

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861409

研究課題名(和文) 去勢による骨塩量低下は去勢抵抗性前立腺癌の骨転移を促進するかどうかの解明

研究課題名(英文) Castration-induced acceleration of bone metastasis in a murine model of castration-resistant prostate cancer

研究代表者

井上 高光 (Takamitsu, Inoue)

秋田大学・医学部・講師

研究者番号：60375243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：アンドロゲン遮断療法(ADT)は破骨細胞のRANKシグナル亢進で骨密度を減少させる。また、Osteoprotegerin(OPG)によるRANKシグナル抑制は前立腺癌の骨関連事象発生を抑制する。しかしADTが去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)の骨転移発生を促進する可能性は、研究がなかった。マウス去勢により、破骨細胞数増加に伴い新たな骨転移の発症が促進され、OPG投与で抑制された。マウス去勢による骨転移促進は、RANKシグナル亢進によると考えられる。現在の癌診療における破骨細胞抑制療法は骨転移発症後に行われるが、ADT開始時からの破骨細胞抑制療法が骨転移発症予防に有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Androgen deprivation therapy (ADT) has several adverse effects, including a reduction in bone mineral density (BMD). Reportedly, ADT reduces BMD by stimulating receptor activator of nuclear factor kappa-B (RANK) signaling in osteoclasts. RANKL inhibitors have been shown to prevent bone metastases. However, the possibility of ADT-induced acceleration of bone metastasis in castration-resistant prostate cancer (CRPC) has not been examined. In this study, we show that ADT significantly accelerates the establishment of CRPC bone metastases, with a reduction in BMD in a murine model. These results suggest that ADT creates a suitable bone microenvironment for circulating CRPC cells to implant into the bone and establish new bone metastases at an accelerated rate. This study supports the idea that it is necessary to suppress osteoclasts from the time of ADT initiation in patients with high-risk non-metastatic prostate cancer to prevent the accelerated establishment of new bone metastases.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：前立腺癌 骨転移 破骨細胞 骨粗鬆症 ホルモン療法

## 1. 研究開始当初の背景

両側精巣摘除術(外科的去勢)あるいはLuteinizing Hormone Releasing Hormone (LH-RH) アゴニストあるいはアンタゴニスト投与(内科的去勢)によるアンドロゲン除去療法(ADT)は、初発前立腺癌の80%以上で有効であり(ホルモン感受性前立腺癌:HSPC)前立腺癌治療において重要な位置を占めている(1. Huggins et al. *Cancer Res* 1941;1:293-297)初発前立腺癌は平均約2年程度で去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)となり、血清アンドロゲン濃度低値にも関わらず再増殖を始める(2. Heidenreich A, *Eur Urol* 2008; 53: 68-80)一方、ADTには様々な有害事象が報告され、骨密度低下は代表的有害事象である(3. Traish et al. *J Androl.* 30, 10-22, 2009)ADTにより前立腺癌患者の約45%で新たに骨粗鬆症が発生すると報告されている(4. Morote et al. *Urology* 69, 500-504, 2007)

ADTはラットの破骨細胞や骨髄、血清におけるRANK ligand(RANKL)濃度を増加させ(5. Proell et al. *Bone* 45, 677-681, 2009)RANKシグナルを亢進させ破骨細胞を活性化させることにより、骨吸収を促進するとされる(6. Li et al. *Bone* 45, 669-676, 2009)また、Osteoprotegerin(OPG)による破骨細胞抑制は、前立腺癌の骨転移の発生や進展を抑制すると報告されている(7. Zhang et al. *J Clin Invest* 107, 1235-1244, 2001)従って破骨細胞活性化による骨密度の低下は、CRPCの骨転移の発生や進展を促進することが予想される。

近年OPGと同様に破骨細胞を抑制するzoledronic acid(ZOL)やdenosumabといった薬剤が、骨転移のある患者の骨関連事象の発生を抑制する目的で臨床的に使用されている(8, 9)最近、骨転移のないADT中のCRPC患者に対しdenosumabを使用し臨床的に骨転移の新規発生を抑制した報告がなされた(10. *Lancet* 2012, Smith *J Clin Oncol* 31:3800-3806)また転移のないADT中のHRPC患者に対するdenosumab少量投与で、3年での骨折発生を有意に抑制した報告もなされた(11. *N Engl J Med* 361, 745-755, 2009)しかしADTが破骨細胞を活性化し骨粗鬆症を増悪させることにより、CRPCの骨転移を促進しているか否かについては、臨床的にも基礎実験でもほとんど知られていない。

