
プロジェクト研究成果報告会

プログラム・要旨集

2022 年 2 月 22 日（火）

オンライン開催

https://www.jbic.or.jp/news_event/2022/report-meeting

<主 催>

一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム

【プログラム】

13:30～13:35 **開会挨拶（5分）**

一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム 会長 赤羽 浩一

13:35～14:05 プロジェクト成果発表（1）

福島医薬品関連産業支援拠点化事業に係る研究開発業務

福島医薬品関連産業支援拠点化事業の進捗と今後

福島県立医科大学 医療-産業トランスレーショナルリサーチセンター 高木 基樹

14:05～15:10 プロジェクト成果発表（2）

患者層別化マーカー探索技術の開発／免疫応答モニタリングによるがん免疫の全容理解に基づく新規層別化マーカーの開発

プロジェクト概要と成果

愛知医科大学医学部 腫瘍免疫寄付講座 上田 龍三

末梢血新規 CD4 クラスターによる抗腫瘍免疫予測

埼玉医科大学 国際医療センター 各務 博

免疫ゲノム解析が明らかにした腫瘍微小環境の特異的免疫抑制機構

国立がん研究センター研究所 腫瘍免疫研究分野 西川 博嘉

統合データウェアハウス「がん免疫ビブリオテカ」と網羅的リン酸化自動計測機器の社会実装に向けて

産業技術総合研究所 人工知能研究センター 堀本 勝久

15 : 10～16 : 10 プロジェクト成果発表 (3)

RNA 標的創薬技術開発／標的 RNA の機能解析・構造解析基盤技術開発

「核磁気共鳴法による中分子創薬と RNA 標的創薬技術開発」の成果

理化学研究所 生命機能科学研究センター 生体分子動的構造研究チーム 嶋田 一夫

「インシリコ技術による構造的実証に基づく RNA 及び中分子シミュレーション技術の開発」の成果

産業技術総合研究所 生命工学領域 細胞分子工学研究部門 動的創薬モダリティ研究グループ

福西 快文

「クライオ電子顕微鏡法による中分子創薬と RNA 標的創薬技術開発」の成果

東京医科歯科大学 高等研究院 卓越研究部門 藤吉 好則

【目 次】

1. 福島医薬品関連産業支援拠点化事業に係る研究開発業務.....	1
1-1. 福島医薬品関連産業支援拠点化事業の進捗と今後	
2. 患者層別化マーカー探索技術の開発／免疫応答モニタリングによるがん免疫の全容理解に基づく新規層別化マーカーの開発	2
2-1. 末梢血新規 CD4 クラスターによる抗腫瘍免疫予測	
2-2. 免疫ゲノム解析が明らかにした腫瘍微小環境の特異的免疫抑制機構	
2-3. 統合データウェアハウス「がん免疫ビブリオテカ」と網羅的リン酸化自動計測機器の社会実装に向けて	
3. RNA 標的創薬技術開発／標的 RNA の機能解析・構造解析基盤技術開発.....	5
3-1. 「核磁気共鳴法による中分子創薬と RNA 標的創薬技術開発」の成果	
3-2. 「インシリコ技術による構造的実証に基づく RNA 及び中分子シミュレーション技術の開発」の成果	
3-3. 「クライオ電子顕微鏡法による中分子創薬と RNA 標的創薬技術開発」の成果	

1. 福島医薬品関連産業支援拠点化事業に係る研究開発業務

1-1. 福島医薬品関連産業支援拠点化事業の進捗と今後

福島県立医科大学 医療-産業トランスレーショナルリサーチセンター 高木 基樹

福島県立医科大学では、東日本大震災からの福島復興事業の一環として平成 24（2012）年度から福島医薬品関連産業支援拠点化事業（福島事業）を推進している。福島事業は令和 2（2020）年度で第一期が終了し、本年度から 5 年間の予定で第二期事業が開始した。JBIC には本事業の「研究開発業務」と「情報収集および提案に関する業務」の一部を委託している。

