

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501352

研究課題名(和文)悪性胸膜中皮腫のプロテオーム解析による分子標的治療の開発

研究課題名(英文) Trial for identification of targeting molecules in malignant pleural mesothelioma by proteomics

研究代表者

藏満 保宏 (KURAMITSU, Yasuhiro)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50281811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：悪性胸膜中皮腫細胞株と正常中皮細胞株との比較プロテオーム解析の結果、HSP70、GRP78、PDX2、Protein disulfide isomerase A3、annexin A3、14kDa phosphohistidine phosphataseの発現が正常胸膜中皮細胞と比較して増強していることを明らかとなった。また、DDX39の発現も増強していることが明らかとなった。ノックダウンを行い、悪性胸膜中皮腫3株における増殖能、運動能への影響を調べたが、上記のいずれの蛋白質をノックダウンしても、有意差を持つての増殖抑制、運動能抑制を示さなかった。

研究成果の概要(英文)：Proteomic differential display between malignant pleural mesothelioma cells and normal pleural cell identified HSP70, GRP78, PDX2, Protein disulfide isomerase A3, annexin A3 and 14kDa phosphohistidine phosphatase as up-regulated proteins in malignant pleural mesothelioma cells compared to normal pleural cell. Furthermore, by means of western blot analysis it was shown that in malignant pleural mesothelioma cells DDX39 was up-regulated compared to normal pleural cell. However, after knocking down these candidates the proliferation and moving were not down-regulated. After this we would like to investigate the function of these identified proteins in the tumorigenesis and pathogenesis of malignant pleural mesothelioma.

研究分野：腫瘍学

キーワード：バイオマーカー 悪性胸膜中皮腫 分子標的 プロテオミクス

## 1. 研究開始当初の背景

過去に職場においてアスベストに暴露し、現在悪性中皮腫に罹患している患者は増加の一方であり、30-40年という潜伏期間から考えると2020年が発症のピークと予測されており、今後の悪性中皮腫患者の対応が非常に重要となる。悪性中皮腫は臓器転移を起こすことはほとんどないものの、診断時にすでに広範囲に進展し、根治手術が不可能であることが多く化学療法のみでの治療の場合、ペメトレキセドとシスプラチンの併用である程度の効果をあげているが有効とは言えず、予後はきわめて不良で、1年生存率が50%、2年生存率が20%であり、満足できる治療ができていない。それ故、もっと有効な治療成績が見込まれる新たな標的治療のターゲットとなるタンパクの同定が是非とも必要となっている。

これまで悪性中皮腫のマーカー同定のために多くの研究がなされてきており、成果としてヒアルロン酸、可溶性メソテリン関連蛋白(SMRP)、keratin 19(CYFRA)等が見つかって来ている。(Diagnostic and prognostic value of soluble mesothelin-related proteins in patients with malignant pleural mesothelioma in comparison with benign asbestosis and lung cancer. Schneider J et al. J Thorac Oncol. 3(11), 1317-1324, 2008)(Clinical utility of diagnostic markers for malignant pleural mesothelioma. Grigoriu BD et al. Monaldi Arch Chest Dis. 71(1), 31-38, 2009)しかしながら、自殺遺伝子を導入するなどの応用は試みられているものの、診断に有効なマーカーであり直接標的治療に役立つような標的タンパクはまだ明らかとなっていない。そこで、申請者がこれまで培ってきたプロテオミクスの技術を駆使して治療の標的となるタンパクを同定し、標的タンパクに照準を合わせた治療法の開発を目的とする。申請者はこれまで癌(肝癌、膵癌、食道癌、乳癌、口腔扁平上皮癌)のプロテオーム解析を精力的に行って来ており、多くの癌関連蛋白や血清中の自己抗体を同定して発表してきている。(Proteomics-Clin Appl 3, 1338-1347, 2009; Pancreas 38 (2), 224-226, 2009; Electrophoresis 30(12), 2168-2181, 2009; Molecular Medicine Reports 1, 429-434, 2008; Molecular Medicine Reports 1, 197-201, 2008; Proteomics-Clin Appl 1(2), 215-223, 2007; International Journal of Oncology 31(6), 1345-1350, 2007; International Journal of Oncology 30(4), 849-855, 2007; Proteomics 6, 3894-3900, 2006; International Journal of Oncology 28(3), 625-631, 2006; Electrophoresis 27, 1659-1668, 2006; Electrophoresis 27, 1651-1658, 2006; Proteomics 5(4), 1024-1032, 2005; Proteomics 5(6), 1686-1692, 2005;

