

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 6 月 20 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：平成 23 年度～平成 24 年度

課題番号：23792365

研究課題名（和文） 口腔癌における DKK 遺伝子の発現解析と分子標的の開発

研究課題名（英文） Expression analysis of DKK gene and development of a molecular targeted therapy for oral cancer

研究代表者

曾我部 陽平 (SOGABE YOHEI)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：50468104

研究成果の概要（和文）：本研究は口腔癌における DKK 遺伝子のエピジェネティックな不活性化と Wnt シグナル経路関連因子の異常について解析したものである。本研究は口腔扁平上皮癌における DKK 遺伝子ファミリーのメチル化と発現消失を初めて明らかにした。口腔扁平上皮癌において他の Wnt シグナル関連異常は希であることから、DKK 遺伝子のメチル化は Wnt シグナル活性化の要因の一つと考えられる。DKK は口腔癌の診断・治療において重要な分子標的となり得ることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we examined the relationship between Wnt signaling and epigenetic alteration of the Dickkopf-related protein (DKK) genes in oral squamous cell carcinomas (OSCC). Our result confirms the frequent methylation and silencing of DKK genes in OSCC, and suggest that their loss of function contributes to activation of Wnt signaling that leads to cell proliferation during oral carcinogenesis.

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	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科・外科系歯学

キーワード：臨床腫瘍学、エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

Wnt シグナル経路は上皮系細胞の増殖・分化に重要な役割を担っており、Wnt 経路の過剰な活性化は大腸癌をはじめ、様々な悪性腫瘍において認められている。口腔扁平上皮癌を対象とした Wnt シグナル経路に関する研究は、本邦の Uzawa らによる Wnt シグナル系の抑制分子である adenomatous polyposis coli(APC)の遺伝子異常の報告に始まる。その後、海外でも発現頻度は異なるものの、同様の知見が報告され、近年では研究者の既報告と同様に、Wnt シグナルのエフェクター分子である β -catenin の細胞内局在に関する研究報告が散見されるようになった。しかし、それぞれの遺伝子変異の頻度は低く、またその

メカニズムについてはなお不明な点が多く、その臨床的な意義は明らかにされていない。癌遺伝子産物である Wnt は、Frizzled と呼ばれる細胞表面受容体と結合して β -catenin 分解複合体による β -catenin リン酸化を抑制する結果、 β -catenin の細胞内レベルが上昇し、細胞増殖が抑制される。過去に行った口腔扁平上皮癌細胞由来細胞株および臨床検体を用いた研究で得られた成果では、多数の口腔扁平上皮癌細胞株で Wnt のアンタゴニストである SFRP 伝子発現の消失とメチル化の間に相関関係が見られる結果が得られている。一方、もう一つの Wnt アンタゴニストである DKK も多くの癌で不活性化し、Wnt シグナルを亢進させていることが報告されている。

口腔癌においても DKK の遺伝子異常が起こっている可能性が考えられたため、研究の着手へと至った。

2. 研究の目的

本研究では、口腔扁平上皮癌における Wnt シグナル異常の解明および癌診療における新たな分子マーカーを見いだすことを目的として、口腔扁平上皮癌における DKK 遺伝子異常を解析することとした。

3. 研究の方法

(1) 細胞株と組織検体

17 細胞株 (HSC-2, HSC-3, HSC-4, Ca9-22, OSC-19, OSC-20, OSC-30, OSC-70, SAS, KOSC-3, Ho-1-u-1, Ho-1-N-1, HOC119, HOC621, MoN2, MoT および OM1) および札幌医科大学附属病院歯科口腔外科の口腔扁平上皮癌患者 44 人からの 44 の癌組織および 33 の非癌組織を用いた。フェノールクロロホルムを用いてゲノム DNA を抽出した。Total RNA の抽出には TRIzol 試薬 (Invitrogen, USA) および DNA-free kit (Ambion, USA) を用いた。また、対照として Biochain 社 (USA) から市販されている正常口腔粘膜からの Total RNA を用いた。

