

令和 2 年 9 月 8 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08819

研究課題名(和文) TSST-1によるオートファジー調節と黄色ブドウ球菌皮膚慢性感染機序の統合的解明

研究課題名(英文) Elucidation of autophagy regulation by TSST-1 integrated with its mechanism on chronic Staphylococcus aureus skin infection

研究代表者

浅野 クリスナ (Krisana, Asano)

弘前大学・医学研究科・教授

研究者番号：70598622

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまで黄色ブドウ球菌が産生する毒性ショック症候群毒素-1 (TSST-1) のオートファジー抑制活性を見出した。本研究では、本菌の慢性皮膚感染メカニズムとTSST-1の役割について研究を行った。この結果、TSST-1がSarABにより温度依存的に調節を受けること、オートファジー抑制はGTPaseのSeptin 7によって仲介されること、上皮細胞で菌の増殖を促進することを明らかにした。マウス皮膚感染モデルでは、TSST-1が組織の損傷と菌の侵入を促進することがわかった。これらの結果は、TSST-1が本菌の持続感染に関与し、慢性感染を促進する可能性があることを示唆していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

黄色ブドウ球菌の慢性感染機序は明らかになっておらず、その解明が待たれている。本研究では、本菌の毒素TSST-1がオートファジー抑制を通して細胞内感染を促進する新しい機序を示すことで、慢性感染機序の一端を明らかにした。この成果は、MRSAをはじめとする多剤耐性黄色ブドウ球菌の感染症予防および治療法開発に貢献し、さらに薬剤耐性菌の原因となる抗生物質に代わる分子標的創薬にもつながる知見を提供する。

研究成果の概要(英文)：Toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) produced by Staphylococcus aureus has been shown to suppress autophagy. Regarding this activity, details in mechanism and a role TSST-1 on chronic skin infection of S. aureus were studied. TSST-1 expression was temperature-dependently regulated by SarAB system. The autophagy suppression mechanism of this toxin was suggested to be mediated by a small GTPase, Septin 7. Live-imaging demonstrated that TSST-1 promotes bacterial number of S. aureus in the epithelial cells. Skin infection in mouse model showed that TSST-1 promotes tissue damage and invasion of S. aureus in the deep dermis layer. These results suggested that TSST-1 may involve in the persistence of S. aureus in the host cells and promote chronic skin infection.

研究分野：細菌学

キーワード：黄色ブドウ球菌 TSST-1 オートファジー 皮膚感染 慢性感染

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は、表層感染から生命に危機を及ぼす深部感染まで、ヒトの様々な感染症の要因となる病原菌である。本菌は従来、細胞外病原体として捉えられてきたが、内皮細胞や上皮細胞といった非貪食性細胞に内在化し生存することが明らかとなってきた。加えて、黄色ブドウ球菌は慢性感染において数週間細胞内に潜伏することも報告されている。申請者らの最近の研究において、黄色ブドウ球菌はオートファゴソーム内局在化と増殖を示す結果を得た。また、毒素性ショック症候群毒素-1 (TSST-1) がオートファゴソーム形成の抑制を通して宿主オートファジーを調節することを示す結果を得た。さらに、宿主細胞内 GTPase の一つである septin7 がこの調節を仲介することを見出した。上記の背景により、TSST-1 はオートファジー調節を通して黄色ブドウ球菌の皮膚慢性感染を促進すると考えられる。しかし、その合目的な役割とメカニズムを理解するにはさらなる研究を要する。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、表皮角化細胞(ケラチノサイト)、およびマウス皮膚感染モデルの系を用いて、各生育条件下での TSST-1 およびその調節遺伝子の発現プロファイルを明らかにし、さらに TSST-1 によるオートファジー調節機序と黄色ブドウ球菌の宿主細胞内潜在化機序を統合的に解析することにより、本菌の皮膚慢性感染メカニズムを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 宿主細胞と培養条件