Proteomics 4(7), 2111-2116, 2004; Proteomics 3(12), 2487-2493, 2003)これらのいずれの研究も二次元電気泳動(2DE)と質量分析を用いたプロテオミクスの技術によって行ってきており、申請者の研究グループによる基本的な癌細胞、癌組織、あるいは血清等のプロテオーム解析及びsiRNAを用いたのロックダウンのストラテジーは完成している。また、二次元電気泳動に頼らない、質量分析のみによるストラテジーもほぼ完成した状態である。

これまで、正常中皮細胞株 MeT-5A とアスベスト暴露に起因する悪性中皮腫細胞株 NCI-H2052 のプロテオーム解析を 2DE と質量分析を用いて行ってきた。その結果、悪性中皮腫細胞株 NCI-H2052 において cofilin-2 など 28 種類の蛋白の発現が増強、peroxiredoxin-6 など 10 種類の蛋白の発現が減弱していることが明らかとなった。さらに 2 種類の悪性中皮腫細胞株 NCI-H28 と NCI-H2452 を入手し同様のプロテオーム解析を行った結果、astrocytic phosphoprotein PEA-15 が共通して増強していたため、siRNA を用いてロックダウンしたところ 7-15% と少ないながらも有意差をもって増殖が抑制されたことから悪性胸膜中皮腫の標的治療のターゲットの一つとして期待している一方、抑制率が 7-15% までであることから他の標的タンパク同定の必要性も認識している。(Proteomic differential display analysis identified up-regulated astrocytic phosphoprotein PEA-15 in human malignant pleural mesothelioma cell lines. Kuramitsu Y et al. Proteomics 9, 5078-5089, 2009)

## 2. 研究の目的

悪性胸膜中皮腫は胸膜の中皮細胞に由来する悪性腫瘍である。過去に職場や日常生活においてアスベストに暴露し、現在悪性胸膜中皮腫に罹患している患者は増加の一方であり、診断時にすでに広範囲に進展し根治手術が不可能であることが多く、化学療法のみでの治療の場合ペメトレキセドとシスプラチンの併用である程度の効果をあげているものの有効とは言えず、予後はきわめて不良である。そこで申請者がこれまで培ってきたプロテオミクスの技術を駆使して治療の標的となるタンパクを同定し、標的タンパクに照準を合わせた治療法の開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 悪性胸膜中皮腫細胞株と正常胸膜中皮腫細胞株、正常胸膜組織の比較プロテオーム解析 二次元電気泳動

悪性胸膜中皮腫細胞株 NCI-H28、NCI-H2052、NCI-H2452、正常胸膜中皮細胞株 MeT-5A、正常胸膜組織から蛋白質を抽出し、濃度測定後にタンパク量 80mg を用いて等電点電気泳動を行なった (IPG strip, 11cm、BIO-RAD)

(rehydration、10 時間 ; 0-500V、4 時間 ; 500-1000V、1 時間;1000-8000V、4 時間;8000V、20 分 ; 500V で持続待機)。2ME を含む平衡化バッファー、ヨードアセトアミドを含む平衡化バッファーで連続して平衡化を行った後に SDS-PAGE を行った (200V)。40%エタノール、10%酢酸で 4 時間固定した後に蛍光タンパク染色液 Flamingo Gel Stain によって一晩振とうで染色を行った。蛍光スキャナー (Perkin-Elmer) によってタンパクスポットを検出記録した。画像解析ソフトウェア SameSpot (Non-Linear) を用いてスポットの蛍光強度の比較を悪性胸膜中皮腫細胞株 NCI-H28、NCI-H2052、NCI-H2452 と正常胸膜中皮細胞株 MeT-5A 間で行った。

### 質量分析

悪性胸膜中皮腫細胞株 NCI-H28、NCI-H2052、NCI-H2452 と正常胸膜中皮細胞株 MeT-5A 間でその発現に有意差のみられるタンパクスポットを切り出した後にトリプシンによってゲル内消化を行い、質量分析計 LC/MSD Trap XCT (Agilent Technologies) と専用の解析ソフトウェアを用いた peptide sequence trap (PST) 分析によってタンパクの同定を行った。

## (2) 比較プロテオーム解析で同定されたタンパクの発現と機能の確認 ウェスタンブロット

悪性胸膜中皮腫細胞株 NCI-H28、NCI-H2052、NCI-H2452 と正常胸膜中皮細胞株 MeT-5A 間でその発現に有意差のみられるタンパクの発現を特異抗体を用いたウェスタンブロットで確認した。