福島事業は平成 19-23 年度に実施された NEDO「遺伝子発現解析技術を活用した個別がん医療の実現と抗がん剤開発の加速」の後継プロジェクトであると共に、「タンパク質機能解析プロジェクト」を起点とする過去の複数の経済産業省バイオ関連国家プロジェクトの集大成事業にあたる。それらのプロジェクトで蓄積した成果やノウハウ（技術）をもとに新たに取得した成果を加えて、医薬品等の開発支援、新規産業の創出、既存企業の誘致及びこれらに伴う雇用の創出等により福島復興に貢献することを目的としている。

本事業の第一期においては、希少かつ微量な生体試料を、①「情報（遺伝子発現プロファイル、ゲノム解析情報、血中・体液中の抗体プロファイル、網羅的抗体試薬・医薬等評価情報、病理組織学的解析情報、薬効評価情報、臨床情報等）に変換する」、②「加工（がん組織由来培養細胞：F-PDO[®]、担がんマウスモデル：F-PDX[®]、遺伝子強制発現細胞株等）して増やす」、③「極微量試料の解析技術（DNA マイクロアレイシステム、タンパク質マイクロアレイシステム）を開発する」ことにより多大なる成果をあげることができた。具体的には、福島事業で創出・取得した生体由来加工試料、解析情報等の多種多様な成果物を「福島コレクション[®]」と命名し、製薬企業や検査・診断薬企業、研究機関等との間で、これら福島コレクション[®]を活用した受託・共同研究や成果物の提供（MTA）等を推進してきた。また、事業発ベンチャー3 社や、福島コレクション[®]の企業・アカデミアへの橋渡し機関として一般財団法人福島医大トランスレーショナルリサーチ機構を設立し、成果普及体制も構築した。

本年度からの第二期においては、第一期の成果である「天然ヒト抗体遺伝子クローニング」及び「タンパク質マイクロアレイ」の二大基盤技術に焦点をあて、これらを活用した抗体医薬・診断薬等の開発や関連産業の集積を通じて福島復興への更なる貢献を目指している。本発表では、本事業の概要を説明した上で、第二期事業における SARS-CoV-2 に対する抗体薬の研究開発等のトピックスを紹介する。



福島医薬品関連産業支援拠点化事業第二期の概要

2. 患者層別化マーカー探索技術の開発／免疫応答モニタリングによるがん免疫の全容理解に基づく新規層別化マーカーの開発

2-1. 末梢血新規 CD4 クラスターによる抗腫瘍免疫予測

埼玉医科大学医学部 国際医療センター呼吸器内科 各務 博

目的

本研究の目的は、末梢血という軽微侵襲で経時的に解析可能な検体に由来する免疫担当細胞を解析することにより、がん細胞に対する免疫状態を数学的に記述し数理的理解し、適切な治療介入を可能とする患者層別マーカーを開発することにある。

背景

抗腫瘍免疫現象には、エフェクターCD8 T細胞とエフェクターCD4 T細胞両者が必須である。

PD-1 阻害薬は主にエフェクターCD8 T細胞の数的、質的増強を誘導するが、CD4 T細胞に対する効果がほとんどみられない。したがって、その抗腫瘍効果は予め存在する CD4 T細胞免疫に依存する。また、抗 CTLA-4 抗体による CD4 T細胞数増加効果の必要性は、既存 CD4 T細胞免疫評価から推定可能である。このように CD4 T細胞免疫評価は、バイオマーカーとしての意義を有している。

成果

1. Unsupervised clustering から解明された抗腫瘍 CD4⁺ T細胞クラスター

肺癌患者末梢血の scRNAseq 解析による unsupervised clustering を基として、naïve-effector priming 状態、ヘルパーT細胞 polarization、TCR clonotype という3つの CD4 T細胞基本属性を用いて解析した結果、Th1, Th17 とは異なる Th meta-cluster が存在し、ICI 抗腫瘍効果と強い相関を示した。

遺伝子発現、メチローム解析、TCR 解析より独立性が示されたこの Th meta-cluster は IL-7R 高発現などの特徴的遺伝子発現パターンを有しており、Th7R と命名した。

