

「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」  
平成 17 年度採択研究代表者

平尾 敦

金沢大学がん研究所がん幹細胞研究センター・教授

## 代謝解析による幹細胞制御機構の解明

### § 1. 研究実施の概要

本研究は、幹細胞を対象に、細胞内代謝の観点からその制御システムを理解することである。正常組織幹細胞に加え、がん組織の中の幹細胞的な役割を持つ“がん幹細胞”も研究の対象とし、幹細胞研究の技術・知識を基盤とするアプローチによって、がんの発生・維持の制御機構を解明し、再生医療における技術向上あるいは新しいがん治療の開発に貢献し、社会へ還元することを目指すものである。本年度は、H21 年度の研究実施計画に基づき、下記のように研究を遂行した。

代謝制御分子 (FOXO, mTOR, HIF1 など) の幹細胞制御における役割に関して詳細な解析を進めた。本年度の成果として、まず、FOXO の白血病幹細胞における役割を明らかにした。動物モデルを作製し、生体内における白血病幹細胞の維持に FOXO が重要な役割を果たしていること、FOXO の活性化が薬剤耐性における原因となっていることを解明した。さらに、FOXO を標的にその活性化調節を行う化合物を探索し、白血病治療のために有用であることを示した。また、mTOR の活性化制御が、造血幹細胞機能や生体内での数の維持に非常に重要であることを明らかにした。一方、低酸素は、細胞内代謝を変動させる重要な要因であり、その適切な制御は、造血幹細胞機能を維持することに必須であることが判明した。以上のように、代謝制御分子機能解析を通して、正常およびがん幹細胞制御機構の解明を目指して研究を推進した。

がんにおける代謝制御を理解する目的で、脳腫瘍モデルを用いてがん幹細胞特定とその動態解析を行った。Nuclestem-GFP のシステムを用いた脳腫瘍モデル解析の結果、GFP 陽性画分に腫瘍源性を持つ細胞(がん幹細胞)が濃縮されており、がん幹細胞集団と非がん幹細胞集団に分画できることが確認された。GFP 陽性細胞は、未分化マーカーを発現しており、GFP 陰性細胞は、未分化抗原が消失していることから、GFP 陽性細胞が幹細胞的性質を有していることが明らかとなった。この脳腫瘍モデルを用いて、代謝産物解析を行ったところ、腫瘍細胞の分化度といくつかのアミノ酸濃度に相関があることが示され、腫瘍源性や未分化性の維持に、栄養代謝が深く関

与していることが示唆された。その他、神経幹細胞や腫瘍細胞分化の解析を進め、がん幹細胞を支持するニッチ環境の性状に関する知見を得た。また、肝臓がん幹細胞の制御機構においてポリコム遺伝子 Bmi1 や腫瘍抑制遺伝子 p63 の機能解析を行い、がん細胞の動態制御に関する知見を得た。

## § 2. 研究実施体制

### (1)「平尾」グループ

① 研究分担グループ長:平尾 敦 (金沢大学、教授)

② 研究項目

正常組織幹細胞とがん幹細胞の代謝解析

### (2)「須田」グループ

① 研究分担グループ長:須田 年生 (慶應義塾大学、教授)

② 研究項目

造血幹細胞の代謝解析

### (3)「合田」グループ

① 研究分担グループ長:合田 亘人 (早稲田大学、教授)

② 研究項目

各種幹細胞の代謝産物の測定

### (4)「田賀」グループ

① 研究分担グループ長: 田賀 哲也 (東京医科歯科大学、教授)

② 研究項目

組織幹細胞および脳腫瘍におけるがん幹細胞の代謝解析

### (5)「岩間」グループ

① 研究分担グループ長:岩間 厚志 (千葉大学、教授)

