

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15488

研究課題名(和文) 遺伝子レスキューマウス解析によるNASH発症を制御する組織・細胞Nrf2の役割解明

研究課題名(英文) The role of Nrf2 in development and carcinogenesis of NASH using gene rescue mice

研究代表者

石毛 和紀 (ISHIGE, Kazunori)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：20597918

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：Sqstm1/Nrf2遺伝子二重欠失マウス(DKOマウス)はNASHを自然発症する。このマウスのNASH発症進展には、肝クッパー細胞のLPSへの過感受性による炎症シグナル活性化を基礎に、腸管内のLPS産生増加、腸管透過性亢進による血清LPS増加、内臓脂肪炎症によるシグナルなど、LPSを中心とする炎症シグナルに肝のみならず、腸管、内臓脂肪など多数の臓器が複雑に関与していると推測された。今後、臓器特異的Nrf2レスキューマウスの表現型をDKOマウスと比較解析しNrf2活性化剤を併用しながら、各臓器のNASHへの病態や全身のLPSおよび炎症シグナル活性化への関連を探求していく予定である。

研究成果の概要(英文)：We generated Sqstm1 and Nrf2 double knockout (DKO) mice and demonstrated that these DKO mice developed mature-onset steatohepatitis. We revealed the mechanism for the development of steatohepatitis in DKO mice as follows: (1) Deficiency of Nrf2 led to hypersensitivity to endotoxin of Kupffer cells and resulted in inflammatory response in the DKO livers. (2) Acceleration of intestinal permeability caused by down-regulation of Zo-1 and Claudin1 in Nrf2 deficiency and increased endotoxin from intestinal microbiota by Sqstm1 deficiency led to an overload of serum endotoxin. (3) These hyper-endotoxemia drove inflammatory signaling in livers directly, and also led to inflammation of adipose tissue. (4) These enhanced inflammatory signaling could cause progression of steatohepatitis in DKO livers. We plan to compare DKO and Nrf2 gene rescued mice, and research the detail of the mechanism for development of NASH and the contribution of each organ in the near future.

研究分野：消化器内科

キーワード：生活習慣病 臓器レスキューマウス 脂肪性肝炎

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 肥満者の約 3 割は非アルコール性脂肪性肝疾患 (Nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD) と称される脂肪肝を伴う慢性進行性の肝障害に罹患している。NAFLD の 10-20% には肝硬変、肝癌へ進行する Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) が含まれ、積極的な医療介入が必要である。

(2) 単純性脂肪肝を基に炎症、線維化を来す NASH への進展機序は未解明である。全身の脂肪酸代謝異常による肝細胞への脂肪沈着、脂肪毒性に加え、腸内細菌叢異常、内臓脂肪からの炎症シグナル、小胞体ストレスや酸化ストレスなど肝のみならず全身の多様な因子が関与する「Multiple parallel hits hypothesis」が提唱され支持されている (Hepatology, 2010)。

(3) NASH の発症進展メカニズムを探索するためには良質な動物疾患モデルが必要不可欠である。しかし、従来の NASH 病態動物は、肥満を伴わなかったり、若年時から急激に病変が進展するなど、ヒトの病態とは乖離していた。

(4) 我々はヒト NASH に類似し、通常食の過食による肥満と単純性脂肪肝から経時的に NASH を発症し、肝発癌を随伴する *Sqstm1/Nrf2* 遺伝子二重欠失マウスを作製した。

### 2. 研究の目的

(1) ヒト NASH に類似する *Sqstm1/Nrf2* 遺伝子二重欠失マウスを用いて、多因子が発症に関与する NASH 病態を臓器連関の観点から、肝のみならず腸管、内臓脂肪の解析を行い、NASH 発症メカニズムを探索する。

(2) *Sqstm1/Nrf2* 二重欠失マウスをベースに、肝、腸管、内臓脂肪、骨髄細胞の組織特異的 *Nrf2* レスキューマウスを作製し、各レスキューマウスと全身欠失マウスを比較観察する。NASH と肝発癌を制御する *Nrf2* について、組織別に発現の重要性の観点より考察する。

