

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：90101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461029

研究課題名(和文)がん・骨髄クロストークの可視化による腫瘍血管の異常性検出と、治療抵抗性の評価系

研究課題名(英文)Non-invasive modality for diagnosis of pancreatic neoplasm

研究代表者

水上 裕輔 (Mizukami, Yusuke)

医療法人徳洲会札幌東徳洲会病院附属臨床研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：30400089

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)：膵癌の多くはKRAS遺伝子をdriver変異とし、この遺伝子異常は難治性に大きく寄与する。膵癌のhallmarkと言えるこの遺伝子異常をターゲットとし、膵癌の発育進展を可視化するバイオマーカーとなるかを検証した。血漿中にはゲノムDNAが断片化された遊離核酸が存在し、担癌患者ではこれが高濃度となる。本研究では、膵癌とその高危険群とされる膵嚢胞患者を対象に、血漿中の遊離核酸をデジタルPCRで増幅し、変異配列に対する特異的プローブによりdriver変異の選択的検出系の確立を試みた。血漿検体におけるDNAコピー数は血漿1mLあたり数千コピーと限られ、低コピー異常の検出には、解析法の工夫が必要である。

研究成果の概要(英文)：Recent technologies are emerging to allow genotyping of plasma cell-free DNA (cfDNA) shed from tumors into the general circulation. There are two main types of pathologically distinct precursors for PDA, pancreatic intraepithelial neoplasias and intraductal papillary mucinous cystic neoplasias (IPMNs), and the mutations in KRAS and/or GNAS mediate key signaling during early development of the tumors. The clinical viability of cfDNA genotyping using digital PCR targeting mutations in KRAS and GNAS were examined. Ten PDA and 21 IPMN patients were recruited. The primary endpoint of this study was to evaluate whether such an approach can appropriately monitor the risk IPMN progression and detect localized early-stage PDA non-invasively. The major technical challenge of widespread implementation of this clinical test is the coverage for uncommon forms of KRAS mutation, as well as sensitivity for early stages cancer where the amount of cfDNA may be limited.

研究分野：消化器病

キーワード：膵癌 低侵襲診断

## 1. 研究開始当初の背景

膵がんは難治性固形がんの代表格であり、早期診断が困難で、極めて高い治療抵抗性を示す。この難治がんの克服には、リスク予測のアルゴリズムやスクリーニング体系の抜本的な見直しが必要である。申請者はその具体的手法として、膵癌の発育進展を「可視化する評価系」の確立が重要であると考えてきた。このような評価系の確立は、難治性を担う細胞・分子ネットワークの解明に繋がり、さらにこれに基づく分子診断や新たな治療標的の特定という展開が期待される。

申請者はこれまでに、*KRAS* がん遺伝子が低酸素応答を介して複数の治療抵抗性、血管新生関連経路を誘導することを明らかにしてきた (*Nat Med* 2005, *J Biol Chem* 2006)。この様な経路は膵癌に特徴的な「間質の悪性化」において重要な役割を示すことを見だし、さらにマウス健常個体から調整した Tie2 陽性骨髄単核球が、膵癌自然発症モデルマウス (*Pdx1-Cre; LSL-KrasG12D; p53Lox/+*) で腫瘍血管の異常性を修復し、低酸素の解除と病変への薬剤分布・効果を増強する可能性を示した (*Cancer Res* 2010)。興味深いことに、担がん個体において、本来は組織修復を担うべき骨髄前駆細胞が、morphogenesis 経路の再賦活化により、血管異常を増幅させることを明らかにした (*Cancer Sci* 2008, *PLoS One* 2010, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012)。さらに、遺伝子改変マウスモデルにおける膵癌の初期発生から浸潤性病変の形成過程で、骨髄前駆細胞の遺伝子発現プロファイルや細胞外基質への親和性が健常個体に比較して段階的に変化することを明らかにしてきた (未発表)。このような理論は、他の研究者により提唱された「原発巣による骨髄細胞の再教育」と、活性化された骨髄細胞による間質異常の誘導というモデルにも裏付けられる (McAllister, *Cell* 2008; Peinado, *Nat Med* 2012)。

