

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293333

研究課題名(和文) 蛍光イメージングを用いた悪性骨軟部腫瘍の転移機序の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Fluorescence imaging for investigation and treatment of bone and soft tissue tumors

研究代表者

土屋 弘行 (Tsuchiya, Hiroyuki)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：40227434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌細胞とヌードマウスを用いて骨転移初期変化の蛍光イメージングを行い、シングルセルレベルでの転移巣初期の変化として、腫瘍が骨に到達して転移巣を形成する過程を継時的に可視化することに成功した。

骨軟部肉腫における新規治療法として、蛍光ガイド下腫瘍切除術、腫瘍特異的バクテリア(A1-R)治療、GSK-3阻害薬の有用性について検討した。蛍光ガイド下手術は前立腺癌の骨転移モデルにおいて腫瘍再発を有意に抑制した。A1-Rは軟部肉腫モデルと骨転移モデルのいずれにおいても腫瘍抑制効果を示した。GSK-3阻害薬は骨肉腫モデルにおいて有意な腫瘍抑制効果を示した。

研究成果の概要(英文)：We demonstrate in vivo fluorescence imaging of bone-marrow micrometastasis of prostate cancer at the cellular level in nude mice using PC-3 human prostate cancer cells labeled with green fluorescent protein (GFP). PC-3-GFP cells were visualized by real-time fluorescence imaging, to traffic and grow in the bone marrow. Formation of bone marrow micrometastasis could be imaged at the single-cell level in live mice, using confocal microscopy. We investigated the efficacies of fluorescence-guided surgery (FGS), genetically-modified auxotrophic strain of *Salmonella typhimurium* (A1-R), and glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibitors. FGS significantly reduced residual tumor as well as the recurrence of experimental prostate-cancer bone metastasis. A1-R significantly inhibited tumor growth and metastasis in soft tissue tumor model and bone metastasis model. Treatment with GSK-3 inhibitors attenuated the growth of orthotopic osteosarcoma in mice.

研究分野：整形外科学

キーワード：骨軟部腫瘍 転移 新規治療 転移メカニズム

## 1. 研究開始当初の背景

蛍光蛋白を用いたイメージング技術は医学の研究に大きな変化をもたらした。組織を固定、染色して観察するという手法は広く行われているが、この手法で観察するのは生きた細胞や組織ではないため、観察した細胞や組織がその後どのように変化するかを知ることが不可能である。一方、蛍光蛋白で標識した細胞や組織は蛍光イメージングにより明確に識別できるため、生体内で起こる変化を継続的に観察することが可能である。さらに、腫瘍細胞とホストを異なる色の蛍光蛋白で標識することにより腫瘍細胞と微小環境を明確に観察することができ、癌細胞の浸潤、転移の過程やホスト側の変化を生体内で観察することが可能である。近年では特定の分子を蛍光蛋白で標識することにより、DNA 修復反応や細胞周期のイメージングが可能となった (Miwa et al. *Anticancer Res* 33:1373-7; Miwa et al. *J Cell Biochem* 114: 2454-60)。

これまでにカリフォルニア大学サンディエゴ校外科学教室およびアンチキャンサー社との共同実験において、腫瘍細胞に蛍光蛋白を発現させることにより癌細胞の生体内イメージングを利用した研究を行ってきた (Yamamoto N et al. *Cancer Res* 63:7785-90,2003; Yamamoto N, et al. *Cancer Res* 64:4251-6,2004; Hayashi K, et al. *Cancer Res* 67:8223-8,2007)。