### 3. 研究の方法

(1) 動物実験: 野生型 (WT), *Nrf2* 欠失, *Sqstm1* 欠失, *Sqstm1/Nrf2* 二重欠失 (DKO) の 8 週齢, 30 週齢マウスより、血液、肝臓、腸管、内臓脂肪、糞便を採取した。

(2) 生化学的検討: 空腹時血糖と血中インスリンより HOMA-IR を算出し、インスリン抵抗性の指標とした。血中と糞便中の LPS 濃度を Pyrochrome LAL kit を用いて測定した。

(3) 腸内細菌叢: 各種マウスの腸内細菌を糞便の PCR で比較解析した。

(4) 腸管透過性試験: 各種マウスの絶食後に、FITC デキストラン 0.5mg/kg を経口投与し、経時的に血中の FITC デキストランの濃度を測定した。

(5) 臓器の炎症シグナル活性化: 各種マウスの肝および内臓脂肪から mRNA を抽出し、定量的 PCR で炎症シグナル (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ,

IL-6) を解析した。

(6) クッパー細胞の機能解析: 各種マウス肝からコラゲナーゼ灌流により非実質細胞を分取し、FACS によりクッパー細胞を分離後、LPS 投与による炎症細胞シグナル活性化を定量的 PCR で解析した。

(7) マクロファージの *Sqstm1* および *Nrf2* ノックアウトによる自然免疫機能解析:

CRISPR/Cas9 システムを用いて RAW264.7 細胞の *Sqstm1* および *Nrf2* をノックアウトし、定常状態および LPS 投与後の炎症シグナルを定量的 PCR および Immunoblot で解析した。

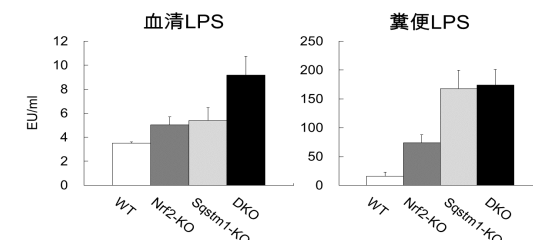
(8) 腸管細胞の *Sqstm1* および *Nrf2* ノックアウトによる腸管バリア機能の解析:

CRISPR/Cas9 システムを用いて Caco2 細胞の *Sqstm1* および *Nrf2* をノックアウトし、タイトジャンクション蛋白発現を Immunoblot で解析した。また、Caco2 細胞を 0.4mm ポリエチレンテレフタレート膜に播種し細胞を分化させ、電気抵抗を Millicell-ERS 電気抵抗システム (Millipore) を用いて測定した。

(9) 組織特異的 *Nrf2* レスキューマウスの作製: *Nrf2* 遺伝子の第 2 イントロンに、*LoxP* 配列で挟まれた転写終結シグナルおよび *polyA* 付加シグナル配列を挿入したノックインマウス (*Nrf2*<sup>K1/K1</sup>) を作製し、この *Nrf2*<sup>K1/K1</sup> マウスを、*Sqstm1*<sup>-/-</sup> マウスと交配して、*Sqstm1*<sup>K1/K1/Nrf2</sup><sup>-/-</sup> マウスを得た。このマウスは、全身で *Sqstm1* および *Nrf2* 遺伝子が二重欠損しており NASH を発症する。次に、組織特異的に *Nrf2* の発現をレスキューするために、上記 *Sqstm1*<sup>K1/K1/Nrf2</sup><sup>-/-</sup> マウスを、組織特異的に *Cre* リコンビナーゼを発現するマウスと交配する。これにより生まれる仔は、*Cre* が発現する組織でのみ *LoxP* で挟まれた転写終結シグナルおよび *polyA* 付加シグナルが除去されるため、*Nrf2* の発現が組織特異的にレスキューされる。本研究では、腸上皮、肝細胞、脂肪細胞、骨髄系細胞 (M $\phi$ , Kupffer 細胞)、特異的 *Nrf2* レスキューマウスを作製するために、それぞれ CK19-Cre, Albumin-Cre,  $\alpha$ P2-Cre, Lyz2-Cre マウスを用いた。

