

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 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22501034

研究課題名（和文） 顕微質量分析法による代謝物分布情報に基づく腫瘍不均一性の検証

研究課題名（英文） Investigation of tumor heterogeneity through analyses of local distribution of tissue metabolites using imaging mass spectrometry

研究代表者

涌井 昌俊 (WAKUI MASATOSHI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：90240465

研究成果の概要（和文）：顕微質量分析イメージングにより腫瘍組織における種々の代謝物の局所分布の検出に成功し、これにより代謝適応を通じて形成される腫瘍の不均一性を示すことができた。この結果はがんの代謝学的側面への洞察を与え、診断・治療への応用開発に有用である。

研究成果の概要（英文）：We successfully detected local distribution of tissue metabolites by imaging mass spectrometry to reveal the tumor heterogeneity formed by metabolic adaptation. These results provide insights into the metabolomic aspects of tumor biology, aiding in the development of diagnostic and therapeutic application.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：腫瘍学

科研費の分科・細目：腫瘍学、腫瘍診断学

キーワード：がんの個性診断、腫瘍組織、顕微質量分析、代謝物、不均一性

1. 研究開始当初の背景

(1) 腫瘍の不均一性.

腫瘍細胞は種々のストレスに対して代謝適応を通じて生存性を高める。同一組織内において環境は様でないので、代謝適応により形成される腫瘍の不均一性が存在し、これががんの難治性につながると考えられる。しかし、代謝物の局在分布を直接的に観察可能な手法はこれまでに確立されていないため、そのような組織レベルでの腫瘍不均一性の実験的検証は容易ではない。

(2) 顕微質量分析法による生体分子の局在分布の検出.

マトリックス支援レーザー脱離イオン化

(MALDI) 法による質量分析イメージングを用いた腫瘍組織の検討が 2000 年代より報告され、腫瘍における種々の生体分子の局所分布が検出されてきたが、大半はタンパク・ペプチドであった。一方、2009 年度より科学技術振興機構 (JST) プログラムの一環として我々が携わってきた新たな顕微質量分析機器の実用化開発を通じて、低分子性代謝物を対象とする質量分析イメージングの可能性が示唆された (Harada et al. Anal. Chem. 2009)。

2. 研究の目的

動物実験モデル由来のサンプルを対象とする顕微質量分析イメージングを通じて腫瘍

不均一性を反映する代謝中間体の分布プロフィールを収集し、様々な細胞事象との関連づけを行い、分子代謝病態として把握する。ヒトがん検体を対象とする顕微質量分析イメージングを通じて、動物実験由来の知見の再現性・普遍性を検証し、さらに腫瘍病理学的側面から検討することで臨床的意義を追求する。これらにより、従来の組織学的検討とオミックス解析的手法では限界のあった腫瘍の代謝特性の理解にブレークスルーをもたらすことをめざす。

3. 研究の方法

(1) 動物実験モデルによる検討

① 対象候補となる代謝中間体の把握と検出条件の適正化のための基礎検討と顕微質量分析イメージングの実践。

対象となり得る代謝中間体の把握と、その検出のための組織切片の前処理やマトリックスの種類、質量分析のモードを確定するべく基礎検討を行う。免疫不全マウスにヒトがん細胞を移入して腫瘍巣を形成させるモデルを基本に、本研究の目的に則した実験条件の最適化を行ない、顕微質量分析イメージングを実践する。

② 顕微質量分析以外の手法による遺伝子・蛋白・代謝物の発現プロフィール解析。

空間情報を保持した免疫組織化学的検討、さらに溶解物を試料とする生化学・分子生物学的検討を通じて、遺伝子・蛋白・代謝物の発現プロフィールを解析する。これにより、細胞事象を裏付けるマーカー的知見および顕微質量分析で検出される代謝物分布を裏付ける傍証的知見を得る。

(2) ヒトがん臨床検体を対象とする検討予備検討を通じて最適なサンプリング法を確立し、がん症例の手術または生検により得られる検体を対象に顕微質量分析イメージングを実践する。