## 2. 研究の目的

本研究は、ヒトCRPC細胞株PC-3Mをマウス心臓に注入しマウスCRPC骨転移モデルを作成し、マウス去勢による破骨細胞の活性化がCRPCの骨転移発症に及ぼす影響を観察することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### <マウスの飼育>

すべての動物実験は秋田大学動物実験センターのInternal ethical committeeの承認を得て施行した。Japan SLC Incから購入したretired breeder(約24週齢以上)のオスBalb/c nu/nuマウスを1匹づつ飼育箱に入れ、通常食を与えて飼育した。マウスは研究の開始から安楽死まで、食餌と水に自由に到達出来るようにした。マウス安楽死は、イソフルレン麻酔下で心室から血液を採取した後、頸椎脱臼法で行った。マウス安楽死後、骨転移部の骨および下肢を液体窒素で凍結し-80度で保存しておいた。

### <CTによるマウス骨塩定量>

マウス飼育室内に設置した動物用マイクロCTを用い、マウス骨密度定量(日立アロカ社製Latheta LCT-200)およびマウス骨の可視化(リガク社製R.mCT2)をそれぞれ用いて行った。マウスにイソフルレンを用いた吸入全身麻酔を行い、動物用マイクロCT内で吸入麻酔を継続しつつ、CTを撮影した。脛骨上端から20スライス of 全骨密度および海綿骨密度を解析し比較した。

### <細胞株、細胞培養>

市販されているVectorを用いてluciferaseを導入し、In vivo imaging system (IVIS)により検出できるようにしたPC3M-luc-C6を購入した(Caliper Inc/Perkin Elmer)(*Clinical and Experimental metastasis* 20, 745-756, 2003)作成方法は、過去の報告に譲る(11. Jenkins DE)RPMI1640に10%Fetal Bovine Serum(FBS)をsupplementedして使用し培養した。37度5%CO<sub>2</sub>の環境下で培養し、80%コンフルエントになったら0.25%のTrypsin-EDTAを使用して継代培養した。

### <マウスの去勢術>

マウス去勢術は、マウスをイソフルレンを用いて全身麻酔し、マウスを固定して腹部正中切開で両側精巣を摘出した。筋膜および皮膚は7-0PDSで連続縫合した。

### <心室内注入>

ヒト去勢抵抗性前立腺癌株PC-3の好転移株PC-3Mの骨転移モデルを作成するため、マウス心室内腫瘍注入を行った。イソフルランによる全身麻酔下で、マウスを仰臥位に固定し、肋間から左心室に直接27Gツベルクリン針を用いて穿刺を行った。ツベルクリン針内部への心室血液の逆流による拍動を確認した後、 $3 \times 10^6$ の細胞を100 $\mu$ Lの生理食塩水に懸濁し、心室内注入した。マウスは注入後瞬間的に心不全となり、呼吸停止に陥るものもあるが、心臓マッサージおよび経過観察を行うと呼吸が安定した。直後にIVISシステムを用いて腫瘍細胞の左心室から動脈系への全身分布を蛍光シグナルにより確認した。右心室系や心臓外への注入の場合は両肺からの蛍光シグナルや傍心臓領域からの蛍光シグナルを確認できる

ため、このマウスは誤注入として本研究から除外した。

#### <尾静脈注入>

OPG 尾静脈注入は、マウスを蓋に 5mm 台の穴を開けた 50mL チューブに固定し、尾を引っ張って 2 mg/kg の recombinant mouse OPG/Fc chimera (R&D Systems Inc., Minneapolis, Minnesota, USA) を 200uL の PBS に溶解し週 2 回 3-4 日毎に尾静脈注射した。