カリフォルニア大学サンディエゴ校は、蛍光標識 CA19-9 抗体を使用することで、マウス内の膵癌を可視化することに成功している (McElroy M, et al. *World J Surg* 32: 1057-66, 2008)。悪性骨軟部腫瘍の術後再発は重要な予後因子であるが、5~10%の症例で遺残腫瘍があると報告されている。微小な腫瘍組織と正常組織を肉眼で区別することは困難であり、腫瘍の遺残を防ぐために現在では広範切除術が標準的手術として行われている。切除範囲は術後の機能に大きく影響するため、可能であれば切除範囲の縮小が望ましいが、切除範囲の縮小には再発のリスクを伴う。一方、我々は化学療法の効果が良好な症例に限り切除範囲を縮小する「意図的辺縁切除」を行い、広範切除と同等の生存率と、良好な機能成績を得ている (Tsuchiya H et al. *Clin Orthop Relat Res* 358: 27-35, 1999)。蛍光により術中に正常組織と腫瘍組織の区別が容易になれば、安全に切除範囲を縮小させることができ、患者の生命予後、機能予後を改善できると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまでに確立してきた技術を応用して骨転移の継続的観察を行い、悪性骨軟部腫瘍における腫瘍細胞の増殖、進展、転移巣形成の機序を調査することにより治療標的を探索した。また、腫瘍特異的のバクテリア治療や蛍光ガイド下腫瘍切除術など新規治療法の有効性について評価を行った。

## 3. 研究の方法

リアルタイムイメージングによる骨転移メカニズムの可視化

骨転移モデルの作製にはあらかじめ蛍光蛋白で標識した乳癌細胞株 MDA-MB-435, 前立腺癌細胞株 PC-3 を用いた。これらの細胞をヌードマウスの心腔内に注射し、4~6週間後に骨転移病変から腫瘍細胞を回収、培養した。2週間後に腫瘍細胞を再び心腔内注射するというサイクルを繰り返すことにより高骨転移株を得た (*in vivo selection*)。これらの細胞をヌードマウスに心腔内注射し、蛍光イメージング装置を用いて頭蓋骨を継続的に観察した。

腫瘍特異的のバクテリア (A1-R) の有用性の検討

癌はその種類にかかわらず腫瘍内が正常組織に比べて嫌気的環境であることが報告されている。Hoffman らは腫瘍内が嫌気的環境であることに注目し、嫌気性菌である *Salmonella typhimurium* が抗腫瘍効果をもつことを報告している (Zhao M, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:755-60,2005; Zhao M, 2005; Zhao M, *Cancer Res* 66: 7647-52, 2006; Zhao M, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 10170-4, 2007)。本研究では、腫瘍組織に特異的に集積する GFP 発現遺伝子組み換え *Salmonella typhimurium* (A1-R) の、軟部肉腫、転移性骨腫瘍に対する有用性を検討した。軟部肉腫モデルには線維肉腫細胞株 HT1080 を用い、転移性骨腫瘍モデルには前立腺がん細胞株 PC-3, 乳癌細胞株 MDA435 を用いた。これらの細胞は投与前に RFP または GFP で標識する。A1-R 投与後の抗腫瘍効果の評価法として、蛍光領域の変化、蛍光の強度の変化を観察した。また、A1-R の安全性について評価するために A1-R 投与後に体重について評価した。

蛍光ガイド下手術

蛍光蛋白で標識した前立腺癌細胞、乳癌細胞をヌードマウスの脛骨に移植し、蛍光イメージング装置を用いて蛍光ガイド下切除術を行った。蛍光ガイド下腫瘍切除術の有効性評価として、腫瘍の切除率、無病生存率、腫瘍のサイズ、肺転移巣、無再発生存率を比較した。

また、生体内の腫瘍を可視化する方法として、腫瘍特異的な抗体が必要であり、抗 CEA 蛍光抗体を用いて蛍光ガイド下腫瘍切除術を行った。GFP で標識したヒト前立腺癌細胞株 PC-3 をマトリゲルとともにヌードマウスの脛骨近位に注射し、1週間後に蛍光イメージング装置 OV100 (Olympus 社) を用いて細胞の生着、腫瘍の形成を確認した。DyLight 650 (Thermo Fisher Scientific 社) で標識した抗 CEA モノクローナル抗体をヌードマウスの尾静脈に注射し、その1日後に Maestro 蛍