### ノックダウン

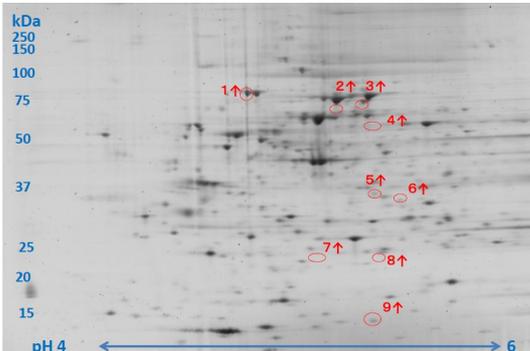
同定されたタンパクの siRNA を用いたノックダウンにより、増殖と浸潤・運動への影響の確認を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 悪性胸膜中皮腫細胞株と正常胸膜中皮細胞株、正常胸膜組織の比較プロテオーム解析 二次元電気泳動

悪性胸膜中皮腫細胞株 NCI-H28、NCI-H2052、NCI-H2452 と正常胸膜中皮細胞株 MeT-5A 間でその発現に有意差のみられるタンパクスポットとして 9 スポットが同定された (図 1)。

The Up-regulated Protein Spots in Malignant Pleural Mesothelioma



(図 1)

### 質量分析

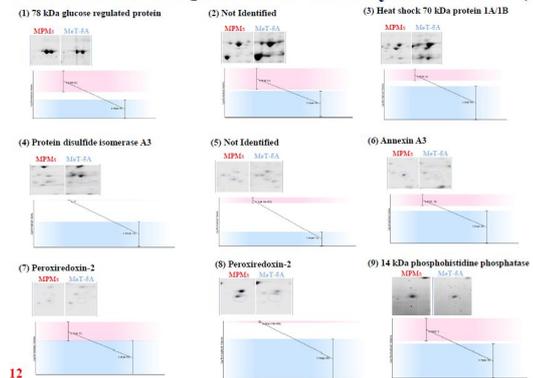
二次元電気泳動で同定された 9 スポットをゲル内消化の後に質量分析を行ったところ、2 スポットは同定できなかったが、残りの 7 スポットはそれぞれ HSP70、GRP78、PDX2、PDX2、Protein disulfide isomerase A3、annexin A3、14kDa phosphohistidine phosphatase であると同定された (表 1) (図 2)。

### Identified Protein Spots by LC-MS/MS

Spot No.	Protein name	Accession No.	Theoretical pI	Theoretical Mr	Distinct peptides	Sequence coverage (%)	MS/MS search score	Fold
1	78 kDa glucose regulated protein	P11021	5.07	72333.3	7	17	98.33	3.6 ↑
2	—							
3	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	P08107	5.48	70052.6	4	6	52.66	3.5 ↑
4	Protein disulfide isomerase A3	P30101	5.99	56782.7	5	12	59.92	5.2 ↑
5	—							
6	Annexin A3	P12429	5.63	36375.5	2	11	29.71	2.4 ↑
7	Peroxiredoxin 2	P32119	5.66	21892	8	40	96.75	5.9 ↑
8	Peroxiredoxin 2	P32119	5.66	21892	1	9	13.68	3.1 ↑
9	14kDa phosphohistidine phosphatase	Q9NRX4	5.65	13832.6	1	10	11.49	4 ↑

(表 1)

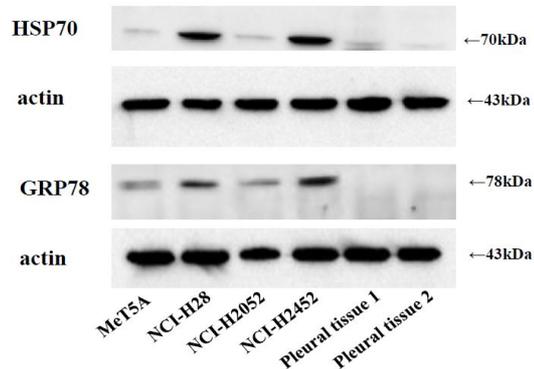
### The Results of Quantitative Analysis of 2-DE (1)



(図 2)

