

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590848

研究課題名（和文） 肝細胞癌で強発現する WT1, PKR の C 型肝炎ウイルス発癌・進展における臨床的役割

研究課題名（英文） Investigation about the role of WT1 and PKR for the carcinogenesis or progression of hepatocellular carcinoma

研究代表者

日浅 陽一 (HIASA YOICHI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：70314961

研究成果の概要（和文）：肝細胞癌で WT1 gene は高発現しており、肝細胞癌の発癌、腫瘍増大、再発に関わる。また、PKR は C 型肝炎ウイルスに対する治療薬であるインターフェロン、リバビリンの抗ウイルス作用にかかわる一方、肝細胞癌で高発現している。これら 2 つの蛋白の臨床的役割について解析した。肝細胞癌において WT1 は抗アポトーシスに作用し、PKR は肝細胞増殖に関与している可能性が示唆された。また肝細胞癌患者を対象に WT1 を用いた免疫治療臨床試験を行い、安全性と一部の症例で有効性を確認した。肝細胞癌に高発現する WT1, PKR は癌の臨床像に関わり、治療標的となり得ることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We investigated about the role of Wilms' tumor 1 (WT1) gene and Protein kinase R (PKR), which over-expressed in the tissue of hepatocellular carcinoma (HCC). The expression of WT1 in HCC was related with oncogenesis, recurrence, tumor growth and prognosis. The PKR was induced by interferon, as well as by ribavirin, both drugs are well known as anti-hepatitis C virus (HCV) drugs. The interaction of PKR and HCV would have some possibilities related with the hepatocarcinogenesis induced by HCV, and overexpressed WT1 and PKR might be therapeutic target of HCC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：WT1 遺伝子、PKR、肝細胞癌、アポトーシス、C 型肝炎ウイルス、interleukin-8

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は高頻度の癌であり、その多くは、肝硬変から発生し、C 型肝炎ウイルス(HCV) が発生原因の約 60%を占めている。

報告者は過去の検討で、肝細胞癌において非癌部の肝組織に比べて強発現する腫瘍抗原蛋白として Wilms' tumor 1 gene (WT1) (文献 1)と Protein kinase R (PKR) (文献 2) の 2 つの蛋白を同定した。

WT1 は Wilms 腫瘍の原因遺伝子として同定され、当初は DNA, RNA と結合して細胞増殖・発生に関わる転写因子を抑制する癌抑制遺伝子として報告された。しかしながらその後の検討で発癌に関わる遺伝子として注目されている。既に白血病、肺癌、腎癌で強発現することから、癌免疫治療の治療標的とされている。

一方、PKR は 2 本鎖 RNA により誘導され

る宿主蛋白で RNA ウイルスである HCV 感染によっても発現が誘導される。PKR は抗 HCV 薬であるインターフェロンに誘導される遺伝子の一つである (文献 3)。しかしながら、PKR は C 型肝細胞癌において周囲の非癌部に比べて強発現しており (文献 2)。PKR が肝細胞癌発癌に関与しているのか、あるいは発癌の結果増強しているのかは不明である。また HCV 感染が肝細胞癌組織における PKR の強発現とそのウイルス発癌にどのように関わっているのかは明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では肝細胞癌において強発現している WT1 と PKR に注目した。HCV 感染・複製に関わる抗 HCV 薬との関連、また発癌への寄与、再発および予後などの病態進展における臨床的役割について解析し、癌免疫療法などの分子標的治療の標的となりうるかも含めて解析することを研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト肝細胞癌組織を用いた WT1, PKR の発現と臨床像の検討

治療のため肝切除術を施行した肝細胞癌患者で同意が得られた患者を対象として、癌部および非癌部の組織を採取した。組織より RNA および蛋白を抽出し、WT1、PKR の発現量について real-time RT-PCR、Western Blot および組織染色により、検討した。

