

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390323

研究課題名（和文）頭蓋内病変に対する陽子線治療の最適化に関する基礎的研究

研究課題名（英文）Radiobiological study of proton beams for optimization of therapeutic effects on brain tumors

研究代表者

坪井 康次 (TSUBOI KOJI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授

研究者番号：90188615

研究成果の概要（和文）：脳腫瘍に対する陽子線治療の効果を最適化するために、腫瘍細胞に対する陽子線の生物学的効果の不確実性を減少させるとともに、放射線抵抗性の解析を行った。培養細胞とDNA溶液を対象とした研究では、まず陽子線のDNA塩基損傷と糖鎖切断の特徴を明らかにした。次に、陽子線のエックス線に対するRBEを異なるエンドポイントで明らかにした。一方、照射後の細胞から放射線抵抗性クローンを単離し、それらのがん幹細胞性質を明らかにすることで、今後の放射線抵抗性克服の手掛かりとした。

研究成果の概要（英文）：In order to optimize the effects of proton beams radiotherapy for brain tumors, some uncertainties in the biological effects of proton beams were resolved in this study. First, characteristics of proton beams in DNA base damage and strand breaks were clarified compared to those of x-rays. Second, RBE values of proton beams to x-rays were measured in different endpoints. In addition, cancer-stemness in isolated radioresistant clones of brain tumor cells was demonstrated, indicating that population of cancer-stem like cells were enriched in survivors after irradiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2009年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2010年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：放射線生物学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：陽子線、脳腫瘍、ラジカル、RBE、がん幹細胞

1. 研究開始当初の背景

高エネルギーに加速された陽子は直進して体内に入ると一定の深さで急峻なブラッグピークを形成して一擧にエネルギーを失うために線量分布は極めてシャープになる。この特性から陽子線治療は深部に存在する難治性脳腫瘍に対して新たな集光的放射線療法として注目されているが、現下の問題を解決してその効果を最適化する必要がある。

悪性脳腫瘍は治療抵抗性であり、今後さら

に QOL を重視した治療戦略が要求される。脳腫瘍は、呼吸などによる移動が極めて少なく、CT や MRI などでも可視化でき、解剖学的に照射方向をかなり自由に選択できるために、陽子線治療の良い適応となり得るが、一方、その機能的な重要性と解剖学的特徴から物理学的な精度とそれを裏付ける生物学的な担保が必須である。

そこで本課題では以下に述べるような現下の陽子線治療に伴う「生物学的不確実性」

を克服し、脳腫瘍に対する陽子線治療の治療効果を向上させることを目指している。物理的には照射の集中性をさらに向上させ、治療システムを強固にすることが重要課題であるが、同時にこれらの生物学的な不確実性を克服し、脳腫瘍に対する陽子線治療を最適化することは、患者の予後向上と陽子線治療の適応を拡大するために必須である。

2. 研究の目的

(1) 陽子線の放射線化学的効果の検討

高エネルギー陽子線の plateau 部分 (P 点) と Bragg peak 近傍 (B 点) 及びエックス線では Lineal energy (y^*) 値が異なり、生物学的効果も異なる。そこで本研究では、200kV エックス線と 155MeV 陽子線の異なる 2 点で y^* 値を測定し、それに対応する DNA 塩基損傷と DNA 二本鎖切断 (DDSB) を定量的に明らかにすることで、エックス線と陽子線の放射線科学的効果の違いを検討した。

(2) 高エネルギー陽子線の治療用エックス線に対する RBE の検討

陽子線の生物学的効果比は 1.1 とされているが、まだ多くの不確実性 (uncertainty) が存在しており、特に高エネルギー陽子線とエックス線による生物学的効果の違いはまだ十分明らかになっていない。そこで本研究では、治療用の高エネルギー陽子線とエックス線によって起きる、①DNA 二本鎖切断、②アポトーシス誘導、③コロニー形成抑制効果を検討した。