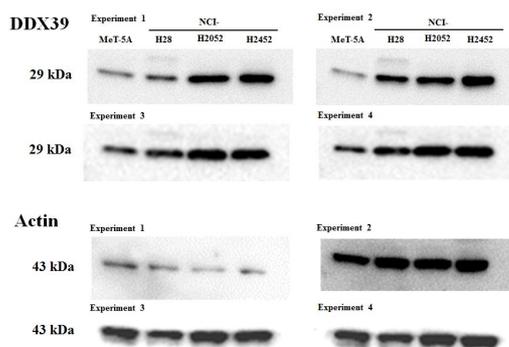
### (2) 比較プロテオーム解析で同定されたタンパクの発現と機能の確認 ウェスタンブロット

プロテオーム解析で同定された 7 スポット 6 タンパクのうち、HSP70、GRP78、PDX2、annexin A3 の発現を特異抗体を用いたウェスタンブロットを行ったところ、いずれも悪性胸膜中皮腫細胞株 NCI-H28、NCI-H2052、NCI-H2452 において正常胸膜中皮細胞株 MeT-5A、正常胸膜組織と比較して発現増強が確認できた (図 3)。



(図 3)

また、肺癌を含むいくつかの癌で発現増強の報告がある DDX39 が悪性胸膜中皮腫においても増強しているかを悪性胸膜中皮腫細胞株 NCI-H28、NCI-H2052、NCI-H2452 と正常胸膜中皮細胞株 MeT-5A 間でのウェスタンブロットで確認したところ、中皮腫細胞株においての DDX39 発現の増強が確認できた(図4)。



(図4)

### ノックダウン

また、悪性胸膜中皮腫細胞株 NCI-H28、NCI-H2052、NCI-H2452 細胞を、HSP70、GRP78、PDX2、annexin A3 の siRNA を用いてノックダウンを行い、MTS アッセイと wound healing アッセイを行って増殖と浸潤・運動への影響を調べたところ、いずれも影響が確認されなかった。

行なってきたプロテオーム解析で同定されたタンパクはどれも標的治療の分子としては弱いものであったが、悪性胸膜中皮腫の病態を表す分子の可能性がことから、今後はこれらの分子と悪性胸膜中皮腫の病態、発生に関係した研究を行う予定である。また、当初予定されていたヒト悪性胸膜中皮腫組織のプロテオーム解析は、手術材料の入手不可のため、実施できなかったため、今後入手でき次第解析を行いたいと考えている。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 29 件)

(1) Tokuda K, Kuramitsu Y, Baron B, Kitagawa T, Tokuda N, Kobayashi D, Nagayama M, Araki N, Sonoda KH, Nakamura K. Up-regulation of DRP-3 long isoform during the induction of neural progenitor cells by glutamate treatment in the ex vivo rat retina. *Biochem Biophys Res Commun* 査読有 2015 印刷中

(2) Zhang X, Kuramitsu Y, Ma A, Zhang H, Nakamura K. Endoplasmic reticulum protein profiling of heat-stressed Jurkat cells by one dimensional electrophoresis and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Cytotechnology* 査読有 2015 印刷中

(3) Kuramitsu Y, Wang Y, Kitagawa T, Tokuda K, Akada J, Tokunaga M, Nakamura K. High mobility group box 1 and Mitogen-activated protein kinase activated protein kinase-2 are up-regulated in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. *Anticancer Res* 査読有 2015 印刷中

(4) Wang Y, Kuramitsu Y, Kitagawa T, Tokuda K, Baron B, Akada J, Nakamura K. The histone deacetylase inhibitor Valproic Acid sensitizes gemcitabine-induced cytotoxicity in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells possibly through inhibition of the DNA repair protein gamma-H2AX. *Targeted Oncology* 査読有 2015 印刷中

(5) Kitagawa T, Okita H, Baron B, Tokuda K, Nakamura M, Wang Y, Akada J, Hoshida H, Akada R, Kuramitsu Y, Nakamura K. Mutant screening for oncogenes of Ewing's sarcoma using yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology* 査読有 2015 印刷中

(6) Kuramitsu Y, Tanaka I, Wang Y, Okada F, Tokuda K, Kitagawa T, Akada J, Nakamura K. Inflammation-related tumor progression in murine fibrosarcoma exhibited over-expression of Sex-determining region Y-box 2 (Sox2) compared to parental regressor cells. *Anticancer Res* 査読有 2015 印刷中

(7) Wang Y, Kuramitsu Y, Kitagawa T, Baron B, Yoshino S, Maehara S, Maehara Y, Oka M, Nakamura K. Cofilin-phosphatase slingshot-1L (SSH1L) is over-expressed in pancreatic cancer (PC) and contributes to tumor cell migration. *Cancer Letters* 査読有 360, 2015, 171-176.

