

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460454

研究課題名(和文) 遺伝子コピー数変化による早期胃癌の進行期への進展リスク評価システムの構築

研究課題名(英文) System construction of progression risk assessments of early to advanced gastric carcinomas by genomic copy-number profile

研究代表者

杉原 洋行 (Sugihara, Hiroyuki)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：30171169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、基本的に不可逆的に変化するゲノムコピー数変化を利用して、胃癌の早期と進行期の間で系譜がつながっているのか否かを明らかにし、個々の早期病変に対し、進展リスクの評価に基づいた適切な治療が選択できることを目指した。方法は、アレイCGHによって網羅的に遺伝子コピー数を検出し、得られたコピー数プロファイルを階層的クラスタ解析で分類した。その結果、未分化型では早期癌はほぼ必ず進行癌に至ること、分化型では、腺腫の大半や早期癌の一部は進行癌に進展しないこと、転移リスクは早期段階での予知が困難であることがわかった。実用化のために、分化型の進展リスクの予知に有用なRXRB等の遺伝子を抽出した。

研究成果の概要(英文)：Using basically irreversible genomic copy-number changes, we aimed to examine continuity and discontinuity of genetic lineages between early and advanced gastric carcinomas (GCs) to enable individual early stage lesions to be treated appropriately on the basis of progression risk assessments. The genomic copy-number profile of each tumor sample, detected by array-based comparative genomic hybridization, was classified by hierarchical clustering. Our data obtained suggested that early undifferentiated-type GCs inevitably progress to advanced stages; in differentiated-type GCs, part of early GCs and large part of non-invasive neoplasms never become advanced; the risk of lymph node metastasis is determined stochastically and difficult to predict in earlier stages. We also extracted some genes, such as RXRB, that are useful in the prediction of progression risk.

研究分野：人体病理学へのゲノム科学の応用

キーワード：胃癌 アレイCGH解析 階層的クラスタリング 定量的PCR 進展リスク 転移リスク

1. 研究開始当初の背景

わが国の胃癌はがん死亡率のトップの座を肺癌に譲ったものの、まだ罹患率、死亡率の高い重要な癌である。内視鏡技術レベルの高いわが国では、多くの胃癌が早期に発見されており、胃癌治療の主体が早期癌に移行している。しかし、年齢訂正死亡率の年次推移は胃癌死亡率の減少傾向を示しているものの、早期発見の数に見合った胃癌死亡数の減少がみられないとの報告もある[谷 瑞希他: 胃と腸 40:27-36, 2005]。このことは、早期癌のすべてが進行期に進展するとは限らない可能性を示唆している。この早期胃癌と進行胃癌との間の系譜の連続性を検討するために、私たちはこれまで、環境要因で可逆的に変化する phenotype ではなく、不可逆的に変化の蓄積していく genotype に基づく系譜解析の方法論を蓄積してきた [Sugihara H et al.: Cancer 65: 122-129, 1990; Peng D-F et al.: J Pathol 201: 439-450, 2003; Peng D-F et al.: J Pathol 203: 884-895, 2004]

ランダムな遺伝子変化の蓄積する中で、特定のドライバー遺伝子セットに変化が出揃った時点では、多くのパセンジャー的な遺伝子変化が共存し、個々の腫瘍病変は固有のゲノム構成を示す[杉原洋行他: 生体の科学 62:541-545, 2011]。筆者らは胃癌で最も高頻度にみられる染色体変化 8q+と 17p-[Peng D-F et al, J Pathol 2003]の標的遺伝子として MYC と TP53 に注目し、ゲノムマイクロアレイを用いて分化型胃癌でのゲノムコピー数変化を解析した。その結果、MYC-かつ TP53+を (現時点では早期癌にしか見られない)dormant パタン、MYC+もしくは TP53-のいずれかを (進行癌の深部浸潤部のほとんどに見られる) aggressive パタンとして、早期癌の進展予測に使える可能性を報告した [Nakayama T et al.: BMC Cancer 10: 311, 2010]。その後、階層的クラスタ解析を行うことによって、TP53 と MYC では分類できなかった症例も、aggressive、dormant をそれぞれを含むクラスタに分類できることを報告した [仲山貴永他、第 71 回日本癌学会学術総会, 2012]。一方、未分化型胃癌では、検索したもののほとんどが早期から上記の aggressive パタンを示していた [園田文乃他、第 71 回日本癌学会学術総会, 2012]。腫瘍切除後の転移リスクについても、転移巣を含む分化型胃癌症例で癌関連遺伝子のコピー数による階層的クラスタ解析を行い、preliminary な結果を発表した [Vo TND et al., 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012]。

