒性がありときに重症化する。従って、分子標的薬の選択するための指標や、新規治療薬の開発に寄与する分子異常の同定は急務である。

本研究では、MM の腫瘍化と進展に関与する染色体遺伝子異常を解析し、層別化治療に寄与する分子遺伝学的な指標を同定することを目的として、以下の点を明らかにする。(1) MM に特異的な *IGH* 転座の相手遺伝子の単離同定

SKY, FISH, 高密度オリゴヌクレオチド

アレイを用いたゲノム解析により *IGH* 転座の相手遺伝子や増幅遺伝子を単離し、腫瘍化と進展への関与を検討する。*IGH* 転座の再構成遺伝子はしばしば増幅するので、アレイ解析で DNA 切断点の同定が容易である。

(2) 8q24 領域の *MYC* 遺伝子と *PVT1* 遺伝子の再構成と転座相手の同定

高密度リボヌクレオチドアレイ, SKY, FISH 法を用いて解析し、*PVT1* mRNA とマイクロ RNA 発現をノザンブロットィングや RT-PCR で解析する。mRNA の構造異常は、cDNA bubble PCR で得た増幅産物を用いて解析する。

(3) 18q21 に存在する *DCC* 遺伝子の mRNA 発現と構造異常の同定

私共のこれまでの解析では、*DCC* は B 細胞リンパ腫では殆ど発現していないが、MM では発現しているが、mRNA の構造異常を認めている。今回の研究では、細胞株と臨床検体を用いて、mRNA の構造異常を cDNA bubble PCR で得た増幅産物の塩基配列解析し、詳細に検討する。タンパク発現についてウエスタンブロットィングと免疫組織化学で検討する。

(4) 臨床像や予後あるいは治療反応性との関連性の検討

(1)~(3) で得られた成績を多数の臨床検体で評価確認し、臨床像や予後を検討し、診断や治療選択の指標を確立する。

3. 研究の方法

(1) *IGH* 転座のゲノム解析と相手遺伝子の単離同定

IGH 遺伝子の FISH 解析で同定された転座相手に局在する遺伝子を、SKY 法とオリゴヌクレオチドアレイ解析を組み合わせ、検索し同定する。マイクロ RNA が検出された場合には、発現を各臓器と血液腫瘍細胞株や臨床検体で発現を検討し、腫瘍化への関与を検討する。

(2) *PVT1* 遺伝子 (8q24) の再構成と mRNA 発現解析

8q24 の再構成を MYC Break Apart probe (Vysis) で検出し、8q24 再構成陽性例では、適切な BAC をプローブにした FISH 法で *PVT1* の再構成と転座相手を検討する。*PVT1* 転座を見出した場合には、SKY 法とオリゴ

ヌクレオチドアレイ解析を組み合わせて相手染色体異常の DNA 切断点を同定する。Coding 領域に切断点がある場合には、cDNA bubble PCR で得られた遺伝子産物をサブクローニング、塩基配列を検討して、キメラを形成する相手遺伝子を同定する。

(3) DCC 遺伝子 (18q21) の mRNA 構造異常の解析

DCC 遺伝子の異常発現を RT-PCR と cDNA bubble PCR で検討する。既報のプライマーを用いた RT-PCR による DCC の発現解析では、腫瘍では一般に発現していないことが多いが、MM では発現が認められる。