(2) 遺伝子変異解析

APC の exon16 の codon 1140-1545 の変異を解析した。この部位に一致するゲノム DNA を APC-F1 および APC-R1 プライマーを用いて増幅したものからゲル切り出しを行い、PCR 産物を ABI3100 自動シークエンサー (Applied Biosystems, USA) でダイレクトシークエンスを行った。シークエンスはセンスおよびアンチセンス両方向から 2 組のプライマー

(APC-F2, APC-F3, APC-R2, APC-R3) を用いて行った。また CTNNB1 exon3 についてもセンスおよびアンチセンス両方向から増幅し、シークエンサーで変異解析を行った。PCR には 50ng のゲノム DNA を含む 50 μ l 溶液と 1x Ex Taq Buffer (タカラバイオ, 大津)、0.3mM dNTP、それぞれ 0.25 μ M のプライマーおよび 1U の Takara Ex Taq Hot Start Version (タカラバイオ) を用いた。PCR は最初に 95°C で 5 分間の熱変性を行った後、95°C 1 分の熱変性 -55°C 1 分のアニーリング -72°C 1 分の伸張反応を 35 サイクル行い、72°C 7 分の最終伸張を行った。プライマー配列は Table I に示す。

(3) RT-PCR

SuperScript III 逆転写酵素 (Invitrogen) を用い、一本鎖 cDNA を作製。コントロールには GAPDH を用いた。PCR には 100ng の cDNA を含む 50 μ l の溶液、1x Ex Taq Buffer (Takara)、0.3mM dNTP、それぞれ 0.25 μ M のプライマーおよび 1U の Takara Ex Taq Hot Start Version (タカラバイオ) を用いた。PCR

は最初に 95°C で 5 分間おいた後、95°C 1 分 -55°C 1 分 -72°C 1 分を 35 サイクル、最終伸張を 72°C 7 分の条件で行った。RT-PCR 用のプライマー配列を Table I に示す。

Table I. Sequences for primers used in this study

	sense	antisense	
Substion analysis	F1 5'-GCCATCCAAATTAAGTGAACGTT-3'	R1 5'-GTGATCTTAAAGCTGCTGTA-3'	
	F2 5'-GCACACTGCAAAAGTTCTTC-3'	R2 5'-GAGGATCACGGGCTTATTA-3'	
	F3 5'-TGAAGAGGCTGCAATGCTCC-3'	R3 5'-GTCAAGTGAATGCAAAAGTGA-3'	
CTNNB1	5'-GCAATCTCACTAATGCTAATACTG-3'	5'-CTGATCTTCACTTTCAGTAAAG-3'	
Methylation analysis	CDH1 MSP-F1 5'-TTTAAAGTAAATAGGAGTAAAGGAGG-3'	5'-AATACATCAAAACAACCAAACTAAAGA-3'	
	CDH1 MSP-M1 5'-TTAGTAAATAGGAGTAAAGGAGG-3'	5'-GATGCAATGCAACCACTAAAGC-3'	
	DKK1 MSP-M2 5'-TTAAGGAGTGAATGTTTGGGTTT-3'	5'-AAACCTAAAACCCCAAAACCAATCC-3'	
	DKK1 MSP-M3 5'-AGGAGGAGGAGGAGTGGGAGGAG-3'	5'-CTTAAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG-3'	
	DKK1 MSP-M4 5'-TGTGTTTAAAGTATTTGGTGGTGA-3'	5'-ATAAATAATCAAAAACATCCCAACCA-3'	
	DKK1 MSP-M5 5'-TTTAAAGTATGTTGGGTTGGTGA-3'	5'-AAAAATCAAAAACCTCCCAAGCC-3'	
	DKK1 MSP-M6 5'-GAGTGAAGTATGTTAGTTGGTGGTGA-3'	5'-CTCTTAAACAATCAAACTCTCAACA-3'	
	DKK1 MSP-M7 5'-CGAGTGAATGTTAGTTGGTGGTGA-3'	5'-CTTAAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG-3'	
	RT-PCR	CDH1 5'-GATCCATCTTCTGGGTTACGGCT-3'	5'-TCACTTCAAGGCAATCTCTTCT-3'
		DKK1 5'-CTTCTCCCTCTGAGGCTCTCTG-3'	5'-CATAGGGAGGAGGCACTGAGGTT-3'
DKK2 5'-GAGAGTGAATGAGGAGTGTGAGGTT-3'		5'-AAATGAGTGTGATGATCTGAGGCT-3'	
DKK3 5'-AGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG-3'		5'-AGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG-3'	
WNT1 5'-GTCGATGAGGAGGAGGAGGAGGAG-3'		5'-CTCTGTGTGAGGAGGAGGAGGAG-3'	
WNT2 5'-TTGATGAGGAGGAGGAGGAGGAGG-3'		5'-ACTTCAAGGAGGAGGAGGAGGAGG-3'	
WNT3 5'-GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG-3'		5'-TGTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG-3'	
WNT4 5'-ATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG-3'		5'-AGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG-3'	
WNT5 5'-GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG-3'		5'-ACTTCAAGGAGGAGGAGGAGGAGG-3'	
WNT6 5'-ATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG-3'		5'-TGTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG-3'	
WNT7 5'-GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG-3'		5'-AGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG-3'	
WNT8 5'-GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG-3'		5'-ACTTCAAGGAGGAGGAGGAGGAGG-3'	
WNT9 5'-ATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG-3'		5'-TGTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG-3'	
WNT10 5'-GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG-3'		5'-AGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG-3'	
WNT11 5'-GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG-3'		5'-ACTTCAAGGAGGAGGAGGAGGAGG-3'	
WNT12 5'-ATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG-3'		5'-TGTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG-3'	

