

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2013

課題番号：21406029

研究課題名(和文) 東南アジアの噛みタバコ習慣が口腔粘膜の遺伝子メチル化異常に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effects of betel quid chewing on the DNA methylation status of oral mucosa in south Asia

研究代表者

柴田 敏之 (SHIBATA, Toshiyuki)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50226172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円、(間接経費) 3,630,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、口腔がんの発生機序におけるDNAメチル化異常の関与を明らかにするために、噛みタバコの習慣による病変のDNAメチル化異常について検証した。本研究の大前提となるp16、MGMTの検索における擦過標本と組織標本との相関性(擦過標本の信頼性)を検討した所、両標本でほぼ同等の結果を示していた。台湾において採取された擦過標本をパイロシーケンス法にて解析した所、p16、MGMTともに陽性率10%を示した。口腔がん患者の血清中のメチル化異常DNA断片を検索した所、p16で高率(ほぼ全例)に観察され、担癌マーカーとして有望と考えられた。

研究成果の概要(英文)：To reveal the effects of DNA methylation status on the oral cancer carcinogenesis, we carried out the analysis of lesions in in betel quid chewers. First of all, we evaluated the swab sample accuracy using swab and tissue samples in promoter region of p16 and MGMT so on. DNA methylation status was well correlated between swab and tissue samples. Then, we analyzed DNA methylation status of Taiwan s wab samples using pyrosequencing method focused on p16 and MGMT. 10% samples indicated positive. Furthermore, we examined the methylation positive of p16 in cancer patients and detected it in high ratio (almost 100%). These results possibly suggested the usefulness of p16 analysis as a biomarker in oral cancer.

研究分野：医歯薬学B

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：口腔 粘膜病変 メチル化異常 東南アジア ヒト

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 学術的背景

周知の如く、東南アジア地域の多くの国々では、噛みタバコの習慣(Betel chewing)により、口腔癌が多発し、全癌の20~30%を占め大きな社会問題となっている。一方、この発癌機序については、現地の社会情勢もあり多くは疫学・病理組織学的研究にとどまり、分子疫学的検討は未開の分野となっている。我々は、これまで東南アジア地域のスリランカにて口腔癌における genetic な変化を明らかとするために海外研究を展開し、噛みタバコの習慣を有する症例の前癌病変(白板症、粘膜下線維症)および癌病変の検体から、癌抑制遺伝子 p53 の変異が Exon5 に集中する他に類を見ない特徴を持つが、前癌病変にはこの変異は認められず、単純な1つの p53 の mutation で発癌に到る訳では無いことを明らかとして来ている。(Oncogene 1998, Int. J. Cancer 1999) また、血球 DNA の解析により、ニトロソアミン類活性化酵素 CYP2A6 と活性化ニトロソアミン類代謝酵素 GSTM1 の個体差 (SNPs) が、口腔癌の発症に重要な背景因子となっていることも示して来ている(Carcinogenesis 2002)。

一方、最新の知見では、先に述べた癌の発生・悪性化進展に遺伝子の変異や欠失などの genetic な変化の蓄積以外に、DNA メチル化異常(hypermethylation) の様な遺伝子配列に異常を示さない epigenetic な変化も発癌要因として重要な役割をしていることが示されて来ている。即ち、細胞周期調節遺伝子(p16INKA4, p57KIP2, etc)、DNA 修復遺伝子(MGMT, hMLH1 etc)、アポトーシス関連遺伝子(TMS1, CASP8, APAF-1, etc)などのプロモーター領域のメチル化異常により各々の遺伝子発現が不活化され、癌化が促進されるものと考えられている。また、これら DNA メチル化異常は、genetic な変化とは異なり脱メチル化によって修復可能な変化であること、発癌の先駆け的な Biomarker となり得る可能性も示されつつある。

### (2) 疫学的背景

DNA メチル化異常と癌病変との関連については多くの領域、例えば肺・食道・子宮等々において、多くの知見が報告されて来ている。口腔癌についても基礎・臨床的に検索されて来ているが、規模の大きなヒトにおける検討はなされていないのが現状である。我々は、この原因の一つとして、前癌~癌病変に到る各段階の検体収集(特に前癌病変:白板症)に国内では限りがあり、これが障壁となっていると考えている。一方、東南アジア地域では先に述べた様に噛みタバコの習慣により白板症等を経て口腔癌が多発している。これらのケースを母集団とする病変の解析により、口腔癌発症におけるメチル化異常の正確な生物学的意義が明らかとなると考えている。また、本研究では DNA メチル化異常を