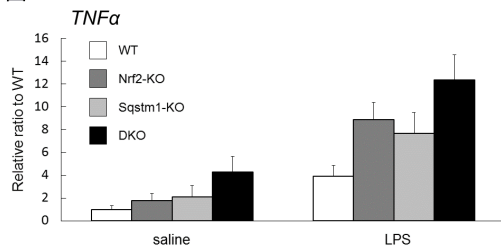
### 4. 研究成果

(1) DKO マウスにおける血中 LPS 増加: 8 週齢では 4 群で差を認めなかったが、30 週齢では糞便中の LPS 濃度が *Sqstm1* 欠失, DKO マウスで増加し、血清中 LPS 濃度は DKO マウスのみで有意に増加した (図 1)。また、DKO マウスの腸内細菌叢は、他に比較して LPS を産生するグラム陰性菌の割合が増加していた (図 2)。更に、*Nrf2* 欠失および DKO マウスは腸管透過性が亢進していた (図 3)。



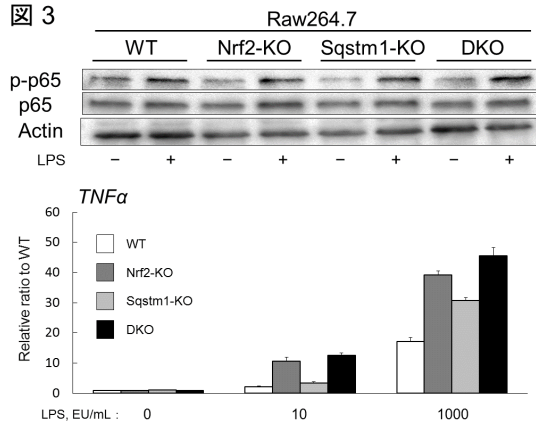
(2) DKO マウスにおける臓器炎症シグナル活性化：30 週齢の DKO マウスでは、肝および内臓脂肪における TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 などの炎症シグナル遺伝子の有意な活性化が認められた。更に、DKO マウス肝では病理学的に脂肪化・炎症などの変化が認められない 8 週齢においても炎症シグナルの活性化が有意であった。8 週齢の若年 DKO マウスから分離した初代培養クッパー細胞では、TNF- $\alpha$  の基礎発現および LPS 投与による反応が増加しており（図 2）、この時点で DKO マウス肝炎症シグナルが活性化していることが確認された。

図 2



(3) Nrf2 ノックアウトによる自然免疫-炎症シグナル活性化：Nrf2 をノックアウトした培養マクロファージ RAW264.7 細胞では、TNF- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  の基礎発現は変わらないものの、LPS 投与による発現増加-炎症シグナル活性化が有意であった。また、p65 の基礎蛋白発現は変化がないものの、Nrf2 をノックアウトした RAW264.7 細胞ではリン酸化 p65 の LPS 投与に対する発現が有意に増加していた。この変化は Nrf2 と Sqstm1 を二重に欠失させても同様に認められた（図 3）。

図 3



(4) Nrf2 ノックアウトによる腸管タイトジャンクション蛋白発現変化による透過性亢進：Nrf2 をノックアウトした培養小腸細胞 Caco2 では、腸管タイトジャンクション蛋白である Zo-1、Claudin1 の蛋白発現が有意に低下していた（図 4）。また、Millicell-ERS 電気抵抗システムによる細胞での電気抵抗を測定すると、Nrf2 をノックアウトした Caco2 細胞では有意に低下し透過性が亢進していた（図 5）。