(2) 肝細胞癌株における WT1 発現量の変化に伴う肝細胞内遺伝子発現修飾についての検討

肝細胞癌株として、C 型肝炎の肝細胞癌由来細胞株である Huh7 と、Huh7.5.1 (Dr. Chisari FV より供与)、HLE の 3 つの細胞株を用いて、WT1 遺伝子発現を変化した場合の細胞の変化を観察した。WT1 遺伝子は、WT1 siRNA および WT1 plasmid (杉山治夫先生より供与) を用いて発現量を変化させた。解析は、まず PCR アレイを用いて網羅的に検討し、抽出された遺伝子からさらに追加解析した。

(3) WT1 の抗アポトーシス作用とその調節に関わる因子の抽出

前述の解析により浮かび上がってきた WT1 の抗アポトーシス作用について Annexin V 染色で評価し、さらに Western blot による Caspase cleaved protein の検出、Apoptosis activity assay を行った。またその調節に関わる細胞内因子について網羅的に解析し同定を試みた。

(4) ヒト肝細胞癌組織を用いた WT1 発現調節に関わる細胞内因子の検討

同定された細胞内因子について、肝細胞癌組織と非癌組織を WT1 mRNA 発現量の中央値で 2 群に分け、WT1 調節に関わる細胞内因子の mRNA 発現量について検討した。

(5) HLA 高結合新規 WT1 ペプチドの同定と、同ペプチドを用いた肝細胞癌に対する免疫療法の第 I/II 相臨床試験

高知大学免疫学教室の宇高恵子教授との共同研究で、HLA-A*24:02, *02:01, *02:06 と高結合する新規の WT1 エピトープアミノ酸配列を同定した。同 WT1 ペプチドを GMP グレードで合成し、愛媛大学医学部臨床倫理委員会で承認後 (0809006 号)、書面にて同意が得られた肝癌患者 18 例に投与して安全性、治療効果を評価した。

(6) C 型肝炎ウイルス (HCV) *in vitro* 複製発現系の確立と、HCV 発現に伴う PKR、WT1 発現の変化

T7 遺伝子の下流にジェノタイプ 1 型の HCV の全長 cDNA を持つプラスミド [pT7-flHCV-Rz (pH77)] を Huh7 細胞株にトランスフェクションし、T7 ポリメラーゼを発現するアデノウイルスベクター (Ad-T7pol) を感染させ、HCV 遺伝子を発現する HCV 遺伝子複製系 (文献 4) を、HepG2 細胞株に移植し、同細胞株を用いた HCV の持続発現系を確立した。

また、HCV 粒子形成、複製系の JFH-1 (脇田隆宇先生より供与) (文献 5) および H77s (Dr. Lemon SM より供与) を用いた HCV 複製系 (文献 6) を立ち上げた。HCV 発現に伴う WT1、PKR の発現変化を確認した。

(7) リバビリルン (RBV) の抗 HCV 作用における PKR の役割

インターフェロン (IFN) の抗 HCV 作用は PKR に依存するが (文献 3)、リバビリルン (RBV) と PKR の関係については不明である。HCV 複製系を用いて IFN および RBV を加え、PKR のほか同じく IFN 誘導遺伝子 (ISG) である 2'5'-OAS、MxA、IL-8 に注目して解析した。さらに ISG に関わる内因性 IFN- β について検討した。

(8) HCV 複製系における PKR の発現抑制と、それに伴う宿主細胞の癌関連遺伝子の変化

HCV 複製系を用いて、PKR の発現を変化させ、肝細胞宿主遺伝子の癌関連遺伝子の変化について網羅的に解析した。

(倫理面への配慮)

検体採取および WT1 ペプチドを用いた臨床試験については愛媛大学医学部臨床研究倫理委員会にて承認後 (0809006 号)、十分な説明を行い、書面による同意を得た上で行った。

4. 研究成果

(1) ヒト肝細胞癌組織を用いた WT1, PKR の発現と臨床像の検討

治療のため肝切除術を施行した肝細胞癌患者の肝細胞癌部の組織において WT1 mRNA の発現は有意に増加し ($p < 0.05$)、免疫組織染色でも癌部における有意な WT1 発現増加がみられた ($p < 0.001$)。