一方で、マイクロアレイ解析は高価であり、臨床応用するためには、アレイ CGH で絞り込まれた特定の遺伝子のコピー数を定量的 PCR で評価するシステムの構築が必要と考え、本研究期間開始時、既に、TP53、MYC を始め予後診断に重要ないくつかの遺伝子について、定量的 PCR のためのプライマー設計を進めていた。

2. 研究の目的

本研究では、以下の目的を設定した。(1) これまでの preliminary な研究結果をより多数例での解析で確認し、分化型早期癌の進展予測に使ってきたアレイ CGH 解析を、非浸潤性腫瘍や未分化型早期癌の進展予測、更に分化型早期癌の転移予測にも適用し、予測に有用な遺伝子を絞り込む。(2) 臨床現場に応用するため、アレイ CGH より安価で、より信頼性の高い定量的 PCR によりコピー数変化を検出するために、予測に有用な遺伝子のプライマーを更に準備し、これらを使って、アレイ CGH の結果が再現できるかどうか検討する。(3) 新たな検体による結果の validation を行う。(4) 遺伝子診断を行なうべき検体を生検段階でスクリーニングするために、進行癌になりやすい早期癌の病理組織学的、免疫組織化学的特徴を抽出する。

3. 研究の方法

(1) アレイ CGH :

未分化型胃癌、腺腫を含む非浸潤性腫瘍と転移巣を含む分化型胃癌のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 切片にレーザマイクロダイセクションにより腫瘍部(T)、非腫瘍部(R)を採取し、DNA を抽出、精製、標識、マイクロアレイへの hybridization を行い、アレイリーダーで蛍光量を計測し、T と R の蛍光強度比(T/R)として DNA コピー数を求めた。(2) **マイクロアレイデータの処理とクラスタ解析 :**

まず、遺伝子内に複数のマーカーがある場合はその間で T/R の平均を取り、ノイズを相殺させた上で、以下のクラスタ解析を行った。

遺伝子サイズだけでランダムに選んだ遺伝子による unsupervised clustering : 初期変化から異なる系譜を識別する。機能と関係なく、コピー数プロファイル(CNP)の類似性のみによってクラスタに分類。同一腫瘍の異なる部位のサンプルどうしは (発癌過程が概ね共通で) 他の腫瘍より類似性が高いため、クラスタ内で隣接することを内部対照として利用した。

用いたマイクロアレイに含まれる 14,000 余りのタンパク質コード遺伝子による unsupervised clustering : 転移や浸潤にかかわる機能遺伝子の CNP で異なるクラスタに分類した。

Supervised clustering : または で識別できたクラスタ間、あるいは転移の有無などの臨床病理学的因子によって分類した 2 群間で、タンパク質コード遺伝子あるいは癌関連遺伝子のコピー数の平均値を遺伝子ごとに t 検定し、Bonferroni 補正後に有意差のある遺伝子を抽出し、その遺伝子を用いてクラスタリングを行った。

(3) **重要な遺伝子の絞り込み :**

進行癌への進展や転移を予測するのに有用な遺伝子を絞り込んだ。上記の(2) 参照。

(4) **マイクロアレイデータの validation :**

絞り込んだ遺伝子について、プライマーを設計して定量的 PCR (qPCR) によるアレイ CGH データの確認を行なった。

(5) **新たな検体による結果の validation :**

新たな症例を用いて再現性を見る。また、腫瘍切除後5年以内に再発した過去の症例と5年以上再発のない症例を用いて、コピー数プロファイルがアウトカムを予測できたかどうかの評価。

