

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：11401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19579

研究課題名(和文) Chase & Run：間質の基質変化を追いかける癌の進展機構

研究課題名(英文) Tumor stromal cells lead cancer cell expansion

研究代表者

田中 正光(Tanaka, Masamitsu)

秋田大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20291396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：「癌細胞または癌組織が広がる時、それらは何を目指して、何に惹かれ移動し拡大してゆくのか」という根本的な未解決命題がある。腫瘍は単純に増殖によって大きくなるだけではない。癌細胞周辺には特異な基質を含む間質組織が作られる。癌が周囲に進展する際、間質の変化が先行して広範囲に生じ、それを追うように癌細胞が広がってゆき、さらに基質の領域は先進拡大する自律的な癌の進展機構Chase & Runの仮説を立てた。研究結果から、癌の浸潤を牽引する線維芽細胞は、正常の線維芽細胞を教育して自分自身を次々と作り出してゆく新しい機構が分かってきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍内で癌細胞をサポートする線維芽細胞の産生に関して、従来とは異なる「線維芽細胞による線維芽細胞の教育」をベースとした新規機構がある事が分かってきた。これにより産生される線維芽細胞(CEF)は、これまで大きく癌関連線維芽細胞と捉えられてきたものの中に多様性を作り、腫瘍先進部でASPINや炎症性サイトカインの増幅をもたらす。癌細胞を誘引するケモカインや、浸潤・転移を促す足場基質である事を確認したASPINを産生するCEFが常に腫瘍辺縁で自律的に広がる事は、当該課題のコンセプトであるChase & Runに当てはまる。今後、CEFの産生を抑制する機構の検討から創薬への展開を目指したい。

研究成果の概要(英文)：Tumors are frequently accompanied by large areas of fibrosis. Although cancer-associated fibroblasts (CAFs) are known to play pivotal roles in tumor progression, fibroblasts within tumors are comprised of heterogeneous subpopulations, and it is not clear how these heterogeneous CAFs are generated and expand in tumors. We identified a novel mechanism for expansion of CAF-like cells with inflammatory phenotypes by “Fibroblasts educate fibroblasts”, in which CAFs educated normal NFs to generate new pro-tumor fibroblasts, which we refer to as CAF-educated fibroblasts (CEFs). CEFs express inflammatory cytokines and extracellular matrix, Asporin. CEFs sequentially educate NFs one after another to further amplify cytokines and chemokines in the tumor microenvironment, which triggers cancer cell dispersion and dissemination. Further, blocking sustained CEF generation could be a suitable therapeutic target for prevention of tumor dissemination.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：癌間質細胞 癌関連線維芽細胞 CAF Asporin

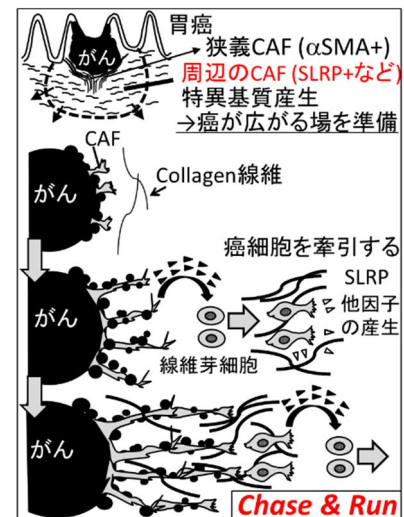
1. 研究開始当初の背景

腫瘍の局所進展において、浸潤先端部では癌細胞自身ではなくむしろ線維芽細胞などの間質細胞がフロントを形成している病理組織像が高頻度に観察される。そのため腫瘍が広がる事に癌関連線維芽細胞(CAF)が大きく貢献する事が指摘されている。一方で、腫瘍内の間質細胞で大きな比重をもつ線維芽細胞についても、多様性がある事に知見が高まっている。これまで CAF とまとめて呼ばれてきた線維芽細胞群も、分子マーカーの特性からいくつかのグループに分類される報告が出ている。

先行研究において、胃癌の間質に含まれる癌関連線維芽細胞(CAF)が特異的に産生する低分子量プロテオグリカン(SLRP)である **Asporin** を同定した(文献1)。**Asporin** は細胞外に分泌され、主要な細胞外基質成分として多くの腫瘍組織にみられる事が、その後自他の報告で明らかになった。胃癌や大腸癌、膵癌、前立腺癌などで CAF が分泌し、腫瘍促進的に働く知見が集積する一方で、乳癌ではタイプにより腫瘍促進と抑制性の両面が報告されており、多面的な機能が想定されるようになった。