肝細胞癌部の WT1 発現量で 2 群に分け解析したところ、WT1 高発現群では腫瘍倍加時間が短く、無再発生存期間が有意に短かった。WT1 は肝細胞癌の腫瘍増殖、発癌、再発に関わっていると考えられた。

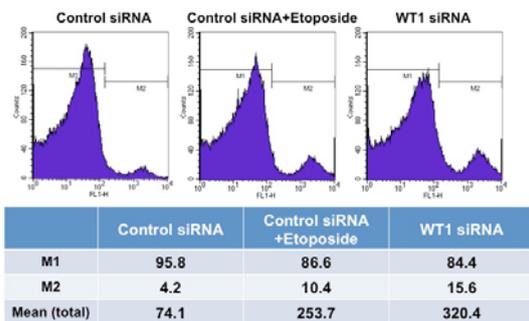
(2) 肝細胞癌株における WT1 発現量の変化に伴う肝細胞内遺伝子発現修飾についての検討

Huh7, Huh7.5.1, HLE の 3 つの肝細胞株の、WT1 発現量変化による宿主細胞内遺伝子変化について PCR アレイで検討したところ、アポトーシスに関連する遺伝子群がいくつか抽出された。特にデスシグナルに関連する遺伝子群の変化がみられた。

(3) WT1 の抗アポトーシス作用とその調節に関わる因子の抽出

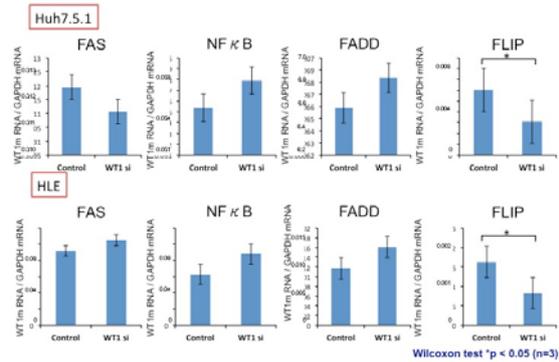
Annexin V 染色を用いたアポトーシスアッセイにおいて、WT1 のノックダウンにより、positive control であるエトポシドで処理した細胞と同等のアポトーシス誘導がみられた (図 1)。また Western blot にて Caspase 3, 8, 9 の cleaved 蛋白の発現増加、Apoptosis activity assay にて Caspase 3/7, 8, 9 の有意な活性化が確認できた。WT1 は抗アポトーシス作用を持つことが確認された。

図1. Annexin V染色を用いたアポトーシスの解析



デスシグナルの要である FLIP, FADD, NF- κ B, Fas の蛋白発現変化をみたところ WT1 ノックダウンにより、FLIP の発現低下、FADD, NF- κ B の発現増加がみられた。Fas の変化はみられなかった。また、WT1 mRNA の検討では、WT1 ノックダウンにより FLIP の有意な低下がみられた (図 2)。

図2. WT1抑制によるFLIP mRNAの低下

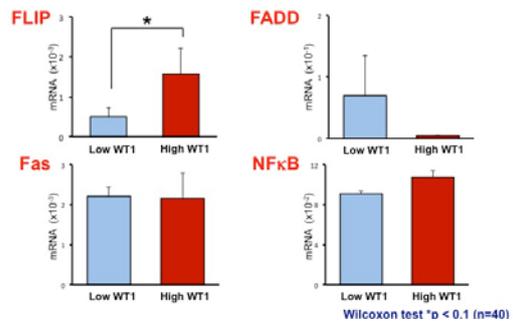


(4) ヒト肝細胞癌組織を用いた WT1 発現調節に関わる細胞内因子の検討

ヒト肝癌組織の WT1 mRNA 発現量により、その中央値で高発現群と低発現群の 2 群に分け、各群の FLIP, FADD, NF- κ B, Fas mRNA 量を比較した。FLIP mRNA は WT1 高発現群で有意に発現量が高く、FADD は低下傾向、Fas, NF- κ B は明らかな差はみられなかった (図 3)。