図 4

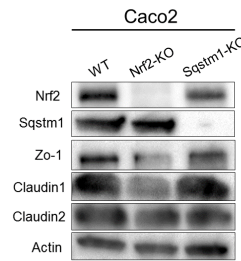
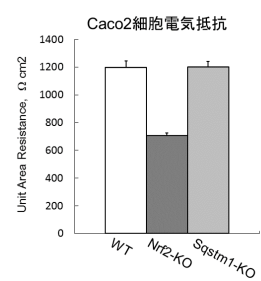


図 5



(5) 組織特異的 Nrf2 レスキューマウスの作製：全身での Sqstm1 と Nrf2 遺伝子二重欠損下において、組織特異的に Nrf2 の発現をレスキューするために、現在 Sqstm1<sup>K1/K</sup>/Nrf2<sup>-/-</sup>マウスを、組織特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウスと交配している。今後、腸上皮、肝細胞、脂肪細胞、骨髄系細胞（M $\phi$ 、Kupffer 細胞）の臓器特異的 Nrf2 レスキューマウスを繁殖させ DKO マウスと比較解析し、表現型を比較する予定である。

以上の結果から、DKO マウスの NASH 発症進展には、以下のメカニズムが推測される。病理学的に NASH が発症する以前から肝の炎症シグナルが活性化していること、Nrf2 欠失がマクロファージの LPS の感受性を増加させることより、まず、肝臓へ流入してくる LPS により DKO のクッパー細胞の炎症が惹起され、若齢から存在するインスリン抵抗性がその炎症を加速させる。Sqstm1 欠失により糞便中のグラム陰性菌が増加し腸管内の LPS 産生が増加し、さらに Nrf2 欠失が腸管透過性を亢進させることにより、DKO マウスでは肝臓へ流入してくる LPS が増大し肝炎症を増悪させる。内臓脂肪からの炎症シグナルが肝炎症を更に増大させる、と考えられる。これら多臓器のネットワークが関与する LPS を中心とした免疫反応と炎症シグナルの活性化が NASH 病態の発症進展に重要な役割を演じていると推測された。今後、臓器特異的 Nrf2 レスキューマウスの表現型を DKO マウスと比較解析し、各臓器の NASH への病態や全身の LPS および炎症シグナル活性化への関連を探索していく予定である。（本研究の成果は論文作成中である）。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

- (1) 高木 薫子, 長谷川 直之, 新里 悠輔, 山浦 正道, 小松 義希, 俣野 大介, 岩井 健太郎, 江南 ちあき, 石毛 和紀, 福田 邦明, 奈良坂 俊明, 金子 剛, 安部 井 誠人, 兵頭 一之介, 溝上 裕士 陽子線による放射線性十二指腸炎からの出血に対してアルゴンプラズマ凝固法が有用であった 1 例 Progress of Digestive Endoscopy 89, 106-107, 2016. (査読無)