(4) メチル化解析

ゲノム DNA を Bisulfite 処理し、メチル化特異的 PCR (MSP) 法によりメチル化の解析を行った。PCR には 50ng の bisulfite 処理を行った DNA を含む 25 μ l の溶液、1x MSP buffer [67 μ M Tris-HCl (pH 8.8)、16.6 μ M (NH₄)₂SO₄、6.7 μ M MgCl₂ および 10 μ M 2-mercaptoethanol]、1.25 mM dNTP、それぞれ 0.4 μ M のプライマーと 0.5U の JumpStart Red Taq DNA Polymerase (Sigma) を用いた。MSP では 95°C で 5 分間熱変性させた後、95°C 30 秒 -60°C 30 秒 -72°C 30 秒を 35 サイクル行った後、72°C で 7 分間最終伸張を行った。プライマーシークエンスを Table I に示す。

(5) ウェスタンブロット

20 μ g の細胞溶解産物を 10% の SDS-PAGE にさらし、溶解したタンパクを Immobilon-P 膜 (Millipore, USA) に転写。膜は TBS 中で 5% 脱脂乳および 0.1% Tween-20 でブロックし、抗 β -catenin (BD Biosciences, USA) および抗 GAPDH 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, USA) で probe し、enhanced chemiluminescence (Amersham, USA) で可視化した。

(6) 蛍光免疫染色

チャンバースライド上で培養した細胞を PBS で洗浄し、4% パラホルムアルデヒドで固定した後、抗 β -catenin モノクローナル抗体 (BD Biosciences) でインキュベートし、抗マウス IgG Alexa Fluor488 (Invitrogen) で染色、FV300-IX71 共焦点レーザー顕微鏡 (オリンパス, 東京) で観察を行った。

(7) コロニーフォーメーションアッセイ

6 ウェルプレート上に 1 \times 10⁵ の細胞をまき、

24 時間後にトランスフェクションを施行。それぞれ 4 μ g の pcDNA3.1His-DKK ベクターもしくは空ベクターを Lipofectamine2000 (invitrogen) でトランスフェクトした。トランスフェクションの 24 時間後に、60mm 培養皿に細胞を継代し、G418 を 0.6mg/ml の濃度で含む培地中で 14 日間選択培養。選択培養後コロニーをギムザ染色し、コロニーの総面積を Image J(NIH, USA) ソフトウェアで解析。