これら膵癌前駆病変の悪性化(浸潤・転移)を促進する分子機構をモニタリングすることが可能になれば、現在、画像診断にほぼ依存している診断、スクリーニング体系を抜本的に見直し、分子レベルでのリスク予測や早期診断を実現できる可能性がある。

そこで本研究では、がん間質を含む悪性形質の形成過程で重要なプレイヤーと考えられる「血液」をターゲットとした膵癌スクリーニングならびにモニタリングの手法を確立することを念頭に計画を立案した。しかし、最近の研究により、がん間質の「異常性」の少なくとも一部が、exosome や micro RNA などのがん細胞に由来する「cell free factor」であることが明らかになりつつある。すなわち、がんの悪性形質を周辺の正常な間質細胞に伝搬する effector の存在がいくつも特定されており、当初本研究の計画段階で目指していた、患者血液中に含まれる間質前駆細胞

を利用したモニタリングよりも、むしろ血清や血漿に直接その原因を見いだすことがより近道であると考え、計画の一部を変更した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、血液を利用した新しい膵がんの診断・モニタリングシステムの理論基盤を構築することである。膵癌がんを考える上で膵癌前駆病変あるいは膵癌サブタイプのひとつとされる膵管内乳頭粘液性腫瘍 (intraductal papillary mucinous neoplasm: IPMN) に着目し、これを進行期で発見される事多い膵癌の初期段階のモデルと位置づけ、血液に含まれる exosome や micro RNA を含む遊離核酸等が、悪性度を反映するバイオマーカーとなるかを検証する。これらは画像診断とは異なった視点から患者の生体情報を評価しうる潜在的可能性を有しており、リスク評価を非侵襲的に実行するツールとしての臨床的意義を明らかにする。

## 3. 研究の方法

膵癌患者、ならびに IPMN を含む膵嚢胞患者を対象に、血漿より遊離核酸と呼ばれる分画を抽出・精製し、その定量とデジタル PCR を用いた *KRAS* (codon 12&13) および *GNAS* (codon 201) の変異コピー数解析を行った (UMIN000012810)。外科切除例では術前に血漿中に検出される変異 DNA が腫瘍原発巣における変異と一致するかを確認した。なお、血液および外科切除組織の使用にあたっては、所属機関ならびに連携する医療機関における倫理委員会の承認のもと、患者本人の同意を得ることを条件とした。

血液サンプルの調製は以下の通りに行った: 血漿分離用 EDTA 採血管 (8 mL) を用いて採血し、2 時間以内に血漿分離を行い (1,100 g、10 分間) その直後に細胞成分を完全に除去するために高速遠心 (18,000 g/4、10 分間) を加え “cell free plasma” を調製とした (-80 にて凍結保存)。QIAamp Circulating nucleic acid kit (Qiagen 社製; #55114) を用いて核酸精製を行い、Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies 社製) および Bioanalyzer (Agilent 社製; High Sensitivity DNA Assay) による dsDNA の定量とサイズ評価の後に、デジタル PCR によるコピー数定量を行った (BioRad 社製; QX200)。血漿遊離 DNA の平均的なサイズを考慮し、*KRAS* および *GNAS* のゲノム DNA に対して 100 bp 程度の PCR 産物を得るプライマーと変異配列とその周辺をターゲットとしたプローブ (野生型プローブは HEX 標識、変異型プローブは FAM 標識) を設計した (Integrated DNA Technologies, Inc.)。プライマー、プローブ