検索するためのサンプルを綿棒で粘膜を擦過することにより得る擦過標本を用いることを予定しており、成果を得られれば、ほぼ無侵襲に複数採取することが可能となると考えられる。このため、口腔癌症例および白板症では、病変部位のみならず対側等の複数部位からも擦過標本を採取可能であり、Field cancerization との関わりを検証することが可能である。本研究により、メチル化異常の検出が口腔病変発症の先駆け的な Biomarker (予知因子)となることが示されれば、口腔健康増進における啓蒙的意義があらもと考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、噛みタバコの習慣にて白板症~口腔癌の多発する東南アジアをフィールドとして、この習慣に暴露されている口腔粘膜から擦過標本を経時的に採取・分析を行い、噛みタバコが口腔粘膜の DNA メチル化異常に及ぼす影響と病変発症との関連を明らかとする。また、メチル化異常の検索が口腔粘膜の健康度を測る Biomarker となり得るかを検証し、有用性を明らかとする。そのために、噛みタバコの習慣者で病変の無い者、白板症症例、癌病変例を対象として、口腔癌で高率に検出している p16INKA4、MGMT 遺伝子プロモーター領域のメチル化異常を Target に、

#1: 噛みタバコ習慣者の口腔粘膜メチル化異常の頻度

#2: 白板症および周囲健全部におけるメチル化異常の頻度

#3: ヒト口腔癌および周囲健全部におけるメチル化異常の頻度

を経時的に調査し、「ヒト口腔癌発症過程に於けるメチル化異常の意義」の解明を目指す。また、擦過標本と組織標本の比較検証を行い擦過標本の信頼性(正診性)を再確認し、確認された後に侵襲の少ない擦過標本サンプルを集積検討する。

## 3. 研究の方法

### 調査実施国・場所

- ・台湾(中華民国): 高雄医科大学病院口腔外科
- ・ベトナム社会主義共和国: 国立ハノイ大学病院口腔外科

### 調査・分析対象

組織標本・綿棒擦過サンプル(以下、擦過サンプル)を用いて p16, MGMT のメチル化を検査すると共に、新規のサンプルを採取し口腔粘膜病変に於ける口腔粘膜の DNA メチル化を検証する。

### 臨床サンプルの収集

サンプル採取対象者および対象疾患:

- 口腔癌症例(malignant)
- 白板症症例
- 粘膜下線維症(premalignant)

嘔みタバコ習慣者  
 サンプル採取方法・部位・時期：  
 方法：口腔がん・白板症・粘膜下線維症の粘膜疾患に関しては、組織の一部を DNA メチル化分析に用いる。  
 部位（擦過サンプル採取部位）：  
 病変部・左右頬粘膜・舌縁部・口腔底部・口蓋・上下口唇・舌背部  
 時期：粘膜病変症例

**DNA メチレーション分析**

- ・対象遺伝子  
 候補として以下のものを予定し、各々の promoter 領域のメチル化異常を検索する。
  - ・細胞周期調節遺伝子 (p16INKA4, p57KIP2)
  - ・DNA 修復遺伝子 (MGMT, hMLH1)
  - ・アポトーシス関連遺伝子 (TMS1, CASP8, APAF-1)
- ・分析方法  
 DNA を bisulfite 処理後、methylation specific PCR 法にて promoter 領域の hypermethylation を検討する。

パイロシーケンスの primer には以下のものを用いた。

Gene	Primer	Size(bp)
P16	Forward 5'-AGGGGTTGGTTGGTTATTAG-3'	76
	Biotinylated-reverse 5'-CTACCTACTCTCCCCCTCTC-3'	
	Sequencing primer 5'-GGTTGGTTATTAGAGGGT-3'	
MGMT	Forward 5'-GTTTAGGATAGTGGGATAGT-3'	106
	Biotinylated-reverse 5'-CCACCCAAACCACTCACCACAAAT-3'	
	Sequencing primer 5'-GTTGGGATAGTAGAGTTTITAGAA-3'	
RECK	Forward 5'-GTTTAGGGAGGTTTGGAAATAT-3'	81
	Biotinylated-reverse 5'-CCCCCACCCTTAATACTAACT-3'	
	Sequencing primer 5'-GGAATATTGTGAGGTAGG-3'	