4. 研究成果

(1) IG 転座相手

今回の研究では、MM における IG 転座の新規の相手遺伝子は検出されなかった。

(2) PVT1 遺伝子の再構成と転座相手の同定

MM 54 例と MM 樹立細胞株 11 株を対象に FISH 法を用いて PVT1 再構成を検索した。PVT1 をはさむ 2 種類の BAC クローンと、PVT1 をカバーする 2 種類の BAC クローンをプローブとして 2 色で FISH 法を行い、各々、7 例 (13.0%) と 5 細胞株 (45.5%) に PVT1 再構成を認めた。PVT1 再構成を認めた MM 細胞株のうち、t(8;13)(q24;q13)を検出した細胞株と der(16)t(16;22)ins(16;8)(q23;q24)を検出した細胞株から新規の PVT1 キメラ遺伝子を単離同定した。t(8;13)(q24;q13)を示した細胞株のゲノムアレイ解析から切断点が PVT1 内の第 1 エキソン近傍にあることを推定した。同領域を中心に cDNA bubble PCR で解析し、得られた遺伝子産物をサブクローニング、塩基配列を検討、キメラを形成する相手遺伝子として *Neurobeachin* (NBEA) を同定した。NBEA は 13q13 に存在し MM で高頻度に欠失することが報告されている。PVT1-NBEA キメラ遺伝子は、PVT1 のエキソン 1 と NBEA のエキソン 3 で融合しており、NBEA のエキソン 2 のスタートコドンが欠失しエキソン 3 の ATG がスタートコドンとなることが予想される。RT-PCR の結果、N 末端を欠くと考えられる異常な NBEA の高発現を認めた。一方、der(16)t(16;22)ins(16;8)(q23;q24)を示した MM 細胞株では、PVT1 再構成の相手遺伝子として WW domain-containing oxidoreductase (WWOX) を同定した。RT-PCR を行い、PVT1 exon 1 -WWOX exon 9 の融合を確認した。キメラ遺伝子を形成した異常 WWOX は高発現していた。従って、MM における 8q24 染色体異常では PVT1 が高頻度に再構成し、PVT1 との融合により癌関連遺伝子の発現が変化することで MM の進展に関与していると考えられた。

(3) DCC 遺伝子の mRNA 発現と構造異常の同定

MM 細胞株と B 細胞リンパ腫(B-NHL)細胞株に共通する 18q21.1-q21.3 の gain を同定し、その領域に存在しがんに関連する遺伝子を RT-PCR で解析した。B-NHL 細胞株では DCC 発現が消失するか著明に減弱していたが、MM 細胞株では殆どに発現が認められた。詳細な検討の結果、MM 細胞株 3 株でエクソン 1 のみを欠く転写産物の存在が示唆された。塩基配列解析から、DCC のエクソン 2 とイントロン 1 の 5' 側の一部の融合が明らかになり、エクソン 2 との融合は全て同じ箇所で行われていた。"Exon extended"といわれる現象と考えられる。エクソン 1 の消失により開始コドンが消失することによって、N 末側の一部が欠失するかあるいは変異した異常 DCC 蛋白が発現していると考え、免疫沈降法による解析を行った。しかし、C 末(細胞内ドメイン)側の抗体と N 末(細胞外ドメイン)側の抗体の何れを用いても蛋白は検出できなかった。従って、異常 DCC mRNA が正常 DCC の発現を抑制する long ncRNA として機能している可能性が考えられた。

(4) 臨床像や予後との関連性

8q24 異常と PVT1 再構成を認めた症例の予後を検討したところ、8q24 異常が予後不良に関与していたが、PVT1 再構成と予後に間に相関は認められなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 17 件)

- ① Matsumoto Y, Horiike S, Ohshiro M, Yamamoto M, Sasaki N, Tsutsumi Y, Kobayashi T, Shimizu D, Uchiyama H, Kuroda J, Nomura K, Shimazaki C, Taniwaki M. Expression of master regulators of helper T-cell differentiation in peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified, by immunohistochemical analysis. *Am J Clin Pathol.* 133(2):281-290, 2010. 査読あり.
- ② Uchiyama H, Sowa Y, Wakada M, Yogosawa M, Nakanishi R, Horinaka M, Shimazaki C, Taniwaki M, Sakai T. Cyclin-dependent kinase inhibitor SU9516 enhances sensitivity to methotrexate in human T-cell leukemia Jurkat cells. *Cancer Sci.* 101 : 728-734, 2010. 査読あり.
- ③ Kuroda J, Yamamoto M, Nagoshi H, Kobayashi T, Sasaki N, Shimura Y, Horiike S, Kimura S, Yamauchi A, Hirashima M, Taniwaki M. Targeting activating transcription factor 3 by Galectin-9 induces apoptosis and overcomes various types of treatment resistance in chronic myelogenous

