

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03736

研究課題名(和文) 肝虚血・再灌流傷害における多段階多元的傷害進展のメカニズム解析

研究課題名(英文) Study on the mechanism of multistage injury progression in hepatic ischemia / reperfusion injury

研究代表者

森田 直樹 (MORITA, Naoki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・総括研究主幹

研究者番号：60371085

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：マウス肝細胞株では、酸化ストレスや低酸素再酸素化によりポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ(PARP)は活性化され、活性化したPARPによりプログラム細胞死であるパータナトスやネクロプトーシスが誘導される可能性が示された。マウス肝虚血再灌流実験においては肝組織においてPARPの活性化が認められたが、PARP阻害剤によりPARPの活性化は抑制され、血清ASTやASTは有意に抑制されていたことから、PARP阻害剤投与により肝組織の壊死は抑制されることが認められた。PARPの活性化が、様々なプログラム細胞死を誘発し、様々な病態発現に関与している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内ではPARPの活性化がパータナトスを引き起こし、パータナトスは、脳損傷、糖尿病、虚血再灌流障害など、多くの疾患でよく見られる細胞死の一種である。しかし、PARPと各種細胞死や炎症との関係については不明である。本研究では、虚血(低酸素化)によりPARPは活性化されること、PARPの活性化には活性酸素が関与していること、活性化したPARPによりパータナトスやネクロプトーシスといったプログラム細胞死が誘導されることを示し、肝虚血再灌流傷害に関し、新たなタイプの細胞死と傷害の持続・増幅の関係について知見を得た。これらとは別の新たな視点から効果的な虚血再灌流傷害抑制法の一つを示すことができた。

研究成果の概要(英文)：In a mouse hepatocyte cell line, oxidative stress and hypoxic-reoxygenation activated poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), indicating that activated PARP may induce parthanatos and necroptosis, which are programmed cell death. Although activation of PARP was observed in liver tissue in the mouse liver ischemia-reperfusion experiment, PARP activation was suppressed by PARP inhibitor, and serum AST and AST were significantly suppressed, indicating that PARP activation suppressed necrosis of liver tissue by PARP administration. The results indicate that activation of PARP induces various programmed cell deaths and may be involved in the development of various pathological conditions.

研究分野：分子生物学

キーワード：肝虚血・再灌流障害 プログラム細胞死 障害抑制 PARP

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝臓手術後及び肝移植後の傷害を抑える目的で、これまでに肝虚血再灌流傷害のメカニズム解明及び傷害抑制の試みが数多くなされてきた。その中で、特に虚血再灌流中に生じる活性酸素(酸化ストレス)、レドックス感受性分子の役割、それに起因するプログラム細胞死(とりわけアポトーシス)に関する研究が盛んに行われてきた。しかしながら、抗酸化剤、アポトーシス阻害剤のみでは、肝虚血再灌流後の傷害の抑制は十分に得られない。こうした状況下で、肝虚血再灌流傷害抑制に向けた研究は、閉塞感も感じられていた。しかし、虚血再灌流後の傷害を抑制することは、それに引き続く非感染性炎症(sterile inflammation)を抑えることで二次的な傷害の拡大を抑えることにも繋がるため、肝臓以外の脳、心臓などにおいても解決すべき重要な課題である。加えて、近年アポトーシス以外のプログラム細胞死が多数報告されるようになってきた。個々のプログラム細胞死の詳細が徐々に明らかになり、フェロプトーシス、ネクロプトーシス、パイロプトーシス、パータナトス、さらには NETosis といった新たな概念の細胞死が報告されるようになった。このように、細胞死の概念の変化とともに新たな段階に入っている。