(8) 統計分析

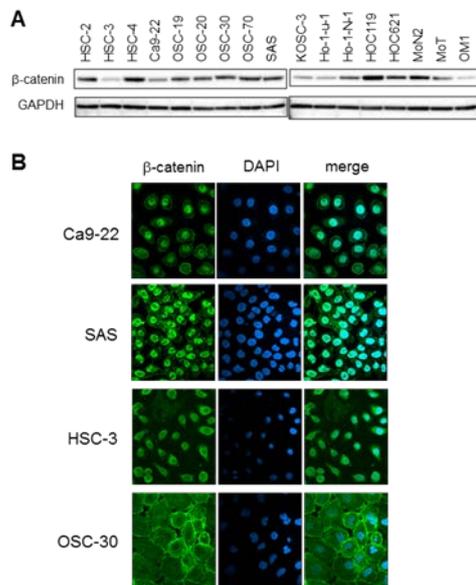
統計解析には SPSS version11.0(SPSS Inc, USA) を使用。DKK 遺伝子のメチル化と臨床病理学的因子との相関について、マン・ホイットニーの U 検定およびフィッシャーの正確確率検定を用いて評価した。P 値 0.05 未満を有意差ありと判定した。

4. 研究成果

(1) OSCC 細胞株における β -catenin 発現の解析

OSCC における Wnt シグナル経路の活性化を知るために、まずはじめに OSCC 細胞株における β -catenin 発現の解析を行った。抗 β -catenin 抗体を用いたウエスタンブロット解析では、調べたすべての細胞株において内因性の β -catenin の発現を認めた (Figure 1A)。

Figure1



蛍光免疫染色においては 15 細胞株 14 細胞株 (93%) において内因性 β -catenin の核または細胞質への局在を認めた (table II および figure 1B)。7 細胞株 (47%) で β -catenin の細胞膜への局在を認めたが、これらの細胞の多くのが核や細胞質でも局在が見られた。これらのことから、OSCC において Wnt シグナルが活性化している可能性が考えられた。

TableII

	β -catenin staining	APC	CTNNB1	CDH1	DKK1	DKK2	DKK3
HSC-2	cytoplasmic	WT	WT	U	U	M	U
HSC-3	cytoplasmic	WT	WT	U	U	M	U
HSC-4	cytoplasmic/membranous	WT	WT	U	U	M	U
Ca9-22	nuclear	WT	WT	U	U	M	M
OSC-19	cytoplasmic	WT	WT	U	U	M	U
OSC-20	cytoplasmic	WT	WT	U	M	M	U
OSC-30	cytoplasmic/membranous	WT	WT	U	U	U	U
OSC-70	cytoplasmic	WT	WT	U	U	M	U
SAS	nuclear	WT	WT	U	U	M	U
KOSC-3	cytoplasmic	WT	WT	U	U	M	M
He-1-u-1	ND	WT	WT	U	U	M	U
He-1-N-1	nuclear/cytoplasmic/membranous	WT	WT	U	U	M	U
HOC119	membranous	WT	WT	U	U	M	U
HOC621	cytoplasmic/membranous	WT	WT	U	U	U	U
OM1	cytoplasmic/membranous	WT	WT	U	U	M	U
MeT	ND	WT	WT	U	U	M	U
OM4	membranous/cytoplasmic	WT	WT	U	U	M	U