私達は腫瘍の局所進展において線維芽細胞に焦点を当て、どのようなタイプの CAF が癌細胞の浸潤をリードし、さらにその CAF はどのように作られてくるのか検討する事とした。

主要な検討項目として、上記 **Asporin** を産生する CAF の腫瘍内分布、他の分子特性をもつ CAF との相異を調べ、腫瘍組織の浸潤を先導する役割を評価する事と、**Asporin**+CAF が連続的に作られる機構について調べようと考えた。これまで癌細胞が正常線維芽細胞を教育し、CAF が産生される事が知られているが、実際の腫瘍組織では癌細胞が少数である腫瘍辺縁部でも線維化が広範囲に見られる症例も多い。線維芽細胞自律的な新たな CAF 産生機構が存在するのではないかと想定した。



2. 研究の目的

「癌細胞または癌組織が広がる時、それらは何を指して、何に惹かれ移動し拡大してゆくのか」という根本的命題に対して検討する。癌細胞周辺には特異な基質を含む間質組織が作られる。癌が周囲に進展する際、間質基質の変化が先行して広範囲に生じ、それを追うように癌細胞が広がってゆき、さらに基質変化の領域は先進拡大する自律的な癌の進展機構：Chase & Run の仮説を立て、それを検証する。

3. 研究の方法

・細胞 癌細胞は最も難治性の胃癌であるスキルス型胃癌細胞株を複数(共同研究体制で国立がん研究センターと大阪市立大学から分与されている)用いた。CAF はスキルス胃癌患者の外科手術サンプルから採集し樹立した細胞株を、同一検体の非癌部線維芽細胞(NF)とセットで複数ペアを大阪市立大学腫瘍外科学講座(八代先生)から供与された。内在性に ASPN の発現しない2種類の胃癌細胞に ASPN 遺伝子導入した株を作成してマウスの間質応答を評価した。

・間質細胞、癌細胞の浸潤モニター：

In vitro:独自の三次元ゲル浸潤アッセイによるイメージング(*Bio-Protocol* 2016;6)。胃癌細胞と間質細胞の浸潤に最適化したコラーゲン、マトリゲル混合のゲルを用い、血清濃度勾配に従ったゲル内浸潤の様子を共焦点顕微鏡で3D再構築した。また MMP9 の活性はゼラチンゼイモグラフィで判定した。

In vivo:蛍光標識胃癌細胞と CAF、TAM の混合を免疫抑制マウス胃の粘膜下層に移植し、定期的に胃スライス切片を作成して胃壁内浸潤を共焦点顕微鏡下に観察した。

・**Asporin** 遺伝子欠損免疫抑制マウス：**Asporin**^{-/-}(**PLAP-1**^{-/-})**C57bl/6** は共同研究体制で大阪大学大学院歯学研究科(村上先生、山田先生：現 東北大学大学院歯学研究科)から供与を受け、さらにヌードマウスと交配してヒト細胞が移植可能な系統を作成した。

・網羅的分子解析：CEF の分子プロファイルを作成するために CEF/NF/CAF のマイクロアレイ解析(外部受託)を施行した。

4. 研究成果

(1) 細胞外基質 Asporin の腫瘍進展における機能について

1 Asporin 陽性 CAF の検討：

Asporin(ASP)の癌組織の浸潤に対する作用を調べる目的で、宿主の間質応答から ASPN を排除して癌組織に与える影響を比較判定するための ASPN^{-/-}nu/nu マウスの作成、およびヒト胃癌組織における発現解析を行った。

ASP^{-/-}nu/nu マウスにおける腫瘍進展抑制効果

ASP^{-/-}および野生型 nu/nu マウスの胃にヒト胃癌細胞を移植して両者の腫瘍組織を比較した結果、ASP^{-/-}nu/nu マウスでは胃癌の局所浸潤が弱く、腫瘍径が小さく深達度も抑制される傾向が明らかだった(図1)。また、ASP が癌の局所浸潤以外に転移を促進する転移前ニッチの形成に関わるかを検討した。様々な癌細胞株由来のエクソソームを精製し、正常線維芽細胞に添加して Asporin の産生誘導を調べたところ、検討した中

