

機関番号：17401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20591530

研究課題名 (和文) 多標的性 miRNA の phenotype を利用した炎症及び癌に対する治療戦略

研究課題名 (英文) Therapy strategy for inflammation and cancer by using the phenotype of multitargeting microRNAs.

研究代表者

蒲原 英伸 (KAMOHARA HIDENOBU)

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90398222

研究成果の概要 (和文) :

癌と炎症に関連するmicroRNAを網羅的に検証するため、手術前後の白血球、炎症局所の白血球および単球由来の細胞株(THP-1)を用いて、サイトカインとmicroRNAの発現を解析した。外科手術後のドレーン廃液中の白血球は、血清中と比してIL-8が大量に分泌され、激しい炎症が局所で惹起されていることが示唆された。microRNAも同様に過剰に発現しており、この中でmiR-21, 146aなどは炎症のシグナル伝達分子をターゲットとし、炎症を負に制御するため、やや遅れて発現していた。THP-1において、LPS、TNF α 、IL-1 β 刺激よりmiR-21は濃度依存的に発現が増強した。

炎症性サイトカインのIL-6の癌細胞に与える影響について、大腸癌・膵臓癌細胞を用いて検証を行った。IL-6がSTAT3の活性を介して、癌の進展(増殖・浸潤)に関与していた。大腸癌細胞株にIL-6刺激によりlet7aの低下が確認された。一方、miR-146aはIL-6により増強された。他にも、炎症・癌に関連するmicroRNAが同定され、targeting therapyに向け、microRNAの役割・意義(Phenotype)を明らかにしていく必要がある。このことが、microRNAを利用した炎症・癌への治療の開発・応用につながる可能性がある。

研究成果の概要 (英文) :

In order to analyze both cancer and inflammation associated-microRNAs, we used leukocytes before and after operation, and THP-1 cells for assay of cytokines and microRNAs expression. IL-8 mRNA expression of leukocytes was significant higher in drainage fluid than in peripheral blood. That indicated severe inflammation occurred in local surgical field. Some kind of microRNAs were detected highly in local sites. Detection of miR-21 and miR146a in a late phase suggested that could play a role of negative feedback regulator after activation of signal transduction. LPS, TNF α and IL-1 β promoted the expression of miR-21 significantly in a dose dependent fashion in THP-1 cells. We determined the effect of IL-6 on the biological function in colon and pancreas cancer. IL-6 activated the phosphorylation of STAT-3 and promoted cancer progression, such as proliferation and invasion. IL-6 suppressed let7a expression and induced miR146a expression. We also identified some microRNAs which were associated with cancer and inflammation. We need to identify the phenotype of microRNAs in vivo to establish targeting therapy by using microRNAs. That will contribute to discover and apply for novel microRNA therapy against cancer and inflammation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、外科学一般

キーワード：microRNA、cancer、inflammation、分子生物学、実験外科学

1. 研究開始当初の背景

炎症の主体は白血球が局所組織へ浸潤し炎症物質を放出させることによる組織の損傷である。Sepsisに対する治療は、survival sepsis campaign guidelineを推奨として世界的にすすめられているが、未だに現代医療の限界があり予後不良である。Sepsisは、感染症にsystemic inflammatory response syndrom(SIRS)を合併し、感染に起因した急性炎症の制御が治療の軸となっている。一方、潰瘍性大腸炎やウイルス性肝炎などの慢性炎症を主とする疾患においては炎症と修復が繰り返されることにより細胞内での遺伝子変異常をきっかけとなりえる。ひいては細胞は癌化し宿主を蝕んでいく。現在、急性・慢性炎症の治療に関しては治療に抵抗性を示すことが多く問題となっている。

この炎症を契機とした腫瘍局所環境(TEM:tumor microenvironment)においては、癌細胞、白血球以外の線維芽細胞、内皮細胞など種々の細胞が存在し互いに修飾しあっている。TEMではサイトカイン、ケモカイン、コラーゲン、MMPなどの分子が豊富に産生され、癌の進展(発癌・増殖・浸潤・転移)に関与していることが明らかになってきた。