(6) **遺伝子コピー数変化と組織形態やフェノタイプ発現との関係の解析 :**

日常の病理診断の中で、生検段階での解析適応の判断にも応用できる、系譜を反映する形態や遺伝子発現パターンがないか検討した。

4. 研究成果

(1) **方法論の検討と研究の方向性の再検討 :**

平成 25 年から 26 年に、qPCR で TP53、MYC を含む 5 遺伝子のコピー数を判定するためのプライマー候補をそれぞれ約 10 セット準備し、培養細胞を用いて使用可能な 1~3 セットを決定した。これらのプライマーセットを使って、ランダムに選んだ 8 サンプルについてアレイデータとの一致率を確認したところ、50%強で不一致となり、(FFPE 材料で) 1 コピーの増減を qPCR で定量することは困難であるという結論に達した。

そこで方針を転換して、アレイ CGH のデータが、染色体レベルで従来の結果と差がないことを確認した。アレイ CGH データの validation について、qPCR 以外の方法を考えた。研究の方法(2) で述べた内部対照の設定や、選択する遺伝子のサイズを変動させたクラスタリングの再現性確認を行った。

qPCR によるゲノムコピー数プロファイル (CNP) 判定の実用化も困難であることが分かり、代替の方向として、少数の遺伝子に絞ったカスタムアレイでコストの削減ができるのではないかと考えている。

qPCR により、DNA 増幅の前後でコピー数が増減することもわかった。腫瘍と正常との間でも遺伝子により増減に再現性があり、アレイ CGH では腫瘍 DNA と正常 DNA との蛍光強度比 (T/R) を取ることによって、この DNA 増幅のバイアスは相殺されていると考えられる。個人に固有の copy number variation (CNV) も同様に相殺されると考えられる。

(2) **未分化型胃癌の系譜解析 :**

平成 25 年度に、それまで蓄積してきた未分化型胃癌 (UGC) のアレイ CGH データをまとめた [Sonoda et al., BMC Medical Genomics, 6: 25, 2013]。粘膜病変を含む複数個所からサンプリングを行った早期および進行期の UGC 29 例 63 サンプルのアレイ CGH 解析を行い、(研究の方法(2) の) unsupervised の条件で階層的クラスタ解析を行った。UGC のアレイデータでこの内部対照を満たすためには、3 個以上のプローブを含む、約 5000 遺伝子を

使えばよいことがわかった。クラスタリングの結果、印環細胞癌の初期像である層構造のある (LS+) UGC を多く含むクラスタ A と層構造が無く腺管成分のある (LS-/TC+) UGC を多く含むクラスタ B とに分かれた。A と B との間でコピー数に t 検定 (Bonferroni 補正後) で有意差が検出された、KIT、ETS1、RAS ファミリー遺伝子や TERT を含む 40 遺伝子を同定したが、A、B ともに、早期癌と進行癌との間で遺伝子コピー数に有意差はなかった (図 1)。このことは、浸潤傾向を示さない (LS+) 粘膜内 UGC も、いずれは進行癌になることを示唆している。

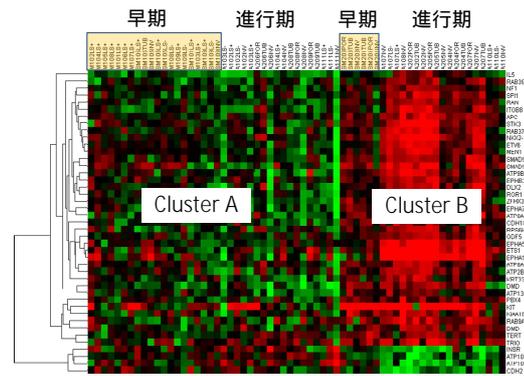


図 1: 印環細胞癌または腺管成分を含む未分化型胃 29 症例 63 検体と 2 つのクラスタ間でコピー数に有意差のあった 40 遺伝子を用いた、アレイ CGH データの階層的クラスタ解析。