宿主細胞として、HaCaT(ヒト表皮角化細胞株)と HeLa 229 (ヒト子宮頸癌細胞株)を使用した。HaCaT は 10%ウシ胎児血清(FBS)および 0.03%の L-glutamine を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)にて 37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件で培養した。HeLa 229 は 10%ウシ胎児血清(FBS)および 0.03%の L-glutamine と 1×non-essential amino acids を添加した Eagle's minimal essential medium (MEM)にて 37℃、5% CO<sub>2</sub>の条件で培養した。

#### (2) TSST-1 発現解析

TSST-1 発現病原菌株(834 株)の培養上清および菌体における TSST-1 の発現を解析した。培養上清については、Brain Heart Infusion 培地において各生育条件(細胞密度、温度、pH、塩濃度)培養を行い、吸光度 550nm=1.0 にて培養上清を回収した。タンパク質の濃縮後、ウェスタンブロッティングにより TSST-1 発現を解析した。また菌体については、各温度条件における 3 時間の培養後、菌体を回収し、リアルタイム PCR により TSST-1 ならびにその調節因子(SarA, SarB, SigB, SrrA, SrrB, AgrB,)の発現プロファイルを解析した。

#### (3) TSST-1 オートファジー調節における分子メカニズムの解析

HaCaT 細胞における LC3 および septin7 の発現のサイレンシングを HiPerFect Transfection Reagent (QAIGEN)を用いて行った。サイレンシング 48 時間後に上記発現をリアルタイム PCR およびウェスタンブロッティングで解析した。

#### (4) TSST-1 によるオートファジー調節と黄色ブドウ球菌のケラチノサイト内潜在化動態の解析

オートファゴソーム形成を通してオートファジーを可視化するため、当初はライソトラッカーの導入により実験を行なったが、不調だったため、レンチウイルスベクターを用いて HaCaT 細胞と HeLa 229 細胞に RFP-LC3 を導入した。この細胞をガラスボトムプレートに播種し、YFP ラベルを施した黄色ブドウ球菌を 30 分間感染させた。lysostaphin で宿主細胞外の菌を除去した後、ライブセルイメージングで細胞内のオートファゴソーム形成と菌の動態を解析した。

#### (5) 感染実験用 mTSST-1 非産生、非病原性黄色ブドウ球菌株の培養

RN4220 (TSST-1 非産生、非病原株)と RN+mTSST-1 (RN4220 のスーパー抗原活性欠損 TSST-1 過剰発現株)を用いた。これらを、tryptic soy broth あるいは tryptic soy agar (TSA)にて 37℃、16 時間培養した。その後菌体を回収し、PBS に懸濁した。

#### (6) 黄色ブドウ球菌の宿主細胞内生存における TSST-1 の効果

HeLa 229 細胞を 24well プレートで 16 時間培養した後、上記の黄色ブドウ球菌 RN4220 株と RN+mTSST-1 株を感染させ、30 分後細胞外の菌を lysostaphin で除去した。この後、細胞内菌数を 0 日、3 日、7 日でカウントした。

#### (7) マウス ATG 欠損皮膚感染モデルを用いた黄色ブドウ球菌感染実験

正常マウス(C57BL/6J)および Atg5(オートファジー形成タンパク質)欠損マウスの背部皮膚除毛後、脱毛クリームを 70%エタノールを含ませた綿棒で擦り込むことにより炎症を誘発させた(直径 0.5 cm のスポット x2)。乾燥後、黄色ブドウ球菌 (RN4220 株と RN+mTSST-1 株)をこれらのスポットに感染させた。感染 7 日目に皮膚を採取してパラフィン切片を作製し、グラム染色により菌の分布を検索した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 異なるコンディションにおける TSST-1 発現プロファイルの解析

