

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659395

研究課題名（和文） フット8コンディショナルノックアウトマウスを用いた肝癌悪性化責任分子の同定

研究課題名（英文） Identification of genes related with malignant transformation of hepatocellular carcinoma using alpha 1-6 fucosyltransferase conditional knock-out mice

研究代表者

青柳 豊 (AOYAGI YUTAKA)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：00142266

研究成果の概要（和文）：

α 1-6 フコース転移酵素（FUT8）は、肝癌の生物学的悪性度の指標とされるフコシル化AFP産生に関与しているが、その分子機構は解明されていない。我々は肝細胞特異的に遺伝子発現抑制を行い、発癌過程におけるFUT8蛋白機能を解析する手法として、コンディショナルノックアウトマウス（FUT8^{loxP/loxP} - AlbCre^{+/-}マウス）を作製した。このマウス肝臓において、Cre酵素切断特異的DNAフラグメントを確認し、FUT8mRNA遺伝子発現の低下を確認した。しかし、HPLCを用いた肝FUT8活性を測定では明らかな活性低下は確認できず、レクチンマイクロアレイを用いた肝糖蛋白糖鎖プロファイリングでは α 1-6 フコースは対象マウスのそれに比較し有意なシグナル強度の変化は確認できなかった。

研究成果の概要（英文）：

Fucosylated fraction of alpha-fetoprotein is the product of α 1-6 fucosyltransferase (FUT8) and is an indicator of unfavorable prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. We have produced liver specific FUT8 conditional knockout mouse (FUT8^{loxP/loxP} - AlbCre^{+/-} mouse) for investigation of physiological function of FUT8 gene in hepatocarcinogenesis. A specific DNA fragment by cre-recombinase was seen in the liver tissue from FUT8^{loxP/loxP} - AlbCre^{+/-} mouse. Real-time PCR analysis showed the FUT8 mRNA level in liver tissue was knocked down. On the other hand, we found no significant decrease of FUT8 activity in the liver tissue from FUT8^{loxP/loxP} - Alb Cre^{+/-} mouse. No significant change in signal intensities of lectins associated with α 1-6 fucosylation was observed in the liver tissue by sugar chain profiling analysis using lectin microchip.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：FUT8、Cre-loxP、conditional knockout mouse、AFP-L3

1. 研究開始当初の背景

フェトプロテイン(AFP)、特にそのフコシル化分画(L3)は、肝細胞癌診断に有用な腫瘍マーカーであるのみならず、同一の解剖学的

腫瘍進展度に属する症例を予後の異なる2群に層別化する重要な予後規定因子である。しかし、フコースの転移が生物学的な悪性度を変化させる分子生物学的機序は未だ明らか

でなく、その説明が望まれている。

フコース転移酵素 (FUT8) は肝細胞癌における AFP フコシル化の責任酵素であり、癌の悪性化におけるフコース転移の意義解明を目的として、FUT8 ノックアウトマウス (KO) が作製されている。しかし、FUT8-KO マウスはその 70% が致死であり、FUT8 の役割は十分解明されるに至っていない。

2. 研究の目的

本研究では、Cre/loxP 系を用いることで肝臓に特異的な FUT8 の conditional knockout が可能なマウスを作製する。得られたマウスに特定薬物投与処理 (FUT8-STAM マウス) による発癌実験、コリン欠乏食投与による非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) 背景肝発癌実験を行う。発癌過程における FUT8 のノックアウトの影響と生物学的悪性度の変化を評価し悪性度の変化に 관련된 各種遺伝子発現の網羅的検索を行うことを目標とする。また、FUT8(-/-) の肝細胞癌細胞系列の樹立を目指す。

3. 研究の方法

(1) FUT8 のコンディショナル KO マウス作製

FUT8 は 12 のエクソンからなる膜貫通型蛋白で、マウス 12 番染色体に存在する。本研究では第 7 エクソンを含む 0.9Kb を loxP 配列ではさみ、アルブミンプロモーター下に Cre リコンビナーゼを発現させることで、肝臓に特異的な第 7 エクソンの欠失とそれによる FUT8 の機能消失を誘導した FUT8 のコンディショナル KO マウスを作製する。