#### <IVIS システムによる腫瘍の定量>

In vivo の bioluminescent imaging を、マウス飼育室内に設置した Xenogen 社の IVIS Imaging System (Xenogen) を用いて行った。計測前に substrate D-luciferin (Biosynth) at 150 mg/kg を PBS200uL に溶解し、撮影 10-15 分前に経腹膜的に投与しておいた。マウスにイソフルレンを用いた吸入全身麻酔を行い、IVIS システムの箱内に寝かせて 3 分間撮影し、蛍光強度を定量化した。(Maita S, Yuasa T, Tsuchiya N et al. Int J Cancer. 2012 Feb 1;130 (3):677-84)

#### <骨組織 TRAP、RANKL 染色>

上記 3, 4 のマウスから大腿骨組織を採取し、10%ホルマリンで固定した。組織は脱灰したあと薄切し、tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) および RANKL による染色を行った。脱パラフィンし、Protainase K による賦活化を行った。1%過酸化水素/メタノールに着け、スキムミルクで非特異反応のブロックを行った。1次抗体は TRAP goat polyclonal antibody (Santa Cruz: sc-30833) および、RANKL rabbit polyclonal antibody (abcam: ab9957) をそれぞれ希釈倍率 25 倍および 50 倍で使用し、4 で overnight 反応させた。2次抗体はヒストファイン シンプスステイン マウス MAX-PO (Goat および Rabbit) を使用し、ジアミノベンジジン (DAB) で発色、ヘマトキシリンで核染色を行なった。薄切は大腿骨の下端で膝関節の直上部で海綿骨が十分に含まれる部位を水平断し、皮質骨で囲まれた内部で TRAP 染色では破骨細胞数を、RANKL 染色では骨芽細胞数をそれぞれ比較した。

#### <血清濃度測定>

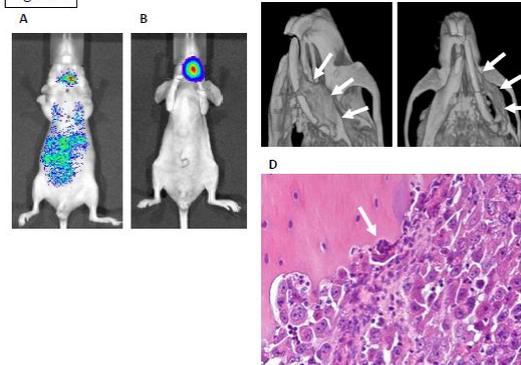
マウス安楽死時に採取した 1mL 程度のマウス血液を 10,000rpm で 5 分間で血清を遠心分離した後、-80 度で保存して置いた。ELISA は Mouse TRACP 5b Assay (TRACP 5b ELISA) (Immunodiagnostic Systems (IDS 社)、品番 DS-SBTR103) および RANKL ELISA (Mouse TRANCE/RANKL/TNFSF11 Quantikine ELISA Kit、R & D, MTR00) を使用した。

## 4. 研究成果

### 「ヒト CRPC 細胞株 PC-3M の Balb/c nude マウス左心室注入による骨転移モデルの作成」

6 週齢の Balb/c nude マウス心臓に PC-3M lucC6 を注入し、骨転移の出現を IVIS system で追跡した。予め luciferin 150 mg/kg を腹腔内注入し、直後に PC-3 の骨高転移株である PC-3M lucC6 を  $3 \times 10^6$  mL 左心室内投与し、全身の動脈に循環する PC-3M lucC6 を観察した (Figure 1A)。続いて 1 週ごとに IVIS で観察してゆくと、約 3 週で骨転移の出現を確認した (Figure 1B)。同部位を micro CT で確認すると、骨の融解像を認めた (Figure 1CD)。マウスを sacrifice し、同部位を HE 染色で観察すると、骨組織に隣接して核腫大を伴う腫瘍細胞の増殖を認めた (Figure 1EF)。以上の所見から、PC-3M lucC6 の左心室内注入により、Balb/c nude マウスには骨転移が発生することを証明できた。