2. 研究の目的

外部からの様々なストレスに対して、生体(臓器、細胞)は様々な反応する。細胞に対する強度のストレスは、直接細胞にネクローシスを起こさせる。ストレスに対して細胞は応答を示し、場合によっては、細胞はストレスによりコンディショニングされ、様々な生理的活動を開始させるためプライミングされる。また、ストレスの程度・種類によっては、プログラム細胞死を誘導することになる。その状況に応じて様々なタイプのプログラム細胞死が誘導されることが知られるようになった。様々な細胞死を誘導する分子が相互に作用しあい(場合によっては、バックアップとして働きながら)、細胞死という事象が進んでいく。アポトーシスはネクロプトーシスによってバックアップされていると考えられており、実際我々の実験でもアポトーシスが起こりにくい状態でネクロプトーシスを観察している。同時に、アポトーシスによりアポトーシス誘導因子(AIF)が活性化(核内移行)することで、その後パータナトスという細胞死を誘導し、細胞死を増幅していることも事実である。ところが、このように並行して進んでいく細胞死に関して、殆どの研究は個々の細胞死を直線的に研究しているのみであり、相互の関係あるいは細胞死間の相互作用、細胞死のカスケード的な進行などは殆ど解析されていない。

この様な状況から、具体的には肝虚血再灌流というひとつのストレスにより引き起こされる様々なプログラム細胞死(フェロプトーシス、アポトーシス、ネクロプトーシス、パイロプトーシス、そしてパータナトス)が、どのような機序でどのようなタイミングと規模で誘導・増幅され、非感染性炎症(sterile inflammation)に至るのかということを理解することが重要である。更には、ひとつのストレスがトリガーとなり引き起こされる細胞死ネットワークを理解することで、臓器内・臓器間の傷害連関を理解する礎になるものと期待される。

ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ(PARP)は、一般にDNA修復酵素として知られ、極度のゲノムストレスやDNAの切断によって活性化され、損傷したDNAを持つ細胞の修復プロセスに関与し、細胞を死から守っている。活性化されたPARPはポリ[ADP-リボース](PAR)を産生し、PARPによって触媒的に産生されたPARは、主にDNA修復酵素のリクルートのための足場として機能している。また、PARPやPARは細胞死や炎症などの様々な細胞内イベントに関与していることも知られている。PARPは、様々な細胞で壊死、パータナトス、ネクロプトーシスなどのプログラム細胞死や非プログラム細胞死を促進すると考えられている。過剰に活性化されたPARPは、NAD(+)とATPを消費/枯渇させることによって壊死を直接誘発している。更にPARPは、パータナトスやネクロプトーシスなどの他のタイプのプログラム細胞死と関連していることが示唆されている。プログラム細胞死であるパータナトスは、DNA損傷、PARPの過剰な活性化、PARの産生、それに続くミトコンドリアからのAIFの核移行によって引き起こされる。PARPと受容体相互作用タンパク質(RIP)の相互作用も報告されており、PARP活性化によって別のタイプのプログラム細胞死であるネクロプトーシスが誘導されることを示唆する。しかし、これらの細胞死(ネクローシス、パータナトス、ネクロプトーシス)の相互関係や、虚血/再灌流(I/R)を含む様々な細胞内イベントへの影響は不明な点が多い。

そこで本研究では、低酸素性/虚血性肝細胞/肝臓傷害におけるPARPの関与を検討した。PARP阻害が低酸素/再酸素化(H/R)またはI/R誘発性肝細胞/肝臓傷害の抑制に及ぼす影響を示し、H/Rはカスパーゼ媒介アポトーシスではなく、酸化還元依存性PARP媒介プログラム細胞死、パータナトスおよびネクロプトーシスを誘導することを証明した。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

マウス肝細胞由来AML12細胞は、ATCCより購入した。AML12細胞は、10%ウシ胎児血清(FBS)及び1xITS-Aを添加したダルベッコ改変イーグル(DMEM)/F-12培地で、37°C、5.0%CO₂で培養した。細胞の低酸素状態は、モジュラーインキュベーターチャンバー(Billups-Rothenberg)で、95%N₂/5%CO₂ガス混合物で10分間フラッシュしてからチャンバーを密閉することで作成・