(2) 肝 α 1-6 フコース転移酵素抑制の確認

FUT8 の機能消失は、主として HPLC を用いて肝組織中の α 1-6 フコース転移活性を定量することで確認する。

(3) 得られたマウスの発癌実験

FUT8 のコンディショナル KO マウスに特定薬物投与処理 (FUT8-STAM マウス) による発癌実験、コリン欠乏食投与による非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) 背景肝発癌実験を行う。

4. 研究成果

(1) FUT8 のコンディショナル KO マウス作製

マウス FUT8 遺伝子のエクソン 7 のターゲット配列を BAC より Neo ならびに loxP を含むベクターにクローニングした。また、ターゲットの 5' 側 3.1kb と 3' 側 7.5kb を pRed/ET を用いて BAC よりサブクローニングし、ターゲット配列、ジフテリア毒素、ならびにアンピシリン耐性遺伝子とともに MultiSite Gateway® Technology によりひとつのターゲットベクターに集約した。エレクトロ

ポレーション法を用いてターゲットベクターを ES 細胞に導入し、相同組み換えが生じた ES 細胞を 8 細胞胚へインジェクションすることでキメラ胚を形成させ、キメラ個体を得た。C57BL/6N マウスにキメラ個体をかけ合わせ、生殖系列に入ることを確認し、ヘテロ loxP のかけ合わせによりホモロガス loxP の個体を得た (FUT8^{loxP/loxP} マウス)。

この FUT8^{loxP/loxP} マウスは FUT8^{loxP/wt} マウスと FUT8^{wt/wt} マウス同様に FUT8 活性を有していることを、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で確認した。

FUT8^{loxP/loxP} マウスと Albumin promoter 下に Cre を発現するマウス B6.Cg-Tg (Alb-cre) 21Mgn/J (Catherine Postic, et al. Journal Bio. Chem. 274(1) 305-315; 1999) を交配し FUT8 コンディショナルノックアウトマウス (FUT8^{loxP/loxP} - AlbCre^{+/-} マウス) を作製した。

(2) 肝 α 1-6 フコース転移酵素抑制の確認

① DNA レベルでの肝 FUT8 遺伝子切断

FUT8^{loxP/loxP} - AlbCre^{+/-} マウスの肝臓 DNA から 836bp の Cre 酵素切断特異的 DNA フラグメントを PCR 法にて確認。この断片を XbaI で酵素処理することにより生ずる、258bp と 578bp の XbaI 酵素処理フラグメントも確認した。同様の DNA 断片を FUT8^{loxP/wt} - AlbCre^{+/-} マウスでも確認したが、FUT8^{loxP/loxP} - AlbCre^{-/-} マウスでは検出されなかった。マウス尾 DNA で同様の検討を行ったが、836bp、578bp の DNA 断片は検出できなかった。以上より、マウス肝臓において、loxP 配列で挟まれた DNA 領域が Cre 酵素により切断されていることが確認された。

② RNA レベルでの肝 FUT8 遺伝子抑制

肝臓での FUT8 遺伝子発現を肝 mRNA 由来 cDNA を鋳型に用い、リアルタイム PCR 定量法で検討した。使用した FUT8 primer は Exon 6-7 (予定では Cre 酵素で Exon 7 が欠損となる) で増幅するように設計し、内部コントロールは GAPDH とし、TaqMan probe 法で定量した。結果、FUT8 遺伝子発現は FUT8^{loxP/loxP} - AlbCre^{-/-} マウスを 100% とすると FUT8^{loxP/loxP} - AlbCre^{+/-} マウスの FUT8 遺伝子発現は平均 32% まで低下していたが、残存していることが判明した。

③ 蛋白レベルでの肝 FUT8 発現

HPLC を用いてマウス肝臓の FUT8 活性を測定した結果、目的マウスである FUT8^{loxP/loxP} - AlbCre^{+/-} マウスの FUT8 活性は平均 4.12 pmol/mg · protein · hr であり、対象の FUT8^{loxP/wt} - AlbCre^{+/-} マウス FUT8 活性の平均 4.19 pmol/mg · protein · hr と同程度であった。

FUT8^{loxP/loxP} - AlbCre^{+/-} マウスと FUT8^{loxP/loxP} - AlbCre^{-/-} マウスの肝組織由来蛋白質の糖鎖