**4. 研究成果**

本研究では、口腔がんの発生機序における DNA メチル化異常の関与を明らかにするために、嘔みタバコの習慣にて白板症～口腔癌の多発する東南アジアをフィールドとして、口腔粘膜の DNA メチル化異常と病変発症との関連性を検証することを目的としている。この目的のために、国内口腔がんを高率に検出している p16INKA4、MGMT 遺伝子プロモーター領域のメチル化異常を Target に東南アジア地域で擦過標本の集積と国内症例を用いた擦過標本と組織標本との相関性（擦過標本の信頼性）を検討して来た。

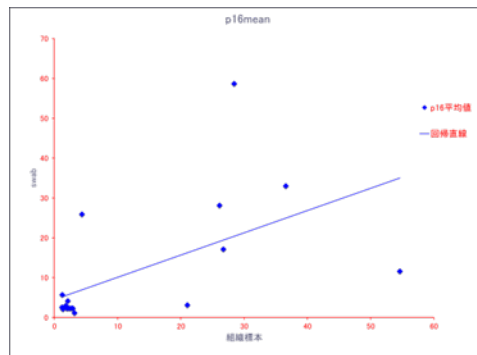
**1. 擦過標本の信頼性の評価**

擦過標本と組織標本間の相関性については、擦過標本と組織標本（手術前の擦過標本と摘出組織標本の比較）において、ではほぼ同等の頻度でメチル化異常が検出されたが、MGMT では検出頻度が p16 に比べ低値であった（下図参照）。尚、その他の当初の検索対象項目であった細胞周期調節遺伝子

(p57KIP2)、DNA 修復遺伝子 (hMLH1)、アポトーシス関連遺伝子 (TMS1, CASP8, APAF-1) 及び RECK では、検出頻度が低く信頼性・相関性にも乏しい結果であった。これらのことより今後は p16INKA4 および MGMT 的を絞ることが重要と考えられた。

**<<p16 の相関性>>**

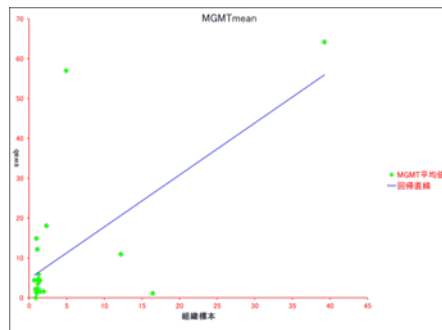
遺伝子	擦過	組織	swab	組織	swab	擦過	組織	swab	組織	swab
CpG 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CpG 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CpG 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CpG 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CpG 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CpG 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



**<<MGMT の相関性>>**

症例	CpG 1		CpG 2		CpG 3		CpG 4		CpG 5	
	組織	swab	組織	swab	組織	swab	組織	swab	組織	swab
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	43.47	69.43	41.49	68.26	35.51	63.03	43.88	68.56	32.1	51.4
4	3.64	54.19	5.53	55.03	5.23	56.42	4.85	58.83	5.4	60.4
5	1.83	14.27	2.32	20.05	2.89	23.77	1.79	9.88	2.75	22.2
6	1.2	0	1.91	4.27	2.52	6.45	0	3.98	2.16	6.87
7	0	2.29	1.9	2.06	2.24	2.93	0	1.28	1.61	2.89
8	0	0.98	1.85	2.31	2.18	2.08	1.29	0	2.22	2.26
9	0	11.03	1.83	14.5	1.73	18.53	0	14.37	1.56	15.7
10	1.51	0	2.03	4.02	2.3	3.75	1.8	0	2.43	0
11	0	3.25	1.78	3.76	2.16	4.3	0	2.63	2	3.82
12	0	0	1.44	1.88	1.87	2.69	0	0	1.62	3.01
13	0	0	1.67	0	1.7	36.96	0	0	2.15	23.5
14	0	3.76	1.77	5.03	2.48	7.7	0	3.85	2.22	8.73
15	0	3.76	1.24	4.43	2.33	4.83	0	3.96	0	4.97
16	0	3.42	2.17	5.16	1.87	4.89	0	3.73	2.37	6.23
17	0	0	1.49	0	1.5	0	0	0	1.53	0
18	0	1.66	1.58	2.33	2.39	3.5	0	1.77	2.83	3.64
19	13.23	12.33	12.97	14.64	12.4	11.47	10.68	7.13	11.84	8.88
20	19.37	0	20.93	1.57	8.56	1.63	22.45	0	11.04	2.17

