

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：32645

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659626

研究課題名(和文)がん幹細胞を標的としたがん治療を実現するための新しいmiRNAデリバリー法の開発

研究課題名(英文)Development of a new miRNA delivery system for targeting cancer stem cells

研究代表者

上田 しのぶ(Ueda, Shinobu)

東京医科大学・医学部・助手

研究者番号：00521874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：microRNA(miRNA)はがんの発生や抑制に関与しており、血中ではエクソソームによって運ばれている。また、がん幹細胞は現在の治療法では残存し再発や転移を起こす可能性がある。我々はがん幹細胞に結合する分子をエクソソーム膜上に発現させ、がん幹細胞の増殖を抑制するmiRNAをエクソソーム中に取り込ませて血中に投与することで、がん幹細胞を標的とした治療法を確立できると考えた。乳がん細胞のEGFRに結合するペプチド(GE11)を発現させたエクソソームにlet-7aを内包させ(let-7a/GE11エクソソーム)、担がんマウスに尾静脈接種すると効率よくがん細胞へ到達し増殖抑制効果を示した。

研究成果の概要(英文)：It is known to dysregulation of microRNAs contribution to the development and progression of cancers. MiRNAs in serum correlate with the cancer, cardiovascular disorders and the various types of diseases. In addition, extracellular miRNAs have been detected in exosomes isolated from numerous body fluids including serum. In this study, we examined whether exosomes were a new useful tools for gene delivery in a model of cancer. Modified exosomes with the GE11 peptide that binds to EGFR including let-7a were prepared (let-7a/GE11 exosomes). let-7a/GE11 exosomes were intravenously injected into Rag2<sup>-/-</sup> mice transplanted breast cancer cells (HCC-70). After four injections, let-7a/GE11 exosomes markedly suppressed tumor growth. These results suggest that exosomes may provide an effective miRNA delivery system for cancer therapy.

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：乳がん miRNA エクソソーム

## 1. 研究開始当初の背景

わが国における乳がんの罹患率は年々増加しており、罹患年齢は低下している。乳がんの治療法の一つであるホルモン療法はホルモン受容体を持たないがんには効果がない。さらに、化学療法では、がん幹細胞は死滅せず残存するという報告があり(Fengyan Yu *et al*, Cell 2007)再発の危険性がある。乳がん幹細胞を効率よく死滅させれば、再発や転移を予防できると考えられる。microRNA(miRNA)は血中にも存在し、我々はがん患者においてその発現が変動することを明らかにした(Tanaka M, Kuroda M *et al*, PLoS One 2009)。さらに、我々は siRNA のデリバリーによって関節炎が効果的に治療できることを報告しており(Takanashi M *et al*, Gene Therapy 2009)、small RNA が疾患の治療に有用であること示した。血中の miRNA はエキソソームに含まれているため安定であることから、がん幹細胞増殖抑制効果をもつ miRNA をエキソソームに運ばせることによってがんの治療ができると考えた。一方、エキソソームの細胞内への侵入にはエキソソーム表面分子を介した標的細胞への結合が重要な役割をしていることが明らかとなっている(Bruno S *et al*, J Am Soc Nephrol 2009)。我々は乳がん幹細胞膜上のレセプターに結合する分子をエキソソーム膜上に発現させることによって、エキソソームが効率よくがん幹細胞へ結合し、miRNA が侵入して増殖抑制効果を発揮すると考えた。

## 2. 研究の目的

miRNA はがんの発生や抑制に関与しており、血中ではエキソソームによって運ばれている。また、がん幹細胞は現在の治療法では残存し再発や転移を起こす可能性がある。我々はがん幹細胞の増殖を抑制する miRNA をエキソソーム中に取り込ませ、血中に投与することによってがんの治療ができると考えた。さらにがん幹細胞に結合する分子をエキソソーム膜上に発現させることにより、miRNA ががん幹細胞内へ高率に侵入可能となると考えた。本研究ではエキソソームによる miRNA の新しいデリバリー法を確立し、がん幹細胞を標的とした治療への応用を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) *in vitro* における検討