4. 研究成果

(1) ヒトがん肝転移モデルにおける検討。重度免疫不全を呈するNOGマウスの脾からヒト大腸がん細胞株を移入して経門脈的に肝へ転移巣を形成させるモデルにおいて、肝組織切片内に複数の微小転移巣が出現するようなプロトコルを完成した。

① 担がん肝組織における肝臓・腫瘍巣・血管特異的代謝物分子のイメージング。

組織・細胞に特異的な局在分布を呈する代謝物を対象に質量分析イメージングすることで、腫瘍部と非腫瘍部に識別できることを検証するため、DHBをマトリックスとしてMALDI法による顕微質量分析で陽イオン化分

子の検出とイメージングを実施した。その結果、2つのリン脂質であるホスファチジルエタノールアミンとホスファチジルコリン、ならびにヘムが検出され、それぞれ肝臓組織、がん転移巣、血管に主に分布していた。ヘムは血管内腔の赤血球由来と考えられる。これにより、代謝物の組織特異的分布を利用して腫瘍細胞と非腫瘍細胞を区別し、腫瘍の浸潤・転移形式についての検証に新たなアプローチをもたらす可能性が示唆された(涌井ら、日本臨床検査自動化学会誌、2010年)。

② 担がん肝における肝臓と腫瘍巣の代謝物イメージングと半定量的分析法の確立。

病変組織において腫瘍巣と非腫瘍部のそれぞれについての代謝特性を解析することは病理理解に有用であり、さらに腫瘍巣内における代謝物分布を検出し、その不均一性を非腫瘍部との異同と照らし合わせることで、同一腫瘍巣内において、より生物学的悪性度が強いがん細胞の存在、または正常組織と類似の代謝適応に基づく化学療法・放射線療法に対する抵抗性の存在を検証できる。

生体試料におけるキャピラリー電気泳動質量分析(CE-MS)により定量解析可能な代謝物に焦点を当ててMALDI法による質量分析イメージングを実施した結果、ヌクレオチド類(ATP, ADP, AMP, GTP, GDP, GMPなど)、糖ヌクレオチド(UDP-Hexose, UDP-HecNAcなど)、還元型グルタチオン(GSH)、酸化型グルタチオン(GSSG)をはじめ種々の低分子代謝物の特徴的分布が認められた。それらは、肝臓と腫瘍巣の間で相違があり、かつ一部の代謝物については腫瘍巣内での不均一性が認められた。また、その腫瘍巣内の不均一性は異なる代謝物の間で様相が異なることも観察できた。

複数のサンプルによって上述のような知見の再現性・普遍性を確認するのにあたり、定量性に難点があるMALDI法による質量分析は異なるサンプル間での定量的比較がそのままでは困難である。CE-MSの定量性能とMALDI法による質量分析イメージングの分子局在情報保持性能を組み合わせることで、異なるサンプル間における代謝物イメージングの半定量的評価系を確立した。具体的には、隣接する2つの組織切片の一方を顕微質量分析に用いて、他方をホモジナズしてCE-MSによる代謝物定量に用いる。人為的蛍光タンパク発現を利用して腫瘍巣を蛍光でマーキングし、蛍光を持たない非腫瘍部と明瞭に区別する。CE-MSで得られた個々の代謝物の組織切片全体の定量値に、イメージングで得られた腫瘍巣と非腫瘍性肝組織のそれぞれの代謝物の相対的シグナル強度および蛍光の有無で識別される両者の面積を掛け合わせることで、組織1gあたりの代謝物推定内容

量を算出することで異なるサンプル間における代謝物分布の半定量的評価に成功した (Kubo et al. Anal. Bioanal. Chem. 2011)。ATP, ADP, AMP の推定内容量およびそれらから計算されるエネルギーチャージ値をもとにイメージングを実施したところ、担がん肝のエネルギー代謝特性が示された。腫瘍巣における UDP-HecNAc や GSH の強い集積が認められた。それらは1つの腫瘍巣内で不均一に分布し、その不均一性は UDP-HecNAc と GSH の間に相違があった。UDP-HecNAc は糖鎖生成の基質であり、その増減はがんの糖鎖異常や分化度の変化を反映すると思われる。GSH は酸化ストレス処理の役割を担い、化学療法・放射線療法に対する抵抗性をもたらし、がん幹細胞では高い発現を示すと考えられている。UDP-HecNAc や GSH の不均一な分布は、腫瘍の分化度の多様性と治療抵抗性を反映すると理解される。