では肺癌細胞株の中に ASPN 誘導エクソソームを高効率に産生する株を見出した。野生型および ASPN^{-/-}nu/nu マウスを用いて、同エクソソームの尾静脈内前投与による癌細胞の肺転移効率を比較したところ、ASP^{-/-}nu/nu マウスでは肺転移の形成が低い結果が得られた。

これらの結果から以下の結論が得られた。

ホストの間質線維芽細胞による Asporin の産生は、¹癌細胞の局所進展を促進する。²癌細胞エクソソームによって遠隔臓器に転移促進ニッチを形成する。

ヒト胃癌症例の免疫染色による検討から：

進行癌では腫瘍の組織型を問わず腫瘍間質細胞での Asporin 発現が高頻度にみられた。筋線維芽細胞タイプの CAF マーカーであるαSMA との二重染色では、ASP⁺/αSMA⁺、ASP⁺/αSMA⁻、ASP⁻/αSMA⁺ CAF が存在し、多様性が確認された。両者の二重陽性 CAF は比較的少数で、いずれか一方のみ陽性の CAF が多数であった。特に ASP⁺/αSMA⁻ CAF は癌細胞巣から離れた辺縁部にも多く、腫瘍の先進拡大に寄与している事が示唆された(図2)。予想外の結果として、CAF 特異的と思われた ASPN が、少数例ではむしろ胃癌細胞での発現が高い群がある事が分かった(図3)。そのため追加検討項目として Asporin 陽性胃癌細胞の特性を調べる事とした(以下²)。

2 Asporin 陽性胃癌細胞の検討：

ASPN 発現が陰性のスキルス胃癌細胞株 HSC43 と 44As3 に ASPN を導入した高発現株(HSC43 ASPN, 44As3 ASPN)を作成した。細胞増殖、浸潤能、マウス胃癌移植腫瘍の進展度について比較検討を行い、以下の結果が得られた。

¹In vitro では、細胞増殖能に有意差は見られなかった。

²細胞浸潤能は ASPN 高発現 2 株でいずれも対照細胞株より増強していた。その機構の1つとして、ASP⁺を高発現する 2 株では MMP9 の産生が顕著に増加していた。

³細胞の活性酸素による酸化ストレスへの抵抗性が、ASP⁺高発現 2 株で亢進していた。

⁴マウス胃への癌細胞移植実験では、ASP⁺高発現 2 株は対照より腫瘍サイズの増大と深部浸潤の促進が見られた。腫瘍サイズの増大は、CD31 陽性腫瘍血管の増加が一因であった。

図1. ASPN KOマウスによる胃癌移植腫瘍の解析結果

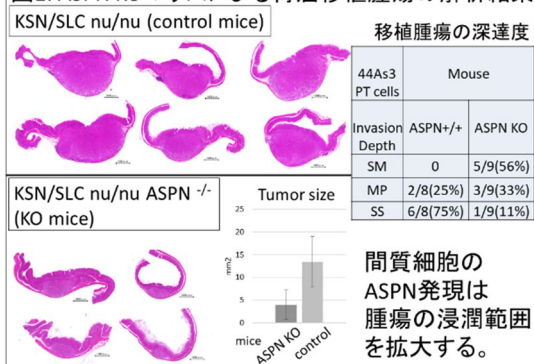


図2 ヒト胃癌

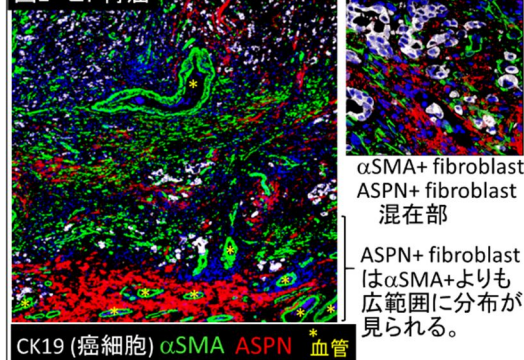
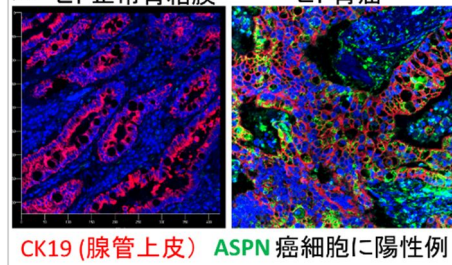


図3 ヒト正常胃粘膜

ヒト胃癌



これらの結果から、癌細胞における **ASP** 産生も腫瘍の浸潤・拡大を促進する事が明らかとなった(図4)。

(2) CAF の新たな産生機構について :