(3) **非浸潤性腫瘍を含む分化型胃腫瘍の系譜解析 :**

平成 25 年度から 26 年度に、非浸潤性腫瘍を含む分化型胃腫瘍のアレイ CGH データをまとめた。ゲノム CNP は、コピー数変化の大きなもの (unstable) と小さなもの (stable/intermediate) の 2 つに大別された。

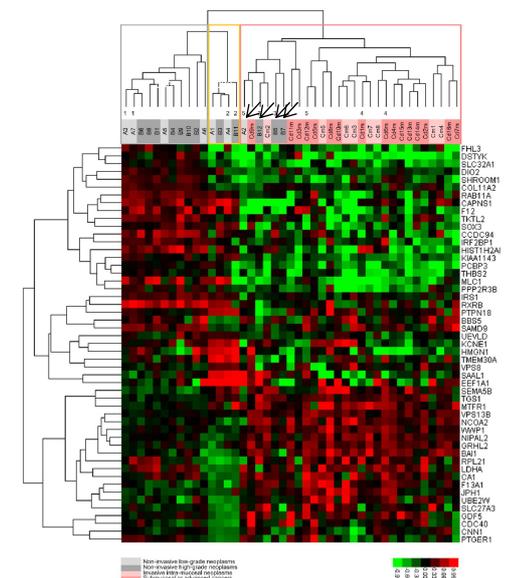


図 2: 非浸潤性胃腫瘍を含む 43 検体と 3 つのクラスタ間でコピー数に有意差のあった 51 遺伝子を用いた、アレイ CGH データの階層的クラスタ解析。

これらのクラスタ間で有意差のある遺伝子を t 検定 (Bonferroni 補正後) で、拾い上げたところ、腺腫を含む非浸潤性腫瘍の進展に関連する遺伝子として、RXRB や RAS 関連遺伝子など 51 遺伝子を抽出した。これらの遺伝子でクラスタリングしたのが図 2 である。stable/intermediate クラスタは非浸潤性腫瘍 (図 2 のサンプル名の背景が灰色) のみから構成され、unstable クラスタは浸潤癌 (背景がピンク色) のすべてと非浸潤性腫瘍の約 20% (図 2 の矢印) から構成されていた。CNP のパターンからは、浸潤癌と同じクラスタに属する非浸潤癌は浸潤癌に進展しうると考えられた。この方法により、進展リスクを個々の腫瘍で予知しうることが分かった [Vo et al., BMC Medical Genomics, 8:6, 2015]。

(4) リンパ節転移リスクの予知について :

平成 25 年から 27 年にかけて蓄積してきた分化型胃癌のアレイ CGH データ (転移陰性 (N0) 症例 16 症例 24 サンプル、リンパ節転移陽性 (N+) 症例 20 症例 64 サンプル) を 27 年度にまとめた。まず、サンプル間で全ゲノム領域の CNP の類似性をみるために、サイズの大きな遺伝子による unsupervised clustering を行ったところ、2 つのクラスタに別れたが、そのクラスタ間で N0 と N+ の割合に有意差がなかった。このことから、転移しやすい素質が進展初期から決まっているとは考えにくい。