の配列、解析プロトコール等の詳細は割愛する(投稿中)。健常人ボランティア 50 例から提供された血液サンプルを用いて、変異コピーが出現しないことを確認した。

稀少 DNA の検出限界を検証するために野生型および変異型の配列をもつ *KRAS* と *GNAS* プラスミドを疑似サンプルとして用い、デジタル PCR による異常コピー検出の予備実験を行った (Bio-Rad 社製; QX-200)。各種がんで見られる *KRAS* 変異は多岐にわたるが、その多くが codon 12 と 13 に、*GNAS* 変異は codon 201 に集中する。そこで今回は、特に頻度の高い 8 種類の *KRAS* 変異、2 種類の *GNAS* 変異の検出を行うこととした。IPMN では、*KRAS* pQ61H (c.183A>C; COSM554) や *GNAS* p.Q227L (c.680A>T; COSM27888) の報告例もあるが、いずれも頻度が低く今回の評価系には含まなかった。野生型あるいは変異型配列に対するプローブの特異性を確認した。Annealing 温度や dNTP 量を含む PCR 条件の調整により、単独のテンプレート (野生型、または 1 種類の変異型配列) を用いた場合に、非特異増幅が全く見られない条件設定が可能であった。次に、野生型配列に対して、50%, 5%, 0.5%, 0.05% の割合で変異型配列を混入した plasmid DNA カクテルを用いて、検出限界を検証した。変異配列の存在率を 0.05% まで希釈したサンプルにおいても、正確な段階希釈直線が得られ、0.01% 程度の検出率があるとされるデジタル PCR の精度が確認された。この検証の後に、*KRAS* と *GNAS* それぞれの Hot Spot に既知の変異を有する細胞株の培養上清を用いて実血漿サンプルから調製した DNA 解析用の条件設定を行った。野生型と 8 種類の変異型 *KRAS* に対するプローブカクテルを用いてテストしたところ、野生型のテンプレートに対しても変異プローブが反応するという非特異反応がみられた。このため、野生型と 4 種類の変異型 *KRAS* に対するプローブカクテルを 2 セットに分けて検証した結果、非特異反応が見られなくなった。そこで *KRAS* に関して、野生型と 4 種類の変異型 *KRAS* に対するプローブを 2 セット設定することで、8 種類の変異検出に対応できるようにした。なお *GNAS* は野生型、p.R201C、p.R201H 変異それぞれに対するプローブのカクテルを用いた場合に非特異反応を認めないプローブ設計が可能であり、1 種類のプローブカクテルで 2 種類の変異検出を行う事とした。

患者検体の解析にあたり、大腸癌、膵癌の切除例各 10 例の術前の血漿サンプルを用い、変異型 *KRAS* の検出が可能かを検証した。これらの原発巣の切除組織 FFPE 切片から腫瘍 DNA を精製し (Qiagen 社製; QIAamp DNA FFPE Tissue Kit #56404 および GeneRead DNA FFPE Kit #180134)、これをテンプレートとして同様にデジタル PCR による変異検出を行い、結果の一致率をみた。また一部は次世代シーケンサ (Life Technologies; Ion Torrent PGM) を用いて *KRAS* を含む 50 のがん関連遺伝子の

パネルにより (Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2) 体細胞変異の有無を確認した。平成 27 年度末までに、膵癌 10 例 (外科切除例) と IPMN 21 症例を含む膵嚢胞 23 症例の膵嚢胞患者の血漿サンプルを得て、前述と同様の解析を行う事とした。よって、*KRAS* および *GNAS* 変異のコピー数を画像、腫瘍マーカーなどの臨床パラメーターとの対比を試みた。

#### 4. 研究成果

##### 1) 血漿遊離 DNA 濃度とサイズ分布

はじめに血漿遊離 DNA 濃度を健常ボランティア、大腸癌、膵癌、IPMN を含む膵嚢胞症例と比較した。健常人の血漿遊離 DNA 濃度は  $11.2 \pm 3.2$  ng/mL plasma と文献的な報告の範囲内であった。大腸癌症例 (いずれも外科切除例で、UICC stage の内訳は I 期; 2 例、II 期; 2 例、III 期; 3 例、IV 期; 3 例) では  $18.6 \pm 5.4$  ng/mL plasma と高値であった。膵癌切除例 (UICC stage の内訳は I 期; 2 例、II 期; 7 例、IV 期; 1 例) では  $18.2 \pm 4.3$  ng/mL plasma と大腸癌同様に高値を示し、IPMN 患者では  $20.9 \pm 12.7$  ng/mL plasma であり、やはり健常ボランティアと比較し高値であった。