以上の結果から、WT1 は肝細胞癌で高発現する WT1 は、デスシグナルに作用して抗アポトーシスを誘導していると考えられた。WT1 の抗アポトーシス作用は肝細胞癌の発癌、再発、腫瘍増殖を誘導しうることから、WT1 は肝細胞癌において治療標的となりうると思われた。

図3. ヒト肝癌組織におけるWT1発現量とアポトーシス関連遺伝子の変化



(5) HLA 高結合 WT1 ペプチドの同定と、同ペプチドを用いた肝細胞癌に対する免疫療法の第 I/II 相臨床試験

高知大学免疫学教室の宇高恵子教授との共同研究で、HLA-A*24:02, *02:01, *02:06 と高結合する WT1 エピトープアミノ酸配列を同定し、GMP グレードで合成した。愛媛大学臨床倫理委員会で承認後、肝細胞癌の治療として血管造影下腫瘍塞栓化学療法 (TACE) で繰り返し治療している患者さんを対象として、第 I/II 相の医師主導臨床試験を行った。治療プロトコルとして、TACE 治療後に週 1 回 WT1 ペプチドとアジュバントを皮内注射し、12 週後に EOB-MRI を撮影

して、同治療の安全性と治療効果について評価した。

18名の肝細胞癌患者より臨床試験参加の同意が得られ、WT1ペプチドの投与を行ったところ、有害事象として、注射部位の発赤1例(grade 1)、血圧上昇1例(grade 2)がみられたが、grade 3以上の有害事象はみられなかった。治療後3ヶ月で4例に腫瘍進展がみられなかった(SD)(表1)。また1例においてWT1ペプチド投与を継続することにより9ヶ月間SDが維持できた。今後さらに治療効果を上げるための投与方法、適応症例選択の工夫が必要であると考えられる。

表1. WT1ペプチド治療の治療成績

Case#	Age	Sex	Etiology	最大径(mm)	腫瘍数	3ヵ月後	6ヵ月後
1	65	M	HCV	20	7	PD	-
2	58	M	HBV	21	5	PD	-
3	79	F	HBV	24	4	PD	-
4	75	F	HCV	21	3	PD	-
5	74	M	HCV	26	3	PD	-
6	65	M	Alcohol	25	7	PD	-
7	46	M	HCV	27	m	SD	PD
8	63	M	HBV	34	m	PD	-
9	59	M	HCV	10	1	PD	-
10	58	M	HCV	21	m	SD	PD
11	71	M	HCV	16	6	SD	SD
12	61	M	HBV	25	m	PD	-
13	74	M	HCV	241	4	SD	PD
14	74	F	HCV	1	4	PD	-
15	66	M	HCV	18	4	PD	-
16	74	M	HCV	19	8	PD	-
17	61	M	HCV	23	m	PD	-
18	74	F	HCV	24	3	PD	-

(6)C型肝炎ウイルス(HCV) *in vitro* 複製発現系の確立と、HCV発現に伴うPKR、WT1発現の変化

HepG2細胞に移植したpH77によるHCV複製系他、JFH-1、H77sを用いたHCV複製系も立ち上げて、HCV発現に伴うPKR、WT1の発現変化をみた。

WT1はHCV発現による発現変化は観察されなかったが、PKRはHCV発現に伴い発現増加および活性化がみられた。また、細胞内のPKRノックダウンによりHCV発現は増加し、PKR発現亢進でHCV発現が低下することからPKRによるHCV抑制効果がみられた。

(7)リバビリン(RBV)の抗HCV作用におけるPKRの役割

HCV複製系にRBVおよびIFNを単独あるいは両方添加して、代表的なISGであるPKR、2'5'-OAS、MxAについて検討したところ、RBVとIFNの添加により、IFN単独よりも有意に強いPKR、MxA遺伝子誘導がHepG2細胞でのみみられた(図4)。