実地臨床において炎症を合併した癌治療は抵抗性を示し予後不良の傾向にある。これまでの分子標的治療においては、main pathwayを阻害しても、また、escape機構によりother pathwayが生じ治療抵抗性を生じてきた。将来Combination therapyが理想ではあるが、まだ十分解析が行われていなく現状では実用にはほど遠い。

microRNAは約22前後の塩基配列をもつsmallRNAで、タンパク質の翻訳されないNon-coding RNAで内因性に発現されている。多くの遺伝子発現をRNA干渉によって同時に制御している。microRNAは多標的であり、分子標的治療のターゲットに成りにくいように考えられるが、多くの遺伝子制御を合算した最終的なphenotypeとして捉えることにより、新たな治療のターゲットとなりえる可能性がある。

これまで、癌に関するmiRNAの報告は急増しているが、炎症に関与するmiRNAの研究報告はまだ少な

い。マウスにLPSを投与し肺組織において発現してくるmiRNAをreal time RT-PCRを用いてprofilingを行い、さらに経時的に定量し12個のmiRNAが特異的に発現していた(Moschos SA, BMC Genomics, 2007)。macrophageにおいてmiR155はTNF α , IFN β , IFN γ 刺激により誘導され、感染防御的に作用する(O'connell RM, PNAS, 2007)。また、IL-6刺激により、let7a(malignant cholangiocyte)(JBC, 2007), miR21(multiple myeloma)(Blood, 2007)が誘導され、炎症関連の癌促進性のmiRと考えられ、一方、miR370(malignant cholangiocyte)は、IL-6により発現が抑制される(Oncogene, 2007)。Let7a, miR21はsuppressor geneがtargetであり、miR370はoncogeneがtargetと予想することができる。一方、単球のLPS刺激により、IRAK1, TRAF6からNF κ Bを介してmiR146は発現促進されるが、その後miR146はnegative feedbackとしてIRAK1, TRAF6を抑制し抗炎症的に作用する(PNAS, 2007)。このようにmicroRNAは炎症・癌の関与していることが示唆されている。

2. 研究の目的

治療に抵抗性を示す炎症に起因した癌に対する治療を開発するために、炎症と癌に起因したmicroRNAを明らかにし、治療の可能性を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

A. 健常者、手術後患者の血液やドレーン廃液から白血球の分離とmicroRNAの分離。

健常者、手術後患者の血液やドレーン廃液を採取し、lymphoprepを用いて白血球(neutrophil, monocyte, lymphocyte)を各分離する。TrizolもしくはmiRNA isolation kitなどを用いてmiRNAを抽出する。

B. THP-1細胞(単球由来)またはがん細胞株を用いて炎症性サイトカインにて誘導されるmicroRNAの同定。

各種細胞をLPS, TNF \cdot , IL-1 \cdot など各炎症惹

起因子と培養し、Trizol もしくは miRNA isolation kit などを用いて miRNA を抽出する。

C. 炎症特異的 miRNA クローニングと同定。

炎症関連として同定されたの miRNA について、miRNA は 3' に poly A tail を有しないため、miRNA に poly A polymerase を用いて poly A を付加する。

Poly A 配列を考慮した RT primer を用いて RT を行う。miRNA の cDNA に対して、特異的 primer を用いて SYBR green based real time PCR を行う。

D. サイトカイン存在下での癌細胞株の増殖能・浸潤能・運動能の評価

炎症性サイトカイン刺激下で、一定時間培養を行い、その後の細胞増殖能を WTS assay kit を用いて施行した。また、浸潤能の評価は Matrigel を Insert chamber 内に重層している Chamber system (Beckton and Dickinson) を用いて、下層の chamber への細胞数を比較していく。運動能は金コロイドを付着させたガラス上で細胞培養を行い、細胞が貪食し、移動した面積を定量して行った。