光イメージングシステム (Perkin-Elmer 社) を用いて腫瘍組織を確認した。骨転移モデルマウスを2群に分類し, BLS 群 (bright-light surgery 群) は明視野で腫瘍を切除し, FGS 群 (fluorescent-light surgery 群) は明視野と蛍光イメージングで腫瘍を確認しながら切除した。蛍光イメージングでは, 635 nm と 675 nm のフィルターを用い, 670-900 nm の蛍光を観察した。術後の遺残腫瘍は蛍光イメージング装置 (OV100) を用いて評価し, 腫瘍の再発は Illumatool Imaging System (Lighttools Research 社) を用いて観察した。有効性の評価として, 術後の腫瘍の切除率, 無病生存率, 腫瘍のサイズ, 二次転移, 無再発生存率を比較した。

#### 骨肉腫に対する GSK-3 $\beta$ 阻害薬

ヒト骨肉腫細胞株 HOS, MG63, 143-B, Saos-2, ヒト骨芽細胞株 hFOB 1.19 における活性化型 GSK-3 $\beta$  の発現を Western blotting で評価した。ヒト骨肉腫細胞株, ヒト骨芽細胞株 hFOB 1.19 を GSK-3 $\beta$  阻害薬 (AR-A014418, SB-216763) で処理し, WST-8 assay, BrdU ELISA, TUNEL imaging assay で評価した。次に siRNA により骨肉腫細胞における GSK-3 $\beta$  を特異的に阻害し, 細胞増殖とアポトーシス誘導を WST-8 assay, TUNEL imaging assay により評価した。また, GSK-3 $\beta$  阻害薬による骨代謝への影響を評価するため, GSK-3 $\beta$  阻害薬投与後の  $\beta$ -catenin 発現を Western blotting analysis, TOP/FOP flash, Immunofluorescent staining により評価した。

ヌードマウスの脛骨にヒト骨肉腫細胞株 143-B 細胞を移植することにより骨肉腫モデルを作成した。GSK-3 $\beta$  阻害薬 (AR-A014418, SB-216763) 2mg/kg の腹腔内注射を週3回, 5週間行い, コントロール群のマウスには DMSO を腹腔内注射した。腫瘍体積は  $0.5 \times (\text{短径})^2 \times (\text{長径})$  で算出し, 継時的な体積の変化を評価した。また, 8週の時点でマウスを屠殺して腫瘍を切除し, 重量を測定し, 切除した腫瘍組織については病理学的に評価した。

## 4. 研究成果

### 蛍光イメージングによるがん骨転移初期の観察

RFP 導入ヌードマウスに GFP で標識した腫瘍細胞を心腔内注射し, FluoView FV1000 confocal laser microscope (Olympus Corp., Tokyo, Japan) を用いて頭蓋骨表面を観察したところ, RFP を発現する骨組織と, 骨に到達した GFP を発現する腫瘍細胞を観察できた (Miwa, et al. J Cell Biochem 117:2533-7, 2016)。心腔内注射の 10~20 分後には GFP 発現がん細胞と RFP を発現する正常組織を明確に区別して可視化できた。心腔内注射の 3 日後にはごくわずかな細胞が生存し, 7 日後, 10 日後にはそのわずかな細胞が増殖して腫瘍を形成することが確認できた。

### 腫瘍特異的バクテリア (A1-R) の有用性の検討

骨転移モデルにおいて腫瘍特異的バクテリア A1-R はアガール培地での培養で腫瘍特異的な集積を認め, in vitro での蛍光イメージングでも腫瘍細胞への集積を認めた (Miwa, et al. Oncotarget 5:7119-25, 2014)。また, 骨転移の発生, 骨転移の進展のいずれにおいても有意な抑制を認めた。

軟部肉腫モデルでは, A1-R は腫瘍に特異的に集積し, 細胞死を誘導した。軟部肉腫の成長, 肺転移を有意に抑制した (Miwa et al. Oncotarget 5:12849-61, 2014)。いずれのモデルにおいても明らかな毒性を認めなかった。