つぎに、Bioanalyzer によるサイズパターンを解析した。健常ボランティアでは、血漿遊離 DNA のサイズが 85-230 bp の範囲におさまり、150-180 bp 付近にピークがみられた。これは、アポトーシスの際にクロマチン DNA のヌクレオソーム単位 (約 180 bp) での断片化が起こることから説明のつくサイズ分布である。一方、大腸癌患者のうち 2 例 (28.6%) で、85-230 bp のほか 240-400 bp の範囲にふたつ目のピークが観察された (いずれも進行癌症例)。このように癌患者では血漿遊離 DNA に二峰性のサイズピークが見られることは過去に報告されており、がん細胞由来の DNA は正常細胞の自然死に伴うものより大きな断片となることが確認された。IPMN 患者 21 例中、血漿遊離 DNA に二峰性ピークが観察されたのは 8 例 (38.1%) であった (主膵管型 1 例、分枝型 7 例)。

##### 2) 血漿遊離 DNA を用いた *KRAS* および *GNAS* のデジタル PCR による変異コピーの検出

次に、デジタル PCR を用いて患者から調製した遊離 DNA 検体における変異遺伝子のコピー数解析を行った。「研究の方法」に示した検証実験において、テンプレート DNA 5 ng 程度で、反応あたり 2,000 コピー以上の目的とする allele 検出が可能であることを確認し、実サンプルでの解析におけるテンプレート量の目安とした。

大腸癌 5 例中 10 例 (50%) に原発巣腫瘍部に *KRAS* 変異を認めたと、このうちステージ II 以上の症例では *KRAS* 変異陽性例の全例

で原発巣に一致する変異が血漿遊離 DNA でも検出された。一方で、膵癌切除例の全例で変異型 *KRAS* が検出されたが、このうち血漿中に変異が検出できたのは進行度の高い 2 例 (20%) のみであった。

次に、IPMN の経過観察例 21 例の血漿遊離 DNA を用いて、*KRAS* および *GNAS* をターゲットとしたデジタル PCR を行った。主膵管型の 2 症例 (主膵管径; 13.8mm, 15.4mm) のうち、明らかな膵管内結節 (CT にて造影あり) また十二指腸への浸潤所見 (生検にて adenocarcinoma 疑い) がみられた 1 例で血漿遊離 DNA 中に複数の変異型 *KRAS* のコピー数増加がみられた (>100 コピー/mL plasma)。また、分枝型 19 症例 (平均嚢胞径 28.2+/-14.9mm) のうち、実質浸潤が強く疑われる 1 例 (嚢胞径 55mm、主膵管径 4mm、結節疑い) では変異型 *GNAS* のコピー数増加がみられた (>100 コピー/mL plasma)。一方で、この症例を含む分枝型 IPMN 症例で、画像パラメーターとデジタル PCR を用いた液体生検による「異常値」に関連性があるかを統計学的に解析したところ、分枝型症例における嚢胞径と血漿中の野生型 *KRAS* および *GNAS* のコピー数に関連性が示唆された。しかし血漿中の変異型 *KRAS* および *GNAS* コピー数と画像パラメーターや腫瘍メーカーとの間に関連性は認められなかった。なお膵嚢胞症例 2 例 (嚢胞径 4.4mm、7.4mm; いずれも典型的な IPMN の画像所見をもたない) では、*KRAS* および *GNAS* の変異コピーは検出されなかった。

以上より、現状では血漿遊離核酸を試料とした変異解析の感度は低く、テンプレート DNA の調製 (採血量を増やす、濃縮するなど) あるいはデジタル PCR の解析プログラムの抜本的見直しが必要と考えられた。現在、解析結果の初期データを投稿中であり、症例数のさらなる集積のもと上記課題の解決に取り組んでいる。

#### 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 10 件; 全て査読あり)

- 1) Saha S, Gordan JD, Kleinstiver BP, Vu P, Najem MS, Yeo JC, Shi L, Kato Y, Levin RS, Webber JT, Damon LJ, Egan RK, Greninger P, McDermott U, Garnett MJ, Jenkins RL, Rieger-Christ KM, Sullivan TB, Hezel AF, Liss AS, Mizukami Y, Goyal L, Ferrone CR, Zhu AX, Joung JK, Shokat KM, Benes CH, Bardeesy N. Isocitrate dehydrogenase mutations confer dasatinib hypersensitivity and SRC-dependence in cholangiocarcinoma. *Cancer Discovery* 2016 (in press)
- 2) Matsuzaka S, Karasaki H, Ono Y,