E. サイトカイン刺激後のシグナル伝達の評価。刺激後の細胞を lysis buffer にて溶解し、目的とする蛋白分子の同定とリン酸化を Western blotting および Immunoprecipitation を各種 STAT-3 の Ab を用いて行った。

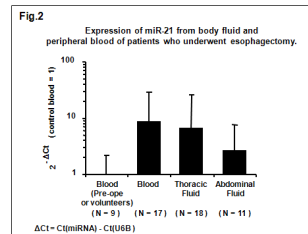
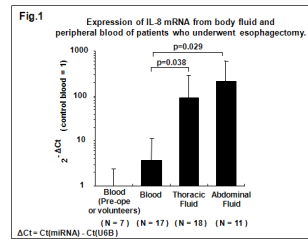
F. 炎症特異的 miRNA の網羅的解析

ヒト microRNAs は Sanger Institute に約 700 近く sequence が登録されているが、現在利用できる。これまでの microRNA 発現の array の data に基づき、microRNA の同定 primer を作成し網羅的に micrRNA の発現を確認する。

4. 研究成果

A. 炎症反応時における microRNA-21 (miR-21) の発現

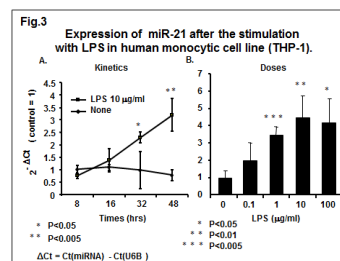
我々は食道癌患者の食道癌組織と正常組織中の miR-21 の発現を検証し、食道癌に有意に発現することを報告した (CCR, 2009)。また、食道癌と非炎症性疾患 (胆石症、ヘルニア) の血清中の miR-21 の発現を比較し、食道癌患者血清において有意に miR-21 が exosome 内に認められることがわかった。同時に炎症指標の CRP が高い群は miR-21 が高い傾向を示した (unpublished data)。このように、miR-21 は癌においても炎症においても発現が左右される microRNA であることが予想される。



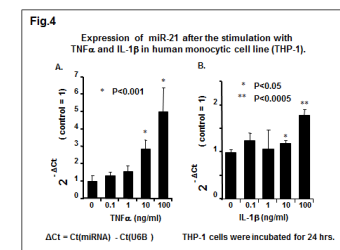
外傷・手術・感染による炎症反応は局所が主体であり、それに伴い全身性の炎症反応 (SIRS) を惹起する。この現象を確認するため食道癌術後に挿入された胸・腹部ドレーン排液と血液中の白血球の IL-8 (Fig. 1) と miR-21 (Fig. 2) の発現を検証した。

IL-8 および miR-21 は、術前より、術後の血清において増強し、血清とドレーン排液の比較では、ドレーン中の白血球において IL-8 の発現が有意に増強していた。一方、miR-21 の発現は変化なかった。他に、miR-146a はドレーン排液中において増強していた。

B. THP-1 細胞におけるサイトカインによる miR-21 の発現



m炎症に関連する microRNA を網羅的に検証するため、THP-1 細胞株 (単球由来) を用いて、TNFalpha, IL-1beta, LPS の存在下にて濃度依存性に発現増強していた (Fig2B, 3A, 3B)。また、LPS 投与後、経時的に miR-21 の発現が増強した。miR-21 は炎症に特異的な指標の一つになり

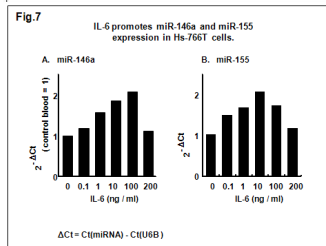
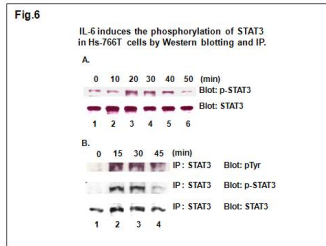
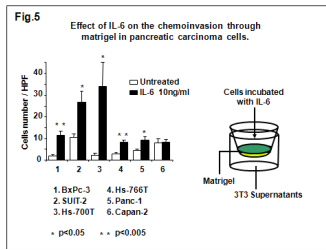