### 蛍光ガイド下手術

BLS 群と FGS 群の術前の腫瘍の蛍光面積はそれぞれ  $24.0 \pm 2.3 \text{ mm}^2$ ,  $24.1 \pm 2.3 \text{ mm}^2$  であった ( $P = 0.490$ ) (Miwa, et al. J Orthop Res 34:559-65, 2016)。腫瘍切除後の GFP の蛍光領域は, BLS 群  $3.0 \pm 0.7 \text{ mm}^2$ , FGS 群  $0.2 \pm 0.1 \text{ mm}^2$  であった ( $P < 0.001$ )。術後 5 週での蛍光面積は, BLS 群  $200.6 \pm 43.9 \text{ mm}^2$ ,  $31.1 \pm 13.2 \text{ mm}^2$  であった ( $P < 0.001$ )。無再発生存期間を比較したところ, 術後 12 週での無再発生存率は BLS 群で 0%, FGS 群で 36.9% であり, FGS は有意に再発を抑制した ( $P < 0.001$ )。

### 骨肉腫に対する GSK-3 $\beta$ 阻害薬

骨肉腫細胞と骨芽細胞における GSK-3 $\beta$  の発現を比較したところ, 骨肉腫細胞では活性化型である pGSK3 $\beta$ Tyr216 の高い発現を示した。一方, 骨芽細胞では不活性化型である pGSK3 $\beta$ Ser9 の高い発現を示した (Shimozaki, et al. Oncotarget 7:77038-51, 2016)。

骨肉腫細胞を GSK-3 $\beta$  阻害薬 (AR-A014418, SB-216763) で刺激したところ, GSK-3 $\beta$  阻害薬は用量依存的, 時間依存的に腫瘍細胞の viability を低下させた。一方, 骨芽細胞 hFOB1.19 への影響はわずかであった。96 時間の時点での AR-A014418 の IC<sub>50</sub> は HOS 細胞で  $12.4 \mu\text{mol/L}$ , 143-B 細胞で  $11.7 \mu\text{mol/L}$ , MG-63 細胞で  $16.0 \mu\text{mol/L}$ , SaOS2 細胞で  $14.6 \mu\text{mol/L}$  であった。また, SB-216763 の IC<sub>50</sub> は HOS 細胞で  $10.5 \mu\text{mol/L}$ , 143-B 細胞で  $17.1 \mu\text{mol/L}$ , MG-63 細胞で  $14.3 \mu\text{mol/L}$ , SaOS2 細胞で  $21.9 \mu\text{mol/L}$  であった。骨肉腫細胞において, GSK-3 $\beta$  阻害薬は BrdU 陽性の増殖細胞を有意に減少させた。また, 骨肉腫細胞において GSK-3 $\beta$  阻害薬は TUNEL 陽性の細胞を有意に増加させたが, 骨芽細胞では有意な増加を認めなかった。RNA 干渉により GSK-3 $\beta$  発現を低下させたところ, 骨肉腫細胞における細胞増殖は低下し, アポトーシスは増加したが, 骨芽細胞における有意な変化は認めなかった。また, Wnt/ $\beta$ -catenin 経路への GSK-3 $\beta$  阻害薬の作用を見るために骨肉腫細胞における  $\beta$  カテニンの発現を評価し, GSK-3 $\beta$  阻害薬処理後の  $\beta$  カテニンの変化を

観察したところ、骨肉腫細胞においてβカテニンのリン酸化を認め、GSK-3β阻害薬はGSK-3βのリン酸化を抑制した。

143-B細胞を同所性に移植したマウスにおいて、GSK-3β阻害薬（AR-A014418、SB-216763）の副作用、腫瘍抑制効果を評価した。腫瘍体積の評価において、GSK-3β阻害薬は治療開始から2週以降で有意な腫瘍増殖抑制を示し、切除した腫瘍重量においても有意な抑制効果を認めた。また、マウスの体重評価では、GSK-3β阻害薬（AR-A014418、SB-216763）による明らかな副作用は見られなかった。また、各群のマウスにおいて肺転移は見られなかった。