維持した。5時間の低酸素状態の後、チャンバーを開き、低酸素培地（FBS を含まない無グルコース DMEM）を酸素添加培地（10% FBS を添加した高グルコース DMEM 培地 [グルコース; 450 mg/dL]）に交換することで、AML12 細胞を再酸素化した。細胞生存は、xCELLigence システム (Roche) に細胞を播種して判定した。細胞死の評価は、肝細胞から培養培地への LDH の放出を LDH 細胞毒性検出キット (Takara Bio) を使用して測定した。AML12 細胞における AIF の核への移行は、蛍光顕微鏡で免疫細胞化学的に観察した。

(2) AML12 マウス肝細胞における光学プローブによる RIP1-RIP3 相互作用の測定

マウス RIP1 と RIP3 の相互作用を測定するために、スプリットルシフェラーゼ再構成に基づいて作製された光学プローブを用い、再構成された分割したルシフェラーゼの発光強度を、リアルタイム発光測定装置 (Kronos Dio, Atto) を用いることで相互作用をモニタリングした。

(3) 動物実験

マウス (C57BL6/J、雄、12 週齢) は実験前一晩絶食した。全身麻酔は麻酔薬イソフルランの吸入により誘発し、開腹後、肝虚血前にヘパリン硫酸塩 (100 U/kg 体重 [BW]) を静脈注射した。左肝葉および中肝葉のすべての血管 (肝動脈、門脈、胆管) をクランプし、肝虚血の 60 分後にこれらの血管のクランプがすべて解除され、循環が回復した。模擬手術を受けた対照マウスは、PJ34、z-VAD-fmk、または Trolox 投与の有無に関わらず、肝虚血なしで開腹手術および閉鎖を受けた。PJ34 (5 mg/kg BW)、z-VAD-fmk (5 mg/kg BW) または Trolox (50 mg/kg BW) を、肝虚血の 5 分前と 1 分後にマウスの腹腔内に 2 回投与した。マウスは、偽手術および再灌流の 24 時間後に肝臓および血液標本を採取した。総ての動物は、本実験を承認した北海道大学動物実験委員会によって定められた統一方針に従って取り扱われた (#16-0135)。

(4) 虚血後肝傷害の評価

肝臓標本を摘出し、10% ホルマリンで固定しパラフィンに包埋し、H&E で染色した。肝虚血前および肝虚血 24 時間後に、血清アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、および乳酸脱水素酵素 (LDH) の生化学分析を肝傷害の指標として実施した。

4. 研究成果

(1) 低酸素・再酸素化傷害における細胞死

マウス肝細胞株 AML12 細胞を用いた実験においては、H/R により AML12 細胞は細胞死を起こした。そこで、H/R 傷害における細胞死において、PARP とカスパーゼの関与を検討した。PARP 阻害剤 (PJ-34) とカスパーゼ阻害剤 (z-VAD-fmk [zVAD]) を AML12 細胞に添加し H/R 化したところ、明らかに PARP 阻害剤 (PJ-34) の方がカスパーゼ阻害剤 (zVAD) よりも有効に細胞死を抑制した (図 1)。これら結果は、H/R 化による細胞死誘導には、アポトーシスではなくパータナトスが深く関与していることを示唆している。