腫瘍内で線維芽細胞の応答が広範囲に見られる症例は頻度が高い。CAF の起源は単一ではないが、正常線維芽細胞が変換して生じる事が主要な CAF 産生機構と考えられている。

癌細胞による直接的な教育で CAF が産生される事が知られているが、一旦作られた CAF はそれ自身が他の正常線維芽細胞を教育して、次々と多様な CAF 様細胞を産生してゆく可能性を調べた。

CAF-educated fibroblast (CEF) の産生

ヒト胃癌細胞由来の CAF と同一患者の正常胃線維芽細胞(NF)を用いて検討した。CAF の培養上清(CM)を NF に添加し、NF における発現遺伝子の変動をマイクロアレイで網羅解析した。

CAF-CM 添加後では **IL-1B**、**IL-33**、**CXCL-1**、**6**、**8** などを含む炎症性サイトカインの発現、および上記 **ASP** N の発現上昇が特徴的に見られた。

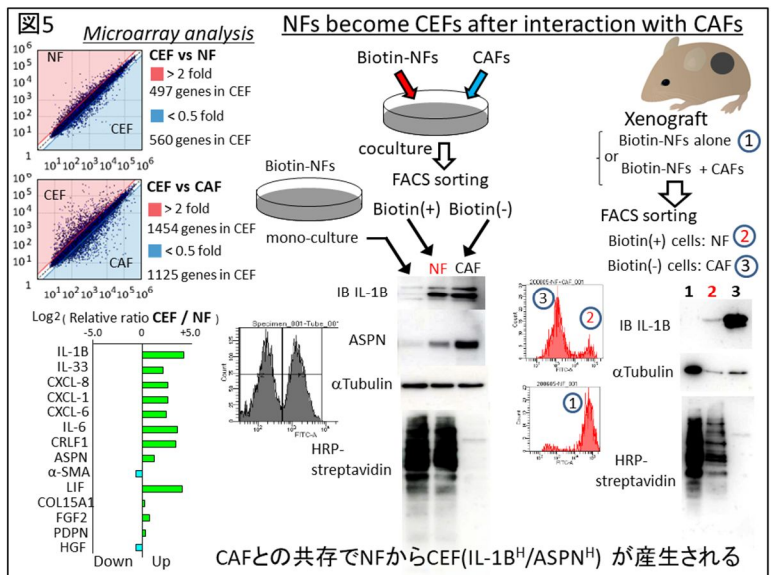
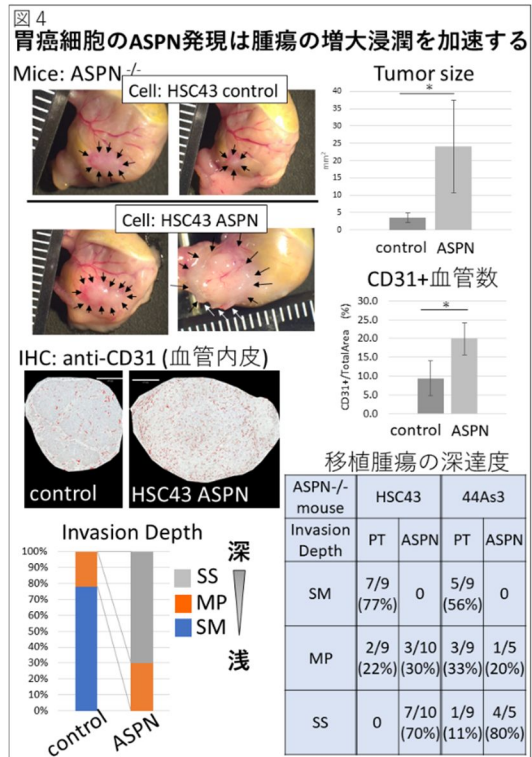
その一方で、**αSMA** や **PDPN** などの CAF マーカー遺伝子は変動しなかった。これらの遺伝子プロファイルを特徴とする細胞を **CAF-educated fibroblast (CEF)** と呼び、検討を加えた(図5)。ピオチン標識した NF と CAF を混合培養後、セルソーターで分取したピオチン+NF でも **IL-1B**、**ASP** N の上昇を含む同様の分子変動がみられ、NF から CEF が産生される事を確認した。また同様の実験結果は、マウスに皮下移植した **biotin+NF / CAF** から再現された(図5)。