Figure 1

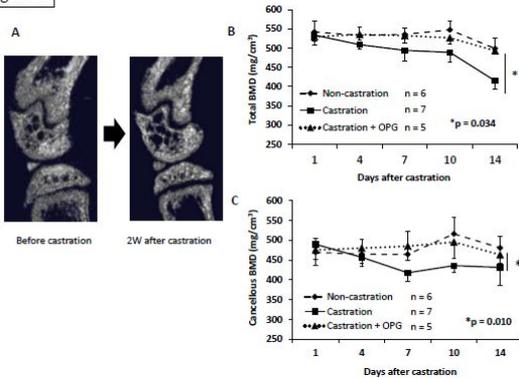


### 「マウス去勢により骨密度が低下し、その効果は OPG により減弱した」

6 週齢の Balb/c nude マウスを去勢したが、去勢前と 2 週間後のマイクロ CT を用いた比較で有意な骨密度変化を認めなかった (data not shown)。そこで Retired bleeder (約 24 週齢以上) の Balb/c nude マウスを非去勢群、去勢群および去勢 + OPG 群に分け、マイクロ CT (アロカ社製 Latheta LCT-200) を去勢手術前および以後経時的に撮影して骨密度の推移を測定した。去勢前の脛骨上端から 20 スライスまでの範囲の全骨密度平均値は  $534.3 \pm 26.8$  mg/cm<sup>3</sup> であった。2 週間後に非去勢群 498.6 mg/cm<sup>3</sup>、去勢群 414.8 mg/cm<sup>3</sup>、去勢 + OPG 群 492.9 mg/cm<sup>3</sup> であった。全経過を通じ、去勢群は非去勢群に対して有意に骨密度が低下した ( $p = 0.034$ , repeated measured ANOVA) (Figure 2A)。脛骨上端から 20 スライスまでの範囲の海綿骨密度平均値は、2 週間後に非去勢群 480.5 mg/cm<sup>3</sup>、去勢群 431.0 mg/cm<sup>3</sup>、去勢 + OPG 群 463.0 mg/cm<sup>3</sup> であった。全経過を通じ、去勢 + OPG 群は去勢群に対して有意に海綿骨密度が上昇した ( $p = 0.010$ , repeated measured ANOVA) (Figure 2B)。膝周囲の骨写真をマイクロ CT (リガク社製 R.mCT2) で撮影し、去勢前と去勢 2 週後の画像を比較した (Figure 2C)。マウス安楽死時にマウス左心室より採取した血液は遠心分離の後、血清を -80 度で保存し

ELISA で血清テストステロン値を測定した。平均血清テストステロン値は、非去勢群 1.25 ng/mL、去勢群および去勢+OPG 群は共に測定限界以下であった。