(3) 髄芽腫細胞株からの放射線耐性株クローニングとそのがん幹細胞性質の解析

悪性脳腫瘍は放射線療法に極めて抵抗性で患者の予後も不良である。近年、さまざまながんにおいて腫瘍形成能をもつがん幹細胞の概念が提唱され、脳腫瘍においても放射線照射後にごん幹細胞マーカーとされる CD133 を発現する細胞の割合が増加することや、フローサイトメトリーを用いて分離した CD133 陽性細胞が放射線抵抗性を示すことが報告されている。このことからがん幹細胞の存在が悪性脳腫瘍の放射線治療抵抗性や放射線治療後の再発に関与していると推測されているが、放射線照射後に生き残った細胞におけるがん幹細胞性質に関する研究はまだ少ない。そこで、本研究では分化能をもつ髄芽腫細胞株から放射線抵抗性細胞を選びそのがん幹細胞性質を検討した。

3. 研究の方法

(1) 陽子線の放射線化学的効果の検討

155MeV の陽子線の 7.2mm (P) と 132mm (B) の深度でマイクロドジメトリーを行い、 y^* 値 (keV/micron) を測定した。鮭の精子 DNA (ST-DNA) を対象として 200kV のエ

ックス線、155MeV 陽子線の 7.2mm の深度、131.4mm の深度の 3 点で照射し、生じた 8-Hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) の生成量を HPLC で定量化した。また DDSB は電気泳動法により定量解析した。一方、培養腫瘍細胞 MOLT-4 を対象として、同様の照射を行い、核内の DDSB を示す γ -H2AX フォーカスを免疫蛍光染色法により可視化し、画像解析にてその数を定量化した。さらに直接作用と間接作用の寄与比率を知る為放射線の間接作用を抑えるラジカル消去剤 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one (edaravone) を添加して同様の検討を行った。

(2) 高エネルギー陽子線の治療用エックス線に対する RBE の検討

ヒト脳腫瘍培養細胞株 ONS 76 とヒト T 細胞白血病細胞株 MOLT4 を対象とし、照射には 200MeV の陽子線と 10MV のエックス線を用いた。照射後に起きる DNA 二本鎖切断は、 γ -H2AX を免疫組織化学染色し画像解析にて定量化した。また、細胞死の評価は、AnnexinV-FITC と PI の二重染色法を行い、フローサイトメトリーにて解析した。さらに、コロニー形成アッセイを行い、生存曲線を LQ モデルにて解析した。コロニー形成アッセイと細胞死の検出では、培養フラスコを水中 10 cm の深さに沈めて照射し、免疫組織化学染色ではチャンバースライドを使いボラスを用いて室温にて照射した。

(3) 髄芽腫細胞株からの放射線耐性株クローニングとその幹細胞様性質の解析

分化能を有するヒト髄芽腫細胞株 ONS76 を対象として用いた。まず ONS76 に対してガンマ線 5Gy を照射し、照射後にコロニーを形成した細胞をクローニングした。次に、クローニングした細胞に再度ガンマ線 5Gy を照射後、増殖能が高いクローンを replica micro-well 法を利用し選択した。ONS76 親株と選択した抵抗性クローンを対象に、①フローサイトメトリーを用いた CD133 の発現解析、②蛍光色素ヘキスト 33342 排出能力を指標とした Side Population (SP) 解析、③スフェア形成アッセイ、④コロニー形成法による生存率解析、を行った。

4. 研究成果

(1) 陽子線の放射線化学的効果の検討

照射後の ST-DNA で生じる塩基損傷 (8OH-dG) の量は、エックス線 > 陽子線 plateau > 陽子線 Bragg peak の順であった。edaravone は濃度依存的に 8OH-dG の生成を減少させ、100 μ M ではいずれの照射でも edaravone の防護率が同率になった。また、ST-DNA の DNA 二重鎖切断は陽子線

plateau > エックス線 > 陽子線 Bragg peak の順であった。edaravone 投与後 DNA 切断は減少し、その効果は陽子線 plateau = エックス線 > 陽子線 Bragg peak となった。MOLT-4 細胞に生じる γ -H2AX はいずれの照射でも差は認められなかった。エダラボン投与後、陽子線 plateau と Bragg peak では変化ないが、エックス線による γ -H2AX focus 生成量は edaravone 投与後に減少した。