2. Th7R の臨床性能

肺癌初回ペムブロリズマブ治療、既治療肺癌 PD-1 阻害薬治療、既治療膀胱がん抗 PD-L1 抗体治療などのコホートにおいて、治療前末梢血 Th7R 割合は ICI 治療後 PFS を予測し得た。

3. 肺癌手術例における腫瘍微小環境内 Th7R 解析

肺癌手術症例を用いた、腫瘍微小環境、手術前末梢血、手術後末梢血の scRNAseq, CyTOF 解析の結果、腫瘍内浸潤 T細胞の CD4 T細胞クラスター構成において Th7R は Th1 と並ぶ重要な構成成分であること、T細胞生存、疲弊などに関する遺伝子発現パターンに特徴があることが判明した。また、手術による肺癌組織消失後に末梢血 Th7R は特徴的な減少傾向を示した。これらの結果は、今後行われる周術期 ICI 治療における Th7R のバイオマーカー性能を示唆するものと考えられた。

2-2. 免疫ゲノム解析が明らかにした腫瘍微小環境の特異的免疫抑制機構

国立がん研究センター研究所 腫瘍免疫研究分野 西川 博嘉

がん免疫編集説(Cancer Immunoediting)に従えば、患者毎に異なる免疫抑制機構が存在する理由として以下の理由が考えられる：がん細胞は免疫系からの攻撃を受けにくい免疫原性の低いがん細胞を選択する（免疫選択）とともに、生体に備わっている様々な免疫抑制機構を用いて免疫系から逃避（免疫逃避）することで、生体内で増殖して臨床的「がん」となる。患者毎に発がん過程での免疫選択と免疫逃避への依存性が異なることにより、高免疫原性および 低免疫原性腫瘍と呼ばれる腫瘍微小環境の違いが生じる。

よって個々のがん患者のがん細胞の特性をゲノム解析により解明するとともに、腫瘍微小環境での免疫応答を統合的に検討する（免疫ゲノム解析） ことにより、がん免疫療法の治療効果を層別化するバイオマーカーや治療抵抗性機序に基づいた免疫プレシジョン医療の展開が求められている。我々は、がん微小環境の解析から、エフェクターT細胞であるCD8陽性T細胞と免疫抑制細胞である制御性T細胞に発現するPD-1の発現強度の違いが抗PD-1/抗PD-L1抗体の治療効果と相関する精度の高い効果予測バイオマーカーとなることを示した。さらに制御性T細胞でPD-1が高発現する新規メカニズムを見出し、制御性T細胞標的治療のバイオマーカーに基づく展開の基盤を構築した。

また、がん細胞自身が持つドライバー遺伝子変異シグナルが直接的にがん局所の免疫応答の調節に関わっていることを解明した。例えば、EGFR変異は直接的に腫瘍組織へのエフェクターT細胞の浸潤を阻害し、制御性T細胞浸潤を誘導していることを見出した。胃癌で認められるRHOA変異は、エフェクターT細胞浸潤を阻害するとともに、がん微小環境での代謝環境を変化させることで制御性T細胞の増殖・活性化を誘導してがん局所に免疫抑制環境を形成し、免疫チェックポイント阻害剤への抵抗性に関与していることを明らかにした。

以上より、腫瘍微小環境を免疫ゲノム解析により詳細に解析し、がんが有する様々な免疫抑制機構を詳かにし、それに基づいた適切ながん治療、すなわち免疫ゲノムプレシジョン医療を展開することが重要であると考えられる。

2-3. 統合データウェアハウス「がん免疫ビブリオテカ」と網羅的リン酸化自動計測機器の社会実装に向けて

産業技術総合研究所 人工知能研究センター 堀本 勝久

中間評価を終えた段階で、本プロジェクトにおける産総研の成果は、

- ① 本プロジェクトで計測されたデータを収納した「がん免疫ビブリオテカ」のプロトタイプ版の完成
- ② 「がん免疫ビブリオテカ」に収納されたデータを利活用するためのツール群のプロトタイプ版の完成
- ③ 日本発のオミックスデータ計測機器となるリン酸化自動計測機器のプロトタイプの完成