② 研究項目

造血幹細胞および肝がんにおけるがん幹細胞の代謝解析

## § 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

## 平尾グループ

### 1) 白血病幹細胞における FOXO の機能解析

本年度は、造血幹細胞の自己複製、未分化性維持およびストレス応答に重要な代謝制御分子フォークヘッド転写因子 FOXO3a の白血病幹細胞における機能解析に取り組んだ。慢性骨髄性白血病の原因は、造血幹細胞における BCR-ABL 融合遺伝子によるチロシンキナーゼ異常活性亢進であり、治療として、チロシンキナーゼ阻害剤イマチニブが特効薬として登場した。イマチニブは、ABL を標的としたチロシンキナーゼ阻害剤であり、従来の DNA 複製阻害剤を中心とした抗がん剤とは違い、特定の分子の機能阻害による薬剤、すなわち分子標的薬剤として、最も早く成功した薬剤として知られている。ところが、薬剤中止後の再発が問題となり、その原因としてイマチニブ耐性白血病幹細胞の存在が示唆された。我々は、マウス慢性骨髄性白血病モデルにおいて、白血病幹細胞の存在を確認し、この白血病幹細胞において、転写因子 FOXO が活性化していること、FOXO 機能を欠損させることによって白血病幹細胞の維持能低下が起こること、さらに、イマチニブ抵抗性は、FOXO の機能に依存していることを発見した<sup>1)</sup>(図 1)。以上より FOXO 阻害剤を開発することによって、慢性骨髄性白血病のイマチニブ耐性を克服できることを示した。次に、白血病幹細胞の FOXO の局在を指標に、複数の上流の標的分子の阻害剤を探索したところ、TGF $\beta$  シグナルが、FOXO の局在や活性などを変動させる上流分子として重要な役割を果たしていることを見出した。ヒト白血病幹細胞を用いた実験でもマウスと同様の知見を得た。以上のことから、FOXO の下流で、細胞内代謝が制御している可能性があり、代謝変動を調節する化合物も、がん治療に有効である可能性が示唆された。

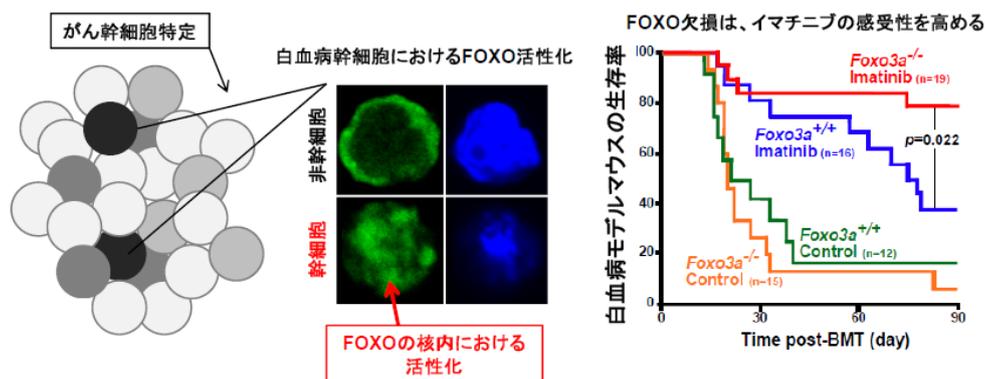


図 1 白血病幹細胞核内における FOXO 活性化がイマチニブ抵抗性の原因である

### 2) 固形腫瘍におけるがん幹細胞解析

固形腫瘍モデルにおけるがん幹細胞 (tumor-initiating cell) の特定法の確立するため、核小体分子 Nucleostemin の発現に着目した。Nucleostemin は、その発現が各種幹細胞で高く細胞の未分化状態との相関が示唆されていた。そこで、Nucleostemin の promoter 活性を用いた GFP レポーターマウス (NS-GFP Tg) を利用した。このマウスでは、Nucleostemin の発現の高い細胞を GFP

にて標識することができる。NS-GFP Tg マウスをベースに脳腫瘍モデルを作製し、形成された脳腫瘍から、GFP の輝度を指標に分画し、培養および同所移植実験を行ったところ、GFP 陽性細胞に腫瘍形成能を有する tumor-initiating cell が濃縮されていることが判明した<sup>2)</sup>。この細胞は、未分化マーカーを発現しており、GFP 陰性細胞は、未分化抗原が消失していることから、GFP 陽性細胞が幹細胞的性質を有していることが明らかとなった。tumor-initiating cell の動態を解析したところ、Ki67 陽性であり活発に分裂していることが判明した。さらに、遺伝子プロファイリングを行ったところ、プリン合成経路に関わる酵素群が高い発現を示した。プリン合成経路は、Nucleostemin 蛋白の発現調節に関わっていることも報告されており、がん幹細胞において、プリン代謝の重要性が示唆された。一方、代謝産物解析では、多くのアミノ酸含量が未分化状態で高い傾向を示した(合田グループの項 参照)。今後、この代謝経路とがん幹細胞の動態の解析を行うことによって、がん幹細胞の動態制御機構の解明が進むことが期待される。その他、皮膚発がんにおける腫瘍発生起点に関して、ROS や senescence 反応など幹細胞制御で重要な制御因子が機能していることを解明した<sup>3)</sup>。