乳がん幹細胞を死滅あるいは分化させるような miRNA を効率よく乳がん幹細胞にデリバリーするためのエキソソームを作製した。本研究では乳がん細胞膜に存在する EGFR に対するリガンド(EGF 全長、または EGFR 結合ペプチド:GE11)をエキソソーム膜上に発現させることによって、エキソソームのがん幹細胞への結合効率を高めることを目指し、以下の実験を行った。

EGF または GE11 発現細胞の作製と培養上清から精製したエキソソームの膜上への発現確認

まず、我々はトランスメンブランダメインを持つ発現ベクター (pDisplay) に EGF 全長または EGFR 結合ペプチド (GE11:YHWYGYTPQNVII) の遺伝子配列を組み込んだ。GE11 は EGFR に結合するが下流のシグナルの活性化は誘導しないことが明らかとなっている(Zonghai Li *et al*, FASEB J.2005)。作製した発現ベクターを HEK293 細胞へトランスフェクションし、恒常発現株を作製した後、これらの細胞株の培養上清から超遠心法にてエキソソームを回収し FACS 解析によってエキソソーム膜上に EGF または GE11 が発現していることを確認した。

EGF または GE11 発現エキソソームによるがん細胞への miRNA の取込み効率の検討  
作製した EGF または GE11 発現エキソソームの乳がん細胞への導入効率を検討した。まず、EGFR の発現が高い乳がん細胞株を選択するため、3 種類の細胞株の EGFR の発現を FACS 解析によって比較した。次に、で作製した EGF/HEK293 または GE11/HEK293 由来のエキソソームを PKH67 でラベルし、各種乳がん細胞への取込みを検討した。EGFR の発現量の違いによって取込み量が変化するかどうかを検討した。さらに、乳がん幹細胞の分化を促進する miRNA として報告されている let-7 を GE11/HEK293 細胞へトランスフェクションした後、培養上清よりエキソソームを超遠心法にて精製した。(let-7a/GE11 エキソソーム)。これを EGFR 高発現乳がん細胞株である HCC-70 に加えて let-7 の導入効率を検討した。

### (2) *in vivo* における検討

ルシフェラーゼ遺伝子を導入した HCC-70 細胞( $2 \times 10^6$  cells/mouse)を RAG2<sup>-/-</sup>マウスに移植し、4 週間後より作製した miRNA/GE11 エキソソームを 1  $\mu$ g/マウスで 4 回(1 回/週、4 週間)尾静脈より投与した。エキソソーム接種前と後の腫瘍の大きさを IVIS による *in vivo* イメージングによって計測し、がん細胞の増殖抑制効果を検証した。

## 4. 研究成果

### (1) *in vitro* における検討

EGF または GE11 発現細胞の作製と培養上清から精製したエキソソームへの発現確認

図 1 a に示すように、発現ベクター pDisplay に EGF または GE11 をコードする配列を組み込んだ。これらの発現ベクターを用いて、EGF または GE11 を恒常的に発現する HEK293 細胞株 (EGF/HEK293 または GE11/HEK293) を樹立し、培養上清よりエキソソームを精製した。精製したエキソソームに導入したベクターの HA が発現していることをウエスタン・ブロット法にて確認した(図 1 b)。さらに FACS にて Myc の発現を確認した(図 1 c)。