える可能性がある。

C. 膵臓癌細胞株における IL-6 刺激後の microRNA の発現の解析

急性相反応蛋白である IL-6 は臨床病態 (敗血症や癌悪性度) と関連し、容易に血清中で測定できるサイトカインの一つである。そこで、IL-6 と癌細胞の影響を検証するため、癌細胞に IL-6 にて刺激し、増殖・浸潤能を検証した

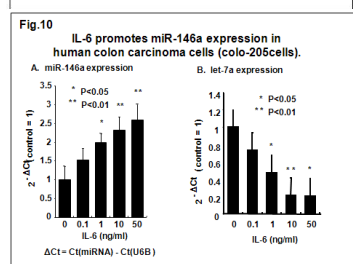
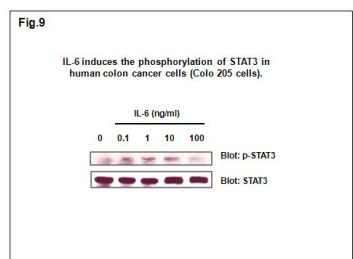
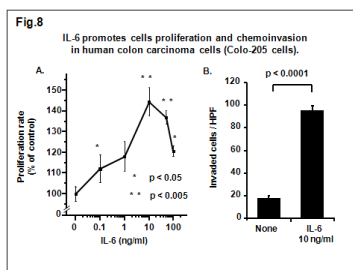
膵臓癌細胞において、IL-6 とその受容体の発現を解析したが、受容体は解析した全て (7/7) に認められたが、IL-6 自体の発現はいくつかの株 (2/7) に認められた。IL-6 の存在下で、膵臓癌細胞は STAT-3 を活



より炎症が惹起され易い環境状態になっていることが予想された(data not shown)。

D. 大腸癌細胞株におけるIL-6刺激後のmicroRNAの発現の解析

NSAID投与により、大腸癌の発生が抑制されること、潰瘍性大腸炎などに癌化が多いことなど、大腸癌と炎症は関連性が示唆される。



性化させ (Fig. 6)、浸潤能 (図 5) と運動能 (data not shown) を有意に亢進させた。この際、miR-155 と 146a が濃度依存的に発現が亢進していた (Fig. 7)。また、線維芽細胞と癌細胞の cross talk を検証するため、co-culture や培養上清の交換添加の結果より、線維芽細胞の存在により IL-6 の発現はより亢進し、tumor microenvironment においては

-10ng/mlをピークとして、100ng/mlでは低下傾向を示した。

IL-6の刺激によって、Let-7aは有意に発現が低下し、miR146aは増加していた。In-vitroにおいてTHP-1(単球由来白血球細胞株)を用いてTNFalpha, IL-1beta刺激時におけるmicroRNA発現について検討した。Let-7aとmiR-21が経時的・濃度依存的に有意に増強していた。Let7aの標的遺伝子としてMyc, Ras, cyclinD2, EB, SP8, E2F5などの癌遺伝子・癌細胞増殖関連遺伝子があげられ、let7aが低下することにより、癌の進展に寄与する可能性が示唆される。また、miR-146aの標的遺伝子として、IRAK, TRAF6などTNFの下流のシグナル伝達分子(NFkappaB)があり、炎症のnegative feed backとしてmiR-146aの発現が増強している可能性がある。

E. 考察

炎症に関連するサイトカインである、TNF, IL-1, IL-6, IL-8や菌体毒素のLPSを用いて癌細胞株、単球由来細胞株、白血球を用いて、そのbioactivityについて解析してきた。血清中と比してサイトカインが大量に分泌され、激しい炎症が局所で惹起されていることが示唆されたが、microRNAも同様に過剰に発現していることが分かってきた。