#### 須田グループ

本年度の須田グループは、昨年度に引き続いてヒト造血幹細胞システムに対する低酸素環境による代謝抑制の機能的影響を検討した。とりわけ、昨年度までの解析から、ヒト臍帯血造血幹細胞を超免疫不全マウス(NOG マウス)に移植すると、幹細胞分画が骨髄内で低酸素環境を獲得していることが分かっていたため、低酸素環境による細胞内代謝制御がヒト造血幹細胞の維持にも重要である可能性が示唆されていた。そこで、本年度は低酸素状態獲得過程の特徴と分子機構に焦点を絞って解析を進めた。具体的方法としては、ヒト臍帯血造血幹細胞を超免疫不全マウス NOG マウスに異種移植することによるヒト骨髄再構築系を用いた解析を行った。その結果、ヒト造血幹細胞分画(Lineage marker 陰性 CD38 陰性 CD34 陽性)は移植直後には細胞周期が早くまわっているものの、時間の経過に従って細胞周期が静止状態を取り戻すことが PyroninY 染色と短期 BrdU ラベル法から明らかになった<sup>4)</sup>。さらに、予め低酸素マーカー pimonidazole(Pimo)をレシピエントマウスに投与しておいてから抗 Pimo 抗体を用いて細胞内の酸素化状態を検討したところ、細胞周期が停止するのに先行してヒト造血幹細胞分画は Pimo 陽性となっていた。この際、ヒト造血前駆細胞分画(Lineage marker 陰性 CD38 陽性 CD34 陽性)の細胞内 Pimo レベルは低く保たれたままで、造血幹細胞が細胞周期の静止期を獲得するためには低酸素状態の獲得が重要である可能性が示唆された。次に低酸素状態がいかなるメカニズムで造血幹細胞の細胞周期を停止させるのかを検討するために移植後の造血幹細胞分画が Pimo 陽性を獲得する前後の cDNA を準備し、リアルタイム PCR 法で造血関連遺伝子群の発現変動を検討した。現在までに細胞周期関連遺伝子群、サイトカイン関連分子、そして低酸素関連分子の遺伝子発現検討が確認されており<sup>5-9)</sup>、現在これらのうち機能的に重要な遺伝子の同定を図っている。

#### 合田グループ

平尾らの研究グループは今年度、癌組織は非常に未分化な細胞と分化した細胞が混在し、未分化の高い細胞は nucleostemin を高発現していることを見いだしてきた。また、たった 1 個の細胞から由来した癌組織でも分化度の異なる細胞集団からなることから、腫瘍形成過程において分化度の違いが代謝変動に影響を及ぼすのではないかと、また逆に代謝変動が分化度を変えているのではないかと考え、in vitro で分化誘導をさせた腫瘍細胞と未分化の腫瘍細胞のメタボローム解析を施行した。その結果、解糖系、TCA 回路、ペントースリン酸回路、核酸代謝に係わる代謝産物はサンプル間でのばらつきが大きく、N 数が少ない今回の解析からははっきりとした傾向は認められなかった。一方、アミノ酸代謝に関しては、Ala, Asn, Gln, Trp, Cys を除く多くのアミノ酸含量が分化誘導後に減少することが明らかになった。この結果はこれまで正常細胞の幹細胞において認められていた幹細胞維持とアミノ酸代謝産物との相関関係とは全く逆の変化であり、アミノ酸代謝ががん幹細胞と正常幹細胞の未分化性維持機構において異なる役割を演じている可能性を示唆していると考えられた。一方で、須田グループは、低酸素応答分子 HIF1 の造血幹細胞制御について解析しているが、我々は、肝細胞再生や病態時における HIF1 を含む代謝制御分子役割を明らかにしている<sup>10,11)</sup>。この結果は、細胞分化や再生能と代謝制御の関連を理解する上で重要な知見であると考えられた。

## 田賀グループ

本研究課題は、造血幹細胞および神経幹細胞の増殖分化機構の解明と、癌幹細胞を規定する特性の解明を目指して取り組んだ。組織幹細胞の研究材料としては、盛んな増殖能を示す胎生期の中枢神経組織ならびに造血組織を用いた。癌幹細胞の研究材料としては、ラット C6 グリオーマにおける癌幹細胞様性質を有する細胞集団を用いた。いずれについても、幹細胞特性と幹細胞微小環境(ニッチ)特性の双方の観点から研究を進めた。