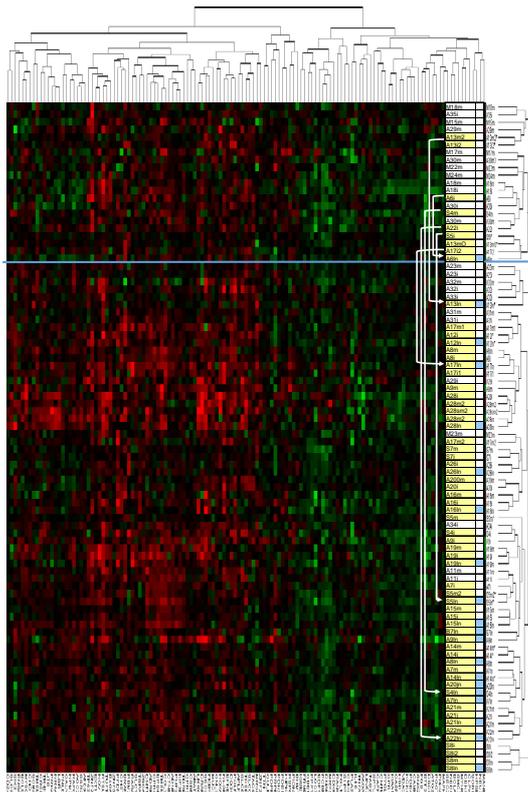


図 3: 分化型胃癌 36 症例 88 検体と N0 (□) と N+ (■) 症例の検体間でコピー数の有意差があった 131 遺伝子を用いた、アレイ CGH データの階層的クラスタ解析。
□: 原発腫瘍の検体; ■: リンパ節転移巣の検体

蛋白質コード遺伝子の CNP を比較すると (研究の方法 (2))、分かれた 2 クラスタの片方がほぼ N+ サンプルから構成され、クラスタ間に有意差が出た。次にこれらの内、N0 と N+ の 2 群間でコピー数に有意差のあった 131 遺伝子を抽出してクラスタリングを行い (研究の方法 (2))、転移リンパ節のサンプルをほとんど含まないクラスタが分離できた (図 3)。このクラスタには、N+ 症例の原発巣が 6 例含まれており、N0 と N+ の分離はできなかった。この抽出遺伝子によるクラスタリングでは、転移巣と原発巣の CNP がかなり異なる (原発巣になかった遺伝子コピー数変化が転移巣で付加的に起きていた) ものが先ほどの 6 例を含めて 12 例 (60%) 存在した。その標的として数個の遺伝子が絞られた。これらのことから、転移リスクの高さは、系譜として決まっているのではなく、late event として起こる特定の遺伝子変化によって確率的に決まっていると考えられた [Duong 他、第 105 回日本病理学会総会、2016]。

(5) 新たな検体による結果の validation :

予定していた、腺腫と癌成分の両方を含む腫瘍や、アウトカムの分かっている早期癌症例は、症例が十分集らず、進んでいないが、新たな validation set の症例による再現性の検討は今も続けている。

(6) 遺伝子コピー数変化と組織形態やフェノタイプ発現との関係 :

平成 25 年度に、腺腫を含む小型の胃粘膜内腫瘍の内視鏡切除材料については、フェノタイプによる系譜解析を行った結果をまとめた [Nishimura et al., Histopathology, 63: 626-629, 2013]。平成 26 年度には同様の材料に対して、アレイ解析を行い、フェノタイプによる系譜解析とゲノムコピー数による系譜解析とを比較した。前者では腸型が腫瘍サイズ依存性に増加した一方で、癌進展に伴って腸型発現が低下したため、フェノタイプでは予後診断が困難であった。ただし、腸型の非浸潤性腫瘍は、形態的にも低異型度で、比較的高異型度の胃型のものより進展リスクが低いので、初期の腫瘍では、腸型は進展リスクの低さを示す指標になりうると考えられた [Vo et al., BMC Medical Genomics, 8:6, 2015]。

(7) 得られた成果の国内外におけるインパクト :

本研究の注目度はいまだに高くないが、重要度は高いと考えられる。現状では、次世代シーケンズから分子標的薬の開発への流れが加速しているが、莫大な経費のかかる分子標的薬の開発が続けば医療経済は早晚破綻する。分子標的薬の開発以上に必要なのは、高価な治療をいかに限定して使うかを教えてくれる、進展リスク予知の研究であると考えている。

(8) 今後の展望:

本研究で確立した系譜解析の方法論は論文 [Vo et al., BMC Medical Genomics, 8:6, 2015] に詳述した。今後の展開として、この方法の、(より注目度の高い) 乳癌や大腸癌への応用を既に始めている。乳癌では、乳頭腫がどの程度がん化するのか、非浸潤性乳管癌のどの程度が浸潤癌になるのか、というこれまでの懸案に挑戦したい。大腸では adenoma-carcinoma sequence と de novo carcinogenesis による発癌がどのくらいの割合で起こっているのかを明らかにするとともに、我々の系譜解析の方法が、大腸癌における既知のドライバー遺伝子を抽出できるかどうかを検証したい。

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 4 件)

杉原洋行、がんをどう理解し説明するか 発がんメカニズムからリスク予知まで、京都消化器医学会会報(査読無)、32、2-12, 2016. <http://hqpato1.luna.weblife.me/wlwp1/?cat=30>

Vo TND, Nakayama T, Yamamoto H, Mukaisho K, Hattori T, Sugihara H, Progression risk assessments of individual non-invasive gastric neoplasms by genomic copy-number profile and mucin phenotype. BMC Medical Genomics (査読有), 8(1): 6, 2015. DOI: 10.1186/s12920-015-0080-6

Sonoda A, Mukaisho K, Nakayama T, Vo TND, Hattori T, Andoh A, Fujiyama Y, Sugihara H, Genetic lineages of undifferentiated-type gastric carcinomas analysed by unsupervised clustering of genomic DNA microarray data. BMC Medical Genomics (査読有), 6: 25, 2013. DOI: 10.1186/1755-8794-6-25

Nishimura R, Mukaisho KI, Yamamoto H, Sonoda A, Andoh A, Fujiyama Y, Hattori T, Sugihara H, Precursor-derived versus de-novo carcinogenesis depends on lineage-specific mucin phenotypes of intramucosal gland-forming gastric neoplasms. Histopathology (査読有), 63: 616-629, 2013. DOI: 10.1111/his.12208

[学会発表](計 29 件)

Duong T Tu, 仲山貴永, Vo TN Diem, 向所賢二, 杉原洋行、胃癌のリンパ節転移リスクはゲノムコピー数プロファイルで予知できるか?、第 105 回日本病理学会総会、2016.5.13、仙台国際センター(宮城県・仙台市)

Vo TN Diem Nakayama T, Yaamamoto H, Mukaisho K, Hattori T, Hotta K, Ohtani T,

Sugihara H, Progression risk assessments of individual non-invasive gastric neoplasms by genomic copy-number profile. NCR1 Cancer Conference, Liverpool (UK)

Vo TN Diem, 仲山貴永, 山本裕人, 向所賢二, 服部隆則, Hua TN Ha, Nguyen S Trung, 杉原洋行, Progression risk of individual non-invasive gastric neoplasms assessed by genomic copy-number profile. 第 74 回日本癌学会学術総会、2015.10.9.名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

堀田兼蔵, 園田文乃, 仲山貴永, 向所賢二, 杉原洋行、層構造を有する未分化型胃癌の系譜解析とその進展予測、第 74 回日本癌学会学術総会、2015.10.8.名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

向所賢二, 服部隆則, 杉原洋行, Phenotypic lineage and polarity of cell proliferation in intramucosal gland-forming gastric neoplasms. 第 56 回日本組織細胞化学会総会・学術集会、2015.10.4.関西医科大学 枚方キャンパス(大阪府・枚方市)

杉原洋行、がんをどう理解し説明するか - 発癌メカニズムから考える -、京都消化器医学会学術講演会(招待講演)2015.8.8. 京都府医師会館(京都府・京都市)

Vo TN Diem, Takahisa Nakayama, Ken-ichi Mukaisho, Takanori Hattori, Hiroyuki Sugihara, Lineage analysis in intramucosal gland-forming gastric neoplasms by cluster analysis of array-based comparative genomic hybridization data. The 8th International Conference of the International Society of Gastroenterological Carcinogenesis, 2014.11.14. ホテル日航福岡(福岡県・福岡市)