TNF, IL-1, LPSは炎症の強いinducerであり、miR-21, miR146aなどが関連して増強した。miR-21, 146aなどは炎症のシグナル伝達分子をターゲットとし、炎症を負に制御するため、やや遅れて発現し、negative feedbackに制御しているかもしれない。

IL-6はlet7aの発現を低下させ癌の進展に関与している可能性が示唆された。また、TEMにおいて炎症が関与していることが明らかにされている中で、今回、線維芽細胞株を用いた解析で、IL-6やIL-8などのサイトカインが修飾され増強していることが示された。腫瘍にはTEMといった炎症が関与しており、癌に対する治療の他、その周囲組織を含めた炎症反応を制御することが重要と思われる。今回、炎症・癌に関連するmicroRNAをいくつか同定できたが、さらなるmicroRNAの発現解析のために、複数のprimerを作製し、microRNAをRTを行ったDNA libraryから種々のmicroRNAが同定された(miR-24, 25, 34a, 27a, 29a, 181d, 199a, 132, 1826など)(data not shown)。今後、これらの意義をさらに明らかにしていく予定である。

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 20 件) すべて査読有

大腸癌細胞株 (Colo-205) を用いて、IL-6刺激後の細胞増殖能 (Fig. 8A) と浸潤能 (Fig. 8B) を検証した。IL-6はcolo-205細胞において有意に増殖した。10ng/mlをピークとして、50, 100ng/mlでは活性はやや抑えられた。浸潤能は有意に促進した。また、STAT-3のリン酸化は1