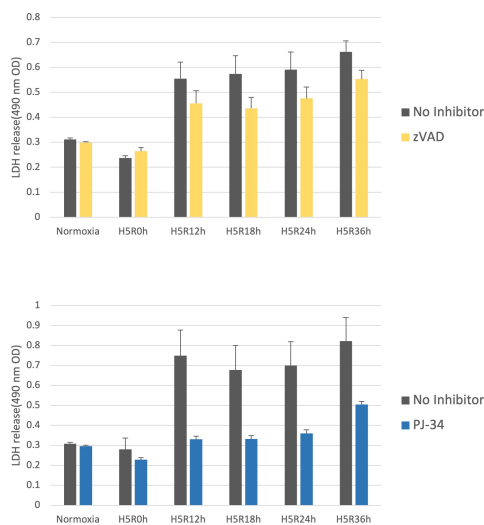


図 1 低酸素・再酸素化における PARP 阻害剤とカスパーゼ阻害剤の影響

(2) 酸化還元状態における PARP の活性化

H/R による PARP の活性化について調べた。PARP の活性化は、PARP の切断と PAR の産生によって評価した。PARP は、in vivo ではカスパーゼ 3 の主な切断ターゲットの 1 つであることが知られており、アポトーシス進行中に 116kDa から 85kDa へ切断される。図 2 左と図 2 中で示す様に、H/R 若しくは PJ34 存在下での H/R では、切断された PARP が観られたが、PJ34 存在下での H/R では PARP の切断は抑制されていた (図 2 右)。また、活性化した PARP が関わる PAR の産生を検討したところ、低酸素状態の前でも PAR の産生が観察されたが、再酸素化後すぐに増加し始め、少なくとも 8 時間増加し続けた (図 2 左)。PAR 産生は PJ34 での前処理によって有意に減少したが、zVAD では減少しなかった (図 2 中、右)。PARP の発現は 5 時間の低酸素状態 (再酸素化 0 時間) にもかかわらず高レベルに維持されたが、 β -アクチンは明らかに減少した (図 2 左、中)。PARP は H/R の 8 時間後に、恐らく H/R によって活性化されたカスパーゼによって部分的に切断されていた。PJ34 による前処理は、PARP 切断に影響を与えることなく、H/R 誘導による PAR 産生を非常に効果的に抑制した (図 2 中)。対照的に、zVAD はカスパーゼ依存的な PARP 切断を明らかに阻害したにも関わらず、PAR 産生には殆ど影響がなかった (図 2 左)。

PARPの活性化にはH/Rが影響を及ぼしていることがわかったため、抗酸化特性を持つビタミンEの類似体であるTroloxが、カスパーゼ活性化と比較してH/R誘導性PAR産生を抑制するかどうかを調べた。Troloxによる前処理は、PARとPARPの産生とその切断を僅かながら有意に抑制した(図3上)。H/R処理はH/R後にカスパーゼ3の活性化

を誘導したが(図3下)、TroloxはH/R誘導性カスパーゼ活性化を抑制しなかった。これらの結果は、H/R誘導性酸化ストレスがカスパーゼではなくPAR産生(すなわちPARP活性化)に寄与していることを示す。

以上の結果は、H/R誘導性酸化ストレスカスパーゼとは独立して、酸化還元依存的にPARPを活性化し、PARを産生したことを示す。

(3) 酸化ストレスとPARPの活性化

AML12マウス肝細胞において、酸化ストレス自体がPARP活性化を介して細胞死を誘導するかどうかを調べた。

H₂O₂ (1 mM) 処理後、8時間以降でカスパーゼ3活性化が起こった。カスパーゼ活性化に応じて、PARPは処理後8~16時間で切断(活性化)され、一方、PARの産生が一時的に減少した。この結果より、H₂O₂刺激8時間以降に起こるPARPの活性化は、カスパーゼ3に関わるアポトーシス機能によるものであると示唆された。

次に、AML12細胞株を使用して、H₂O₂誘導性細胞死に対するPJ34の保護効果を調べた。H₂O₂処理後、肝細胞の細胞死は直ちに(1~2時間)引き起こされ、それは16時間後まで続いた。PJ34は、総ての時点でH₂O₂誘発性細胞死に対して保護効果を示した(図4)。H₂O₂による細胞死の誘発は、カスパーゼが全く活性化されていないH₂O₂処理後2時間でも明らかに起こっていた。これは、H₂O₂誘発性の即時細胞死がカスパーゼによって誘発されていないことを示す。PARの産生は、H₂O₂処理後に顕著に検出されたが、PJ34による前処理によって明らかに阻害された(図4)。

これらのデータは、酸化ストレスがPARP依存的に細胞死を即座に誘発及び促進する可能性があることを示している。

(4) PARPの活性化とパータナトス、ネクロプトーシス

PARPはカスパーゼ活性化に影響せず、アポトーシス細胞死も誘導しなかったため、次に酸化ストレスまたはH/RがPARP活性化を介して他のタイプの細胞死を誘導するかどうかを調べた。