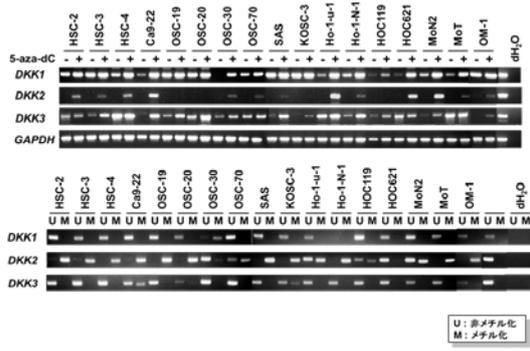
(2) 口腔扁平上皮癌における APC および CTNNB1、CDH1 の解析

口腔扁平上皮癌細胞における Wnt シグナル活性化のメカニズムを明らかにするため、APC および CTNNB1 の変異解析を行った。17 の口腔扁平上皮癌細胞株を用いて APC 遺伝子の mutation cluster 領域である codon 1140-1545 を調べた。この領域は大腸癌においては体細胞突然変異が高頻度に見られる領域であるが、今回調べた中において、OSCC においては遺伝子変異が一つも見つからなかった (table II)。我々は口腔扁平上皮癌における CTNNB1 の変異についても解析を行った。ヒト癌において最も変異の多く見つかっている exon3 について変異解析を行った。しかしながら、口腔扁平上皮癌では APC 同様、CTNNB1 においても変異は見つからなかった。加えて、E-cadherin の消失によって細胞膜に局在する β -catenin が減少する可能性が考えられることから、口腔扁平上皮癌細胞株において CDH1 がエピジェネティックに不活性化されているかどうかを調べた。MSP 解析では CDH1 のメチル化は調べた細胞株中では一つも認められず、RT-PCR ですべての細胞株で CDH1 の発現が確認された。口腔扁平上皮癌細胞株においては、APC、CTNNB1、CDH1 ともメチル化は見られなかった。

(3) 口腔扁平上皮癌細胞株における DKK 遺伝子の発現解析

以前に我々は胃癌や大腸癌において DKK がメチル化によって抑制されていることを報告した。それゆえ、まずは口腔扁平上皮癌細胞株で 3 つの DKK について発現の形跡を行った。17 細胞株中 3 株 (18%) で DKK1-mRNA の発現消失が見られ、DNA メチル化転移酵素阻害剤である 5-aza-dC によって発現の回復が見られた (Figure 2A)。DKK2 はすべての細胞株で発現が消失していた。DKK3 の mRNA レベルは 8 細胞株 (47%) で発現消失が見られ、5-aza-dC で発現の回復が見られた (Figure 2A)。正常口腔粘膜では解析を行った 3 つの DKK すべて発現が見られた (Figure 2A)。これらより、口腔扁平上皮癌において DKK がメチル化を通じたエピジェネティックな抑制の標的となっている可能性が示唆された。

Figure 2



(4) 口腔扁平上皮癌細胞株における DKK 遺伝子のメチル化解析

MSP 法にてメチル化の解析を行った。口腔扁平上皮癌細胞株において 17 細胞株中 1 株 (6%) において DKK1 遺伝子のメチル化を認められた (Figure 2B、Table II)。DKK2 は 15 細胞株 (88%)、DKK3 は 2 細胞株 (12%) でメチル化が認められた (Figure 2B、Table II)。少しの例外を除いて、メチル化と DKK 遺伝子の発現抑制との間には相関が見られた正常口腔粘膜においてはいずれの DKK 遺伝子ともメチル化は認められなかった (Figure 2B)。

(5) OSCC 臨床例における DKK のメチル化

口腔扁平上皮癌細胞株で DKK の高頻度なメチル化が認められた事より、口腔扁平上皮癌臨床例における異常メチル化の解析を行った。MSP 法では DKK1 は 42 例中 10 例 (24%)、DKK2 は 44 例中 16 例 (36%)、DKK3 は 43 例中 7 例においてメチル化が見られた (Table III、figure III)。解析を行った 44 症例のうち 22 症例 (50%) において、DKK1、-2、-3 のうち少なくとも 1 つ以上のメチル化が認められた (Table III)。一般的に DKK のメチル化は癌特異的に見られるのに対し、口腔扁平上皮癌の非癌部でものメチル化が検出された (Figure III)。これは癌部に隣接する非癌部から組織を採取したため、癌細胞が混入していた可能性が考えられる。