仲山貴永, 向所賢二, 山本裕人, Vo TN Diem, 園田文乃, 杉原洋行、胃癌のアレイ CGH における FHIT homozygous deletion の系譜特異性、第 73 回日本癌学会学術総会、2014.9.26. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Vo TN Diem, Takahisa Nakayama, Ken-ichi Mukaisho, Takanori Hattori, Hiroyuki Sugihara, Parallel genetic lineages rather than single sequence in progression of gland-forming neoplasms of the stomach. 第 73 回日本癌学会学術総会、2014.9.26. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

杉原洋行, 園田文乃, 仲山貴永, Vo TN Diem, 向所賢二、層構造を伴う胃印環細胞癌の系譜と初期から見られる進展のサイン、第 73 回日本癌学会学術総会、2014.9.26. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

杉原洋行、ゲノムレベルと発現レベルの系譜解析による早期癌の進展リスク予測、第 39 回日本組織細胞化学講習会(招待講演)2014.8.7. ピアザ淡海(滋賀県・大津市)

Vo TN Diem, Nakayama T, Mukaisho K, Hattori T, Sugihara H, Lineage analysis by

aCGH data and mucin phenotype expression in non-invasive gastric neoplasms. 第103回日本病理学会総会、2014.4.25. 広島国際会議場(広島県・広島市)

園田文乃、向所賢一、Vo TN Diem、仲山貴永、藤山佳秀、杉原洋行、DNA マイクロアレイデータのクラスタリングによる系譜解析：胃粘膜内癌の組織型別進展リスクについて、第86回日本胃癌学会総会、2014.3.22. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Takahisa Nakayama, Hiroto Yamamoto, Vo TN Diem, Ken-ichi Mukaisho, Takanori Hattori, Hiroyuki Sugihara. Lineage analysis of early and advanced tubular adenocarcinoma of the stomach analyzed by array CGH and TP53 mutation analysis. The 4th JCA-AACR Special Joint Conference, 2013.12.17. 東京ベイ舞浜ホテルクラブリゾート(千葉県・浦安市)

Vo TN Diem, Takahisa Nakayama, Ken-ichi Mukaisho, Hiroyuki Sugihara. Array CGH-based screening of genes carrying high metastasis risk in tubular adenocarcinoma of the stomach. The 4th JCA-AACR Special Joint Conference, 2013.12.17. 東京ベイ舞浜ホテルクラブリゾート(千葉県・浦安市)

Hiroyuki Sugihara, Ayano Sonoda, Ken-ichi Mukaisho, Takahisa Nakayama, V TN Diem, Akira Andoh, Yoshihide Fujiyama, Takanori Hattori. Genetic lineages of early and advanced undifferentiated-type gastric carcinomas analyzed by clustering of genomic DNA microarray data. The 4th JCA-AACR Special Joint Conference, 2013.12.17. 東京ベイ舞浜ホテルクラブリゾート(千葉県・浦安市)

園田文乃、向所賢一、仲山貴永、Vo TN Diem、服部隆則、藤山佳秀、杉原洋行、DNA マイクロアレイデータのクラスタリングによる未分化型胃癌の系譜解析、第72回日本願学会学術総会、2013.10.4. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

〔図書〕(計 2件)

杉原洋行、文光堂、腫瘍病理鑑別診断アトラス 胃癌(第2版)、2015、75-83.

杉原洋行、日本組織細胞化学会、組織細胞化学 2014、2014、213-225.

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
滋賀医科大学病理学講座分子診断病理学部門ホームページ：
<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqpatho1/>

6. 研究組織

(1)研究代表者
杉原 洋行(Sugihara, Hiroyuki)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号：30171169

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者

向所 賢一(Mukaisho, Ken-ichi)
滋賀医科大学・医学部・准教授
研究者番号：50343223

仲山 貴永(Nakayama, Takahisa)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：90632315

山本 裕人(Yamamoto, Hiroto)
滋賀医科大学・医学部・特任助教
研究者番号：30610654