以上より、樹立した EGF/HEK293 または GE11/HEK293 細胞由来のエキソソームの膜上に導入遺伝子が発現していること確認した。

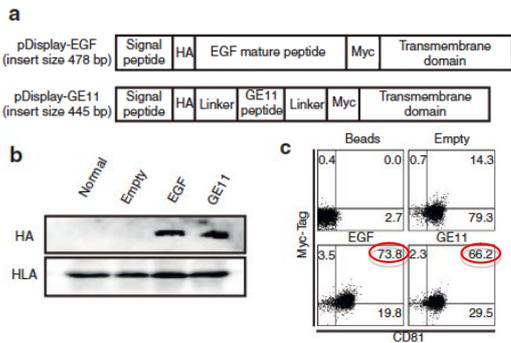


図 1 EGF または EGFR 結合ペプチド (GE11) 発現エキソソームの作成

EGF または GE11 発現エキソソームによるがん細胞への miRNA の取込み効率の検討  
乳がん細胞株の種類によって EGFR の発現量は異なる (図 2 a)。EGFR の発現量を比較したところ、HCC-70 が EGFR の発現が高い細胞株であることが明らかになった。これらの細胞株の培養液中に PKH67 でラベルした EGF 及び GE11 エキソソームを加えて培養すると、EGFR の発現量の低い MCF-7 よりも HCC-70 の方が EGF エキソソーム、GE11 エキソソームともに取込み量が高いことが確認できた (図 2 b, c)。以上より、作製した EGF 及び GE11 エキソソームは乳がん細胞の EGFR に結合し、効果的に乳がん細胞内へ取り込まれることが明らかとなった。

さらに、EGFR を高発現させた MCF-7 においてもエキソソームの取込み量を検討した結果、コントロール MCF-7 に比べて EGFR 高発現 MCF-7 において EGF エキソソーム、GE11 エキソソームともに取込み量が増加することが明らかとなった。EGF エキソソームと GE11 エキソソームでは取込み量に差がないため、GE11 エキソソームを用いて乳がん細胞の増殖抑制効果について検討することとした (データは論文に示す)。

let-7a を GE11/HEK293 細胞へトランスフェクションし、培養上清よりエキソソームを精製した。エキソソーム中に let-7a が含まれていることを qPCR 法 (TagMan miRNA assays, Applied Biosystems) にて確認し (図 3 a)、これらを動物実験に使用することとした。

### (2) *in vivo* における検討

ルシフェラーゼ導入 HCC-70 細胞を RAG2<sup>-/-</sup> に移植し、IVIS によって腫瘍の大きさを計測した。1 µg/マウス let-7a/GE11 エキソソームを尾静脈より 4 回接種した後、腫瘍の大きさを計測した。その結果、let-7a を導入した GE11/HEK293 由来のエキソソーム接種群でコントロール群に比較して腫瘍の増殖を抑制し

た (図 3 b, c)。これらの結果から GE11 を高発現したエキソソームに let-7a を内包することにより、尾静脈接種でも EGFR を発現する乳がん細胞に効率よく let-7a が導入され、乳がんの増殖を抑制することが明らかになった。