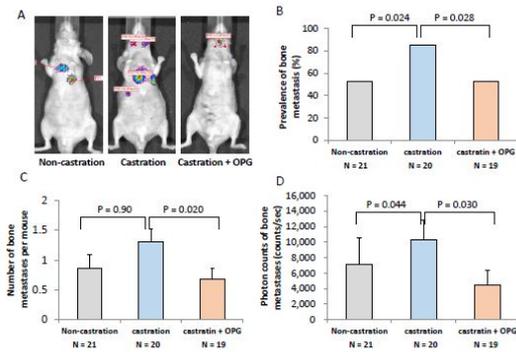
Figure 2



### 「マウス去勢により骨転移発症が増加し、その効果は OPG により減弱した」

Retired bleeder の Balb/c nude マウスを非去勢群、去勢群および去勢 + OPG 群に分け、day -2 に去勢群および去勢 + OPG 群に対しイソフルランでの麻酔下で去勢術を行い、day -1 に去勢 + OPG 群に対し OPG の尾静脈初回注射を行った後、day 0 にすべての群に対し PC-3M lucC6 を左心注入し、骨転移の発症個体数、1 個体あたりの骨転移個数および平均 photon counts を 3 群で IVIS system を用い毎週比較した。心注後 3 週間における IVIS による転移巣測定後、イソフルレン全身麻酔下にマウス頸椎脱臼で安楽死させ、マウスを解剖し IVIS で検出された転移巣の部位を肉眼的に確認した。非去勢群 21 匹中 5 匹、去勢群 20 匹中 4 匹、OPG 群 19 匹中 2 匹で、IVIS で検出された転移巣に肝転移が含まれていたため、転移巣の数から差し引いた数を骨転移数とした。PC3M-luc-C6 心室内投与 3 週間における骨転移発症率は、非去勢群 11/21 匹 (52.4%)、去勢群 17/20 匹 (85.0%)、去勢 + OPG 群 10/19 匹 (52.6%) となり、去勢群は非去勢群に対して有意に高く ( $p = 0.024$ , Fisher's exact test)、去勢 + OPG 群は去勢群に対して有意に低かった ( $p = 0.028$ , Fisher's exact test) (Figure 3B)。また心室内投与 3 週間における 1 個体あたりの平均骨転移数は、非去勢群  $0.85 \pm 0.24$  個、去勢群  $1.30 \pm 0.23$  個、去勢 + OPG 群  $0.68 \pm 0.17$  個となり、去勢 + OPG 群は去勢群に対して有意に骨転移数が抑制された ( $p = 0.020$ , Student's t test) (Figure 3C)。また心室内投与 3 週間における骨転移巣平均 Photon counts は、非去勢群  $7,103 \pm 3,448$ 、去勢群  $10,248 \pm 2,552$ 、去勢 + OPG 群  $4,426 \pm 1,873$  (counts/sec) となり、去勢群は非去勢群に対して有意に Photon counts が促進された ( $p = 0.023$ , Mann-Whitney's U test) (Figure 3D)。

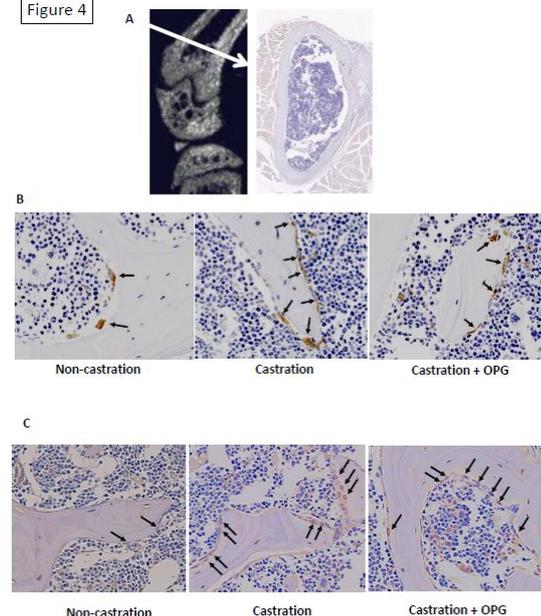
Figure 3

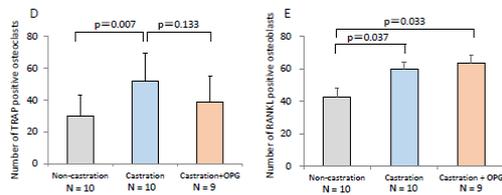


### 「マウス去勢により骨組織中の TRAP 陽性破骨細胞数および RANKL 陽性骨芽細胞が増加し、その効果は OPG により減弱した」

下端 3mm 付近を水平断で薄切して TRAP および RANKL による免疫染色を行い、それぞれ皮質骨で囲まれた部分の平均 TRAP 陽性破骨細胞数および平均 RANKL 陽性細胞数を各群で比較した (Figure 4A)。平均 TRAP 陽性破骨細胞数は、非去勢群  $30.4 \pm 13.3$  個、去勢群  $52.5 \pm 17.2$  個、去勢 + OPG 群  $39.6 \pm 15.7$  個となり、去勢群は非去勢群に対して有意に TRAP 陽性破骨細胞数が増加していた ( $p = 0.007$ , Mann-Whitney's U test) (Figure 4BD)。また有意差はないものの、去勢 + OPG 群は去勢群に対して TRAP 陽性破骨細胞数が減少する傾向を認めた ( $p = 0.133$ , Mann-Whitney's U test)。平均 RANKL 陽性骨芽細胞数は、非去勢群  $42.5 \pm 5.2$  個、去勢群  $59.9 \pm 4.1$  個、および去勢 + OPG 群  $63.4 \pm 5.1$  個となり、去勢群および去勢 + OPG 群は非去勢群に比較して RANKL 陽性骨芽細胞数が有意に多かった ( $p = 0.037$  and  $p = 0.033$ , Figure 4CE)。