Ogata M, Oikawa K, Tamakawa S, Chiba S, Muraki M, Yokochi T, Funakoshi H, Kono T, Nagashima K, Mizukami Y. Tracking the clonal evolution of adenosquamous carcinoma, a rare variant of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *Pancreas* (2016, in press)

- 3) Sugiyama Y, Sasajima J, Mizukami Y, Koizumi K, Kawamoto T, Karasaki H, Yusuke Ono, Tanabe H, Fujiya M, Kohgo Y. The protein expression level of Gli2 is a feasible marker of ligand-dependent hedgehog activation in pancreatic neoplasms. *Pol J Pathol* (2016, in press)
- 4) Sugiyama Y, Kawamoto T, Sasajima J, Koizumi K, Karasaki H, Mizukami Y. A Rare Case of Epidermoid Cyst in the Pancreatic Tail Invaginated from the Splenic Hilum: Long-term Alteration in Imaging Findings. *Internal Medicine* (2016, in press)
- 5) Imai K, Karasaki K, Ono Y, Sasajima J, Chiba S, Funakoshi H, Muraki M, Hanaoka H, Furukawa T, Furukawa H, Kono T, Nagashima K and Mizukami Y. Metachronous pancreatic cancer originating from disseminated founder pancreatic intraductal neoplasias (PanINs). *The Journal of Pathology: Clinical Research* 1;76-82 (2015) DOI: 10.1002/CJP2.8
- 6) Gala MK, Mizukami Y, Le LP, Moriichi K, Austin T, Yamamoto M, Lauwers GY, Bardeesy N, Chung DC. Germline mutations in oncogene-induced senescence pathways are associated with multiple sessile serrated adenomas. *Gastroenterology* 146;520-9 (2014) DOI: 10.1053/j.gastro.2013.10.045
- 7) Watanabe K, Karasaki H, Mizukami Y, Kawamoto T, Kono T, Imai K, Einama T, Taniguchi M, Kohgo Y, Furukawa H. Cyst infection of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: management of a rare complication: report of 2 cases. *Pancreas* 43(3):478-81 (2014) doi: 10.1097/MPA.0000000000000036.
- 8) Deschênes-Simard X, Mizukami Y, Bardeesy N. Macrophages in pancreatic cancer: starting things off on the wrong track. *J Cell Biol* 202(3):403-5 (2013) DOI: 10.1083/jcb.201307066
- 9) Kawamoto T, Sasajima J, Sugiyama Y, Nakamura K, Tanabe H, Fujiya M, Nata T, Iuchi Y, Ashida T, Torimoto Y,

Mizukami Y, Kohgo Y. Ex vivo activation of angiogenic property in human peripheral blood-derived monocytes by thrombopoietin. *Int J Hematol* 98:417-29 (2013) DOI: 10.1007/s12185-013-1423-8.

- 10) Aburakawa Y, Kawabe J, Okada M, Yamauchi A, Asanome A, Kabara M, Matsuki M, Takehara N, Nakagawa N, Okumura S, Minami Y, Mizukami Y, Yuhki K, Ushikubi F, Hasebe N. Prostacyclin stimulated integrin-dependent angiogenic effects of endothelial progenitor cells and mediated potent circulation recovery in ischemic hind limb model. *Circ J* 77(4):1053-62 (2013) DOI: 10.1253/circj.CJ-12-0897

〔学会発表〕(計10件)