黄色ブドウ球菌 834 株を各温度、pH 条件の BHI 培地で培養し、TSST-1 の発現を Western blotting で解析した。この結果、温度条件については 40 で TSST-1 の発現が最大となり、42 で発現が消失していた。pH 条件については、pH7.0 で TSST-1 の発現が最大となった。さらに、黄色ブドウ球菌 834 株の BHI 寒天培地上で好気性、微好気性の条件 (6-12% O<sub>2</sub>, 5-8% CO<sub>2</sub>) で培養すると、TSST-1 は微好気性の条件において好気性条件に比べ 3-4 倍高い発現を示した。これらの結果から、黄色ブドウ球菌の細胞内、組織内感染において、TSST-1 は pH7.0、微好気性条件、40 で TSST-1 が高発現することが明らかになった。このメカニズムを解明するため、37 および 40 における TSST-1 発現関連因子の発現を網羅的に定量 RT-PCR で解析した。この結果、37 で TSST-1 発現を抑制する SarA の発現量が 40 で減少し、その上流で SarA を制御する SarR が増加していることが分かった (図 1)。これにより、SarA-SarR が高温条件での TSST-1 発現を制御することを示す結果を得た。

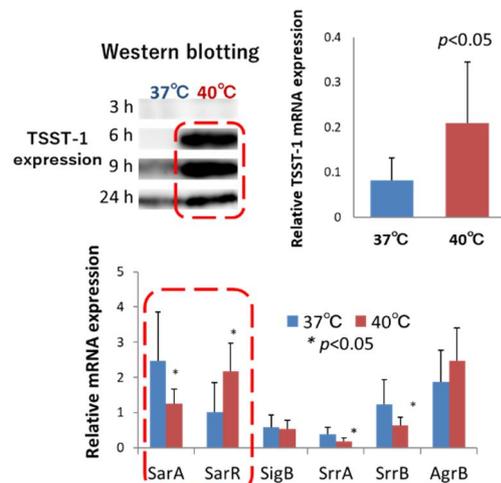


図 1. (A) TSST-1 expression in various conditions detected by Western blotting. (B) Expression of TSST-1-regulators detected by real-time PCR.

##### (2) TSST-1 発現/非発現菌株のオートファジー調節とケラチノサイト内潜在化動態の解析

RFP-LC3 をレンチウイルスにより上皮細胞に感染させ、RFP-LC3 発現細胞を選別し実験に用いた。皮膚由来 HaCaT 細胞に比べ子宮由来 HeLa 229 細胞で強い発現が得られたため、後者を用いた。RFP-LC3/HeLa 229 細胞に YFP 標識黄色ブドウ球菌 (TSST-1 産生株と非産生株) を感染させ、ライブイメージングにより宿主 autophagosome 形成および細菌の局在化と細胞内増殖を検討した。この結果、TSST-1 産生・非産生の両株で autophagosome と細胞質間に菌が局在し、双方の移動がみられたが、TSST-1 産生株においては、より少ない autophagosome 量と、より多い細胞内増殖がみられた (図 2)。このことから TSST-1 のオートファジー抑制と菌の細胞内潜在化促進が示唆された。

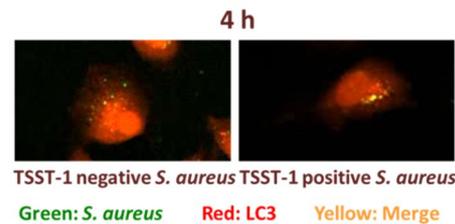


図 2. Effect of TSST-1 on dynamic movement of *S. aureus* in epithelial cells.

##### (3) TSST-1 オートファジー調節における分子メカニズムの解析

TSST-1 は septin7 を介してオートファジーを調節すると考えられる。このメカニズムについて上皮細胞株を用いて解析した。HaCaT 細胞で Septin7 遺伝子をサイレンシングすると、qRT-PCR による LC3 遺伝子の発現が増加した。Western blotting においても、Septin7 遺伝子サイレンシングにおいて LC3B 量がサイレンシング無しに比べて著しく増加していた (図 3)。この結果から、Septin7 はオートファゴソーム形成を調節していることが解明された。