相関係数 0.7034    0.6881    0.6389    0.6663    0.56  
cut off値 10



同一病変から得られた組織標本と綿棒による擦過標本の DNA を同時に pyrosequence 法にて解析した所、相関係数 0.6 前後と一定の

相関関係を認めた。

2. 上記の結果を基に、高雄医科大学（台湾）において採取された擦過標本をパイロシーケンス法にて解析した所、p16INKA4、MGMTともに陽性率 10%程度であった（下図参照）。この結果は我々が、これまでにバンド法を用いて行って来た結果、即ち、ヒト口腔癌（国内例）のメチル化異常陽性率 p16INKA4 50.9%、MGMT 56.4% に比べ低値であった。また、同一症例の病理学的に非病変部粘膜においても p16INKA4 では 37.5%、MGMT では 60.0% と高率に周辺「正常」組織にもメチル化異常が生じていたこと（J Cancer Res Clin Oncol. 2006）に比べても低値であった。さらに、スリランカでの結果、p16 のメチル化異常が mild dysplasia で 12/29(41.1%) severe dysplasia で 10/20(50%)、扁平上皮癌 16/29(55.2%) と移行的な頻度の増加を観察した結果（J Oral Pathol Med 2007）に比べても DNA メチル化異常の頻度・陽性率は低値であった。本来、感度が高いはずであるパイロシーケンス法においてバンド法に比べ低値である理由について、台湾サンプル採取の問題とこれまでのバンド法における false positive がかなり混在しているも可能性が考えられた。

P16 DNA メチル化異常検索結果  
（口腔がん病変部からの擦過標本）

Sample	CpG-1	CpG-2	CpG-3	CpG-4	CpG-5	CpG-6	Mean	S.D
100001T	21.77	21.8	20.03	19.8	22.97	19.26	20.94	1.45
100002T	11.28	13.35	10.61	11.32	12.91	9.88	11.56	1.33
100003T	2.76	4.54	2.19	2.17	3.99	1.21	2.81	1.24
100004T	1.15	3.87	1.18	1.65	2.79	1.52	2.03	1.08
H100005T	1.43	3.32	0.83	1.78	2.26	0.76	1.73	0.96
H100006T	1.09	3.82	1.34	1.88	2.68	1.14	1.99	1.08
H100007T	1.58	4.92	2.32	2.49	3.17	1.06	2.59	1.36
H100008T	2.75	7.18	2.87	3.13	2.54	2.25	3.45	1.85
H100009T	1.26	3.37	0	1.56	2.05	0	1.37	1.29
H100010T	2.15	4.35	1.31	1.92	2.21	1.13	2.18	1.15
H100011T	2.18	3.3	1.9	1.61	3.48	1.09	2.26	0.95
H100012T	1.1	3.2	1.16	1.64	2.36	1.01	1.75	0.87
H100013T	2.29	3.22	0.77	1.64	2.35	1.25	1.92	0.88
H100014T	1.36	4.46	1.23	1.38	2.09	1.46	2	1.24
H100015T	1.65	3.82	1.17	1.66	2.24	1.19	1.96	0.99
H100016T	2.91	5.57	2.54	2.74	4.22	2.65	3.44	1.21
H100017T	5.8	9.01	4.48	3.54	6.82	4.51	5.69	1.99