【結論】同じ吸収線量で照射した場合、エックス線は陽子線よりも多くの塩基損傷を生じ、さらに陽子線による塩基損傷は y^* 値が小さい方が多くなることが示された。

edaravone の 8OH-dG 産生抑制効果もそれを裏付けていた。陽子線による細胞内の DNA 二重鎖切断 (γ -H2AX focus) の数は edaravone 添加有無にかかわらず plateau と Bragg peak 両者で有意な差はなかった。陽子線による ST-DNA 二重鎖切断 (電気泳動法) も y^* 値が小さい方が多く生じ、edaravone による防護効果もそれを裏付けた。以上から、陽子線による間接作用の割合は plateau > Bragg peak であることが示唆された。今回の結果から y^* 値の測定と微視的な DNA 損傷の結果を融合した物理・生物学的評価システムの構築により陽子線の生物効果に関する不確実性を減少させることが可能であることが示された。

(2) 高エネルギー陽子線の治療用エックス線に対する RBE の検討 :

0.5-2Gy の範囲では γ -H2AX フォーカスは線量依存性に増加し照射後 30 分でピークとなりその後漸減した。また、同じ線量の照射で、陽子線はエックス線の 1.14 - 1.436 倍の γ -H2AX フォーカスを形成した。アポトーシスは陽子線照射後の方がエックス線より早く出現し、8Gy の照射では陽子線によるアポトーシスは 12 時間でピークとなったがエックス線では 20 時間でもピークは観察されなかった。また、陽子線はエックス線の 1.01 - 1.52 倍の PI 陽性細胞死を誘導することが明らかになった。コロニー形成アッセイでは 10% S/So における陽子線のエックス線に対する生物学的効果比は 1.067 であった。

【結論】以上の結果から、増殖能を評価するコロニー形成アッセイよりも直接的に細胞損傷を評価する方法 (DNA 二本鎖切断、アポトーシスの誘導) では陽子線の細胞障害性はエックス線よりも有意に高いことが示めされた。生物学的修飾を受けないエンドポイントでは RBE が高くなることから、陽子線の細胞傷害のメカニズムがエックス線とは異なることが示唆された。

(3) 髄芽腫細胞株からの放射線耐性株クローニングとその幹細胞様性質の解析 単離したガンマ線抵抗性クローン 20 株の

うち 8 クローンでは親株よりも CD133 の発現が上昇していた。一方残りの 12 クローンでは CD133 の発現は不変かやや減少していた。さらに、この CD133 発現が上昇した 8 クローンのうち 3 クローン (ONS-76-F8、ONS-76-B1、ONS-76-F11) では CD133 の発現が特に高発現していた。この 3 クローンを対象として解析した結果、side population fraction が増加し、スフェア形成能も高いことが示された。また、コロニー形成アッセイでもこれらの 3 株は親株に比べてガンマ線抵抗性が高いことが確認できた。

【結論】放射線照射後の再発を模擬した手法により、ガンマ線抵抗性を持つ 20 クローンの中から、replica micro-well 法にて高いがん幹細胞性質が備わった 3 つのクローンを単離することができた。このことは、放射線照射後生き残った細胞の中にはがん幹細胞性質を示す細胞群が濃縮されており、これらの少数のがん幹細胞が放射線治療後の局所再発の原因であるという仮説を支持していると考えられる。

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 19 件)