である。当初計画通りすべての課題についてのプロトタイプを完成させ、目前のもしくは定型の成果ではなく、事業終了時を見据えて柔軟かつ伸びしろのある成果を達成した。残り2年で、様々な内部・外部の機関の協力を得て、最も困難な段階である社会実装を試みる。

①のがん免疫ビブリオテカは、基本フォーマットを完成し、各種データの収納を継続的に行っている。内部データの収集・整理は、論文作成のために少々遅延しているが、外部データを半自動的に収集するスクリプトを作成/利用して多種多様かつ大量なデータの収納が可能であることを検証した。今後の開発は、利用者を製薬企業研究開発関係者に限定公開することにより、収納データの種類などの要求を把握することで社会実装に向け作り込む。

②の解析ツール開発に関しては、過剰適合を抑制した少数マーカー探索法の開発、動態方程式に基づく広義マーカーの提唱と例証、持続的な学習のための参加型AIツール開発を行った。今後、限定公開によるモニタリングを実施し、がん免疫研究に利用頻度の高い公開ツールの利用環境の整備と独自開発ツールの利便性の向上を図る。

研究開発計画当初、①と②の融合による、raw dataを含むすべての計測データとその解析を可能とするツール群を装備したサーバー空間（がんビブリオテカ）の構築を目指した。三年後の現在、同様な空間の構築が、TERRA(Nature,601:154-55,2022)など主に米国で進められている。開発の方向性に間違いはなく、現プロトタイプを基に本邦独自のがん免疫に特化したサーバー空間に作り込んでいく段階に入った。

③のキャノングループのリン酸化自動計測機器開発については、開発支援を行った。実際、リン酸化解析による「薬剤耐性機序及びバイパス・パスウェイの推定」と「マルチキナーゼ阻害剤投与に関する治療ラインと分子機序との整合性」に関する論文に加え、昨年度「EGFR阻害剤の情報伝達パスウェイの時系列変化検出」に関する論文を発表し、本機器開発の対象である網羅的リン酸化解析の実用性の認知度向上に努めた。既にキャノングループは、2つの機能要素のモジュール開発（リン酸化反応に関する生化学系及びその検出に関する光学系）が完了し、モジュールの統合によるプロト機器が本年度末に完成する。今後、市販に向けた製品要件の検証を経て、世界のデファクトスタンダード機器となり、本邦ががん免疫のみならず医学/生命科学でのリン酸化解析による成果の発信地になることが期待できる。

3. RNA 標的創薬技術開発／標的 RNA の機能解析・構造解析基盤技術開発

3-1. 「核磁気共鳴法による中分子創薬と RNA 標的創薬技術開発」の成果

理化学研究所 生命機能科学研究センター 生体分子動的構造研究チーム 嶋田 一夫

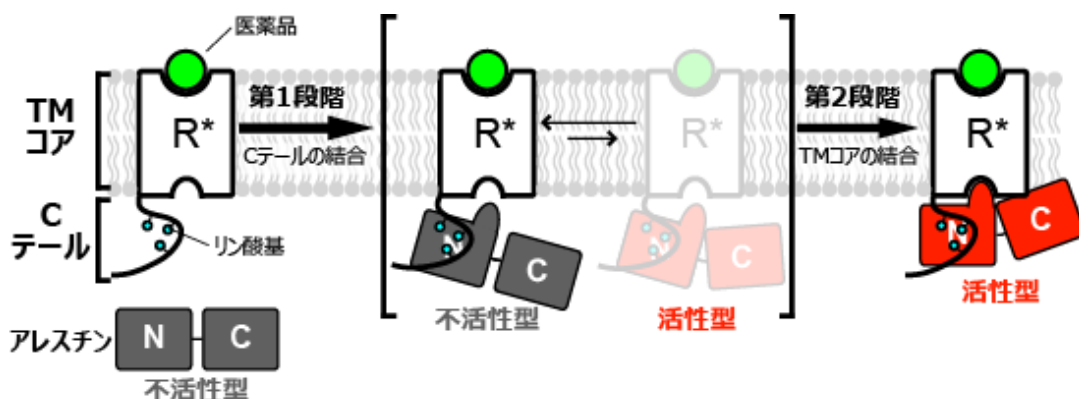
本発表では昨年度終了した革新的中分子創薬技術の開発の成果および本年度から発足した RNA 標的創薬技術開発の計画に関して概説する。