P16 DNA メチル化異常検索結果  
（口腔がん病変部対側・健常部からの擦過標

本）

Sample	CpG-1	CpG-2	CpG-3	CpG-4	CpG-5	CpG-6	Mean	S.D
100001N	1.34	3.63	2.19	2.2	2.78	1.25	2.23	0.9
100002N	4.28	3.85	2.46	3.79	3.54	2.01	3.32	0.89
100003N	1.89	5.39	4.02	1.61	3.18	1.1	2.87	1.64
100004N	3.51	6.91	2.82	2.42	3.51	2.44	3.6	1.69
H100005N	1.16	2.8	0.99	1.33	2.43	0.9	1.6	0.81
H100006N	1.42	1.19	1.05	1.86	2.07	0.86	1.41	0.47
H100007N	1.81	4.06	0.96	1.88	2.46	1.4	2.1	1.09
H100008N	1.33	4.31	1.84	1.89	2.4	1.38	2.19	1.11
H100009N	1.78	4.18	0	2.1	2.53	0.88	1.91	1.44
H100010N	0.99	3.98	1.46	1.8	1.94	1.14	1.89	1.09
H100011N	1.45	3.68	0	1.83	3.7	1.39	2.01	1.44
H100012N	1.55	2.76	1.2	1.89	2.62	1.47	1.92	0.64
H100013N	1.48	2.96	0	1.72	2.33	1.33	1.64	1
H100014N	0.96	2.88	1.07	1.78	1.87	1.12	1.61	0.73
H100015N	2.05	3.37	0	1.62	2.65	0.97	1.78	1.2
H100016N	3.45	4.24	2.09	2.63	3.68	1.72	2.97	0.98
H100017N	3.71	3.92	1.12	1.94	1.98	1.12	2.3	1.24

同一症例における病変部および対側（健常側）から得られた擦過標本から DNA を抽出しパイロシーケンス法にて CpG-1 から CpG-6 の範囲で網羅的に検索した。

3. 血清中のメチル化異常 DNA 断片の検索

口腔がん患者の血清中のメチル化異常を示す DNA 断片の検索を目的に血清およびがん組織から DNA を抽出し検討した所、p16 では原発組織 21 例中 20 例にメチル化異常が検出され、血清では 21 例中 14 例で検出された。尚、血清では 5 例が正常・異常ともに検出されておらず、血清で異常が検出された 14 例では何れも組織で異常が検出されていた（下図・表参照）。

これらの事からも口腔がんにおいて p16 の DNA メチル化異常を検索する意義は高いと推察された（投稿準備中）。

Case No	primary	serum	Case No	primary	serum
1	M U	M U	12	M U	- -
2	M U	M U	13	M U	- -
3	M U	- U	14	M U	M U
4	M U	M U	15	M U	M U
5	M U	M U	16	M U	M U
6	M U	M U	17	M U	M U
7	M U	M U	18	M U	M U
8	M U	M U	19	M U	- -
9	M U	M U	20	M U	M U
10	M U	- U	21	- U	- -
11	M U	- -			

Frequency of the hypermethylation of p16 in cancer patients

	Hypermethylation rate (%)	
	Primary	Serum
p16 methylation (+)	20 / 21	14 / 21 *

\* 5 case did not detect both methyl- and unmethyl band

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 12 件)

下記の論文は全て査読有り

Kato H, Kanematsu M, Kato Z, Teramoto T, Mizuta, K, Aoki M, Makita H, Kato K  
Necrotic cervical nodes: Usefulness of diffusion-weighted MR imaging in the differentiation of suppurative lymphadenitis from malignancy. Eur J Radiol. 2013 Jan;82(1):e28-35. doi: 10.1016/j.ejrad.2012.08.014. Epub 2012 Sep 4.

Kudo Y, Iizuka S, Yoshida M, Nguyen PT, Siriwardena SB, Tsunematsu T, Ohbayashi M, Ando T, Hatakeyama D, Shibata T, Koizumi K, Maeda M, Ishimaru N, Ogawa I, Takata T. Periostin directly and indirectly promotes tumor lymphangiogenesis of head and neck cancer. PLoS One. 2012;7(8):e44488. doi: 10.1371/journal.pone.0044488. Epub 2012 Aug 30.

Kato H, Kanematsu M, Toida M, Kawaguchi T, Shibata T, Kajita K, Hoshi H. Salivary gland function evaluated by diffusion-weighted MR imaging with gustatory stimulation: preliminary results. Journal of Magnetic Resonance Imaging 2011;34: 904-909. doi: 10.1002/jmri.22729. Epub 2011 Aug 11.

Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, Hong H, Nakagawa M, Tanabe K, Tezuka K, Shibata T, Kunisada T, Takahashi M, Takahashi J, Saji H, Yamanaka S. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. Nat Methods. 2011 May;8(5):409-12. doi: 10.1038/nmeth.1591. Epub 2011 Apr 3.