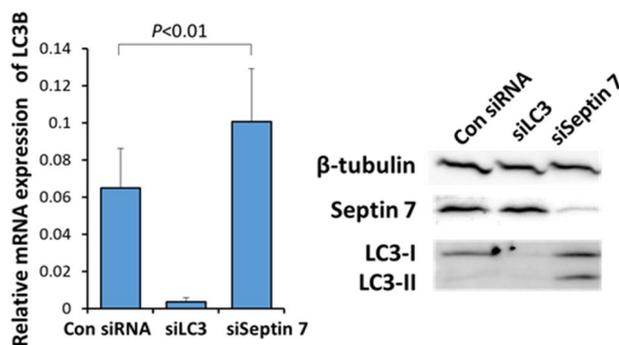


図 3. Relation of Septin 7 with autophagosome formation.

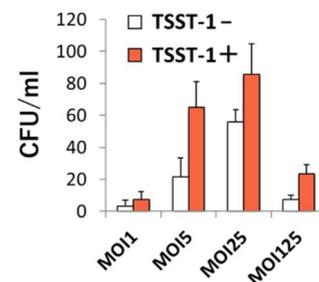


図 4. Effect of TSST-1 on intracellular survival of *S. aureus* in epithelial cells.

#### (4) TSST-1 発現/非発現菌株のケラチノサイト内増殖の解析

TSST-1 産生・非産生の両菌株感染における HeLa 229 細胞内の菌数を解析した。感染後 Day 0, Day 3 の細胞内菌数については、TSST-1 産生・非産生の菌株間で同等だったが、Day 7 では TSST-1 産生株で細胞内菌数が非産生株より有意に多くなり、各感染条件(MOI :1, 5, 25)で同様な結果が得られた(図 4)。これらより、TSST-1 が黄色ブドウ球菌の持続感染に関わることを確認した。

#### (5) マウス皮膚創傷モデル慢性感染動態における潜在化メカニズムの解析

マウス皮膚創傷モデル慢性感染動態における潜在化メカニズムを検証するため、正常マウス (C57BL/6J) および Atg5(オートファジー形成タンパク質)欠損マウスを用いて慢性皮膚感染実験を行った。結果として、正常マウスでは TSST-1 非産生菌株の多くは皮膚表面に留まり、一部が上皮に侵入していたが、皮膚の傷害は確認されなかった。一方、TSST-1 産生菌株では、特に上皮レベルで皮膚の傷害を認め、傷害部での菌の局在を確認した。また、一部は真皮の深部に達していた(図 5)。Atg5 欠損マウスについては、皮膚損傷による肥厚が感染の再現性に影響することが分かったため、現在飼育条件等の改善を検討している。

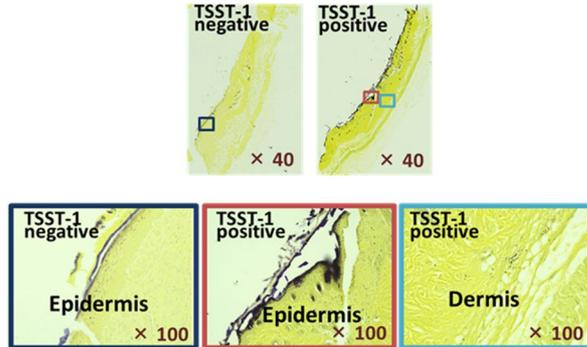


図5. Effect of TSST-1 on skin infection of *S. aureus*.