パータナトスによる細胞死を検出するために、細胞質AIFの核移行を免疫細胞化学的に調べた。刺激がない場合、AML12細胞株の核ではAIFは観察されなかった(図5A)。H/RはAML12マウス肝細胞でAIFの核移行を誘導した(図5B矢印)が、これはPJ34によって効果的に阻害された(図5C)。H/RによるAIFの核移行は抗酸化物質Troloxによっても阻害された(図5D)。これらのデータは、パータナトスがH/R(酸化ストレス)/PARP経路を通して誘導されることを示しており、I/R誘導性肝傷害におけるパータナトスの関与を示唆している。

次に、酸化ストレスまたはH/RがPARP活性化を介してネクロプトーシスを誘導するかどうかを調べた。我々は以前、酸化ストレスまたはH/RによりAML12細胞株でネクロプトーシスが誘導されることを報告した。ネクロプトーシスの誘導にはRIP1およびRIP3分子の相互作用が必要であるため、我々は光学プローブを用いてAML12細胞株におけるこれらの分子の相互作用を評

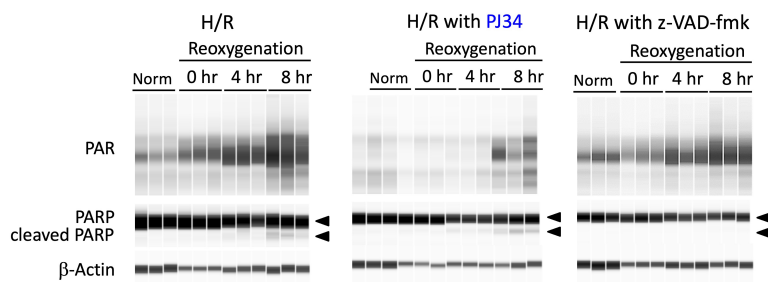


図2 低酸素・再酸素化後のPARP活性化PARP阻害剤とカスパーゼ阻害剤の影響

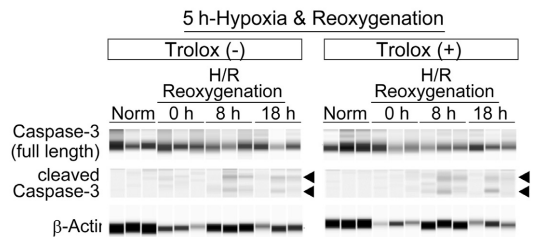
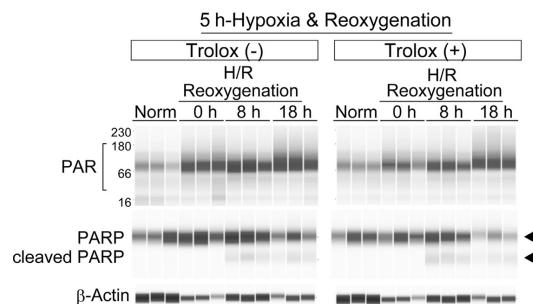


図3 抗酸化剤(Trolox)がPARP活性とカスパーゼ活性に及ぼす影響

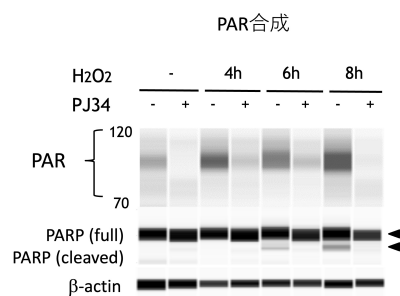


図4 抗酸化剤(Trolox)によるカスパーゼ3への影響

価した。H/R は RIP1-RIP3 相互作用を誘導したが、これも PARP 阻害 (PJ34、図 6 左) または抗酸化剤 (Trolox、図 6 右) によって抑制された。RIP1 と RIP3 は H/R 後に徐々に相互作用し始め、再酸素化後 24 時間以内にピークレベルに達し、少なくとも 36 時間持続した。Trolox は RIP1-RIP3 相互作用を即座に阻害し、H/R 後 36 時間まで十分な効果