1. Hirosako S, Goto E, Fujii K, Tsumori K, Hirata N, Tsumura S, Kamohara H, Kohrogi H. Human bronchial intraepithelial T cells produce interferon-gamma and stimulate epithelial cells. *Clin Exp Immunol*. 2009 Feb;155(2):266-74. Epub 2008 Nov 26.
2. Koga Y, Ishikawa S, Nakamura T, Masuda T, Nagai Y, Takamori H, Hirota M, Kanemitsu K, Baba Y, Baba H. Oxysterol binding protein-related protein-5 is related to invasion and poor prognosis in pancreatic cancer. *Cancer Sci*. 2008 Dec;99(12):2387-94.
3. Ida S, Fujimura Y, Hirota M, Imamura Y, Ozaki N, Suyama K, Hashimoto D, Ohmuraya M, Tanaka H, Takamori H, Baba H. Significance of endothelial molecular markers in the evaluation of the severity of acute pancreatitis. *Surg Today*. 2009;39(4):314-9.
4. Chikamoto A, Tsuji T, Nakahara O, Sakamoto Y, Ikuta Y, Tanaka H, Takamori H, Hirota M, Kanemitsu K, Baba H.
5. Cancer cells spread through lymph vessels in the submucosal layer of the common bile duct in gallbladder carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2009;16(4):557-61.
6. Hirota M, Ichihara A, Furuhashi S, Tanaka H, Takamori H, Baba H. Spleen and gastrosplenic ligament preserving distal pancreatectomy under a minimum incision approach assisted by laparoscopy. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2009;16(6):792-5.
7. Hashimoto D, Takamori H, Sakamoto Y, Ikuta Y, Nakahara O, Furuhashi S, Tanaka H, Watanabe M, Beppu T, Hirota M, Baba H. Is an estimation of physiologic ability and surgical stress able to predict operative morbidity after pancreaticoduodenectomy? *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2010 Mar;17(2):132-8.
8. Hashimoto D, Ohmuraya M, Wang J, Yamamura K, Hirota M, Baba H. Effect of low-molecular weight trypsin inhibitor, nafamostat mesilate, on trypsin activity using the pancreatic acinar cells. *Pancreas*. 2009 Jul;38(5):595-7.
9. Ozaki N, Ohmuraya M, Hirota M, Ida S, Wang J, Takamori H, Higashiyama S, Baba H, Yamamura K. Serine protease inhibitor Kazal type 1 promotes proliferation of pancreatic cancer cells through the epidermal growth factor receptor. *Mol Cancer Res*. 2009 Sep;7(9):1572-81.
10. Ishikawa S, Nagai Y, Masuda T, Koga Y, Nakamura T, Imamura Y, Takamori H, Hirota M, Funakosi A, Fukushima M, Baba H. The role of oxysterol binding protein-related protein 5 in pancreatic cancer. *Cancer Sci*. 2010 Apr;101(4):898-905.
11. Hiyoshi Y, Kamohara H, Karashima R, Sato N, Imamura Y, Nagai Y, Yoshida N, Toyama E, Hayashi N, Watanabe M, Baba H. MicroRNA-21 regulates the proliferation and invasion in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res*. 2009, 15(6), 1915-1922.
12. Wang J, Ohmuraya M, Suyama K, Hirota M, Ozaki N, Baba H, Nakagata N, Araki K, Yamamura K. Relationship of strain-dependent susceptibility to experimentally induced acute pancreatitis with regulation of Prss1 and Spink3 expression. *Lab Invest*. 2010 May;90(5):654-64.
13. Zhou L, Tan X, Kamohara H, Wang W, Wang B, Liu J, Egami H, Baba H, Dai X. MEK1 and MEK2 isoforms regulate distinct functions in pancreatic cancer cells. *Oncol Rep*. 2010, 24, 251-255.
14. Hashimoto D, Takamori H, Sakamoto Y, Tanaka H, Hirota M, Baba H. Can the physiologic ability and surgical stress (E-PASS) scoring system predict operative morbidity after distal pancreatectomy? *Surg Today*. 2010 Jul;40(7):632-7.
15. Ida S, Ohmuraya M, Hirota M, Ozaki N, Hiramatsu S, Uehara H, Takamori H, Araki K, Baba H, Yamamura K. Chronic pancreatitis in mice by treatment with choline-deficient ethionine-supplemented diet. *Exp Anim*. 2010, 59, 421-429.
16. Nakahara O, Takamori H, Tanaka H, Sakamoto Y, Ikuta Y, Furuhashi S, Watanabe M, Beppu T, Hirota M, Kanemitsu K, Baba H. Clinical significance of dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase expression in patients with pancreatic cancer. *Int J Clin Oncol*. 2010, 15, 39-45.
17. Imamura Y, Hirota M, Ida S, Hayashi N, Watanabe M, Takamori H, Awai K, Baba H.

Significance of renal rim grade on computed tomography in severity evaluation of acute pancreatitis. *Pancreas*, 2010, 39, 41-46.

18. Sugita H, Kaneki M, Furuhashi S, Hirota M, Takamori H, Baba H. Nitric oxide inhibits the proliferation and invasion of pancreatic cancer cells through degradation of insulin receptor substrate-1 protein. *Mol Cancer Res*. 2010 Aug;8(8):1152-63.

19. Takamori H, Kanemitsu K, Hirota M, Ikeda O, Tanaka H, Beppu T, Yamashita Y, Oya N, Baba H. Perioperative intra-arterial and systemic chemotherapy for pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol*. 2011 Apr;18(4):1110-5.

20. Satoh K, Shimosegawa T, Masamune A, Hirota M, Kikuta K, Kihara Y, Kuriyama S, Tsuji I, Satoh A, Hamada S. Nationwide epidemiological survey of acute pancreatitis in Japan. *Pancreas*, 2011, 40, 503-507.