- 1) 松原 悠、水上裕輔、正宗 淳、水谷彰吾、太田智之 . *SPINK1* 遺伝子 p.P45S 変異が確認された遺伝性膵炎の1例 . 第117回日本消化器病学会北海道支部例会 086 (消) (2015年8月29日 ; 札幌)
- 2) Mizukami Y, Ono Y, Karasaki H, Ogata M, Koizumi K, Ando K, Yokochi T, Yamada M, Kono T, Nagashima K. Plasma DNA genotyping using digital PCR for early detection of pancreatic neoplasm. 46th Annual Meeting of the American Pancreatic Association; San Diego, November 4-7, 2015
- 3) 水上裕輔、真口宏介、小泉一也 . 液体生検による膵癌リスク評価 第23回日本消化器関連学会週間 (JDDW 2015) デジタルポスターセッション 消 P-258 (2015年10月9日 ; 東京)
- 4) Mizukami Y, Ono Y, Karasaki H, Asahara S, Ando K, Shinohara T, Nagashima K. Plasma DNA genotyping using digital PCR for early detection of pancreatic cancer (液体生検による膵癌診断). 第74回日本癌学会学術総会 [E14-4] 一般口演(英語) 消化器がんに対する網羅的遺伝子解析 . (2015年10月9日 ; 名古屋)
- 5) Ono Y, Karasaki H, Chiba S, Nagashima K, Mizukami Y. Tracking the clonal evolution of adenosquamous carcinoma, a rare variant of intraductal papillary mucinous neoplasm(膵管内乳頭粘液性腫瘍より発生した膵腺扁平上皮癌). 第74回日本癌学会学術総会 [P14-21] ポスターセッション 臓器がんの基礎・診断・治療 (21) (2015年10月9日 ; 名古屋)
- 6) Ono Y, Karasaki H, Imai K, Sasajima

J, Chiba S, Funakoshi H, Muraki M, Hanaoka H, Furukawa T, Furukawa H, Kono T, Nagashima K, Mizukami Y. Metachronous pancreatic cancer originating from disseminated founder pancreatic intraductal neoplasias. General Poster Session B (Board #B51): Cancers of the Pancreas, Small Bowel, and Hepatobiliary Tract, 2015 Gastrointestinal Cancers Symposium: J Clin Oncol 33, 2015 (suppl 3; abstr 330): San Francisco, Jan 16, 2015

- 7) Karasaki H, Kono T, Ono Y, Maejima T, Mizukami Y. Adenosquamous cell carcinoma derived from intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas confirmed by genetic analysis. General Poster Session B (Board #A46): Cancers of the Pancreas, Small Bowel, and Hepatobiliary Tract, 2015 Gastrointestinal Cancers Symposium: J Clin Oncol 33, 2015 (suppl 3; abstr 275): San Francisco, Jan 16, 2015
- 8) Mizukami Y, Imai K, Chiba S, Ono Y, Sasajima J, Karasaki H, Kono T, Nagashima K. A case of metachronous ductal adenocarcinomas with unique KRAS mutation (膵がん異時多発の1例) 第73回日本癌学会学術総会 膵臓、その他 . ポスター発表 (2014年10月26日 ; 横浜)
- 9) Sasajima J, Kawamoto T, Sugiyama Y, Mizukami Y, Iuchi Y, Ashida T, Tanabe H, Torimoto Y, Kohgo Y. Increased angiogenic property of human peripheral blood monocytes by ex vivo culture with c-Mpl agonists in hindlimb ischemia mouse model. American Society of Hematology. Poster session. Dec 5-8, 2013 (New Orleans, LA)
- 10) 蘆田知史、奈田利恵、井内康之、千葉眞子、加藤邦子、福岡亜衣、森木彩名、永幡美鈴、薄木亜也、松原由佳、原 愛里、八戸大輔、山崎誠治、水上裕輔 . Single venous access による末梢血単核球分離とその効率 . 第12回日本再生医療学会総会 (2013年3月21日 ; 横浜)

〔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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.higashi-tokushukai.or.jp/clinical\\_study/index.php](http://www.higashi-tokushukai.or.jp/clinical_study/index.php)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水上 裕輔（MIZUKAMI, Yusuke）  
医療法人 徳洲会 札幌東徳洲会病院  
附属臨床研究センター  
臨床生体情報解析部  
部門長  
（平成28年4月より「がん研究部 部門長」へ異動）

研究者番号：30400089

### (2) 研究分担者

蘆田 知史（ASHIDA, Toshifumi）  
医療法人 徳洲会 札幌東徳洲会病院  
附属臨床研究センター  
IBD 研究部  
研究員

研究者番号：50261409

盛一 健太郎（MORIICHI, Kentaro）  
旭川医科大学・医学部  
内科学講座  
講師

研究者番号：70455715

### (3) 連携研究者

該当者なし