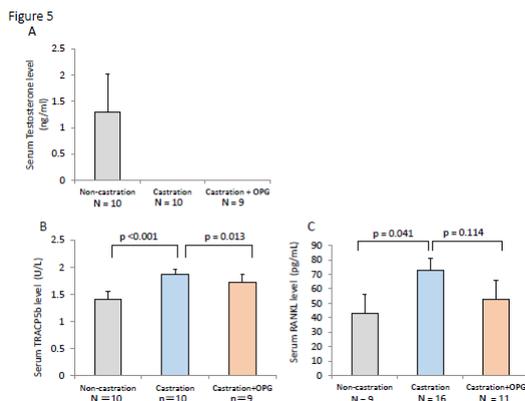
Figure 4





### 「マウス去勢により血清TRACP5bおよびRANKL濃度が上昇し、その効果はOPGにより減弱した」

マウス安楽死時にマウス左心室より採取した血液は遠心分離の後、血清を-80度で保存しELISAでTRACP5bおよびRANKL濃度を測定した。血清平均TRACP5b濃度は非去勢群  $1.39 \pm 0.15$  (U/L)、去勢群  $1.87 \pm 0.08$  (U/L)、去勢+OPG群  $1.72 \pm 0.14$  (U/L)となり、去勢群は非去勢群に対して有意に血清TRACP5b濃度が上昇し ( $p < 0.001$ , Mann-Whitney's U test)、去勢+OPG群は去勢群に対して有意に血清TRACP5b濃度が減少した ( $p = 0.013$ , Mann-Whitney's U test) (Figure 5C)。平均血清RANKL濃度は、非去勢群  $43.0 \pm 39.9$  (pg/mL)、去勢群  $72.8 \pm 33.9$  (pg/mL)、去勢+OPG群  $52.9 \pm 42.5$  (pg/mL)となり、去勢群は非去勢群に対して有意に血清RANKL濃度が上昇した ( $p = 0.041$ , Mann-Whitney's U test) (Figure 5D)。



#### <考察>

本研究ではマウス去勢による骨密度低下およびTRAP陽性の破骨細胞数の増加に伴い、PC-3M-luc-C6の骨転移発症率および骨転移平均 photon countsが有意に上昇した。これは左心室に注入し体循環に入ったCRPCの循環癌細胞(CTC)が骨転移として定着する際に、去勢の効果で破骨細胞が活性化し骨密度が低下していると定着しやすくなることを示唆する。またこれらの去勢による効果は、骨転移発症率および個体あたりの骨転移数においてOPG投与により相殺された。更に去勢により血清TRACP5bおよび血清RANKL濃度の上昇を伴ってTRAP染色陽性破骨細胞およびRANKL陽性骨芽細胞が免疫染色で増加したため、破骨細胞増加に伴う骨転移増加はRANK-RANKLシグナルの活性化に伴うと考えら

れる。本研究により、外科的去勢を含むADTはRANK-RANKLシグナルによる破骨細胞活性化により骨密度を低下させ、CRPC骨転移の発症を促進させることがマウス実験により強く示唆された。

近年、前立腺全摘術前の、転移のない限局性のホルモン感受性前立腺癌(HSPC)腫瘍中には、既にCD133陽性細胞やE-Cadherin陽性細胞といったEMTを起こし癌幹細胞の特徴を持つ細胞が含まれ(Fiñones RR, PLoS One. 2013 Sep 25;8(9):e74438)これらは循環腫瘍細胞(CTC)として転移発症前から全身を循環している、と報告されている(15. Pal et al. Clinical Genitourinary Cancer 13, 13-136, 2015)これらの細胞成分は既に発症時からCRPCであると推測される(Fiñones RR, PLoS One. 2013 Sep 25;8(9):e74438)。従って骨転移の未だないHSPC患者においても、患者における初めてのADT開始時には破骨細胞の抑制は必須である可能性がある。現在の癌診療における破骨細胞抑制療法は骨転移の発症後に行われるが、特に非転移性局所進行性ハイリスク前立腺癌の初期治療においてADT開始時からの破骨細胞抑制療法が、将来の骨転移発症予防に有効であ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 0 件)