- leukemia. *Mol Cancer Res.* 8 : 994-1001, 2010. 査読あり.
- ④ Kobayashi T, Kuroda J, Ashihara E, Oomizu S, Terui Y, Taniyama A, Adachi S, Takagi T, Yamamoto M, Sasaki N, Horiike S, Hatake K, Yamauchi A, Hirashima M, Taniwaki M. Galectin-9 exhibits anti-myeloma activity through JNK and p38 MAP kinase pathways. *Leukemia.* 24 : 843-850, 2010. 査読あり.
- ⑤ Asano N, Kinoshita T, Tamaru J, Ohshima K, Yoshino T, Niitsu N, Tsukamoto N, Hirabayashi K, Izutsu K, Taniwaki M, Morishima Y, Nakamura S. Cytotoxic molecule-positive classical Hodgkin's lymphoma: a clinicopathological comparison with cytotoxic molecule-positive peripheral T-cell lymphoma of not otherwise specified type. *Haematologica.* 11:1636-1643,2011. 査読あり.
- ⑥ Enomoto Y, Kitaura J, Hatakeyama K, Watanuki J, Akasaka T, Kato N, Shimanuki M, Nishimura K, Takahashi M, Taniwaki M, Haferlach C, Siebert R, Dyer MJS, Asou N, Aburatani H, Nakakuma H, Kitamura T, Sonoki T. Eμ/miR-125b transgenic mice develop lethal B-cell malignancies. *Leukemia.* 25:1849-1856, 2011. 査読あり.
- ⑦ Kobayashi S, Taki T, Chinen Y, Tsutsumi Y, Ohshiro M, Kobayashi T, Matsumoto Y, Kuroda J, Horiike S, Nishida K, Taniwaki M. Identification of IGHCδ-BACH2 fusion transcripts resulting from cryptic chromosomal rearrangements of 14q32 with 6q15 in aggressive B-cell lymphoma/leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* 50:207-216, 2011. 査読あり.
- ⑧ Sasaki N, Kuroda J, Nagoshi H, Yamamoto M, Kobayashi S, Tsutsumi Y, Kobayashi T, Shimura Y, Matsumoto Y, Taki T, Nishida K, Horiike S, Akao Y, Taniwaki M. Bcl-2 is a better therapeutic target than c-Myc, but attacking both could be a more effective treatment strategy for B-cell lymphoma with concurrent Bcl-2 and c-Myc overexpression. *Exp Hematol.* 39(8):817-828, 2011. 査読あり.
- ⑨ Yamamoto-Sugitani M, Kuroda J, Ashihara E, Nagoshi H, Kobayashi T, Matsumoto Y, Sasaki N, Shimura Y, Kiyota M, Nakayama R, Akaji K, Taki T, Uoshima N, Kobayashi Y, Horiike S, Maekawa T, Taniwaki M. Galectin-3 (Gal-3) induced by leukemia microenvironment promotes drug resistance and bone marrow lodgment in chronic myelogenous leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(42):17468-17473,2011. 査読あり.
- ⑩ Watanabe T, Tobinai K, Shibata T, Tsukasaki K, Morishima Y, Maseki N, Kinoshita T, Suzuki T, Yamaguchi M, Ando K, Ogura M, Taniwaki M, Uike N, Takeuchi K, Nawano S, Terauchi T, Hotta T. Phase II/III study of R-CHOP-21 versus R-CHOP-14 for untreated indolent B-cell non-Hodgkin's lymphoma: JCOG 0203 trial. *J Clin Oncol.* 29:3990-3998, 2011. 査読あり.
- ⑪ Ohshiro M, Kuroda J, Kobayashi Y, Akaogi T, Kawata E, Uoshima N, Kamitsuji Y, Kaneko H, Shimura K, Shimazaki C, Murakami S, Hatsuse M, Okano A, Kobayashi T, Uchiyama H, Matsumoto Y, Horiike S, Taniwaki M. ADAMTS-13 activity can predict the outcome of disseminated intravascular coagulation in hematologic malignancies treated with recombinant human soluble thrombomodulin. *Am J Hematol.* 87(1):116-119, 2012. 査読あり.
- ⑫ Kobayashi T, Tsutsumi Y, Sakamoto N, Nagoshi H, Yamamoto-Sugitani M, Shimura Y, Mizutani S, Matsumoto Y, Nishida K, Horiike S, Asano N, Nakamura S, Kuroda J, Taniwaki M. Double-hit Lymphomas Constitute a Highly Aggressive Subgroup in Diffuse Large B-cell Lymphomas in the Era of Rituximab. *Jpn J Clin Oncol.* 42(11):1035-42, 2012. 査読あり.
- ⑬ Kondo Y, Nagai K, Nakahata S, Saito Y, Ichikawa T, Suekane A, Taki T, Iwakawa R, Enari M, Taniwaki M, Yokota J, Sakoda S, Morishita K. Overexpression of the DNA sensor proteins, absent in melanoma 2 and interferon-inducible 16, contributes to tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma with p53 inactivation. *Cancer Sci.* 103(4):782-790, 2012. 査読あり.
- ⑭ Gotou M, Hanamura I, Nagoshi H, Wakabayashi M, Sakamoto N, Tsunekawa N, Horio T, Goto M, Mizuno S, Takahashi M, Suganuma K, Yamamoto H, Hiramatsu A, Watarai M, Shikami M, Imamura A, Mihara H, Taki T, Miwa H, Taniwaki M, Nitta M. Establishment of a novel human myeloid leukemia cell line, AMU-AML1, carrying t(12;22)(p13;q11) without chimeric MN1-TEL and with high expression of MN1. *Genes Chromosomes Cancer.* 51(1):42-53, 2012. 査読あり.
- ⑮ Shimura Y, Kuroda J, Ri M, Nagoshi H, Yamamoto-Sugitani M, Kobayashi T, Kiyota M, Nakayama R, Mizutani S,