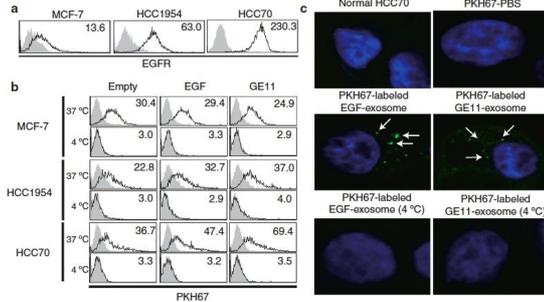


図 2 EGF または GE11 エキソソームの乳がん細胞への取込み

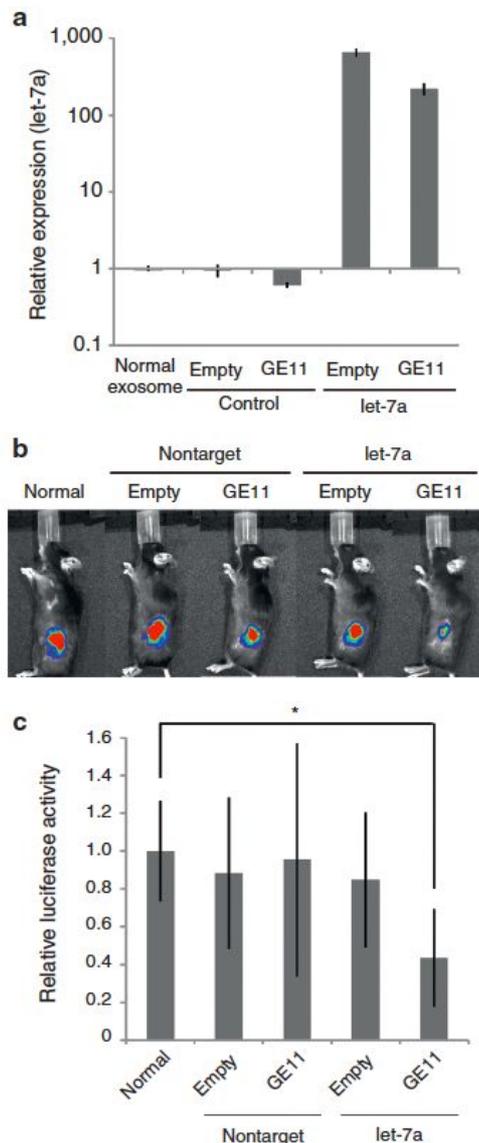


図 3 let-7a/GE11 エキソソームによる乳がん細胞増殖抑制効果

以上より、1) miRNA を内包したエクソソームの膜上にがん特異的に結合する蛋白質を発現させることによって、全身投与でも局所(がん)に効率よく miRNA を到達させ、機能させることができることが明らかとなった。2) がん幹細胞の維持、分化、増殖などに関わる miRNA によってがん細胞の増殖を抑制することが可能である、という結果を得ることができた。

ヒトへの治療に応用するには、エクソソームに対する拒絶反応がおこる可能性があるため課題は残されているが、iPS 細胞由来や自己細胞由来のエクソソームを用いることで解決できる可能性があると考えている。また、がん幹細胞が化学療法や放射線療法によって残存し再発する可能性があることや、副作用などの従来の治療法における問題点を克服する画期的ながんの治療法となり得ることが示唆された。

以上の研究成果は Molecular Therapy. 21 (1):185-191. 2013. に発表した。

#### 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 22 件)

Yamawaki K, Ueda S, Okada T, Oshima T, Kakitani M, Kato T, Tomizuka K. Adult-specific systemic over-expression reveals novel in vivo effects of the soluble forms of ActRIIA, ActRIIB and BMPRII. PLoS One. 8(10): e78076. 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0078076. 査読有り

Nagasawa K, Tanizaki Y, Okui T, Watarai A, Ueda S, Kato T. Significant modulation of the hepatic proteome induced by exposure to low temperature in *Xenopus laevis*. Biology Open. 2(10): 1057-69. 2013. DOI:10.1242/bio.20136106. 査読有り

Nishi H, Kuroda M, Isaka K. Estrogen and estrogen receptor induce matrix metalloproteinase-26 expression in endometrial carcinoma cells. Oncol Rep. 30(2):751-6. 2013. DOI:10.3892/or.2013.2527. 査読有り

Nakaya M, Tajima M, Kosako H, Nakaya T, Hashimoto A, Watari K, Nishihara H, Ohba M, Komiya S, Tani N, Nishida M, Taniguchi H, Sato Y, Matsumoto M, Tsuda M, Kuroda M, Inoue K, and Kurose H. GKR6-deficiency in mice causes autoimmune disease due to impaired apoptotic cell clearance. Nature Communications. 4:1532. 2013. DOI: 10.1038/ncomms2540. 査読有り

Murakami Y, Tamori A, Itami S, Tanahashi T, Toyoda H, Tanaka M, Wu W,

Brojigin N, Kaneoka Y, Maeda A, Kumada T, Kawada N, Kubo S and Kuroda M. The expression level of miR-18b in hepatocellular carcinoma is associated with the grade of malignancy and prognosis. BMC Cancer.(Section: Genetics, genomics and epigenetics) 13:99.2013. DOI: 10.1186/1471-2407-13-99. 査読有り