これらの結果から、GSK-3の発現と活性は骨肉腫細胞における細胞の増殖に関与しており、骨肉腫の治療標的となる可能性が示唆された。

## 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148件）

1. Tome Y, Kimura H, Kiyuna T, Sugimoto N, Tsuchiya H, Kanaya F, Bouvet M, Hoffman RM. Disintegrin targeting of an αvβ3 integrin-over-expressing high-metastatic human osteosarcoma with Echinostatin inhibits cell proliferation, migration, invasion and adhesion in vitro. **Oncotarget** 査読有 (in press)
2. Takeuchi A, Tsuchiya H, Ishii T, Nishida Y, Abe S, Matsumine A, Kawai A, Yoshimura K, Ueda T. Clinical outcome of recurrent giant cell tumor of the extremity in the era before molecular target therapy: the Japanese Musculoskeletal Oncology Group study. **BMC Musculoskelet Disord** 査読有 17: 306, 2016.
3. Kato S, Murakami H, Demura S, Fujimaki Y, Yoshioka K, Yokogawa N, Tsuchiya H. The impact of complete surgical resection of spinal metastases on the survival of patients with thyroid cancer. **Cancer Med** 査読有 5: 2343-9, 2016.
4. Takeuchi A, Yamamoto N, Shirai T, Hayashi K, Miwa S, Munesue S, Yamamoto Y, Tsuchiya H. Clinical relevance of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression in myxoid liposarcoma. **BMC Cancer** 査読有 16: 442, 2016.
5. Shirai T, Tsuchiya H, Terauchi R, Tsuchida S, Mizoshiri N, Igarashi K, Miwa S, Takeuchi A, Kimura H, Hayashi K, Yamamoto N, Kubo T. The outcomes of reconstruction using frozen autograft combined with iodine-coated implants for malignant bone tumors: compared with non-coated implants. **Jpn J Clin Oncol** 査読有 46: 735-40, 2016.
6. Takeuchi A, Yamamoto N, Hayashi K, Miwa S, Takahira M, Fukui K, Oikawa T, Tsuchiya H. Tenosynovial giant cell tumors in unusual locations detected by positron emission tomography imaging confused with malignant tumors: report of two cases. **BMC Musculoskelet Disord** 査読有 17: 180, 2016.
7. Miwa S, Toneri M, Igarashi K, Yano S, Kimura H, Hayashi K, Yamamoto N, Tsuchiya H, Hoffman RM. Real-Time In Vivo Confocal Fluorescence Imaging of Prostate Cancer Bone-Marrow Micrometastasis Development at the Cellular Level in Nude Mice. **J Cell Biochem** 査読有 117: 2533-7, 2016.
8. Kato S, Murakami H, Demura S, Nambu K, Fujimaki Y, Yoshioka K, Kawahara N, Tomita K, Tsuchiya H. Spinal metastasectomy of renal cell carcinoma: A 16-year single center experience with a minimum 3-year follow-up. **J Surg Oncol** 査読有 113: 587-92, 2016.
9. Miwa S, Yano S, Kimura H, Yamamoto M, Toneri M, Matsumoto Y, Uehara F, Hiroshima Y, Murakami T, Hayashi K, Yamamoto N, Bouvet M, Fujiwara T, Tsuchiya H, Hoffman RM. Cell-cycle fate-monitoring distinguishes individual chemosensitive and chemoresistant cancer cells in drug-treated heterogeneous populations demonstrated by real-time FUCCI imaging. **Cell Cycle** 査読有 14: 621-9, 2015.
10. Miwa S, Yano S, Yamamoto M, Matsumoto Y, Uehara F, Toneri M, Murakami T, Kimura H, Hayashi K, Yamamoto N, Efimova EV, Tsuchiya H, Hoffman RM. Real-time fluorescence imaging of the DNA damage repair response during mitosis. **J Cell Biochem** 査読有 116: 661-6, 2015.
11. Hiroshima Y, Zhao M, Zhang Y, Zhang N, Maawy A, Murakami T, Mii S, Uehara F, Yamamoto M, Miwa S, Yano S, Momiyama M, Mori R, Matsuyama R, Chishima T, Tanaka K, Ichikawa Y, Bouvet M, Endo I, Hoffman RM. Tumor-Targeting Salmonella typhimurium A1-R Arrests a Chemo-Resistant Patient Soft-Tissue Sarcoma in Nude Mice. **PLoS One** 査読有 10: e0134324, 2015.
12. Yano S, Hiroshima Y, Maawy A, Kishimoto H, Suetsugu A, Miwa S, Toneri M, Yamamoto M, Katz MH, Fleming JB, Urata Y, Tazawa H, Kagawa S, Bouvet M, Fujiwara T, Hoffman RM. Color-coding cancer and stromal cells with genetic reporters in a patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) model of pancreatic

cancer enhances fluorescence-guided surgery. **Cancer Gene Ther** 査読有 22: 344-50, 2015.