CEF が癌細胞にフィードバックする生物学的効果を検討したところ、CEF の培養上清(CM)は胃癌細胞の分散・移動・浸潤を促進し、これは主に CEF が分泌する **IL-1B** による癌細胞の **Rac1** の活性化に依存する事が分かった。CEF による癌細胞の分散効果を指標に検討したところ、CEF の特性は可逆性であるが、初期の CAF による NF の教育時間が遷延した場合には CEF の特性は **in vitro** で 14 日以上持続し、しかも

CEF の CM はさらに NF から次世代の CEF を誘導する、CEF の連続産生機構を明らかにした。この CEF の産生は **NFκB** シグナルの活性化に基づき、その結果二次的に **ASP** N の発現誘導も生じる。CEF では **P300**、**Gen5**、**Tip60** など複数のアセチル化酵素の遺伝子発現上昇もみられ、**Epigenetic** な制御を受けていると考えられた。

意義・展望など

課題研究から、腫瘍内で癌細胞をサポートする線維芽細胞の産生に関して、従来とは異なる「線維芽細胞による線維芽細胞の教育」をベースとした新規機構がある事が分かってきた。これにより産生される CEF は、これまで大きく CAF と捉えられてきたものの中に多様性を作り、



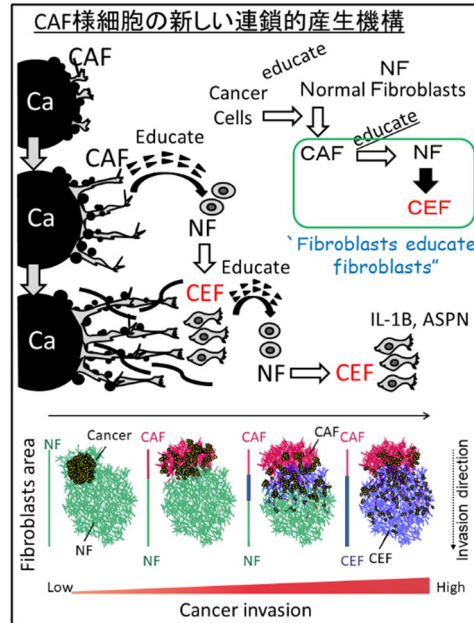
腫瘍辺縁部(先進部)で **ASP**N や炎症性サイトカインの増幅をもたらす。培養実験でみられた **CEF** の連続産生が生体内で生じる事の立証は今後の検討内容であるが、癌細胞を誘引するケモカインや、浸潤・転移を促す足場基質である事を確認した **ASP**N を産生する **CEF** が常に腫瘍辺縁で自律的に広がる事は、当課題のコンセプトである **Chase & Run** に当てはまる。今後、**CEF** の産生を抑制する機構の検討から創薬への展開を期待している。

課題研究中の予期せぬ結果としては、癌細胞自身の **ASP**N 発現陽性例が少数みられ、この事も腫瘍の悪性度の進行に寄与する事が実験的に分かった。

今後実際の腫瘍症例で、このグループの悪性指標との相関を検討してゆきたい。

文献 1

Asporin activates coordinated invasion of scirrhous gastric cancer and cancer associated fibroblasts. Satoyoshi R., Tanaka M. et al. (2015) Oncogene 29, 650-660.