造血幹細胞に関する研究においては、胎生期のマウスにおける造血組織に焦点を当てた。造血の場合は、個体発生の進行に伴い変化することが知られており、たとえば、成体型造血幹細胞は、大動脈-生殖原基-中腎(AGM)領域、肝臓、胎盤と、その存在が変遷する。この現象は、時期ならびに場所に特異的な、幹細胞特性の変化と幹細胞ニッチの変化を反映しているものと考察されることから、胎生期造血組織は、幹細胞特性と幹細胞ニッチの双方に取り組むにあたり適した材料といえる。胎盤における造血幹細胞の存在はいくつかの報告があるが、その表面マーカーなどの詳しい特性は未解決である。今年度の本研究課題では、昨年度に着手した胎盤における造血幹細胞の性状に関する研究を展開させた。胎生 10.5 日目から 15.5 日目まで 1 日ごとのマウス胎盤について、OP9 ストローマ細胞上での敷石状コロニー形成能および半固形培地におけるコロニー形成能を指標に造血活性を解析したところ、調べたいずれの胎生時期においても、CD45 陽性かつ c-Kit 陽性の細胞集団に造血活性が認められた。CD45 陽性 c-Kit 陰性細胞集団、CD45 陰性 c-Kit 陽性細胞集団、CD45 陰性 c-Kit 陰性細胞集団には造血活性は殆ど検出されなかった。また、成体造血幹細胞が濃縮される細胞集団として知られている Hoechst33342 色素排出性の SP 細胞集団は、CD45 陽性 c-Kit 陽性細胞集団中に最も高い割合で観察された。胎盤は胎児側組

織と母体側組織が入り組んでいるが、GFPトランスジェニックマウスの利用により、胎児由来細胞を GFP 標識することを今年度可能にした。これにより幹細胞ニッチの探索に来年度展開させる糸口を得た。

神経幹細胞に関する研究においては、扁平上皮癌において遺伝子増幅が見られる *gasc1* の変異マウスの解析に着手した。この遺伝子産物は、ヒストン H3 の 9 番目のリジンの脱メチル化酵素である。用いた変異マウスは同遺伝子への外来遺伝子の挿入変異を有し、*Gasc1* 蛋白の発現減弱を来す。外来遺伝子に含まれる *LacZ* 遺伝子発現解析の結果、胎生期神経幹細胞ニューロンの成熟に伴い発現量が増加する知見を得た。来年度以降、ヒストン修飾の変化が幹細胞特性に与える影響を解析する予定である。これとは別に、我々は前年度までに FGF2 と Wnt のふたつのシグナルが相互作用してマウス神経網膜の幹細胞画分を増殖させるという報告をしたが、今年度は、神経網膜中の GFAP 陽性アストログリア細胞の増加がふたつのサイトカイン leukemia inhibitory factor (LIF) と bone morphogenetic protein 2 (BMP2) によって引き起こされることを報告した<sup>12)</sup>。ラット C6 グリオーマを用いて進めた研究からは、腫瘍再構成能の高い SP 細胞集団の *in vitro* 培養後の SP 細胞維持効率が、意外にも SP 細胞だけを培養した条件下よりも、SP 細胞と非 SP 細胞を混合した培養条件下の方が高いことを見出した。この知見は、癌幹細胞が自ら一部分化して癌幹細胞を支持するニッチ環境を構築するという生存戦略をとっている可能性を示唆する点で興味深い。さらに、がん幹細胞抗原 CD133 の発現制御について解析した<sup>13)</sup>。この知見に基づいて次年度の、癌幹細胞特性と癌幹細胞ニッチ特性の研究へと展開させる。