現在、Nature Communications に投稿中である。掲載不能の場合は、Cancer Research, Int J Cancer や Cancer Letter, Journal of Urologyなどを投稿先として考慮している。

〔学会発表〕(計 9 件)

- 1) 高山孝一郎, 井上高光, 成田伸太郎, 鶴田 大, 沼倉一幸, 秋濱 晋, 齋藤 満, 土谷順彦, 羽瀨友則 (2014) マウス去勢抵抗性前立腺癌モデルにおける去勢による骨塩量減少の骨転移促進効果、第102回日本泌尿器科学会総会, 4月24日, 神戸
- 2) 高山孝一郎, 井上高光, 成田伸太郎, 鶴田 大, 沼倉一幸, 秋濱 晋, 齋藤 満, 土谷順彦, 羽瀨友則 (2014) マウス去勢抵抗性前立腺癌モデルにおける去勢による骨塩量減少の骨転移促進効果、第17回秋田県尿路生殖器・免疫感染症研究会, 6月19日 秋田
- 3) 高山孝一郎, 井上高光, 成田伸太郎, 黄 明国, 鶴田大, 秋濱 晋, 齋藤 満, 土谷順彦, 羽瀨友則 (2014) マウス去勢抵抗性前立腺癌骨転移モデルに

おける去勢による骨密度減少と骨転移促進果、第 14 回日本 Men's Health 医学会, 9 月 27 日, 大阪

- 4) 井上高光、高山孝一郎、土谷順彦、鶴田大、秋濱晋、前野淳、齋藤満、成田伸太郎、羽瀨友則 (2015) 前立腺癌骨転移とアンドロゲン除去療法~いつから破骨細胞を抑制すべきか? 第 11 回 Prostate cancer forum ~ 前立腺癌治療 Up to Date 2015 ~ 2 月 21 日、仙台
- 5) 高山孝一郎、井上高光、成田伸太郎、黄明国、鶴田大、前野淳、齋藤満、土谷順彦、羽瀨友則 (2015) マウス抗性前立腺癌骨転移モデルにおける去勢による骨密度低下と骨転移促進、第 24 回 泌尿器科分子・細胞研究会、2 月 28 日、東京
- 6) Takayama K, Inoue T, Narita S, Huang M, Tsuruta H, Saito M, Tsuchiya N, and Habuchi T. (2015) Castration-induced acceleration of bone metastasis prevented by RANK inhibitor osteoprotegerin in murine castration-resistant prostate cancer model. EAU15, 2015/3/20-24, Madrid, Spain
- 7) 高山孝一郎、井上高光、成田伸太郎、黄明国、鶴田大、前野淳、齋藤満、土谷順彦、羽瀨友則 (2015) マウス抗性前立腺癌骨転移モデルにおける去勢による骨密度低下と骨転移促進、第 103 回 日本泌尿器科学会総会、4 月 20 日、金沢
- 8) Takayama K, Inoue T, Narita S, Huang M, Mitobe Y, Tsuruta H, Akihama S, Saito M, Tsuchiya N and Habuchi T (2015) Castration-induced acceleration of bone metastasis prevented by RANK inhibition in murine castration-resistant prostate cancer model、The 110<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Urological Association, May 15-19, New Orleans, USA
- 9) 高山孝一郎、井上高光、成田伸太郎、黄明国、鶴田大、前野淳、齋藤満、土谷順彦、羽瀨友則 (2015) マウス抗性前立腺癌骨転移モデルにおける去勢による骨密度低下と骨転移促進、第 10 回 Basic Urological Research Seminar、8 月 29 日、東京

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

秋田大学大学院医学系研究科講師

井上 高光 (INOUE Takamitsu)

研究者番号: 60375243

(2) 研究分担者

(3) 研究協力者

秋田大学大学院医学研究科

大学院生

高山 孝一郎 (TAKAYAMA Kouichiro)