プロファイリングをレクチンマイクロアレイにて行った結果、LCA、AAL、AOLといった α 1-6Fucose認識レクチンのシグナル強度に有意な差は認められなかった。

④マウス肝実質細胞を用いた検討

コラゲナーゼ還流下にマウス肝実質細胞を分離し同様の解析を行った。通常、分離細胞は24時間培養するが、培養後に非実質細胞が増えてくる、培養液にアミノ酸が含まれるために分離直後の細胞を用いて検討した。トリパノール染色では実際の分離細胞の生存率は約50%だった。

肝実質細胞RNAの検討ではFUT8^{loxP/loxP} - AlbCre^{-/-}マウスのFUT8mRNA発現を100%とするとFUT8^{loxP/loxP} - AlbCre^{+/-}マウスのFUT8遺伝子発現は平均7%まで低下していた。

HPLCを用いてマウス肝実質細胞のFUT8活性を測定したが、試料中のノイズにより活性評価が困難であった。

肝実質細胞蛋白質のレクチンマイクロアレイを用いた糖鎖プロファイリングを行い、 α 1-6フコースに関連するレクチンであるLTL、PSA、LCA、AOL、AALの信号変化に着目し糖鎖変化を比較した。結果、Contマウス分離肝実質細胞を1とするとKOマウス分離肝実質細胞は0.9の輝度、すなわち、コンディショナルKOマウス(FUT8^{loxP/loxP} - AlbCre^{+/-}マウス)の肝実質細胞の糖蛋白の糖鎖 α 1-6フコースは対象マウスのそれに比較し約90%のシグナル強度であった(10%のシグナル強度の低下のみ)。

(3) 考察

作製したFUT8^{loxP/loxP} - AlbCre^{+/-}マウスについて、肝細胞RNAレベルでのFUT8活性は十分な抑制が確認できたが、蛋白質レベルでの抑制はほとんど確認できなかった。マウス肝臓でのFUT8アイソフォームの存在やCreの発現が弱い場合、十分なFUT8遺伝子抑制がされないかと推測される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計27件)

1. Takamura M, Yamagiwa S, Matsuda Y, Ichida T, Aoyagi Y. Involvement of liver-intestine cadherin in cancer progression. *Med Mol Morphol*. 査読有 2013 Jan 10. 46:1-7 PMID: 23306661

[PubMed - as supplied by publisher]

doi: 10.1007/s00795-012-0003-y

2. Imai M, Higuchi M, Kawamura H, Yoshita M, Takahashi M, Oie M, Matsuki H, Tanaka Y, Aoyagi Y, Fujii M. Human T cell leukemia virus type 2 (HTLV-2) Tax2 has a dominant activity over HTLV-1 Tax1 to immortalize human CD4(+) T cells. *Virus Genes*. 査読有 2012 Sep 29. 46:39-46 doi: 10.1007/s11262-012-0831-9
3. Kamimura K, Suda T, Tamura Y, Takamura M, Yokoo T, Igarashi M, Kawai H, Yamagiwa S, Nomoto M, Aoyagi Y. Phase I study of miriplatin combined with transarterial chemotherapy using CDDP powder in patients with hepatocellular carcinoma. *BMC Gastroenterol*. 査読有 2012 Sep 20;12:127. doi: 10.1186/1471-230X-12-127
4. Tsuchiya A, Imai M, Kamimura H, Takamura M, Yamagiwa S, Sugiyama T, Nomoto M, Heike T, Nagasawa T, Nakahata T, Aoyagi Y. Increased Susceptibility to Severe Chronic Liver Damage in CXCR4 Conditional Knock-Out Mice. *Dig Dis Sci*. 査読有 2012 Jun 5. 57:2892-900 doi: 10.1007/s10620-012-2239-8
5. Fukuhara Y, Suda T, Kobayashi M, Tamura Y, Igarashi M, Waguri N, Kawai H, Aoyagi Y. Identification of cellular genes showing differential expression associated with hepatitis B virus infection. *World J Hepatol*. 査読有 2012 Apr 27;4(4):139-48. doi: 10.4254/wjh.v4.i4.139