- (2) 田地 広明, 會田 有香, 大澤 翔, 北沢 晴奈, 中嶋 真之, 渡辺 裕子, 塩澤 利博, 中澤 健介, 増子 裕典, 小川 良子, 際本 拓未, 松野 洋輔, 川口 未央, 森島 祐子, 坂本 透, 家城 隆次, 檜澤 伸之, 石毛 和紀, 坂下 信悟, 野口 雅之, 後藤 行延, 佐藤 幸夫, 関根 郁夫 小細胞肺癌へ転化し、EGFR 遺伝子変異検索が鑑別に有用であった肺腺癌の1例 肺癌 56, 321-322, 2016. (査読無)
- (3) Ito S, Kimura S, Warabi E, Kawachi Y, Yamatoji M, Uchida F, Ishibashi-Kanno N, Yamagata K, Hasegawa S, Shoda J, Tabuchi K, Sakai S, Bukawa H, Sekido M, Yanagawa T. p62 modulates the intrinsic signaling of UVB-induced apoptosis. J Dermatol Sci 74, 9-17, 2016. (査読有)
- (4) Oh S, So R, Shida T, Matsuo T, Kim B, Akiyama K, Isobe T, Okamoto Y, Tanaka K, Shoda J. High-intensity aerobic exercise improves both hepatic fat content and stiffness in sedentary obese men with non-alcoholic fatty liver disease: A randomized controlled study. Sci Rep 7, 43029, 2016. (査読有)
- (5) Shoda J, Matsuda A, Shida T, Yamamoto M, Nagino M, Tsuyuguchi T, Yasaka T, Tazuma S, Uchiyama K, Unno M, Ohkohchi N, Nakanuma Y, Kuno A, Narimatsu H. Wisteria floribunda Agglutinin-Sialylated Mucin Core Polypeptide 1 is a Sensitive Biomarker for Biliary Tract Carcinoma and Intrahepatic Cholangiocarcinoma: A Multicenter Study. J Gastroenterology 52, 218-228, 2016. (査読有)
- (6) Yamaguchi T, Yokoyama Y, Ebata T, Matsuda A, Kuno A, Ikehara Y, Narimatsu H, Shoda J, Nagino M. Verification of WFA-sialylated MUC1 as a sensitive biliary biomarker for human biliary tract cancer. Anal Sug Oncol 23, 671-7, 2016. (査読有)
- (7) Horie M, Warabi E, Komine S, Oh S, Shoda J. Cytoprotective Role of Nrf2 in Electrical Pulse Stimulated C2C12 Myotube. PLoS One 10, 12, 2015. (査読有)
- (8) Oh S, Tanaka K, Chiaki K, Tsujimoto T, So R, Shida T, Shoda J. Total Volume of Moderate-Vigorous Physical Activity a Week is an Important Factor Improving the Pathophysiology of Obesity-Related Liver Disease. Hepatology 61, 1205-15, 2015. (査読有)
- (9) 志田隆史, 磯辺智範, 呉 世昶, 上牧 隆, 岡本嘉一, 安藤浩樹, 正田純一 FibroScan502の肝脂肪量測定による非アルコール性脂肪性肝疾患の非侵襲的診断法の有用性について 日本超音波技師学会雑誌 40, 167-173, 2015. (査読有)
- (10) Kawamoto T, Thomas M, Yamashita-Kashima Y, Shu S, Ishikura N, Ariizumi S, Yamamoto M, Kurosaki K, Shoda J. Overexpression and Gene Amplification of HER1, HER2 and HER3 in Biliary Tract Carcinomas and the Possibility for Therapy with a HER2-Targeting Antibody Pertuzumab. J Gastroenterol 50, 467-479, 2015. (査読有)
- (11) Oh S, Shida T, Ikeda A, Maruyama T, Eguchi K, Isobe T, Okamoto Y, Arai E, Shiba N, Shoda J. Therapeutic effect of hybrid training of voluntary and electrical muscle contractions on middle-aged obese women with NAFLD: a pilot study. Ther Clin Risk Manag 11, 371-380, 2015. (査読有)
- (12) Suzuki H, Roa JC, Kawamoto T, Ishige K, Shoda J, Wistuba II, Li D, Thomas MB. Expression of insulin-like growth factor receptor (IGFR) as a useful biomarker for predicting prognosis in biliary tract cancer patients. Mol & Clin Oncol 3, 464-470, 2015. (査読有)
- [学会発表](計 15 件)
- (1) 内田 優一, 長谷川 直之, 石毛 和紀, 福田 邦明, 奈良坂 俊明, 金子 剛, 安部井 誠人, 溝上 裕士, 兵頭 一之介 内視鏡的経胃ドレナージ・経乳頭ドレナージ、経皮的ドレナージを組み合わせた治療が有用であった慢性膵炎後膵仮性嚢胞の一例 第103回日本消化器内視鏡学会関東支部会 2016年12月17日~2016年12月18日 シェーンバツハサポー, 東京
- (2) 野中 遥奈, 田島 大樹, 廣瀬 優, 山浦 正道, 菅沼 大輔, 佐藤 雅志, 内田 優一, 山田 武史, 山本 祥之, 長谷川 直之, 石毛 和紀, 金子 剛, 鈴木 英雄, 奈良坂 俊明, 福田 邦明, 安部井 誠人, 兵頭 一之介, 溝上 裕士 ダビガトランによる剥離性食道炎を伴った食道表在癌の1例 第103回日本消化器内視鏡学会関東支部会 2016年12月17日~2016年12月18日 シェーンバツハサポー, 東京
- (3) 高木 薫子, 長谷川 直之, 新里 悠輔, 山浦 正道, 小松 義希, 俣野 大介, 岩井 健太郎, 江南 ちあき, 石毛 和紀, 福田 邦明, 奈良坂 俊明, 金子 剛, 安部井 誠人, 溝上 裕士, 兵頭 一之介 陽子線による放射線性十二指腸炎からの出血に対してアルゴンプラズマ凝固法(APC)が有用であった一例 第102回日本消化器内視鏡学会関東支部会 2016年12月17日~2016年12月18日 シェーンバツハサポー, 東京