Chinen Y, Sakamoto N, Matsumoto Y, Horiike S, Shiotsu Y, Iida S, Taniwaki M. RSK2^{Ser227} at N-terminal kinase domain is a potential therapeutic target for multiple myeloma. *Mol Cancer Ther.* 11:2600-9, 2012. 査読あり.

- ⑯ Tokunaga T, Shimada K, Yamamoto K, Chihara D, Ichihashi T, Oshima R, Tanimoto M, Iwasaki T, Isoda A, Sakai A, Kobayashi H, Kitamura K, Matsue K, Taniwaki M, Tamashima S, Saburi Y, Masunari T, Naoe T, Nakamura S, Kinoshita T. Retrospective analysis of prognostic factors for angioimmunoblastic T-cell lymphoma: a multicenter cooperative study in Japan. *Blood.* 119(12):2837-2843, 2012. 査読あり.
- ⑰ Nagoshi H, Taki T, Hanamura I, Nitta M, Otsuki T, Nishida K, Okuda K, Sakamoto N, Kobayashi S, Yamamoto-Sugitani M, Tsutsumi Y, Kobayashi T, Matsumoto Y, Horiike S, Kuroda J, Taniwaki M. Frequent *PVT1* rearrangement and novel chimeric genes *PVT1-NBEA* and *PVT1-WWOX* occur in multiple myeloma with 8q24 abnormality. *Cancer Res.* 72(19):4954-62, 2012. 査読あり.