6. Osaki A, Suda T, Waguri N, Ishikawa T, Yokoo T, Kamimura K, Tamura Y, Takamura M, Igarashi M, Kawai H, Yamagiwa S, Aoyagi Y. Formula to Predict Platelet Count after Partial Splenic Arterial Embolization in Patients with Hypersplenism. *J Vasc Interv Radiol*. 査読有 2012 May 23. 23:900-7 doi: 10.1016/j.jvir.2012.03.008
7. Ohkoshi S, Yamagiwa S, Yano M, Takahashi H, Aoki YH, Waguri N, Igarashi K, Sugitani S, Takahashi T, Ishikawa T, Kamimura T, Wakabayashi H, Watanabe T, Matsuda Y, Aoyagi Y. Failure to achieve 2-log10 viral decrease in first four weeks of peg-IFNalpha-2b plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C with genotype 1b and high viral titer is useful in predicting non-response: evaluation of response-guided therapy. *Hepatogastroenterology*. 査読有 2011 May-Jun;58(107-108):965-70
8. Kamimura H, Yamagiwa S, Tsuchiya A, Takamura M, Matsuda Y, Ohkoshi S, Inoue M, Wakai T, Shirai Y, Nomoto M, Aoyagi Y. Reduced NKG2D ligand expression in hepatocellular carcinoma correlates with early recurrence. *J. Hepatol*. 査読有 2012 Feb; 56(2):381-8 doi: 10.1016/j.jhep.2011.06.017. Epub 2011 Jul 12.
9. Aoyagi Y, Tamura Y, Suda T, EDITORIAL, History and recent progress in evaluation of the fucosylated alpha-fetoprotein fraction, *J Gastroenterol Hepatol*, 査読有 2011 Apr; 26(4):615-6. doi: 10.1111/j.1440-1746.2011.06671.x.
10. Kobayashi M, Takeuchi M, Ajioka Y, Hashimoto S, Sato A, Narisawa R, Aoyagi Y. Mucin phenotype and narrow-band imaging with magnifying endoscopy for differentiated-type mucosal gastric cancer. *J Gastroenterol*. 査読有 2011 Sep;46(9):1064-70. doi: 10.1007/s00535-011-0418-6. Epub 2011 Jun 11.
11. Tsuchiya A, Kamimura H, Tamura Y, Takamura M, Yamagiwa S, Suda T, Nomoto M, Aoyagi Y. Hepatocellular carcinoma with progenitor cell features distinguishable by the hepatic stem/progenitor cell marker NCAM. *Cancer Lett*. 査読有 2011 Oct 1;309(1):95-103. doi: 10.1016/j.canlet.2011.05.021. Epub 2011 Jun 12.
12. Abe S, Nagasaka K, Hirayama Y, Kozuka-Hata H, Oyama M, Aoyagi Y, Obuse C, Hirota T. The initial phase of chromosome condensation requires Cdk1-mediated phosphorylation of the CAP-D3 subunit of condensin II. *Genes Dev*. 査読有 2011 Apr 15;25(8):863-74. doi: 10.1101/gad.2016411.
13. Aoki YH, Ohkoshi S, Yamagiwa S, Yano M, Takahashi H, Waguri N, Igarashi K, Sugitani S, Takahashi T, Ishikawa T, Kamimura T, Wakabayashi H, Watanabe T, Matsuda Y, Nomoto M, Aoyagi Y. Characterization of elevated alanine aminotransferase levels during

pegylated-interferon α -2b plus ribavirin treatment for chronic hepatitis C. *Hepatol Res.* 査読有 2011 Feb;41(2):118-25 doi: 10.1111/j.1872-034X.2010.00749.x.

14. Kawai H, Nomoto M, Suda T, Kamimura K, Tsuchiya A, Tamura Y, Yano M, Takamura M, Igarashi M, Wakai T, Yamagiwa S, Matsuda Y, Ohkoshi S, Kurosaki I, Shirai Y, Okada M, Aoyagi Y
Multicentric occurrence of hepatocellular carcinoma with nonalcoholic steatohepatitis *World J Hepatol* 査読有 2011 January 27; 3(1): 15-23 doi: 10.4254/wjh.v3.i1.15.