革新的中分子創薬技術の開発／中分子シミュレーション技術の開発

シグナル伝達複合体の 2 段階活性化—GPCR によるアレスチンの動的な活性化機構の解明—

GPCR は、細胞外の刺激を細胞内に伝える役割を担う重要な膜タンパク質である。リガンドが GPCR と結合することにより、G タンパク質とアレスチンの二種の細胞内タンパク質を活性化し、それぞれのシグナル伝達を惹起する。しかし、GPCR によるアレスチンの活性化の仕組みの詳細は不明であった。

今回、我々は、リガンドの結合に伴う GPCR とアレスチンの NMR 解析を行い、まずリン酸化された GPCR の C 末端を介した強い結合により GPCR-アレスチン複合体が形成され、続いて起こる TM コアとの弱い結合がアレスチンに構造変化を導き、アレスチンを活性化させるという、2 段階の動的な過程を明らかにした (Shiraishi, *et al.*, *Nat. Commun.* (2021) doi: 10.1038/s41467-021-27482-3)。また、このような広い界面でのタンパク質間相互作用を標的とした医薬品を開発するには、分子サイズが大きく広い構造領域を認識できる中分子医薬品を用いることが有効と考えた。



G タンパク質共役型受容体 (GPCR) によるアレスチンの 2 段階活性化

RNA 標的創薬技術開発／標的 RNA の機能解析・構造解析基盤技術開発

医薬品開発における創薬標的の枯渇を解消する新たな可能性として、立体構造を形成する RNA への注目が高まっている。しかし、RNA 標的創薬の基盤となる立体構造情報は極めて少ない。特に、血清中や実際に作用する細胞内における構造情報はほとんど皆無であり、これらの事実が国内製薬企業において、RNA 創薬の実現への障害となっている。また、創薬の標的になるような RNA 上のサイトは、典型的な塩基対を形成せず複数の構造間の平衡にあることが多い。よって、RNA 標的創薬の実現には、産学連携の枠組みで創薬標的 RNA およびその複合体の立体構造の決定、生理環境における動的相互作用の解明、および得られた構造情報に基づいた薬剤設計を可能にするシミュレーション技術の確立が必要である。そこで、本提案では、クライオ電子顕微鏡法、NMR 法、インシリコ計算技術を融合し、「RNA 標的および RNA 複合体の立体構造および動的な相互作用を明らかにする構造解析技術の開発」、「生理的環境における RNA の創薬作用点の構造的特徴の解明」および、「化合物の探索と最適化に貢献する実証に基づくシミュレーション解析技術の開発」を行う。NMR 法では、初めに、新規の安定同位体標識法および NMR 解析技術の確立により、高分子量 RNA 標的の立体構造の決定法および動的構造解析技術を確立することを目指す。

3-2. 「インシリコ技術による構造的実証に基づく中分子シミュレーション技術の開発」の成果

産業技術総合研究所 生命工学領域 細胞分子工学研究部門 動的創薬モダリティ研究グループ
福西 快文

「単一標的分子から標的分子集合体へ、硬い創薬標的分子から柔軟な創薬標的分子へ」がインシリコチームの一貫した研究開発方針である。そこで関連の深い2つの成果:「革新的中分子創薬のための技術開発/中分子用シミュレーション技術の開発」と「RNA 標的創薬技術開発/RNA 標的創薬に資する RNA およびその複合体の機能・構造解析基盤技術の開発」のインシリコ技術開発を、まとめて報告する。