Ohno S, Takanashi M, Sudo K, Ueda S, Ishikawa A, Matsuyama N, Fujita K, Mizutani T, Ohgi T, Ochiya T, Gotoh N, Kuroda M. Systemically Injected Exosomes Targeted to EGFR Deliver Antitumor MicroRNA to Breast Cancer Cells. Molecular Therapy. 21 (1):185-191. 2013. DOI: 10.1038/mt.2012.180. 査読有り

Katsuda T, Tsuchiya R, Kosaka N, Yoshioka Y, Takagaki K, Oki K, Takeshita F, Sakai Y, Kuroda M, Ochiya T. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete functional neprilysin-bound exosomes. SCIENTIFIC REPORTS.3:1197.2013. DOI: 10.1038/srep01197 査読有り

Minegishi Y, Shibagaki Y, Mizutani A, Fujita K, Tezuka T, Kinoshita M, Kuroda M, Hattori S, Gotoh N. An adaptor protein complex of FRS2beta and CIN85/CD2AP provides a novel mechanism for ErbB2/HER2 protein downregulation. CancerScience. 104(3):345-52. 2013. DOI: 10.1111/cas.12086. 査読有り

Umezumi T, Ohyashiki K, Kuroda M, Ohyashiki JH. Leukemia cell to endothelial cell communication via exosomal miRNAs. Oncogene. 32(22):2747-55. 2012. DOI:10.1038/onc.2012.295 査読有り

Borjigin N, Ohno S, Wu W, Tanaka M, Suzuki R, Fujita K, Takanashi M, Oikawa K, Goto T, Motoi T, Kosaka T, Yamamoto K, Kuroda M. TLS-CHOP represses miR-486 expression, inducing upregulation of a metastasis regulator PAI-1 in human myxoid liposarcoma. Biochemical and Biophysical Research Communications. 427(2):355-60: 2012. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.09.063. 査読有り

Kobayashi S, Yamada-Okabe H, Suzuki M, Natori O, Kato A, Matsubara K, Chen YJ, Yamazaki M, Funahashi S, Yoshida K, Hashimoto E, Watanabe Y, Mutoh H, Ashihara M, Kato C, Watanabe T, Yoshikubo T, Tamaoki N, Ochiya T, Kuroda M, Levine AJ, and Yamazaki T. Drug-resistant colon cancer stem cells are Lgr5-negative and are capable of

tumor reconstitution progressing through a Lgr5-positive state. *Stem cell*. 30(12):2631-44.2012. DOI:10.1002/stem.1257. 査読有り

Ohno S, Ishikawa A, Kuroda M. Roles of exosomes and microvesicles in disease pathogenesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 65(3):398-401. 2013. DOI:10.1016/j.addr.2012.07.019. 査読無し

Hamasaki T, Suzuki H, Shirohzu H, Matsumoto T, D'Alessandro-Gabazza CN, Gil-Bernabe P, Boveda-Ruiz D, Naito M, Kobayashi T, Toda M, Mizutani T, Taguchi O, Morser J, Eguchi Y, Kuroda M, Ochiya T, Hayashi H, Gabazza EC, Ohgi T. Efficacy of a Novel Class of RNA Interference Therapeutic Agents. *PLoS One*. 7(8):e42655. 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0042655. 査読有り

Yamaguchi G, Takanashi M, Tanaka M, Fujita K, Ohira T, Kuroda M, Ikeda N. Isolation of miRNAs that target EGFR mRNA in human lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 420(2):411-6. 2012. DOI:10.1016/j.bbrc.2012.03.008. 査読有り

Xu M, Takanashi M, Oikawa K, Nishi H, Isaka K, Yoshimoto T, Ohyashiki J, Kuroda M. Identification of a novel role of Septin 10 in paclitaxel-resistance in cancers through a functional genomics screen. *Cancer Sci*. 103(4):821-7.2012. DOI:10.1111/j.1349-7006.2012.02221.x. 査読有り

Malon C, Brachtel E, Cosatto E, Graf HP, Kurata A, Kuroda M, Meyer JS, Saito A, Wu S, Yagi Y. Mitotic figure recognition: agreement among pathologists and computerized detector. *Anal Cell Pathol (Amst)*. 35(2):97-100.2012. DOI: 10.3233/ACP-2011-0029. 査読有り