## 岩間グループ

がん幹細胞研究に関する研究として、まず癌幹細胞の重要な制御分子であるポリコーム複合体の解析を昨年に引き続き行った。その結果、ヒト肝細胞癌におけるポリコーム蛋白 BMI1 と EZH2 の発現亢進が、幹細胞癌の再発と有意に相関することを明らかにした。我々はポリコーム蛋白が肝癌幹細胞の維持・造腫瘍活性に必須であることをこれまでに報告してきたが、その重要性がヒト肝細胞癌症例において確認された<sup>14)</sup>。また、昨年度の研究においてポリコーム遺伝子産物 Bmi1 が癌幹細胞において制御する遺伝子群の同定を行ったが、その中で転写因子 Sox17 が BMI1 によって直接されること、マウス *Dlk1*<sup>+</sup>胎児肝幹・前駆細胞に BMI1 とともに Sox17 を強制発現すると、BMI1 による造腫瘍活性が著明に抑制されることを確認した。したがって、Sox17 は癌抑制遺伝子と機能しうること、しかしながら癌化の過程においては BMI1 によってその発現が抑制されているものと考えられる(論文投稿中)。以上の知見は、癌幹細胞において活性が増強しているポリコーム複合体によって、多くの癌抑制遺伝子の発現が同時に抑制されていることを示唆するものであり、癌幹細胞の成立・維持の分子メカニズムの一面を明らかにするものである。さらに、ポリコーム複合体が遺伝子発現制御を介して癌幹細胞特異的な代謝制御にも関与する可能性を示唆するものであり、この点について ChIP-Chip 法などにより解析を進める予定である。

また、肝細胞癌における癌抑制遺伝子産物 p63 の活性が Plk1 によるリン酸化によりどのように制

御されているかを報告するとともに<sup>15)</sup>、ヒト骨髄増殖性疾患の癌幹細胞におけるシグナル制御機構を解析し、染色体転座に伴う融合遺伝子として TEL-Lyn 融合遺伝子を同定した。TEL-Lyn は造血幹細胞の自己複製を強力に増強し、マウスモデルにおいて致死性の骨髄増殖性疾患を誘発することを確認した<sup>16)</sup>。また、phospholipase C-beta3 が STAT5 の活性を抑制的に制御すること、phospholipase C-β3 欠損マウスにおいては STAT5 の活性亢進に伴い造血幹細胞の自己複製活性が増強され、高率に骨髄増殖性疾患を発症することを明らかにした<sup>17)</sup>。

## § 4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

1. Naka K, Hoshii T, Muraguchi T, Tadokoro Y, Ooshio T, Kondo Y, Nakao S, Motoyama N and Hirao A. TGFβ-FOXO signalling maintains leukaemia-initiating cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature*, 463:676-80, 2010 (DOI:10.1038/nature08734)

2. Tamase A, Muraguchi T, Naka K, Tanaka S, Kinoshita M, Hoshii T, Ohmura M, Shugo H, Ooshio T, Nakada M, Sawamoto K, Onodera M, Matsumoto K, Oshima M, Asano M, Saya H, Okano H, Suda T, Hamada JI, Hirao A. Identification of tumor-initiating cells in a highly aggressive brain tumor using promoter activity of nucleostemin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:17163-8, 2009 (DOI:10.1073/pnas.0905016106)

3. Yamakoshi K, Takahashi A, Hirota F, Nakayama R, Ishimaru N, Kubo Y, Mann DJ, Ohmura M, Hirao A, Saya H, Arase S, Hayashi Y, Nakao K, Matsumoto M, Ohtani N, Hara E. Real-time in vivo imaging of p16Ink4a reveals cross talk with p53. *J Cell Biol*. 186:393-407, 2009. (DOI:10.1083/jcb.200904105)

4. Shima H, Takubo K, Iwasaki H, Yoshihara H, Gomei Y, Hosokawa K, Arai F, Takahashi T, Suda T: Reconstitution activity of hypoxic cultured human cord blood CD34-positive cells in NOG mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 378: 467-72, 2009 (DOI:10.1016/j.bbrc.2008.11.056)

5. Yamada W, Nagao K, Horikoshi K, Fujikura A, Ikeda E, Inagaki Y, Kakitani M, Tomizuka K, Miyazaki H, Suda T, Takubo K: Craniofacial malformation in R-spondin2 knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 381:453-8, 2009 (DOI:10.1016/j.bbrc.2009.02.066)

6. Sato T, Onai N, Yoshihara H, Arai F, Suda T, Ohteki T: Interferon regulatory factor-2 protects quiescent hematopoietic stem cells from type I interferon-dependent exhaustion. *Nat Med*.