を示した。これらの観察結果は、酸化ストレスと PARP が H/R 誘導 RIP1-RIP3 相互作用 (すなわち、ネクロプトーシス) を媒介することを示唆している。PARP 阻害により H/R 後の時点で RIP1-RIP3 相互作用が解離したことから (図 6 左)、PARP は I/R 後の後期に現れる傷害に関与している可能性がある。

PARP 阻害剤 PJ34 は H/R または H₂O₂ によって誘導される AIF 移行及び RIP1-RIP3 相互作用を阻害した。

これは、パータナトスとネクロプトーシスの両方が H/R によって活性化された PARP の下流イベントであったことを示している。したがって、H/R はカスパーゼとは無関係に、酸化還元依存的に活性化された PARP を介してパータナトスとネクロプトーシスを誘導する可能性がある。

(5) マウス肝虚血後の傷害における PARP 阻害の効果

最後に、マウスモデルを使用して、PARP 阻害が zVAD または Trolox と比較して I/R 誘発性肝傷害をどの程度効果的に軽減するかを調べた。

PJ34、zVAD、または Trolox の単独投与では、肝虚血のないコントロール (sham) マウスの血液生化学 (ALT、AST、LDH) に有意な影響は見られなかった。60 分間の肝虚血は、マウスの再灌流から 24 時間後に重度の肝傷害を引き起こした。ALT、AST 及び LDH の血清レベルは、肝 I/R から 24 時間後に著しく増加した。これらの酵素レベルの上昇は、PJ34 及び zVAD または Trolox による治療によって有意かつ十分に抑制された。虚血後肝組織の組織学的検査では、虚血後肝組織の広範囲な壊死の存在が実証された。この肝傷害は、特に PJ34 による前処理によって著しく改善されたが、zVAD または Trolox でも同様に虚血後肝組織の壊死領域が減少していた。

肝臓組織では、虚血がない場合でも、PARP の全長および切断型が微量に検出された。PARP の発現は I/R 直後に明らかに増加したが、PJ34 の前処理により効果的に抑制された。PARP の産生は肝臓 I/R による PARP の増加とともに著しく増加したが、これも PJ34 による前処理により大幅に減少した。これらは、PARP が肝臓 I/R によって確かに活性化され、PJ34 によって効果的に抑制されたことを示している。

マウスを使用した in vivo 実験では、PJ34 が PARP の活性化を抑制することで、肝臓の I/R 誘発性傷害を顕著に防げる可能性を示した。

(6) 結論

本研究では、マウスの虚血/再灌流誘発性肝傷害及び症において PARP が重要な役割を果たしている可能性を初めて実証した。H/R によって開始され、PARP が介在する細胞死 (パータナトス及びネクロプトーシス) はカスパーゼとは独立して起こり、酸化還元依存的に引き起こされるカスパーゼ誘発性細胞死 (アポトーシス) にも重要な関わりがある。H/R によって活性化された PARP は、H/R 後の初期から後期にかけてパータナトスおよびネクロプトーシスを誘発しました。I/R 誘発性肝傷害および炎症における PARP の役割を解明するには、更なる研究が必要であるが、我々の研究結果は、肝臓手術における虚血後肝傷害の病理の理解を深めることに貢献できたと考える。虚血再灌流傷害を引き起こす細胞死のメカニズムをより正確に理解することで、虚血再灌流傷害をより効果的・的確に抑制し、肝臓外科手術後の傷害を軽減することに肝臓外科手術後の傷害軽減に繋がると確信している。