(8) Ebrahimi M, Sharifi K, Islam A, Miyazaki H, Yasumoto Y, Kagawa Y, Yamamoto Y, Kitagawa T, Kuramitsu Y, Nakamura K, Owada Y. Proteomic differential display analysis reveals decreased expression of PEA-15 and vimentin in FABP7-deficient astrocytes. *J Proteomics & Bioinformatics* 査読有 8, 2015, 9-14.

(9) Baron B, Fujioka T, Kitagawa T, Maehara S, Maehara Y, Nakamura K, Kuramitsu Y. Comparative proteomic analysis of two stress-management strategies in pancreatic cancer. *Cancer Genomics & Proteomics* 査読有 12, 2015, 83-87.

(10) Baron B, Kitagawa T, Nakamura K, Kuramitsu Y. Isolation of a growth factor stress-induced pancreatic cancer sub population: insight into changes due to micro-environment. *Cancer Genomics &*

Proteomics 査読有 12, 2015, 49-55.

**(11)** Baron B, Wang Y, Kuramitsu Y, Nakamura K. Resistance to gemcitabine in the pancreatic cancer cell line KLM1-R abolished by metformin action. *Anticancer Res* 査読有 35, 2015, 1941-1949.

**(12)** Nakao M, Ueno T, Oga A, Kuramitsu Y, Nakatsu H, Oka M. Proposal of intestinal tissue engineering combined with Bianchi's procedure. *Journal of Pediatric Surgery* 査読有 50, 2015, 573-580.

**(13)** Wang Y, Kuramitsu Y, Tokuda K, Baron B, Kitagawa T, Akada J, Maehara S, Maehara Y, Nakamura K. Gemcitabine induces poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) degradation through autophagy in pancreatic cancer. *PLOS ONE* 査読有 9, 2014, DOI:10.1371/journal.pone.0109076.

**(14)** Akada J, Okuda M, Hiramoto N, Kitagawa T, Zhang X, Kamei S, Ito A, Nakamura M, Uchida T, Hiwatani T, Fukuda Y, Nakazawa T, Kuramitsu Y, Nakamura K. Proteomic characterization of *Helicobacter pylori* CagA antigen recognized by child serum antibodies and its epitope mapping by peptide array. *PLOS ONE* 査読有 9, 2014, DOI:10.1371/journal.pone.0104611.

**(15)** Nawata J, Kuramitsu Y, Wang Y, Kitagawa T, Tokuda K, Baron B, Akada J, Suenaga S, Kaino S, Maehara S, Maehara Y, Sakaida I, Nakamura K. Active hexose-correlated compound down regulates Sex-determining region Y-box 2 of pancreatic cancer cells. *Anticancer Res* 査読有 34, 2014, 4807-4811.

**(16)** Kanda Y, Kawaguchi T, Kuramitsu Y, Kitagawa T, Kobayashi T, Takahashi N, Tazawa H, Habelhah H, Hamada J, Kobayashi M, Hirahata M, Onuma K, Osaki M, Nakamura K, Kitagawa T, Hosokawa M, Okada F. Fascin regulates chronic inflammation-related human colon carcinogenesis by inhibiting cell anoikis. *Proteomics* 査読有 14, 2014, 1031-1041.

**(17)** Wang Y, Kuramitsu Y, Tokuda K, Okada F, Baron B, Akada J, Kitagawa T, Nakamura K. Proteomic analysis indicates that overexpression and nuclear translocation of lactoylglutathione lyase (GLO1) is associated with tumor progression in murine fibrosarcoma. *Electrophoresis* 査読有 35, 2014, 2195-2202.

**(18)** Sarvari J, Mojtahedi Z, Kuramitsu Y, Fattahi MR, Ghaderi A, Nakamura K, Erfani N. Comparative proteomics of sera from HCC patients with different origins. *Hepatitis Monthly* 査読有 14, 2014, e13103.

**(19)** Suenaga S, Kuramitsu Y, Kaino S, Maehara S, Maehara Y, Sakaida I,

Nakamura, K. Active hexose-correlated compound down-regulates HSP27 of pancreatic cancer cells, and helps the cytotoxic effect of gemcitabine. *Anticancer Res* 査読有 34, 2014, 141-146.

**(20)** Suenaga S, Kuramitsu Y, Wang Y, Baron B, Kitagawa T, Akada J, Tokuda K, Kaino S, Maehara S, Maehara Y, Sakaida I, Nakamura K. Human pancreatic cancer cells with acquired gemcitabine resistance exhibit significant up-regulation of peroxiredoxin 2 compared to sensitive parental cells. *Anticancer Res* 査読有 33, 2013, 4821-4826.