Toida M, Nanya Y, Takeda-Kawaguchi T, Baba S, Iida K, Kato K, Hatakeyama D, Makita H, Yamashita T, Shibata T. Oral complaints and stimulated salivary flow rate in 1188 adults. J Oral Pathol Med. 2010 May;39(5):407-19. doi: 10.1111/j.1600-0714.2009.00852.x. Epub 2010 Feb 28.

Iida K, Takeda-Kawaguchi T, Tezuka Y, Kunisada T, Shibata T, Tezuka K. Hypoxia enhances colony formation and proliferation but inhibits differentiation of human dental pulp cells. Arch Oral Biol. 2010 Sep;55(9):648-54.

Tamaoki N, Takahashi K, Tanaka T, Ichisaka T, Aoki H, Takeda-Kawaguchi T,

Iida K, Kunisada T, Shibata T, Yamanaka S, Tezuka K. Dental pulp cells for induced pluripotent stem cell banking. J Dent Res. 2010 Aug;89(8):773-8. doi: 10.1177/0022034510366846. Epub 2010 Jun 16.

Tomita H, Hirata A, Yamada Y, Hata K, Oyama T, Mori H, Yamashita S, Ushijima T, Hara A. Suppressive effect of global DNA hypomethylation on gastric carcinogenesis. Carcinogenesis. 2010 Sep;31(9):1627-33. doi: 10.1093/carcin/bgq129. Epub 2010 Jul 9.

Baba S, Yamada Y, Hatano Y, Miyazaki Y, Mori H, Shibata T, Hara A. Global DNA hypomethylation suppresses squamous carcinogenesis in the tongue and esophagus. Cancer Sci. 2009 Jul;100(7):1186-91. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01171.x. Epub 2009 Apr 21.

⑩Yamashita T, Toida M, Kato K, Long NK, Miyazaki Y, Asaka Y, Hatakeyama D, Yonemoto K, Makita H, Kato Y, Shibata T. The effect of neoadjuvant therapy on the 5-fluorouracil metabolic and relative enzymes of oral squamous cell carcinoma. Oncol Rep. 22(3):501-7. 2009.

Nakao K, Tanaka K, Ichiishi S, Mikamo H, Shibata T, Watanabe K. Susceptibilities of 23 Desulfovibrio isolates from humans. Antimicrob Agents Chemother. 2009 Dec;53(12):5308-11. doi: 10.1128/AAC.00630-09. Epub 2009 Sep 28.

Baba S, Hara A, Kato K, Long NK, Hatano Y, Kimura M, Okano Y, Yamada Y, Shibata T. Aberrant promoter hypermethylation of the CHFR gene in oral squamous cell carcinomas. Oncol Rep. 22(5):1173-9.2009.

〔学会発表〕(計 4 件)

加藤 恵三、玉置 也剛、飯田 一規、米本 和弘、畠山 大二郎、牧田 浩樹、山下 知巳、柴田 敏之 ヒト口腔扁平上皮がんにおける DNA メチル化異常の検討 擦過 標本と組織標本の相関性 第 19 回日本がん予防学会 2012 年 06 月 22 日じゅうろくプラザ(岐阜市)

Shibata T  
Hypermethylation status of oral squamous cell carcinoma  
Kaohsiung International Cancer Symposium  
2010 年 11 月 20 日 (台湾・高雄市)

牧田浩樹、加藤恵三、柴田敏之

4NQO 誘発ラット舌発癌モデルにおける遺伝子変異機構の解析第 69 回日本がん学会総会  
2010 年 9 月 23 日 大阪

Nguyen Khanh Long, Keizo Kato, Tomomi Yamashita, Hiroki Makita, Makoto Toida, Daijiro Hatakeyama, Akira Hara, Hideki Mori, Toshiyuki Shibata.

Hypermethylation of the RECK gene predicts poor prognosis in oral squamous cell carcinomas 9th International conference of the Asian clinical oncology  
2010 年 8 月 27 日 Gifu

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

柴田 敏之 (SHIBATA, Toshiyuki)  
岐阜大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号 : 50226172

### (2)研究分担者

原 明 (HARA, Akira)  
岐阜大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号 : 10242728

加藤 恵三 (KATO, Keizou)  
岐阜大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号 : 40397336

牧田 浩樹 (MAKITA, Hiroki)  
岐阜大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号 : 50345790