以上の結果から、TSST-1 が黄色ブドウ球菌の皮膚感染を促進し、これにはオートファジー抑制が関与することが明らかとなった。現在、これらについての人工皮膚モデルを用いた経時的解析、慢性感染化のメカニズムについて検証を進めており、これらを論文として公表する予定である。

#### (6) 総括

これらにより、病原性黄色ブドウ球菌の上皮感染において TSST-1 が宿主 Autophagosome 形成を抑制し、細胞内増殖を促進することが分かった。本研究成果は、黄色ブドウ球菌が宿主オートファジーによる細菌クリアランスを回避するための複雑な機構の一端を明らかにした。この結果から、TSST-1 は MRSA の持続感染にも関わることを考えられ、慢性皮膚感染において、TSST-1 をターゲットとした予防法および治療法が、過剰な抗生物質の使用に代わり有効である可能性がある。今後は、細菌-宿主相互作用に注目した研究をさらに進める予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Narita K, Asano K, Morimoto Y, Igarashi T, Nakane A	4. 巻 13
2. 論文標題 Chronic irradiation with 222-nm UVC light induces neither DNA damage nor epidermal lesions in mouse skin, even at high doses	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0201259
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0201259	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 -
1. 著者名 Asano K, Narita K, Hirose S, Nakane A	4. 巻 207
2. 論文標題 Contribution of toxic shock syndrome toxin-1 to systemic inflammation investigated by a mouse model of cervicovaginal infection with Staphylococcus aureus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Med Microbiol Immunol	6. 最初と最後の頁 297-306
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00430-018-0551-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ono HK, Yoshimura S, Hirose S, Narita K, Tsuboi M, Asano K, Nakane A	4. 巻 18
2. 論文標題 Salmon cartilage proteoglycan attenuates allergic responses in mouse model of papain-induced respiratory inflammation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Med Rep	6. 最初と最後の頁 4058-4064
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mmr.2018.9364	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 -
1. 著者名 Ono HK, Hachiya N, Suzuki Y, Naito I, Hirose S, Asano K, Omoe K, Nakane A, Hu DL	4. 巻 10
2. 論文標題 Development of an Immunoassay for Detection of Staphylococcal Enterotoxin-Like J, A Non-Characterized Toxin	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Toxins (Basel)	6. 最初と最後の頁 pii: E458
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/toxins10110458	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 -

1. 著者名 Narita K, Asano K, Nakane A	4. 巻 206
2. 論文標題 IL-17A plays an important role in protection induced by vaccination with fibronectin-binding domain of fibronectin-binding protein A against Staphylococcus aureus infection	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Med Microbiol Immunol	6. 最初と最後の頁 225-234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00430-017-0499-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Narita K, Asano K, Morimoto Y, Igarashi T, Hamblin MR, Dai T, Nakane A	4. 巻 178
2. 論文標題 Disinfection and healing effects of 222-nm UVC light on methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection in mouse wounds	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Photochem Photobiol B	6. 最初と最後の頁 10-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphotobiol.2017.10.030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Asano K, Takahashi E, Yoshimura S, Nakane A	4. 巻 8
2. 論文標題 Oral administration of salmon cartilage proteoglycan extends the survival of allografts in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomed Rep	6. 最初と最後の頁 37-40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/br.2017.1011	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 -

1. 著者名 Hirose S, Narita K, Asano K, Nakane A	4. 巻 4
2. 論文標題 Salmon cartilage proteoglycan promotes the healing process of Staphylococcus aureus-infected wound	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e00587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2018.e00587	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 -

1. 著者名 Ono HK, Hirose S, Narita K, Sugiyama M, Asano K, Hu DL, Nakane A.	4. 巻 15
2. 論文標題 Histamine Release From Intestinal Mast Cells Induced by Staphylococcal Enterotoxin A (SEA) Evokes Vomiting Reflex in Common Marmoset	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS Pathog	6. 最初と最後の頁 e1007803
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1007803	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 -

1. 著者名 Narita K, Hu DL, Asano K, Nakane A	4. 巻 87
2. 論文標題 Interleukin-10 (IL-10) produced by mutant toxic shock syndrome toxin 1 vaccine-induced memory T cells downregulates IL-17 production and abrogates the protective effect against Staphylococcus aureus infection.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Infect Immun.	6. 最初と最後の頁 e00494-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/IAI.00494-19	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 -