次に、DKK 遺伝子メチル化の状態と口腔扁平上皮癌の臨床病理学的所見との関連について検討を行った (Table III)。男性において DKK1 のメチル化が多い傾向にあった。その他 DKK のメチル化は年齢、T 分類、N 分類、N 分類、分化度、病期分類、喫煙歴、飲酒歴との間に関連を見いだす事は出来なかった。

Figure 3

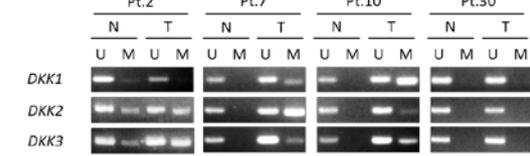


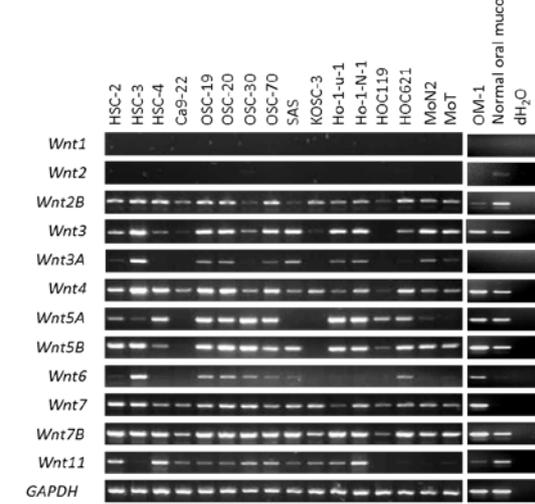
Table III

	DKK1 (n=42)		DKK2 (n=44)		DKK3 (n=43)		All genes	
	non-methylated	methylated	non-methylated	methylated	non-methylated	methylated	non-methylated	methylated
Age	44	32	37	24	36	30	20	20
Sex	44	32	37	24	36	30	20	20
Stage	44	32	37	24	36	30	20	20
Pathologic complete response	44	32	37	24	36	30	20	20
Wnt1	44	32	37	24	36	30	20	20
Wnt2	44	32	37	24	36	30	20	20
Wnt3	44	32	37	24	36	30	20	20
Wnt4	44	32	37	24	36	30	20	20
Wnt5A	44	32	37	24	36	30	20	20
Wnt5B	44	32	37	24	36	30	20	20
Wnt6	44	32	37	24	36	30	20	20
Wnt7	44	32	37	24	36	30	20	20
Wnt7B	44	32	37	24	36	30	20	20
Wnt11	44	32	37	24	36	30	20	20
GAPDH	44	32	37	24	36	30	20	20

(6) DKK 高発現による口腔扁平上皮癌細胞の増殖抑制

これまでの結果より、DKK の発現消失が口腔扁平上皮癌細胞の発現消失につながっている可能性が考えられた。口腔扁平上皮癌細胞株における Wnt リガンドの発現を RT-PCR によって解析した。Wnt1、Wnt2 遺伝子はいずれの口腔扁平上皮癌細胞株においても発現が見られなかったものの、すべての口腔扁平上皮癌細胞株において、複数の Wnt 遺伝子の発現が認められた (Figure 4)。特に Wnt3A、-6、-7 は多くの口腔扁平上皮癌細胞株で発現が認められた。正常口腔粘膜においては Wnt 遺伝子ファミリーの発現は一つも見られなかった (Figure 4)。