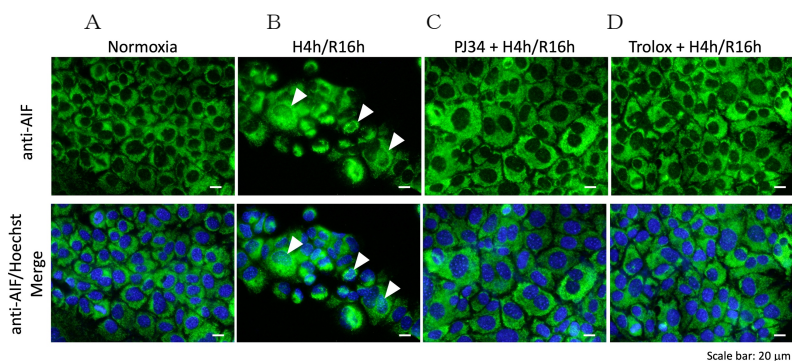


図5 低酸素・再酸素化による AIF の核への移行
Green: AIF, Blue: Nuclei

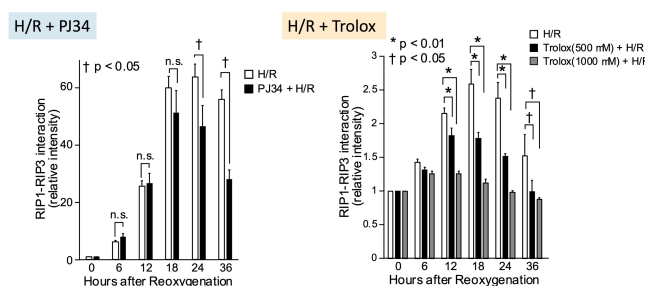


図6 低酸素再酸素化により RIP1-RIP3 結合

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 Haga Sanae, Kanno Akira, Morita Naoki, Jin Shigeki, Matoba Kotaro, Ozawa Takeaki, Ozaki Michitaka	4. 巻 270
2. 論文標題 Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) is Critically Involved in Liver Ischemia/Reperfusion-injury	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Surgical Research	6. 最初と最後の頁 124 ~ 138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jss.2021.09.008	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 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 尾崎 倫孝、芳賀 早苗、森田 直樹、小澤 岳昌
2. 発表標題 光プローブをもちいた肝の酸化ストレスと傷害（プログラム細胞死）の観察と評価
3. 学会等名 第28回肝細胞研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 芳賀 早苗、森田 直樹、伊敏、神 繁樹、尾崎 倫孝
2. 発表標題 肝脂肪化による肝傷害には、種々のプログラム細胞死が関与している可能性がある
3. 学会等名 第42回日本肥満学会・第39回日本肥満症治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 尾崎倫孝、芳賀早苗、浅野真未、菅野憲、小澤岳昌、森田直樹
2. 発表標題 肝虚血再灌流傷害進展における Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 依存性細胞死の解析
3. 学会等名 第27回肝細胞研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 芳賀早苗、森田直樹、小澤岳昌、尾崎倫孝
2. 発表標題 様々な様式の細胞死は、慢性脂肪肝における遷延化した組織傷害に関与する可能性がある
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Michitaka Ozaki, Sanae Haga, Mami Asano, Naoki Morita
2. 発表標題 Poly(ADP-ribose) polymerase plays a critical role in oxidative stress- and hypoxia/reoxygenation-induced programmed cell death in mouse liver cells.
3. 学会等名 The Digital International Liver Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 芳賀早苗、森田直樹、尾崎倫孝
2. 発表標題 Fasリガンド/酸化ストレスによって引き起こされるプログラム細胞死の機序解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 芳賀早苗、浅野真未、森田直樹、尾崎倫孝
2. 発表標題 脂肪肝における易傷害性メカニズム解析の基礎的研究
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 芳賀早苗、森田 直樹、尾崎 倫孝
2. 発表標題 肝虚血再灌流傷害の発生と進展におけるPoly (ADP-ribose) polymerase(PARP)の役割の検討
3. 学会等名 第29回肝細胞研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 芳賀 早苗、森田 直樹、尾崎 倫孝
2. 発表標題 肝虚血再灌流におけるPoly (ADP-ribose) polymerase (PARP)の炎症誘導能の検討
3. 学会等名 第30回肝細胞研究会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	小澤 岳昌 (OZAWA Takeaki) (40302806)	東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・教授 (12601)	
研究分担者	芳賀 早苗 (HAGA Sanae) (60706505)	北海道大学・保健科学研究院・特任講師 (10101)	
研究分担者	尾崎 倫孝 (OZAKI Michitaka) (80256510)	北海道大学・保健科学研究院・教授 (10101)	

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