(1) 分子動力学(MD)シミュレーションによる薬物ドッキング手法と MD ドッキングによる分子設計手法の開発

我々は、構造の柔軟なタンパク質への薬物ドッキング手法を複数開発している。過去 20 年間、①薬物結合ポケットの開いた硬い酵素と低分子の結合エネルギー計算、②薬物結合ポケットへの実用的な薬物ドッキング、③ポケットに蓋があり、薬物結合に大きな構造変化を要するタンパク質-薬物ドッキング、④タンパク質全体が大きく揺らぎ薬物結合ポケットの形状が不明な場合での中分子のドッキング、そして今、⑤タンパク質を RNA へ置き換え、やや構造の硬い RNA への低分子のドッキングを行っている。タンパク質では、構造の変化しにくい領域や構造変化しやすい領域、共同運動する部位など生物学的な知見が MD 計算で得られており、これらの知見を活かすことで MD 計算を効率化している。しかし RNA での動的性質の知見は少なく、「どうやったら実験と対応する計算が効率的にできるか?」を探索している^(文献)。

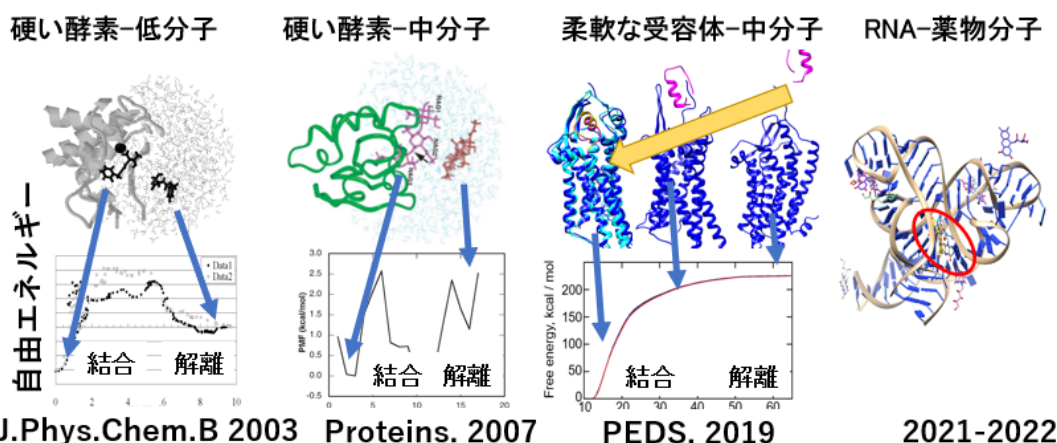


図 我々の標的分子-薬物分子 MDドッキングシミュレーション手法開発の推移

(2) 薬物ドッキング・スクリーニング手法の開発

薬物ドッキング・スクリーニング手法は、中分子や、標的分子の動的構造変化が大きい場合、分子の配座探索が重要となる。また、構造変化する標的との「変動する分子間相互作用を簡易に表現する」には、機械学習も必要と思われ、中分子の膜透過予測を試金石として、分子の配座探索と機械学習法の確立を行った。これを RNA に向けて適用するための、ドッキング理論とドッキングソフトウェアの再構築を行っている。

(3) バイオ DX としての RNA 創薬へ向けて

タンパク質創薬では、30 年間培われた分子シミュレーション計算が、クライオ電顕・X 線結晶解析・溶液 NMR 実験の結果の正当性の確認・意味づけを行い、小さな摂動なら、計算による予測も可能だった。しかし、RNA 創薬のインシリコ手法は、今、歩き始めたばかりであり、タンパク質創薬におけるものと同様な信頼性は期待できない。バイオ実験が与える立体構造、動的構性質、分子間相互作用を手本として、技術を育てる必要がある。そこで、膜透過速度実験を例にとり、インシリコチームの留意すべき点・計算値と実験値の齟齬をどう解釈するか、知見を紹介する。

【文献】 J. Higo, et. al. (2022) to be submitted.