リバビリンは肝細胞の内因性IFN-β産生を亢進しており、この内因性IFN-β産生亢進がPKR誘導に依存していた(図5)。作用はIFNの抗HCV作用に相加的であった。

一方、同じくISGの一つであるIL-8はIFNによらずRBV単独で有意な発現増強が確認された(図6)。IL-8の増加は内因性IFN-βと連動せず、RBVによって直接誘導されるもの

図4. RBVはIFN-αのISG誘導を相対的に増強

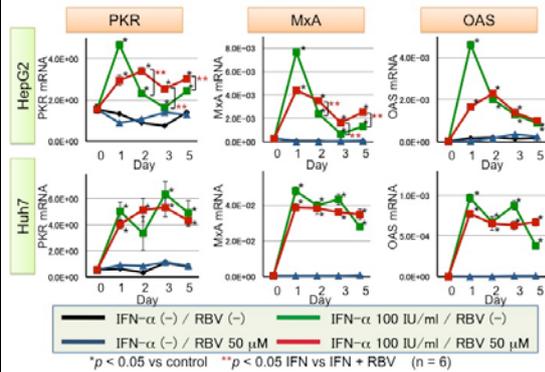


図5. RBVはIFN-αのIFN-β mRNA誘導を相対的に増強

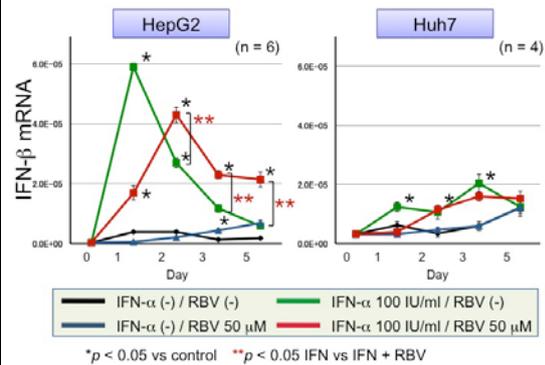
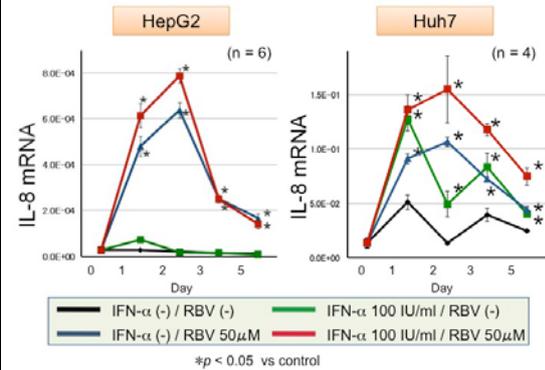


図6. RBVはIL-8 mRNAを誘導



と考えられる。IL-8は血管増殖因子であり、RBVによって誘導されるIL-8と肝細胞癌の発癌および進展との関連については今後の検討課題となると思われる。

(8)HCV複製系におけるPKRの発現抑制と、それに伴う宿主細胞の癌関連遺伝子の変化

HCV複製系においてPKRをsiRNAのノックダウンあるいは発現増強してPCRアレイで網羅的に検討したところ、細胞増殖に関わる遺伝子が複数抽出された。これらの変化はHCV発現時に顕著であり、PKRの過剰発現がHCVによる肝細胞癌の進展に関わっている可能性が考えられる。現在、それらの遺伝子変化についてreal-time RT-PCR法にて検討している。

結語

肝細胞癌で高発現する WT1 と PKR は、肝細胞癌の発育、進展、発癌、再発に関わっている可能性がある。また、PKR は IFN、RBV の抗 HCV 作用にも関わる。WT1、PKR は肝細胞癌における役割を明確にするべき遺伝子であり、治療標的ともなりうる遺伝子と考えられる。