[学会発表] (計57件)

1. Kamimura K, Suda T, Zhang G, Aoyagi Y, Liu D. Hydrodynamics-based Gene Transfer to Large Animals. Genetic Transformation Technologies. 2013/2/12. University of Vienna (Vienna, Austria)
2. Yamagiwa S, Takamura M, Matsuda Y, Geneda T, Takahashi T, Ichida T, Aoyagi Y. Presence of antibodies against self-HLA class II molecules in autoimmune hepatitis. The 63rd Annual Meeting of the AASLD. 2012/11/9. Hynes Convention Center (Boston, USA)
3. Takamura M, Xu B, Yamagiwa S, Matsuda Y, Shimada S, Zhang Y, Yoshida Y, Yaoita E, Nomoto M, Yamamoto T, Aoyagi Y. Comparative proteomic analysis of the liver in a murine model of non-alcoholic steatohepatitis. The 63rd Annual Meeting of the AASLD. 2012/11/9. Hynes Convention Center (Boston, USA)
4. Suda T, Kanefuji T, Aoyagi Y. Nutritional intervention in cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma on the basis of energy state assessment. The 3rd Asian-Pacific Topic Conference. 2012/11/3. Shiba Park Hotel (Tokyo)
5. 上村顕也, 須田剛士, 兼藤努, 田村康, 高村昌昭, 五十嵐正人, 川合弘一, 山際訓, 野本実, 青柳豊. APM2 は肝細胞癌のシスプラチン効果予測指標となりうる. 第71回日本癌学会学術集会. 2012/9/20. ロイトン札幌ほか(北海道札幌市)
6. 上村顕也, 須田剛士, 大崎暁彦, 五十嵐正人, 野本実, 青柳豊. APM2 は肝細胞癌に対するシスプラチンの効果予測マーカー候補である. 第48回日本肝癌研究会. 2012/7/20. 石川県立音楽堂ほか(石川県金沢市)
7. Kanefuji T, Kamimura K, Suda T, Gao M, Zhang G, Aoyagi Y, Liu D. Establishing Clinically Applicable, Image-Guided, and Computer-Controlled Hydrodynamic Gene Delivery for Treatment of Hemophilia B. 第18回日本遺伝子治療学会学術集会. 2012/6/28. ホテル熊本テルサ(熊本県熊本市)
8. 山際訓, 高村昌昭, 野本実, 青柳豊. 自己免疫性肝炎急性発症時における抗HLA class II抗体出現と肝細胞傷害への関与. 第48回日本肝臓学会総会. 2012/6/6. ANAクラウンプラザホテル金沢(石川県金沢市)
9. Yokoo T, Kamimura K, Suda T, Kanefuji T, Oda M, Zhang G, Liu D, Aoyagi Y. Long Term Transgene Expression in Rat Liver Using a Novel Electromotor-Driven Hydrodynamic Gene Injector. The 15th Annual meeting of American Society of Gene Therapy. 2012/5/16. Pennsylvania Convention Center (Philadelphia, PA. USA)
10. Kamimura K, Suda T, Kanefuji T, Zhang G, Aoyagi Y, Liu D. Image-Guided, Lobe-Specific Hydrodynamic Gene Delivery to Baboon Liver. The 15th Annual meeting of American Society of Gene Therapy. 2012/5/16. Pennsylvania Convention Center (Philadelphia, PA. USA)
11. 田村康, 上村顕也, 兼藤努, 五十嵐正人, 高村昌昭, 山際訓, 須田剛士, 野本実, 青柳豊. C型肝炎に対するインターフェロン治療によるAFP値変動と肝発癌抑制. 第98回日本消化器病学会総会. 2012/4/20. 京王プラザホテル(東京都新宿区)