[学会発表] (計 14 件)

1. 蒲原英伸、吉田直矢、外山栄一郎、林尚子、渡邊雅之、宮成信友、馬場秀夫. 大腸癌細胞における IL-6 の STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) を介した IL-10 発現機構の解析とその意義について. 日本消化器外科学会 2008. 7. 16 札幌

2. 蒲原英伸、石河隆俊、日吉幸晴、高森啓史、廣田昌彦、馬場秀夫. IL-6 の膵癌細胞の増殖・転移に及ぼす影響と間質細胞による IL-6 発現制御機構. 日本消化器癌発生研究会 2008. 9 別府

3. 蒲原英伸、米満弘一郎、門岡康弘、廣佐古進、鷺島克之、杉田裕樹、河野宏明、馬場秀夫、木下順弘. 手術侵襲に伴う生体防御反応に関与する microRNA の発現とその意義について. 日本救急医学会、2008. 10. 13-15、ロイトン札幌

4. 蒲原英伸、石河隆敏、高森啓史、廣田昌彦、馬場秀夫. 膵癌細胞における STAT3 を介した増殖・転移機構の解析(主にサイトカインの役割について) 日本消化器病学会 2008. 10 東京

5. 蒲原英伸、日吉幸晴、吉田直矢、外山栄一郎、林尚子、渡邊雅之、馬場秀夫. IL-6 による大腸癌細胞の増殖・浸潤機構における microRNA 発現の意義について 日本外科学会、2009. 4、福岡

6. 蒲原英伸、石河隆敏、高森啓史、馬場秀夫. 膵癌細胞におけるサイトカイン刺激による STAT3 活性化の意義について、日本消化器外科学会、2009. 7. 16-18 大阪市

7. 蒲原英伸、日吉幸晴、林尚子、渡邊雅之、馬場秀夫. IL-6 による大腸癌細胞の増殖・浸

潤機構における microRNA 発現の解析、日本消化器病学会 2009. 10 京都

8. 蒲原英伸、日吉幸晴、木下浩一、蔵重淳三、木下順弘、馬場秀夫. SIRS における microRNA-21 の発現機構の解析とその意義について、日本外科学会、2010. 4. 9、名古屋

9. 蒲原英伸、日吉幸晴、石河隆敏、林尚子、渡邊雅之、馬場秀夫. 大腸癌細胞における let7a 発現制御機構の解析、日本癌学会、2009. 10. 1、パシフィコ横浜

10. 蒲原英伸、高橋将史、石河隆敏、境恵祐、廣佐古進、鷺島克之、木下順弘、馬場秀夫. SIRS における CXCL-8 の発現の意義とその受容体 (CXCR1、CXCR2) を標的とした治療戦略、日本外科学会、震災のため学会紙上発表、2011. 5

11. Hidenobu Kamohara, Shunzi Suzuki, Seiji Mita, Takatoshi Ishiko, Yoshiharu Hiyoshi, Hideo Baba. IL-6 induces IL-10 expression and promotes cancer progression after activation of STAT3 in human colon carcinoma cells. AACR, 2009. 4. 21 Denver, USA

12. Hidenobu Kamohara, Takatoshi Ishiko, Hiroshi Takamori, Hideo Baba. IL-6 promotes pancreatic cancer progression by interaction of fibroblasts. International Conference on Tumor Microenvironment, 2009. 10. 22, Versailles, France.

13. Hidenobu Kamohara, Hiyoshi Yukihar, Junji Kurashige, Koichi Kinoshita, Hideo Baba. Induction of interleukin-8 (CXCL-8) by tumor necrosis factor- α (TNF- α) and leukemia inhibitory factor (LIF) in pancreatic carcinoma cells. : Impact of CXCL-8 as an autocrine growth factor. AACR, 2010. 4. 21, Washington DC, USA

14. Hidenobu Kamohara, Kouichi Kinoshita, Junji Kurashige, Yohei Tanaka, Hideo Baba. The role of IL-6 in communication of pancreatic carcinoma cells with fibroblasts. AACR, 2011. 4. 3 Orland, FL, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蒲原 英伸 (KAMOHARA HIDENOBU)
熊本大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90398222

(2) 研究分担者

広田 昌彦 (HIROTA MASAHIKO)
熊本大学・医学部附属病院・非常勤講師
研究者番号：80284769