- ① 坪井康次
脳腫瘍に対する陽子線治療
脳神経外科速報 vol. 21 no. 1 48-55, 2011
査読無
- ② 水本斉志、坪井康次
新時代の脳腫瘍学 - 診断・治療の最前線 -
V. 脳腫瘍の治療 脳腫瘍の放射線治療
陽子線治療
日本臨床 68 巻 増刊号 10 (2010 年 12 月 20 日発行) 査読無
- ③ Gerelchuluun A, Hong Z, Sun L, Suzuki K, Terunuma T, Yasuoka K, Sakae T, Moritake T, Tsuboi K. Induction of in situ DNA double-strand breaks and apoptosis by 200 MeV protons and 10 MV X-rays in human tumour cell lines. Int J Radiat Biol. 2010 Oct 18. [Epub ahead of print] 査読有
- ④ Mizumoto M, Okumura T, Hashimoto T, Fukuda K, Oshiro Y, Fukumitsu N, Abei M, Kawaguchi A, Hayashi Y, Ookawa A, Hashii H, Kanemoto A, Moritake T, Tohno E, Tsuboi K, Sakae T, Sakurai H. Proton Beam Therapy for Hepatocellular Carcinoma: A Comparison of Three Treatment Protocols. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2010 Sep 30. [Epub ahead of print] 査読有

- ⑤ Nakayama H, Satoh H, Sugahara S, Kurishima K, Tsuboi K, Sakurai H, Ishikawa S, Tokuyue K. Proton Beam Therapy of Stage II and III Non-Small-Cell Lung Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010 Sep 30. [Epub ahead of print] 査読有
- ⑥ Ishikawa E, Yamamoto T, Sakamoto N, Nakai K, Akutsu H, Tsuboi K, Takano S, Matsumura A. Low Peripheral Lymphocyte Count Before Focal Radiotherapy Plus Concomitant Temozolomide Predicts Severe Lymphopenia During Malignant Glioma Treatment. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 50, 638-644, 2010 査読有
- ⑦ Mizumoto M, Sugahara S, Nakayama H, Hashii H, Nakahara A, Terashima H, Okumura T, Tsuboi K, Tokuyue K, Sakurai H. Clinical results of proton-beam therapy for locoregionally advanced esophageal cancer. *Strahlenther Onkol*. 2010 Sep;186(9):482-8. Epub 2010 Aug 30. 査読有
- ⑧ Oshiro Y, Aruga T, Tsuboi K, Marino K, Hara R, Sanayama Y, Itami J. Stereotactic body radiotherapy for lung tumors at the pulmonary hilum. *Strahlenther Onkol*. 2010 May;186(5):274-9. Epub 2010 Apr 26. 査読有
- ⑨ Yamamoto T, Tsuboi K. [Particle radiotherapy for malignant gliomas] *Brain Nerve*. 2009 Jul;61(7):855-66. 査読有
- ⑩ Sugahara S, Oshiro Y, Nakayama H, Fukuda K, Mizumoto M, Abei M, Shoda J, Matsuzaki Y, Thono E, Tokita M, Tsuboi K, Tokuyue K. Proton Beam Therapy for Large Hepatocellular Carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009 May 7. [Epub ahead of print] 査読有
- ⑪ Nakayama H, Sugahara S, Tokita M, Fukuda K, Mizumoto M, Abei M, Shoda J, Sakurai H, Tsuboi K, Tokuyue K. Proton beam therapy for hepatocellular carcinoma: the University of Tsukuba experience. *Cancer*. 2009 Dec 1;115(23):5499-506. 査読有
- ⑫ Mizumoto M, Nakayama H, Tokita M, Sugahara S, Hashii H, Sakae T, Tsuboi K, Sakurai H, Tokuyue K. Technical considerations for noncoplanar proton-beam therapy of patients with tumors proximal to the optic nerve. *Strahlenther Onkol*. 2010 Jan;186(1):36-9. Epub 2009 Dec 28. 査読有
- ⑬ Sugahara S, Nakayama H, Fukuda K, Mizumoto M, Tokita M, Abei M, Shoda J, Matsuzaki Y, Thono E, Tsuboi K, Tokuyue K. Proton-beam therapy for hepatocellular carcinoma associated with portal vein tumor thrombosis. *Strahlenther Onkol*. 2009 Dec;185(12):782-8. 査読有
- ⑭ 山本哲哉、坪井康次 「脳腫瘍に対する粒子線治療」 *Particle radiotherapies for brain tumors*. 脳と神経 2009 査読無
- ⑮ Mizumoto M, Tsuboi K, Igaki H, Yamamoto T, Takano S, Oshiro Y, Hayashi Y, Hashii H, Kanemoto A, Nakayama H, Sugahara S, Sakurai H, Matsumura A, Tokuyue K. Phase I/II Trial of Hyperfractionated Concomitant Boost Proton Radiotherapy for Supratentorial Glioblastoma Multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009 Aug 19. [Epub ahead of print] 査読有
- ⑯ Fukumitsu N, Sugahara S, Nakayama H, Fukuda K, Mizumoto M, Abei M, Shoda J, Thono E, Tsuboi K, Tokuyue K. A prospective study of hypofractionated proton beam therapy for patients with hepatocellular carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009 Jul 1;74(3):831-6. Epub 2009 Mar 21. 査読有
- ⑰ Eiichi Ishikawa, Tetsuya Yamamoto, Noriaki Sakamoto, Kei Nakai, Hiroyoshi Akutsu, Koji Tsuboi, Shingo Takano, and Akira Matsumura. Low peripheral lymphocyte count before focal radiotherapy plus concomitant temozolomide predicts severe lymphopenia during malignant glioma treatment. *Neurologia medico-chirurgica* 2009 査読有
- ⑱ Moritake T, Matsumaru Y, Takigawa T, Nishizawa K, Matsumura A, Tsuboi K. Dose measurement on both patients and operators during neurointerventional procedures using photoluminescence glass dosimeters. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2008 Nov;29(10):1910-7. Epub 2008 Aug 21. 査読有
- ⑲ Oshiro Y, Sugahara S, Noma M, Sato M,