1. 著者名 Narita K, Asano K, Naito K, Ohashi H, Sasaki M, Morimoto Y, Igarashi T, Nakane A.	4. 巻 S0195-6701
2. 論文標題 222-nm UVC inactivates a wide spectrum of microbial pathogens.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Hosp Infect.	6. 最初と最後の頁 30129-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.jhin.2020.03.030.	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14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 吉村 小百合、浅野 クリスナ、中根 明夫
2. 発表標題 マウス異系同種皮膚移植片に対するサケ鼻軟骨プロテオグリカン経口投与による改善効果
3. 学会等名 第72回 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Krisana Asano and Akio Nakane
2. 発表標題 Establishment of a mouse cervicovaginal infection model to investigate the role of toxic shock syndrome toxin-1 on uterine infection of Staphylococcus aureus
3. 学会等名 第63回日本ブドウ球菌研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Krisana Asano and Akio Nakane
2. 発表標題 Contribution of toxic shock syndrome toxin-1 to tampon-related toxic shock syndrome investigated by a mouse model of cervicovaginal infection
3. 学会等名 18th International symposium on staphylococci and staphylococcal infections (ISSSI 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akio Nakane, Krisana Asano
2. 発表標題 Contribution of toxic shock syndrome toxin-1 to systemic inflammation investigated by a mouse model of cervicovaginal infection with Staphylococcus aureus
3. 学会等名 平成30年度 東北乳酸菌研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Krisana Asano and Akio Nakane
2. 発表標題 Impact of toxic shock syndrome toxin-1 on autophagy and skin infection of Staphylococcus aureus
3. 学会等名 The 8th International Symposium on Autophagy (ISA) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中根明夫、浅野クリスナ
2. 発表標題 抗ActAおよび抗リステリオリシンO抗体の受動免疫はListeria monocytogenes感染に対する防御効果を提供する
3. 学会等名 平成29年度 東北乳酸菌研究会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Krisana Asano and Akio Nakane
2. 発表標題 Effect of toxic shock syndrome toxin-1 on Staphylococcus aureus infections in cervical and skin mouse models
3. 学会等名 第71回日本細菌学会東北支部総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Krisana Asano, Akio Nakane
2. 発表標題 ブドウ球菌毒素性ショック症候群毒素(TSST-1)の新たな病原機構
3. 学会等名 第62回日本ブドウ球菌研究会抄録
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 浅野クリスナ、中根明夫
2. 発表標題 Systemic distribution of TSST-1 investigated by vaginocervical infection of mouse model
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Asano K, Nakane A
2. 発表標題 Role of toxic shock syndrome toxin-1 on tampon-related toxic shock syndrome.
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Asano K, Hirose S, Narita K, Nakane A
2. 発表標題 Pathogenesis of extracellular vesicles derived from Staphylococcus aureus.
3. 学会等名 第64回日本ブドウ球菌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Asano K, Hirose S, Narita K, Nakane A.
2. 発表標題 Extracellular vesicles from Staphylococcus aureus stimulate inflammatory response and induce host cell death
3. 学会等名 第73回細菌学会支部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Asano K, Yoshimura S, Narita K, Hirose S, Takahashi T, Ito K, Iddamalgoda A, Nakane A.
2. 発表標題 Alteration of intestinal microbiota in mice orally administered with salmon cartilage proteoglycan, a prophylactic agent.
3. 学会等名 The 11th International Conference on Proteoglycans (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Asano K, Hirose S, Narita K, Nakane A.
2. 発表標題 Microvesicles released from Staphylococcus aureus induce inflammatory response and pyroptosis
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020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
連携研究者	中根 明夫  (Nakane Akio)  (30164239)	弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・教授   (11101)	
連携研究者	成田 浩司  (Narita Kouji)  (30419220)	弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・助教   (11101)	
連携研究者	廣瀬 昌平  (Hirose Shouhei)  (20722218)	弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・助手   (11101)	
連携研究者	岡田 貴志  (Okada Takashi)  (00506503)	弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助手   (11101)	