- (4) 奈良坂 俊明, 溝上 裕士, 俣野 大介, 岩井 健太郎, 江南 ちあき, 寺崎 正彦, 坏 大輔, 長谷川 直之, 石毛 和紀, 金子 剛, 鈴木 英雄, 福田 邦明, 松井 裕史, 兵頭 一之介 抗凝固薬による薬剤性食道炎の検討 第 92 回日本消化器内視鏡学会総会 2016 年 11 月 03 日 ~ 2016 年 11 月 06 日 神戸コンベンションセンター, 兵庫県神戸市
- (5) 福田 邦明, 森 健作, 長谷川 直之, 石毛 和紀, 那須 克宏, 安部井誠人, 南学, 兵頭 一之介 肝癌ラジオ波焼灼術における SPIO-MRI の有用性 第 58 回日本消化器病学会大会 2016 年 11 月 03 日 ~ 2016 年 11 月 06 日 神戸コンベンションセンター, 兵庫県神戸市
- (6) 佐藤 雅志, 長谷川 直之, 松田 健二, 橋本 真治, 石毛 和紀, 福田邦明, 西雅明, 川西 宣裕, 松木 康彦, 安部井誠人, 溝上 裕士, 兵頭 一之介 胆道癌に関連した後天性血友病の 2 例 胆道 2016 年 09 月 29 日 ~ 2016 年 09 月 30 日 新横浜プリンスホテル, 神奈川県横浜市
- (7) 奈良坂 俊明, 石毛 和紀, 長谷川 直之, 坏 大輔, 溝上 裕士 安全で確実な内視鏡診療のためのリスクマネジメント 当院における内視鏡リスクマネジメント 第 102 回日本消化器内視鏡学会関東支部会 2016 年 06 月 11 日 ~ 2016 年 06 月 12 日 シェーンバツハサボー, 東京
- (8) 志田隆史, 丸山 剛, 呉 世昶, 秋山健太郎, 澤井朱美, 福元喜啓, 磯辺智範, 平野雄二, 岡本嘉一, 正田純一. 超音波を用いた非アルコール性脂肪性肝疾患における骨格筋異常の解析. 日本超音波医学会第 89 回学術集会 2016 年 05 月 27 日 ~ 2016 年 05 月 29 日 国立京都国際会館, 京都府京都市
- (9) 呉 世昶, 石原瑞穂, 志田隆史, 正田純一 骨格筋が非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) における代謝病態因子に及ぼす影響 第 52 回日本肝臓学会総会 2016 年 05 月 19 日 ~ 2016 年 05 月 20 日 ホテルニューオータニ幕張, 千葉県千葉市
- (10) 蘇 リナ, 田中喜代次, 正田純一 非アルコール性脂肪性肝疾患に効果的な運動プログラムの検討-前向きランダム化比較試験より- 第 52 回日本肝臓学会総会 2016 年 05 月 19 日 ~ 2016 年 05 月 20 日 ホテルニューオータニ幕張, 千葉県千葉市
- (11) 志田隆史, 秋山健太郎, 内田文彦, 蘇 リナ, 呉 世昶, 田中弘教, 飯島尋子, 正田純一. NAFLD に随伴する中高度肥満と糖尿病が Kupffer 細胞機能に及ぼす影