Sakakibara Y, Sakae T, Hayashi Y, Nakayama H, Tsuboi K, Fukumitsu N, Kanemoto A, Hashimoto T, Tokuyue K. Proton beam therapy interference with implanted cardiac pacemakers. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2008 Nov 1;72(3):723-7. Epub 2008 Jun 4. 査読有

[学会発表] (計 28 件)

- ① 孫 略
Stemness of radioresistant clones isolated from a medulloblastoma cell line ONS-76.
The 5th Tsukuba Medical Science Research Meeting 2011.1.22 筑波大学臨床講義室 A
- ② 坪井 康次
膠芽腫に対する高線量陽子線照射の予後
第 28 回日本脳腫瘍学会学術集会 2010.11.28、軽井沢プリンスホテルウエスト
- ③ 洪 正善
高エネルギー陽子線の lineal energy 値と微視的 DNA 損傷定量化による物理・生物学的評価システム
日本放射線影響学会第 53 回大会 2010.10.20-22、京都テルサ
- ④ 孫 略
髄芽腫細胞株 ONS76 を用いた放射線耐性株クローニングとその幹細胞様性質の解析
日本放射線影響学会第 53 回大会 2010.10.20、京都テルサ
- ⑤ 鈴木 健之
悪性脳腫瘍細胞の放射線感受性に対する COX-2 阻害剤 Celecoxib の効果
日本放射線影響学会第 53 回大会 2010.10.20、京都テルサ
- ⑥ Ariungerel Gerelchuluun
Induction of in Situ DNA Double Strand Breaks and Apoptosis by 200 MeV Protons and 10 MV X-rays in Human Tumor Cell Lines. 49th Annual meeting of the Particle Therapy Co-Operative Group (PTCOG49), 2010.05.17- 22、Gunma University; National Institute of Radiological Sciences
- ⑦ 坪井康次
頭蓋内疾患に対する陽子線治療
茨城大学研究推進プロジェクト「がん放射線治療に関する生命基礎研究」量子医療サイエンスフォーラム 公開シンポジウム (第 3 回 Quantum Medicine 研究会) 「がん放射線治療と人材養成」ー基礎科学と

ベッドサイドを結ぶ連携を目指してー平成 22 年 2 月 6 日 (茨城大学理学部、水戸)