Tsuchida A, Ohno S, Wu W, Borjigin N, Fujita K, Aoki T, Ueda S, Takanashi M, Kuroda M. miR-92 is a key oncogenic component of the miR-17-92 cluster in colon cancer. *Cancer Sci*. 102(12):2264-71.2011 DOI:10.1111/j.1349-7006.2011.02081.x 査読有り

Yamaguchi G, Takanashi M, Tanaka M, Fujita K, Ohira T, Kuroda M, Ikeda N. Isolation of miRNAs that target EGFR mRNA in human lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 420(2):411-6.2012. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.03.008. 査読有り

Xu M, Morishima N, Mizoguchi I, Chiba Y, Fujita K, Kuroda M, Iwakura Y, Cua DJ, Yasutomo K, Mizoguchi J, Yoshimoto T. Regulation of the development of acute hepatitis by IL-23 through IL-22 and IL-17 production. *Eur J Immunol*. 41(10):2828-39.2011.

DOI:10.1002/eji.201141291. 査読有り

Onomoto K, Morimoto S, Kawaguchi T, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Uno K, Kumada T, Matsuda F, Shimotohno K, Fujita T, Murakami Y. Dysregulation of IFN system can lead to poor response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C. *PLoS One*. 6(5):e19799. 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0019799. 査読有り

②① Ohyashiki K, Umezumi T, Yoshizawa S, Ito Y, Ohyashiki M, Kawashima H, Tanaka M, Kuroda M, Ohyashiki JH. Clinical impact of down-regulated plasma miR-92a levels in non-Hodgkin's lymphoma. *PLoS One*. 6(2):e16408. 2011 DOI: 10.1371/journal.pone.0016408. 査読有り

②② Murakami Y, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Harada Y, Matsuda F, Tajima A, Kosaka N, Ochiya T, Shimotohno K. The progression of liver fibrosis is related with overexpression of the miR-199 and 200 families. *PLoS One*. 6(1):e16081. 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0016081. 査読有り

〔学会発表〕(計 16 件)

黒田雅彦、村上善基、上田しのぶ、藤田浩司 microRNA の病理研究・治療への応用 第 102 回 日本病理学会総会 2013/6/6-2013/6/8 札幌

高梨正勝、須藤カツ子、松永芳径、石川章夫、大木忠明、濱崎智洋、後藤浩、黒田雅彦 新規核酸を用いた血管新生網膜症に対する分子標的治療法の開発 第 102 回 日本病理学会総会 2013/6/6-2013/6/8 札幌

山田正俊、大野慎一郎、藤田浩司、倉田厚、黒田雅彦 前立腺癌における microRNA-200c の発現解析 第 102 回 日本病理学会総会 2013/6/6-2013/6/8 札幌

黒田雅彦、高梨正勝、須藤カツ子 新規の lipid conjugate RNA を用いたがん治療法の開発 第 72 回 日本癌学会総会 2013/10/3-2013/10/5

Ohno S, Takanashi M, Ohgi T, Mizutani T, Murakami Y, Kuroda M. Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver anti-tumor microRNA to breast

cancer cells. Keystone Symposia Conference - Noncoding RNAs in Development and Cancer(A7) January 20-25,2013 Vancouver, British Columbia, CANADA

高梨 正勝、須藤 カツ子、大野 慎一郎、上田 しのぶ、石川 章夫、黒田 雅彦 . マウスに経口投与したエクソソームの生体内での安定性と分布 . 第 71 回日本癌学会学術総会 2012/9/19~21 札幌

黒田 雅彦 大腸癌発生における形態異常と miRNA . 第 71 回日本癌学会学術総会 2012/9/19~21 札幌

高梨 正勝、須藤 カツ子、松永 芳径、大木 忠明、濱崎 智洋、谷口 維紹、仲矢 丈雄、臼井 嘉彦、後藤 浩、黒田 雅彦 . 血管新生網膜症に対する分子標的治療法を目指した核酸薬の開発 . 第 32 回日本眼薬理学会 2012 年/9/15~16 滋賀