[学会発表] (計 8 件)

- ① Nagoshi H, Taki T, Kuroda J, Nishida K, Gotoh M, Okuda K, Kobayashi S, Yamamoto M, Tsutsumi Y, Kobayashi T, Matsumoto Y, Horiike S, Otsuki T, Taniwaki M. Identification and Functional Significance of Novel Type of Structurally Aberrant Transcripts of DCC in B-Cell Malignancies. 52th ASH Annual Meeting. Orlando, USA, Dec 6, 2010.
- ② Nagoshi H, Taki T, Kuroda J, Nishida K, Gotoh M, Okuda K, Kobayashi S, Yamamoto M, Tsutsumi Y, Kobayashi T, Matsumoto Y, Horiike S, Otsuki T, Taniwaki M. Expression of altered DCC gene in multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma. 第 72 回日本血液学会学術集会, 横浜, 2010.
- ③ Kuroda J, Yamamoto M, Ashihara E, Nagoshi H, Kobayashi T, Matsumoto Y, Sasaki N, Shimura Y, Kiyota M, Nakayama R, Horiike S, Maekawa T, Taniwaki M. Leukemia Microenvironment-Specific Galectin-3 Expression of Leukemic Cells Promotes Malignant Niche Formation and Bone Marrow Lodgment of leukemic Cells in Chronic Myelogenous Leukemia. 53th ASH Annual Meeting. San Diego. USA, Dec 10, 2011.

- ④ Nagoshi H, Taki T, Hanamura I, Nitta M, Otsuki T, Nishida K, Okuda K, Sakamoto N, Kobayashi S, Yamamoto M, Tsutsumi Y, Kobayashi T, Matsumoto Y, Horiike S, Kuroda J, Taniwaki M. Frequent Involvement of *PVT1* in Multiple Myeloma Carrying 8q24 Rearrangement and Identification of Novel *PVT1-NBEA* Chimeric Gene. 53th ASH Annual Meeting. San Diego. USA, Dec 12, 2011.
- ⑤ Nagoshi H, Taki T, Hanamura I, Nishida K, Kuroda J, Okuda K, Kobayashi S, Yamamoto M, Tsutsumi Y, Kobayashi T, Matsumoto Y, Horiike S, Otsuki T, Nitta M, Taniwaki M. Frequent rearrangements of *PVT1* and a novel *PVT1-NBEA* chimeric gene in multiple myeloma. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011.
- ⑥ 名越久朗, 滝 智彦, 花村一朗, 仁田正和, 大槻剛己, 西田一弘, 奥田恵子, 小林 覚, 山本未央, 隄 康彦, 古林 勉, 松本洋典, 堀池重夫, 黒田純也, 谷脇雅史. 8q24 異常を伴う MM における *PVT1* の関与および新規キメラ遺伝子 *PVT1-NBEA* の同定. 第 70 回日本癌学術総会, 名古屋, 2011.
- ⑦ Nagoshi H, Taki T, Nishida K, Kuroda J, Chinen Y, Kobayashi S*, Yokokawa Y, Yamamoto-Sugitani M, Kobayashi T, Matsumoto Y, Horiike S, Taniwaki M. Identification of the novel chimeric gene, *PVT1-WWOX*, in multiple myeloma with 8q24 abnormality. 54th The American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. Atlanta. USA, Dec 8, 2012.
- ⑧ Shimura Y, Kuroda J, Nagoshi H, M Yamamoto-Sugitani M, Kobayashi T, Kiyota M, Nakayama R, Mizutani S, Chinen Y, Sakamoto N, Matsumoto Y, Horiike S, Ri M, Shiotsu Y, Iida S, Taki T, Taniwaki M. RSK2^{Ser227} is a therapeutic target of myeloma cells regardless of upstream signalings. 54th The American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. Atlanta. USA, Dec 9, 2012.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷脇 雅史 (TANIWAKI MASAFUMI)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：80163640

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者
なし ()

研究者番号：