**(21)** Sarvari J, Mojtahedi Z, Taghavi SA, Kuramitsu Y, Shamsi Shahrabadi M, Ghaderi A, Nakamura K. Differentially expressed proteins in chronic active hepatitis, cirrhosis, and HCC related to HCV infection in comparison with HBV infection: A proteomics study. *Hepatitis Monthly* 査読有 13, 2013, DOI:10.5812/hepatmon.8351.

**(22)** Tazawa H, Kawaguchi T, Kobayashi T, Kuramitsu Y, Wada S, Satomi Y, Nishino H, Kobayashi M, Kanda Y, Osaki M, Kitagawa T, Hosokawa M. Chronic inflammation derived Nitric Oxide causes conversion of human colonic adenoma cells into adenocarcinoma cells. *Experimental Cell Res* 査読有 319, 2013, 2835-2844.

**(23)** Tanaka T, Kuramitsu Y, Wang Y, Baron B, Kitagawa T, Tokuda K, Hirakawa K, Yashiro M, Naito S, Nakamura K. Glyoxalase 1 as a candidate for indicating the metastatic potential of SN12C human renal cell carcinoma cell clones. *Oncology Reports* 査読有 30, 2013, 2365-2370.

**(24)** Akada J, Kamei S, Ito A, Ito M, Kitagawa T, Furumoto H, Kato Y, Tamesa M, Takashima M, Shirai M, Yamano H, Oka M, Kuramitsu Y, Nakamura K. A new type of protein chip to detect hepatocellular carcinoma-related autoimmune antibodies in the sera of hepatitis C virus-positive patients. *Proteome Science* 査読有 11, 2013, 33.

**(25)** Kuramitsu Y, Wang Y, Okada F, Baron B, Tokuda K, Kitagawa T, Akada J, Nakamura K. Malignant progressive tumor cell clone exhibits significant up-regulation of cofilin-2 and 27 kDa modified form of cofilin-1 compared to regressive clone. *Anticancer Res* 査読有 33, 2013, 3661-3665.

**(26)** Kuramitsu Y, Suenaga S, Wang Y, Tokuda K, Kitagawa T, Tanaka T, Akada J, Maehara S, Maehara Y, Nakamura K. Up-regulation of DDX39 in human pancreatic cancer cells with acquired

gemcitabine-resistance compared to gemcitabine-sensitive parental cells. Anticancer Res 査読有 33, 2013, 3133-3136.

(27) Kuramitsu Y, Tominaga W, Baron B, Tokuda K, Wang Y, Kitagawa T, Nakamura K. Up-regulation of DDX39 in human malignant pleural mesothelioma cell lines compared to normal pleural mesothelial cells. Anticancer Res 査読有 33, 2013, 2557-2560.

(28) Sugimoto K, Matsui K, Ozawa R, Kuramitsu Y, Kley J, David A, Muck A, Nakamura K, Boland W, Takabayashi J. Induced defence in lima bean plants exposed to the volatiles from two-spotted spider mite-infested conspecifics is independent of the major protein expression. Journal of Plant Interactions 査読有 8, 2013, 219-224.

(29) Takenawa T, Kuramitsu Y, Wang Y, Okada F, Tokuda K, Kitagawa T, Ueyama Y, Nakamura K. Proteomic analysis showed down-regulation of nucleophosmin in progressive tumor cells compared to regressive tumor cells. Anticancer Res 査読有 33, 2013, 153-160.

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) Kuramitsu Y, Tominaga W, Baron B, Kitagawa T, Akada J, Nakamura K. Proteomics analysis of human malignant pleural mesothelioma cells compared to normal mesothelial cells.

HUPO 12th Annual World Congress, 2013 年 9 月 14-18 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

(2) Kuramitsu Y, Tominaga Y, Baron B, Kitagawa T, Nakamura K. Proteomic analysis showed heat shock 70 kDa protein and 78 kDa glucose-regulated protein were up-regulated in human malignant pleural mesothelioma cells.

European Multidisciplinary Conference in Thoracic Oncology (EMCTO), 2013 年 5 月 9-11 日、Lugano (Switzerland)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

藏満 保宏 (KURAMITSU, Yasuhiro)  
山口大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号 : 50281811

(2) 研究分担者

上田 和弘 (UEDA, Kazuhiro)  
山口大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号 : 90420520

(3) 連携研究者

なし