大野 慎一郎、上田 しのぶ、石川 章夫、松山 永久、藤田 浩司、高梨 正勝、黒田 雅彦 EGFR リガンド発現エクソソームを用いた新規ドラッグデリバリーシステムの開発 第 101 回日本病理学会総会 2012/4/26-28 東京

Ohno S, Takanashi M, Sudo K, Mizutani T, Ochiya T, Kuroda M .Delivery of miRNA to the EGFR-expressed tumor by systemic injection of target exosomes . International Society for the EGFR-extracellular Vesicles (ISEV) 2012/4/18 Gothenburg, Sweden  
Selective target delivery of miRNA using EGF expressing exosomes Ohno S, Takanashi M, Ueda S, Ohgi T, Mizutani T, Kuroda M . Keystone symposia Nucleic Acid Therapeutics: From Base Pairs to Bedsides (A2) 2012/1/10-15 Santa Fe, New Mexico

Delivery of antitumor molecules to the EGFR expressing cancer using EGF expressing exosomes 大野 慎一郎、上田 しのぶ、石川 章夫、藤田 浩司、高梨 正勝、黒田 雅彦 第 37 回分子生物学会年会 2011/12/1316 横浜

乳がん幹細胞の維持に關与する microRNA の探索 上田 しのぶ、高梨 正勝、黒田 雅彦 第 70 回日本癌学会学術総会 2011/10/03-05 名古屋

リガンド修飾エクソソームによる EGF receptor 発現細胞を標的としたドラッグデリバリーシステムの開発 大野 慎一郎、上田 しのぶ、石川 章夫、松山 永久、高梨 正勝、黒田 雅彦 第 70 回日本癌学会学術総会 2011/10/03-05 名古屋

CD63-GFP を発現したエクソソームのマウス生体内での安定性と分布について高

梨 正勝、須藤 カツ子、大野 慎一郎、上田 しのぶ、石川 章夫、黒田 雅彦 第 70 回日本癌学会学術総会 2011/10/03-05 名古屋

人工型 exosome の生体内分布と安定性についての研究 高梨 正勝、須藤 カツ子、大野 慎一郎、上田 しのぶ、石川 章夫、黒田 雅彦 第 100 回日本病理学会総会 2011/4/28-30 横浜

〔図書〕(計 3 件)

大野 慎一郎、高梨 正勝、黒田 雅彦 新たなドラッグデリバリーシステムとしてのエクソソーム . 細胞工学 秀潤社 vol.32 No.1 53-56, 2013

落谷孝広 / 監修、黒田 雅彦・尾崎充彦 / 編集 : 臨床・創薬利用が見えてきた microRNA . 遺伝子医学 MOOK23, メディカルドゥ、2012 年 9 月

仲矢丈雄・黒田 雅彦・大木忠明 : 次世代に向けた核酸医薬品の新技術 -RNA 干涉法を用いた分子標的核酸医薬の開発 . 化学 株式会社化学同人 第 67 巻第 9 号 25-29 , 2012

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tokyo-med.ac.jp/molpathol/index.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

上田 しのぶ (UEDA, Shinobu)  
東京医科大学・医学部・助手  
研究者番号 : 0 0 5 2 1 8 7 4

### (2)研究分担者

黒田 雅彦 (KURODA, Masahiko)  
東京医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 8 0 2 5 1 3 0 4

高梨 正勝 (TAKANASHI, Masakatsu)  
東京医科大学・医学部・講師  
研究者番号 : 8 0 3 1 2 0 0 7

大野 慎一郎 (OHNO, Shinichiro)  
東京医科大学・医学部・助教  
研究者番号 : 9 0 5 1 3 6 8 0

### (3)連携研究者

土田 明彦 (TSUCHIDA, Akihiko)  
東京医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 5 0 2 0 7 3 9 6