12. 高村昌昭, 許波, 嶋田修一郎, 張螢, 吉田豊, 矢尾板永信, 山際訓, 松田康伸, 野本実, 山本格, **青柳豊**. 実験的NASHモデルマウス肝組織のプロテオーム解析. 第 98 回日本消化器病学会総会. 2012/4/19. 京王プラザホテル(東京都新宿区)
13. **須田剛士**, 上村顕也, **青柳豊**ほか. 肝細胞癌(HCC)に対するラジオ波焼灼療法(RFA)の効果と限界. 第 109 回日本内科学会総会・講演会. 2012/4/12. みやこめっせ(京都府京都市)
14. Yamagiwa S, Kamimura H, Tsuchiya A, Takamura M, Matsuda Y, Shirai Y, **Aoyagi Y**. Reduced NKG2D ligand expression in hepatocellular carcinoma correlates with early recurrence. The 62nd AASLD 2011 Annual Meeting. 2011/11/3. Moscone West Convention Center(San Francisco, California, USA)
15. **田村康**, 土屋淳紀, 上村顕也, 矢野雅彦, 高村昌昭, 五十嵐正人, 川合弘一, 山際訓, **須田剛士**, 大越章吾, 野本実, **青柳豊**. 肝細胞癌に対するミリプラチン使用経験とその治療効果について. 第 53 回日本消化器病学会大会. 2011/10/21. 福岡国際センター他(福岡県福岡市)
16. **田村康**, **須田剛士**, **青柳豊**, 若井俊文, 黒崎功, 白井良夫. ミラノ基準内HCC症候群における高感度AFP-L3分画測定の臨床的意義. 第 47 回日本肝癌研究会. 2011/7/29. 静岡県コンベンションアーツセンター「グランシップ」(静岡県静岡市)
17. **田村康**, **須田剛士**, 五十嵐正人, 土屋淳紀, 上村顕也, 山際訓, 野本実, 大越章吾, **青柳豊**. 高感度AFP-L3分画と肝細胞癌切除組織所見および予後との関連性についての検討. 第 47 回日本肝臓学会総会. 2011/6/3. ホテルグランパシフィックLE DAIBA(東京都港区)
18. **須田剛士**, 土屋淳紀, 上村顕也, 矢野雅彦, **田村康**, 高村昌昭, 五十嵐正人, 川合弘一, 山際訓, **青柳豊**. Gd-EOB-DTPA造影MRIで乏血性かつ肝細胞造影相で低信号を示す病変の自然経過. 第 47 回日本肝臓学会総会. 2011/6/2. ホテルグランパシフィックLE DAIBA(東京都港区)
19. 上村顕也, **須田剛士**, 土屋淳紀, 矢野雅彦, **田村康**, 高村昌昭, 五十嵐正人, 川合弘一, 山際訓, 大越章吾, 野本実, **青柳豊**. 切除不能進行肝細胞癌に対するミ
リプラチン/Aイエーコール併用肝動注療法(第 I 相試験). 第 47 回日本肝臓学会総会. 2011/6/2. ホテルグランパシフィックLE DAIBA(東京都港区)
20. 山際訓, **田村康**, 野本実, **青柳豊**. 自己免疫性肝炎急性発症時におけるAFPおよびAFP-L3分画の上昇. 第 47 回日本肝臓学会総会. 2011/6/2. ホテルグランパシフィックLE DAIBA(東京都港区)
21. Kamimura K, **Suda T**, Kanefuji T, Zhang G, Liu D, **Aoyagi Y**. Optimization of Image-Guided Hydrodynamic Gene Delivery to Liver of Large Animals. 第 14 回アメリカ遺伝子細胞治療学会. 2011/5/19. Washington State Convention & Trade Center(Seattle, WA, USA)
22. **Suda T**, Kamimura K, Kanefuji T, Zhang G, Liu D, **Aoyagi Y**. Optimization of Image-Guided Hydrodynamic Gene Delivery to Liver of Large Animals. 第 14 回アメリカ遺伝子細胞治療学会. 2011/5/19. Washington State Convention & Trade Center(Seattle, WA, USA)
23. Kamimura K, **Suda T**, Fukuhara Y, Osaki A, **Aoyagi Y**. APM2 is a Candidate of Predictive Marker for Cisplatin Sensitivity in Hepatocellular Carcinoma. The 3rd JCA-AACR Special Joint Conference. 2011/3/2. 東京ベイ舞浜ホテルクラブリゾート(千葉県舞浜市)
6. 研究組織
(1)研究代表者
青柳 豊 (AOYAGI YUTAKA)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号: 00142266
(2)研究分担者
須田 剛士 (SUDA TAKESHI)
新潟大学・医歯学総合病院・講師
研究者番号: 10361916
田村 康 (TAMURA YASUSHI)
新潟大学・医歯学総合病院・医員
研究者番号: 80467076
(3)連携研究者
なし