3-3. 「クライオ電子顕微鏡法による中分子シミュレーション技術の開発」の成果

東京医科歯科大学 高等研究院 卓越研究部門 藤吉 好則

①「革新的中分子創薬のための技術開発」に引き続いて、②「RNA 標的創薬技術開発」をクライオ電子顕微鏡法を活用して実施しているので、これらの2つのプロジェクトそれぞれの成果を報告する。

①のプロジェクトにおいて、パラセラーとトランスセラーの輸送機構を理解し、その制御を行う技術開発を行った。「膜透過能を有する構造的特徴を予測する実証に基づくシミュレーション技術開発」では、クロードイン-3とC-CPEとの複合体の構造を解析した結果、3番目のヘリックス上の134番のアミノ酸は27種類のクロードインの全てにおいてP, G, Aの3種類のみのものであり、これらのアミノ酸で制御される3番目のヘリックスの曲りがタイト結合の性質に大きく影響を与えることを見出した(Nature Comms. 10, 816 (2019))。このタイト結合を崩壊させる技術に加えて、形成を促進する中分子を探索して、JIPsと命名した42アミノ酸以下のペプチドを発見することができた(Sci. Adv. 7, eabj6895 (2021))。これらの成果により、タイト結合の崩壊制御と共に結合形成促進という両方向の制御が可能となり、タイト結合の理想的な制御の可能性も出てきた。トランスセラーチャネルとして、ギャップ結合チャネルの研究を進めた。ギャップ結合チャネルは、発生制御、炎症、細胞死、免疫嘔吐、筋収縮などの重要な生理機能に関わっており、重要な創薬標的でもある。3種類の状態でイネキシン-6の構造解析に成功した結果、脂質分子が関わるgatingモデルを提案した(Sci. Adv. eaax3157 (2020))。さらに、ヒト由来のPannexinの構造も複数の状態で解析し、脂質分子が関わるgatingモデルを支持する結果を得た(Sci. Signal. in press (2022))。胃内腔側をpH1にできるほどのプロトン濃度勾配に抗してポンピングできるH⁺, K⁺-ATPaseと胃薬との複合体の構造を解析し、胃薬vonoprazanはクリプトサイトへ結合と、100万倍のH⁺の濃度勾配に逆らってポンピングできる驚異のプロトンポンプの機能を立体構造から詳細に理解できるようになった(Nature, 556, 214-218 (2018), eLIFE, 8 47701 (2019))。同様のATPaseのフリッパーゼATP11Cのほとんどすべての中間体の構造を解析した(JBC, 295, 10180-94 (2020), Cell Reports, 32, 108208 (2020))。さらに、バクテリア由来の電位感受性Ca²⁺チャネルを発見することができた(eLIFE, 9 52828 (2020))。

②のプロジェクトにおいては、クライオ電子顕微鏡を活用してRNAの立体構造解析法やRNA-タンパク質複合体の構造解析法を開発すべく研究を進めている。このプロジェクトに必要とされる、試料調製技術開発、RNA観察のためのクライオ電子顕微鏡システムの高度化、RNA-タンパク質複合体などの構造情報の取得、核膜孔や血液脳関門の透過制御や技術開発、DDSのためと細胞内動態観察のための技術開発などの基盤技術開発を進めている。クライオ電子顕微鏡は比較的大きな構造体の立体構造解析技術は確立しつつあるが、RNAのような小さい分子の構造解析は容易ではないので、小さい分子や動的解析に優れているNMRとの密な連携を進めることによって、切れ目なくRNAの構造情報を取得し、得られた構造を薬剤設計に役立てることを目指している。例えば、急性の心機能障害・痙攣などを病態とする疾患で、突然死に至ることもある脳心筋炎ウイルスに関係するJ-K領域の構造解析をNMR法と連携してクライオ電子顕微鏡での解析も進めている。RNAの類似した構造部分を疑問の余地なく決定するための方法や、J-KドメインとeIF4A, eIF4Gとの複合体構造の高分解能での解析を進めた。また全身性エリテマトーデスに関わるSm/RNP複合体とそれにCd72が結合した複合体などの構造解析も進めている。Pre-miRNAなどのRNAの核膜孔透過機構を理解するために、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析法と電子線トモグラフィー法などを用いた研究を行っている。また同様の技術を活用した血液脳関門の透過制御技術開発も目指して、タイト結合の構造情報を取得する技術や、細胞内動態を観察する技術の開発を進めている。

以上2つの創薬技術開発のために進めてきている研究成果について要点を報告する。