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Umakoshi M, Takahashi S, Itoh G, Kuriyama S, Sasaki Y, Yanagihara K, Yashiro M, Maeda D, Goto A, Tanaka M	4. 巻 38
2. 論文標題 Macrophage-mediated transfer of cancer-derived components to stromal cells contributes to establishment of a pro-tumor microenvironment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 2162-2176
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-018-0564-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kuriyama S, Tsuji T, Sakuma T, Yamamoto T, Tanaka M	4. 巻 4
2. 論文標題 PLEKHN1 promotes apoptosis by enhancing Bax-Bak hetro-oligomerization through interaction with Bid in human colon cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Death Discovery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41420-017-0006-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Itoh G, Ikeda M, Iemura K, Amin MA, Kuriyama S, Tanaka M, Mizuno N, Osakada H, Haraguchi T, Tanaka K	4. 巻 8
2. 論文標題 Lateral attachment of kinetochores to microtubules is enriched in prometaphase rosette and facilitates chromosome alignment and bi-orientation establishment.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-22164-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Pervin MS, Itoh G, Talukder MSU, Fujimoto K, Morimoto YV, Tanaka M, Ueda M, Yumura S.	4. 巻 8
2. 論文標題 A study of wound repair in Dictyostelium cells by using novel laserporation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-26337-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimazu K, Inoue M, Sugiyama S, Fukuda K, Yoshida T, Taguchi D, Uehara Y, Kuriyama S, Tanaka M, Miura M, Nanjyo H, Iwabuchi Y, Shibata H	4. 巻 109
2. 論文標題 Curcumin analog, GO-Y078, overcomes resistance to tumor angiogenesis inhibitors.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3285-3293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13741.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka M, Kuriyama S, Itoh G, Maeda D, Goto A, Tamiya Y, Yanagihara K, Yashiro M, Aiba N.	4. 巻 77
2. 論文標題 Mesothelial cells create a novel tissue niche that facilitates gastric cancer invasion.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 684-695
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-16-0964.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Itoh G., Chida S., Yanagihara K., Yashiro M., Aiba N., Tanaka M	4. 巻 36
2. 論文標題 Cancer-associated fibroblasts induce cancer cell apoptosis that regulates invasion mode of tumors	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 4434-4444
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/onc.2017.49	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kuriyama S, Tamiya Y., Tanaka M.	4. 巻 147
2. 論文標題 Spatiotemporal expression of UPK3B and its promoter activity during embryogenesis and spermatogenesis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Histochem Cell Biol	6. 最初と最後の頁 17-26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-016-1486-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Goto A, Tanaka M, Yoshida M, Umakoshi M, Nanjo H, Shiraishi K, Saito M, Kohno T, Kuriyama S, Konno H, Imai K, Saito H, Minamiya Y, Maeda D.	4. 巻 12
2. 論文標題 The low expression of miR-451 predicts a worse prognosis in non-small cell lung cancer cases	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0181270	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 田中正光
2. 発表標題 Cancer associated fibroblasts educate normal fibroblasts to facilitate cancer cell dissemination
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗山 正、田中正光
2. 発表標題 PEDF overexpression in osteosarcoma cell line increases the endothelial permeability and promotes metastasis
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤 剛、田中正光
2. 発表標題 Proliferation and invasion-geometry of giant cancer cells cooperating with stromal cells
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋 壮、田中正光
2. 発表標題 CCDC85A is regulated by miR-224 and alters migration and proliferation of pancreatic cancer cells
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中正光
2. 発表標題 Contribution of Giant and/or multinucleated cancer cells to tumor progression
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤 剛、田中正光
2. 発表標題 マクロファージ、CAF、癌細胞が強調したMMP9産生と活性化および、癌への関与
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中正光
2. 発表標題 Macrophages transmit tumor-derived extracellular vesicles to stromal cells and create pro-tumor microenvironment.
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中正光
2. 発表標題 Macrophages transfer cancer cell derived EVs to stromal cells that promotes gastric cancer invasion.
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 栗山 正、田中正光
2. 発表標題 Gene expression profiling of organ tropism related upregulation in osteosarcoma derived sub-cell lines.
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤 剛、田中正光
2. 発表標題 Cancer invasion geometry of giant cancer cells cooperating with stromal cells.
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中正光
2. 発表標題 Cancer cell-derived extracellular vesicles educate macrophages to facilitate tumor invasion.
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 栗山 正、田中正光
2. 発表標題 PLEKHN1 promotes apoptosis by enhancing Bax oligomerization through interaction with Bid in human colon cancer.
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊藤 剛、田中正光
2. 発表標題 CAF (cancer-associated fibroblasts) induce cancer cell apoptosis that regulates invasion mode of tumors.
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田中正光
2. 発表標題 癌関連線維芽細胞による癌細胞死誘導は腫瘍の浸潤モードを制御する
3. 学会等名 第106回日本病理学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 栗山 正、田中正光
2. 発表標題 Collective durotaxis of cranial neural crest cells in Xenopus.
3. 学会等名 The 50th JSDB meeting
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊藤 剛、田中正光
2. 発表標題 癌細胞のデス小胞が促進する CAF リード型の癌浸潤プロセスの解明
3. 学会等名 日本生化学会東北支部第83回例会・シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

秋田大学大学院医学系研究科 分子生化学講座HP
http://www.med.akita-u.ac.jp/~seika2/Akita_Univ._Dept._Molecular_Biochemistry/youkoso.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	伊藤 剛 (Itoh Go) (60607563)	秋田大学・医学系研究科・助教 (11401)	
研究協力者	栗山 正 (Kuriyama Sei) (30398226)	秋田大学・医学系研究科・准教授 (11401)	