響と運動療法の効果. 第 102 回日本消化器病学会総会 2016 年 04 月 21 日 ~ 2016 年 04 月 23 日 京王プラザホテル, 東京

- (12) 秋山健太郎, 蕨 栄治, 正田純一 非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)自然発症マウスにおける Kupffer 細胞の表現形質 の変化と発症機序との関連性. 第 102 回日本消化器病学会総会 2016 年 04 月 21 日 ~ 2016 年 04 月 23 日 京王プラザホテル, 東京
- (13) Ikeuchi M, Warabi E, Nagaoka T, Ariizumi S, Yamamoto M, Shoda J. The effect of female hormones on NAFLD in p62 knockout mice. 25th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver(国際学会) 2016 年 02 月 23 日 ~ 2016 年 02 月 23 日 International Convention Center Pampir, Tokyo, Japan
- (14) Akiyama K, Warabi E, Okada K, Ariizumi S, Yamamoto M, Shoda J. p62:Nrf2 double knockout mice develop steatohepatitis through the serum endotoxin overload. 25th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (国際学会) 2016 年 02 月 23 日 ~ 2016 年 02 月 23 日 International Convention Center Pampir, Tokyo, Japan
- (15) 秋山健太郎, 蕨 栄治, 岡田浩介, 正田純一 p62: Nrf2 遺伝子二重欠損マウスは血清中エンドトキシンが増加し, 脂肪性肝炎を発症する. 第 88 回日本生化学会大会 2015 年 12 月 08 日 ~ 2015 年 12 月 10 日 神戸国際会議場, 兵庫県神戸市

〔図書〕(計 7 件)

- (1) 川本 徹, 山本雅一, 正田純一 メディカルビュー社 肝胆膵 HER family: 肝内胆管癌の potential drug targets 107-114, 2016
- (2) 正田純一 日本消化器病学会 肥満の治療 10-12, 2016
- (3) Shoda J, Warabi E, Okada K, Yamamoto M. Springer New Horizon of Herbal Medicines 207-224, 2016
- (4) 正田純一 医学書院 今日の治療指針 2017 37-39, 2016
- (5) 正田純一 金原出版 肥満と消化器疾患 市民向けガイド 10-12, 2016
- (6) 正田純一 医学と薬学 結石症の診断と治療 1491-95, 2016
- (7) 正田純一 中外医学社 胆汁酸とその分画 新・検査値のみかた 51, 2015

〔産業財産権〕

○取得状況 (計 1 件)

名称: 非アルコール性脂肪性肝炎および肝腫瘍自然発症モデルとしての p62 : Nrf2 遺伝子二重欠損マウスおよび該マウスを用いた方

法

発明者：藤 栄治，正田純一，岡田浩介，柳川 徹，山本雅之  
権利者：国立大学法人 筑波大学  
種類：発明特許  
番号：第 6020791  
取得年月日：平成 28 年 10 月 14 日  
国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石毛 和紀 (ISHIGE, Kazunori)  
筑波大学・医学医療系・講師  
研究者番号：20597918

### (2) 研究分担者

正田 純一 (SHODA Junichi)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号：90241827

藤 栄治 (WARABI Eiji)  
筑波大学・医学医療系・講師  
研究者番号：70396612

柳川 徹 (YANAGAWA Toru)  
筑波大学・医学医療系・准教授  
研究者番号：10312852

### (3) 連携研究者

山本 雅之 (YAMAMOTO Masayuki)  
東北大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：50166823