参考文献

1. Sera T, Hiasa Y, Mashiba T, et al. *Eur J Cancer* 44 巻 600-608 (2008)
2. Hiasa Y, Kamegaya Y, Nuriya H, et al. *Am J Gastroenterol* 98 巻 2528-2534 (2003)
3. Tokumoto Y, Hiasa Y, Horiike N, et al. *J Med Virol* 79 巻 1120-1127 (2007)
4. Hiasa Y, Kuzuhara H, Tokumoto Y, et al. *Hepatology* 72 巻 867-872 (2008)
5. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, et al. *Nat Med* 11 巻 791-796, (2005)
6. Yi M, Villanueva RA, Thomas DL, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 巻 2310-2305 (2006)

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)

1. Tokumoto Y, Hiasa Y, Uesugi K (他 7 名, 2 番目) Rivabirin regulates hepatitis C virus replication through enhancing interferon-stimulated genes and interleukin 8. *J Infect Dis. E pub* (2012) 査読有
2. Hirooka M, Ochi H, Hiasa Y (他 6 名, 8 番目) Splenic elasticity measured with real-time tissue elastography is a marker of portal hypertension. *Radiology* 261 巻 960-968 (2011) 査読有
3. Hirooka M, Koizumi Y, Hiasa Y (他 4 名, 3 番目) Hepatic elasticity in patients with ascites: evaluation with real-time tissue elastography. *AJR Am J Roentgenol* 196 巻 W766-771 (2011) 査読有
4. Konishi I, Hiasa Y, Tokumoto Y (他 5 名, 2 番目) Aerobic exercise improves insulin resistance and decreases body fat and serum levels of leptin in patients with hepatitis C virus. *Hepato Res* 41 巻 928-935 (2011) 査読有
5. Watanabe T, Konishi I, Hiasa Y (他 12 名, 14 番目) Sustained virological response of patients with hepatitis C virus genotype 2 depends on pegylated interferon compliance. *Hepato Res* 41 巻 720-730 (2011) 査読有
6. Tanaka Y, Kurosaki M, Hiasa Y (他 19 名, 16 番目) Genome-wide association study identified ITPA/DDRGK1 variants reflecting thrombocytopenia in pegylated interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Hum Mol Genet* 20 巻 3507-3516 (2011) 査読有
7. Sakamoto N, Nakagawa M, Hiasa Y (他 17 名, 16 番目) Association of IL28B variants with response to pegylated-interferon alpha plus ribavirin combination therapy reveals intersubgenotypic differences between genotypes 2a and 2b. *J Med Virol* 83 巻 871-878 (2011) 査読有
8. Koizumi Y, Hirooka M, Hiasa Y (他 6 名, 8 番目) Liver Fibrosis in Patients with Chronic Hepatitis C: Noninvasive Diagnosis by Means of Real-time Tissue Elastography -Establishment of the Method for Measurement. *Radiology* 258 巻 610-617 (2011) 査読有り
9. Chayama K, Hayes CN, Hiasa Y (他 14 名, 11 番目) Factors predictive of sustained virological response following 72 weeks of combination therapy for genotype 1b hepatitis C. *J Gastroenterol* 46 巻 545-555 (2011) 査読有
10. Chayama K, Hayes CN, Hiasa Y (他 14 名, 11 番目) Accumulation of refractory factors for pegylated interferon plus ribavirin therapy in older female patients with chronic hepatitis C. *Hepato Res* 40 巻 1155-1167 (2010) 査読有
11. Akbar SM, Yoshida O, Hiasa Y (他 5 名, 7 番目) Immune modulator and antiviral potential of dendritic cells pulsed with both hepatitis B surface antigen and core antigen for treating chronic HBV infection. *Antivir Ther* 15 巻 887-895 (2010) 査読有
12. Blackard JT, Ma G, Hiasa Y (他 8 名, 7 番目) Variability of the polymerase gene (NS5B) in HCV-infected women. *J Clin Microbiol* 48 巻 4256-4259 (2010) 査読有
13. Kasama Y, Sekiguchi S, Hiasa Y (他 8 名, 9 番目) Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells induces spontaneous development of