13. Hiroshima Y, Zhang Y, Zhang N, Maawy A, Mii S, Yamamoto M, Uehara F, Miwa S, Yano S, Murakami T, Momiyama M, Chishima T, Tanaka K, Ichikawa Y, Bouvet M, Murata T, Endo I, Hoffman RM. Establishment of a patient-derived orthotopic Xenograft (PDOX) model of HER-2-positive cervical cancer expressing the clinical metastatic pattern. **PLoS One** 査読有 10: e0117417, 2015.
14. Miwa S, Zhang Y, Baek KE, Uehara F, Yano S, Yamamoto M, Hiroshima Y, Matsumoto Y, Kimura H, Hayashi K, Yamamoto N, Tsuchiya H, Bouvet M, Hoffman RM. Inhibition of spontaneous and experimental lung metastasis of soft-tissue sarcoma by tumor-targeting Salmonella typhimurium A1-R. **Oncotarget** 査読有 5: 12849-61, 2014.
15. Miwa S, Yano S, Zhang Y, Matsumoto Y, Uehara F, Yamamoto M, Hiroshima Y, Kimura H, Hayashi K, Yamamoto N, Bouvet M, Tsuchiya H, Hoffman RM, Zhao M. Tumor-targeting Salmonella typhimurium A1-R prevents experimental human breast cancer bone metastasis in nude mice. **Oncotarget** 査読有 5: 7119-25, 2014.
16. Miwa S, Hiroshima Y, Yano S, Zhang Y, Matsumoto Y, Uehara F, Yamamoto M, Kimura H, Hayashi K, Bouvet M, Tsuchiya H, Hoffman RM. Fluorescence-guided surgery improves outcome in an orthotopic osteosarcoma nude-mouse model. **J Orthop Res** 査読有 32: 1596-601, 2014.
17. Miwa S, Matsumoto Y, Hiroshima Y, Yano S, Uehara F, Yamamoto M, Zhang Y, Kimura H, Hayashi K, Yamamoto N, Bouvet M, Sugimoto N, Tsuchiya H, Hoffman RM. Fluorescence guided-surgery of prostate cancer bone metastasis. **J Surg Res** 査読有 192: 124-33, 2014.

〔学会発表〕(計 29 件)

1. 土屋 弘行 . Treatment guidelines for musculoskeletal sarcoma in Japan 第 54 回 日本癌治療学会 International Session (2016 年 10 月 20-22 日, 横浜市)
2. 土屋弘行 . 骨軟部腫瘍に対する患肢温存手術とリハビリテーション 第 53 回日本リハビリテーション医学会学術集会教育講演 (2016 年 6 月 10 日, 京都市)
3. 土屋弘行 . 骨欠損に対する生物学的再建術-未来に向けて- 第 89 回日本整形外科学会学術総会教育研修講演 (2016 年 5 月 12-15 日, 横浜市)

〔図書〕(計 1 件)

1. Matsubara H, Tsuchiya H; Management of juxtaphyseal malignant bone tumors around the knee joint: New concepts in limb-sparing surgery. In Pediatric Lower Limb Deformities-principles and techniques of management, Sabharwal S ed., Springer Cham Heidelberg, New York Dordrecht London, pp 349-358, 2016.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 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 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

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

土屋 弘行 (TSUCHIYA, Hiroyuki)  
金沢大学・医学系・教授  
研究者番号：40227434

(2)研究分担者

三輪 真嗣 (MIWA, Shinji)  
名古屋市立大学・附属病院・助教  
研究者番号：40753455

林 克洋 (HAYASHI, Katsuhiro)  
金沢大学・附属病院・助教  
研究者番号：80507054

山本 憲男 (YAMAMOTO, Norio)  
金沢大学・医薬保健学総合研究科・特任教授  
研究者番号：90332668