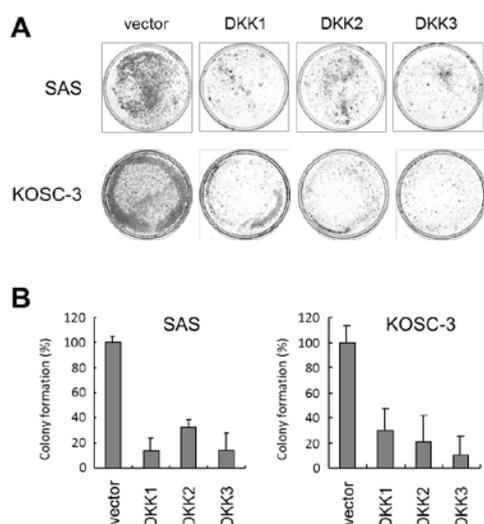
Figure 4



これらの事より、口腔扁平上皮癌細胞において DKK 遺伝子の発現消失は Wnt リガンドに何らかの影響を与えている可能性が考えられ

た。我々は口腔扁平上皮癌細胞株である SAS と KOSC-3 において DKK1、-2、-3 をトランスフェクションで強制発現させ、コロニーフォーメーション解析を行う事で DKK による腫瘍増殖抑制能の機能解析を行った (Figure 5)。これらの細胞で DKK を強制発現させる事によって細胞増殖が明らかに抑制された事から、口腔扁平上皮癌においては DKK は Wnt シグナルを抑制する事によって腫瘍を抑制している可能性が示唆された。

Figure 5



(7) まとめ

正常口腔上皮ではβ-catenin 蛋白は細胞膜に局在しているが、口腔扁平上皮癌では膜局在が減少・消失して細胞質・核への集積が増加することが複数の研究者により報告されている。さらに、そのようなβ-catenin 蛋白の発現変化は予後不良因子であるという報告もある。我々の蛍光免疫染色の結果からも、ほとんどの細胞株においてβ-catenin の細胞質・核集積を認める一方、細胞膜局在を示した細胞株は半数以下であった。これらのことから口腔扁平上皮癌の発癌に Wnt シグナルが重要な役割を担っている事が推測される。しかし、これまでの報告から口腔扁平上皮癌における APC、CTNNB1、AXIN の遺伝子変異頻度は極めて低いとされている。さらに複数の研究者が APC の LOH を解析しているがその頻度は 13%~73% とばらつきが多い。我々も口腔扁平上皮癌細胞株における APC、CTNNB1 の遺伝子変異および CDH1 のメチル化を解析したが、一例も異常を認めなかった。

今回、我々は口腔扁平上皮癌細胞株および臨床例において DKK 遺伝子メチル化が高頻度であることを明らかにした。口腔扁平上皮癌における APC、CTNNB1、AXIN、CDH1 遺伝子異常が稀であることと併せると DKK メチル化は口腔扁平上皮癌における Wnt シグナル活性化

の主要なメカニズムの一つであると考えられる。口腔扁平上皮癌において DKK が癌抑制遺伝子として機能しているかどうかを確認するために、細胞株における Wnt リガンド遺伝子の発現解析を行ったところ、全ての細胞株において複数の Wnt リガンドの発現が確認されたことから、DKK の消失は Wnt シグナルの活性化につながると考えられた。DKK 発現が消失した口腔扁平上皮癌細胞に DKK 遺伝子を導入することで増殖が抑制されたことから、DKK が口腔扁平上皮癌における新規の癌抑制遺伝子である事が示唆された。

本研究は口腔扁平上皮癌における DKK 遺伝子群のメチル化と発現消失を初めて明らかにした。口腔扁平上皮癌において他の Wnt シグナル関連遺伝子異常は稀であることから、DKK 遺伝子メチル化は Wnt シグナル活性化の要因の一つと考えられる。DKK は口腔扁平上皮癌の診断・治療において重要な分子マーカーとなりうる事が示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

曾我部 陽平 (SOGABE YOHEI)
札幌医科大学・医学部・研究員
研究者番号：50468104

(2) 研究分担者

なし

(3) 研究協力者

荻 和弘 (OGI KAZUHIRO)
札幌医科大学・医学部・訪問研究員
研究者番号：40433114
平塚 博義 (HIRATSUKA HIROYOSHI)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：50165180