- ⑧ 坪井康次
頭蓋底腫瘍に対する陽子線過分割照射の治療成績、Hyperfraction Proton beam radiotherapy for skull base tumors in Tsukuba.
第 23 回茨城県脳腫瘍治療研究会 平成 22 年 2 月 5 日 (つくば国際会議場)
- ⑨ 坪井康次
脳腫瘍に対する放射線免疫融合療法
第 3 回新都心神経研究会平成 22 年 1 月 22 日 (東京医科大学、新宿)
- ⑩ ゲレルチュルン アリウンゲレル
陽子線と治療用 X 線により生成される DNA 二本鎖切断アポトーシスの定量的解析
第 52 回日本放射線影響学会 2009 年 11 月 11 日~13 日 広島南区民文化センター (広島市)
- ⑪ 洪 正善
高エネルギー陽子線による DNA 塩基損傷のメカニズム
第 52 回日本放射線影響学会 2009 年 11 月 11 日~13 日 広島南区民文化センター
- ⑫ Koji Tsuboi
A phase I / II clinical trial of hyperfractionated concomitant boost proton radiotherapy for supratentorial glioblastoma multiforme.
ASTRO 2009 , 2009.11.3, , Chicago, USA Selected for "ARRO Poster Walk with a Professor"
- ⑬ 坪井康次
脳腫瘍に対する陽子線治療
第 68 回日本脳神経外科学会、ランチョンセミナー01:脳腫瘍と頭頸部癌の粒子線治療
平成 21 年 10 月 14 日 (京王プラザホテル、東京)
- ⑭ K. Tsuboi
Hyperfractionated concomitant boost proton radiotherapy for supratentorial glioblastoma multiforme
PTCOG48 2009.10.3 Heidelberg Convention Center (ドイツ)
- ⑮ 坪井康次
悪性脳腫瘍に対する陽子線治療
第 26 回日本放射線腫瘍学会、シンポジウム 3:脳腫瘍の放射線治療:現状と将来展望
平成 21 年 9 月 17 日 (京都国際会議場)
- ⑯ 盛武 敬
頭蓋底腫瘍に対する陽子線治療の長期成績

第 68 回日本脳神経外科学会総会
2009.10.14 京王プラザホテル (東京)

- ⑰ 鶴淵 隆夫
膠芽腫における陽子線照射後のMRI変化
とその病理組織学的検討
第 68 回日本脳神経外科学会総会
2009.10.15 京王プラザホテル (東京)
- ⑱ T. Terunuma
Prototype of real-time tumor-tracking
system without implanted fiducial marker
for proton therapy.
PTCOG48 2009.9.28 ~ 2009.10.3
Heidelberg Convention Center (ドイツ)
- ⑲ Ariungerel Gerelchuluun
陽子線と治療用 X 線により生成される DNA
二本鎖切断アポトーシスの定量的解析
高 LET 放射線研究会 2009.07.30~31 東
京大学
- ⑳ Koji Tsuboi
Hyperfractionated concomitant boost
proton radiotherapy for supratentorial
glioblastoma multiforme. PTCOG 47.
2008.5.23. Jacksonville, Florida, USA

[図書] (計 1 件)

- ① Eiichi Ishikawa, Shingo Takano, Tadao
Ohno and Koji Tsuboi*: Adoptive cell
transfer therapy for malignant gliomas.
“Glioma: Immunotherapeutic
Approaches” Edited by Yamanaka R.
Landes Bioscience, Austine, TX, USA.
2009

[その他]

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/radiation/index.html>

<http://www.pnrc.tsukuba.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坪井 康次 (TSUBOI KOJI)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
教授
研究者番号：90188615

(2) 研究分担者

安西 和紀 (ANZAI KAZUNORI)
日本薬科大学・薬品物理化学分野・
教授

研究者番号：70128643

高野 晋吾 (TAKANO SHINGO)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
准教授
研究者番号：50292553

榮 武二 (SAKAE TAKEJI)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
教授
研究者番号：60162278

盛武 敬 (MORITAKE TAKASHI)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
講師
研究者番号：50450432

安岡 聖 (YASUOKA KIYOSHI)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
講師
研究者番号：50200499

照沼 利之 (TERUMUNA TOSHIYUKI)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
助手
研究者番号：40361349