- B-cell lymphomas in vivo. Blood 116 卷 4926-4933 (2010) 査読有
14. Akbar SM, Furukawa S, Hiasa Y (他 3 名, 5 番目) Safety and immunogenicity of hepatitis B surface antigen-pulsed dendritic cells in patients with chronic hepatitis B. J Viral Hepat 18 卷 408-414 (2010) 査読有
 15. Akbar SM, Horiike N, Hiasa Y (他 5 名, 6 番目) Mechanism of restoration of immune responses of patients with chronic hepatitis B during lamivudine therapy: increased antigen processing and presentation by dendritic cells. J Viral Hepat 18 卷 200-205 (2010) 査読有
 16. Miyake T, Akbar SM, Hiasa Y (他 5 名, 5 番目) Impaired dendritic cell functions disrupt antigen-specific adaptive immune responses in mice with nonalcoholic fatty liver disease. J Gastroenterol 45 卷 859-867 (2010) 査読有
 17. Hirooka M, Koizumi Y, Hiasa Y (他 5 名, 7 番目) Mass reduction by radiofrequency ablation before hepatic arterial infusion chemotherapy improved prognosis for patients with huge hepatocellular carcinoma and portal vein thrombus. AJR Am J Roentgenol 194 卷 W221-226 (2010) 査読有
 18. Kumagi T, Hiasa Y, Hirschfield GM. Hepatocellular carcinoma for the non-specialist. BMJ 339 卷 1366-1370 (2009) 査読有
 19. Hiraoka A, Michitaka K, Hiasa Y (他 16 名, 17 番目) Radiofrequency ablation therapy for hepatocellular carcinoma in elderly patients. J Gastroenterol Hepatol 25 卷 403-407 (2009) 査読有
 20. Michitaka K, Nishiguchi S, Hiasa Y (他 3 名, 4 番目) Etiology of liver cirrhosis in Japan: a nationwide survey. J Gastroenterol 45 卷 86-94 (2009) 査読有
 21. Tanaka Y, Nishida N, Hiasa Y (他 26 名, 18 番目) Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. Nat Genet 48 卷 1647-1650 (2009) 査読有
 22. Konishi I, Hiasa Y, Shigematsu S (他 7 名, 2 番目) Diabetes pattern on the 75 g oral glucose tolerance test is a risk

factor for hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus. Liver Int 29 卷 1194-1201 (2009) 査読有

[学会発表] (計 3 件)

1. Shigematsu S, Hiasa Y, Fukuda S (他 3 名, 2 番目). Characterization of ZNF689 in Human Hepatocellular Carcinoma as a Novel Target for Chemotherapy. The 62th AASLD. 2011 年 11 月 4 日. San Francisco, USA.
2. Uesugi K, Koizumi Y, Hiasa Y (他 8 名, 3 番目) Up-regulated Wilms' tumor 1 gene functions in anti-apoptosis: potential therapeutic target for hepatocellular carcinoma. The 61th AASLD. 2010 年 11 月 1 日. Boston, USA.
3. Hiasa Y, Tokumoto Y, Konishi I (他 4 名, 1 番目) Decrease of SOCS-3 by ME3738 contributes to its synergistic anti-HCV effects when combined with type I interferon. The 60th AASLD. 2009 年 11 月 3 日. Boston, USA.

[図書] (計 2 件)

1. 日浅陽一、恩地森一. 動物モデルによる HBV 増殖とその応用 B 型肝炎ウイルス研究の進歩. 日本臨床社 日本臨床 363-368 (2011) 査読無
2. 日浅陽一、上杉和寛、恩地森一. クリニカルトピックス Wilms' tumor 1 遺伝子と肝細胞癌. BIO Clinica 25 卷 349-353 (2010) 査読無

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: SEP (splenic elasticity for portal hypertension) score

発明者: 日浅陽一、廣岡昌史、恩地森一

権利者: 日浅陽一、廣岡昌史、恩地森一

種類: 特許権

番号: 特願 2011-130701

出願年月日: 2011 年 6 月 1 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

日浅 陽一 (HIASA YOICHI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 70314961

(2)研究分担者

なし