15:696-700, 2009 (DOI:10.1038/nm.1973)

7. Hosokawa K, Arai F, Yoshihara H, Iwasaki H, Hembree M, Yin T, Nakamura N, Gomei Y, Takubo K, Shiama H, Matsuoka S, Li L, Suda T: Cadherin-based adhesion is a potential target for niche manipulation to protect hematopoietic stem cells in adult bone marrow. *Cell Stem Cell*, 6:194-8, 2010 (DOI:10.1016/j.stem.2009.04.013)
8. Morikawa S, Mabuchi Y, Kubota Y, Nagai Y, Niibe K, Hiratsu E, Suzuki S, Miyauchi-Hara C, Nagoshi N, Sunabori T, Shimmura S, Miyawaki A, Nakagawa T, Suda T, Okano H, Matsuzaki Y: Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J Exp Med*, 206: 2483-96, 2009 (DOI:10.1084/jem.20091046)
9. Kobayashi I, Ono H, Moritomo T, Kano K, Nakanishi T, Suda T: Comparative gene expression analysis of zebrafish and mammals identifies common regulators in hematopoietic stem cells. *Blood*, 115: 1-9, 2010 (DOI:10.1182/blood-2009-07-232322.)
10. Tajima T, Goda N, Fujiki N, Hishiki T, Nishiyama Y, Senoo-Matsuda N, Shimazu M, Soga T, Yoshimura Y, Johnson RS, Suematsu M. HIF-1 $\alpha$  is necessary to support gluconeogenesis during liver regeneration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , 387:789-794, 2009 (DOI:10.1016/j.bbrc.2009.07.115)
11. Kondo K, Sugioka T, Tsukada K, Aizawa M, Takizawa M, Shimizu K, Morimoto M, Suematsu M, Goda N. Fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  agonist, improves hepatic microcirculatory patency and oxygen availability in a high-fat-diet-induced fatty liver in mice. *Adv Exp Med Biol*. 662, 77-82, 2010 (DOI:10.1007/978-1-4419-1241-1\_10)
12. Fukushima M, Setoguchi T, Komiya S, Tanihara H, and Taga T. Retinal astrocyte differentiation mediated by leukemia inhibitory factor in cooperation with bone morphogenetic protein 2. *Int. J. Dev. Neurosci.* 27:685-690, 2009 (DOI:10.1016/j.ijdevneu.2009.07.006 )
13. Tabu K, Kimura T, Sasai K, Wang L, Bizen N, Nishihara H, Taga T, Tanaka S, Analysis of an alternative human CD133 promoter reveals the implication of Ras/ERK pathway in tumor stem-like hallmarks. *Molecular Cancer*, 2010, in Press (DOI:10.1186/1476-4598-9-39)
14. Yonemitsu Y, Imazeki F, Chiba T, Fukai K, Nagai Y, Miyagi S, Arai M, Aoki R, Miyazaki M, Nakatani Y, Iwama A, Yokosuka O. Distinct expression of polycomb group proteins EZH2 and

BMI1 in hepatocellular carcinoma. *Hum Pathology* 40, 1304-1311, 2009

(DOI:10.1016/j.humpath.2009.01.017)

15. Komatsu S, Takenobu H, Ozaki T, Ando K, Koida N, Suenaga Y, Ichikawa T, Hishiki T, Chiba T, Iwama A, Yoshida H, Ohnuma N, Nakagawara A and Kamijo T. Plk1 regulates liver tumor cell death by phosphorylation of TAp63. *Oncogene* 28, 3631-3641, 2009 (DOI: 10.1038/onc.2009.216)

16. Tanaka H, Takeuchi M, Takeda Y, Sakai S, Oda K, Abe D, Ohwada C, Ozawa S, Sakaida E, Shimizu N, Saito Y, Miyagi S, Iwama A, and Nakaseko C. Identification of a novel TEL-Lyn fusion gene in primary myelofibrosis. *Leukemia* 24:197-200, 2010. (DOI: 10.1038/leu.2009.167 )

17. Xiao W, Hong H, Kawakami Y, Kato Y, Wu D, Yasudo H, Kimura A, Kuwabara H, Bertoli LF, Davis RS, Chau LA, Madrenas J, Hsia CC, Xenocostas A, Kipps TJ, Hennighausen L, Iwama A, Nakauchi H, and Kawakami T. Tumor suppression by phospholipase C- $\beta$ 3 via SHP-1-mediated dephosphorylation of Stat5. *Cancer Cell* 16, 161-171, 2009 (DOI: 10.1016/j.ccr.2009.05.018)

#### (4-2) 知財出願

① 平成21年度特許出願件数(国内 1 件)

② CREST 研究期間累積件数(国内 3 件)