(2) ヒトがん皮下腫瘍モデルにおける検討
NOG マウスを宿主としてヒト大腸がん細胞株を移入して皮下腫瘍を形成させるモデルにおいて、腫瘍組織内部に酸素環境の違いによる不均一性が組織学的に認められるような腫瘍成長段階での検討に適したプロトコルを完成した。

非腫瘍組織と比較して腫瘍組織内にヌクレオチド、糖ヌクレオチド、グルタチオン、解糖中間体を含む種々の代謝物の強い集積が認められ、その多くは量的に不均一な分布を呈していた。がん細胞の酸化ストレス抵抗性や糖鎖異常に関連する代謝物が腫瘍部に一致して豊富に認められる一方、複数の代謝物の腫瘍組織内の不均一性が示された。また、これまで報告されていない、低酸素環境に対するがんの特異な代謝適応の存在を示唆する代謝中間体の特徴的局在分布も検出された。ヒトがん細胞株の低酸素培養実験検討にて、そのような代謝適応の存在を裏付けるような代謝関連遺伝子発現の挙動が観察された。このような低酸素環境に対するがんの特異な代謝適応の分子基盤を明らかにすることで新たながんの診断・治療の分子標的がもたらされることになる。

壊死部近傍において脂肪酸酸化亢進を示唆する代謝中間体の特徴的な分布が明らかとなり、低酸素や飢餓等の環境ストレスに対するがんの特異な代謝適応の存在が示唆された。その可能性の検証として実施した低酸素培養ヒト大腸がん細胞株のトランスクリプトーム解析にて、脂肪酸酸化の代謝関連遺伝子の一部、脂質代謝活性化に関わる PPAR ファミリー分子により誘導される複数の遺伝子、および心筋に特徴的な細胞骨格タンパク遺伝子の発現が上昇していた。電顕像では低酸素培養したヒト大腸がん細胞株にグリ

コーゲン顆粒が顕著に観察され、生化学的定量解析でもグリコーゲンが増加していた。etomoxir を用いた脂肪酸酸化の薬理的阻害により、低酸素培養における細胞生存の軽度減少とグリコーゲンの著明減少が認められた。心筋は基本的に脂肪酸酸化によりエネルギーを産生しグリコーゲンを貯蓄するが、エネルギー需要が急に増えた場合または脂肪酸酸化が障害された場合は細胞内グリコーゲンの分解で得られるグルコース-6-リン酸や血中のグルコースを利用して解糖によってエネルギーを生成する。これらの結果から、低酸素環境に対する腫瘍細胞の代謝適応の一環として心筋代謝とのアナロジーが存在する可能性が示された。得られた知見はこれまでに指摘されなかった腫瘍の代謝生物学的側面であり、がんの新たな診断・治療の分子標的となり得る (投稿準備中)。

(3) ヒトがん組織検体による検討
最適なサンプリング法を確立したうえで、ヒトがん手術検体を対象に MALDI 法による顕微質量分析の予備検討を行なった。

動物モデルと異なり、ヌクレオチド、糖ヌクレオチド、グルタチオン、解糖中間体等、主要基本経路の代謝物の良好なイメージングは得られなかった。原因として、血管の結紮・吻合処置等の切除前後で不可欠な術中手技が虚血性変化をもたらす組織代謝が人為的に変調をきたしてしまうためと考えられた。事実、採材にあたりそのような術中手技の必要がない動物モデルのサンプルでは前述のように良好なイメージングが得られた。

リン脂質、コレステロール、胆汁酸の代謝中間体等については良好なイメージングが得られ、腫瘍部に特徴的かつ不均一な分布が認められた。これらの脂質代謝物は術中手技による影響が十分小さく評価可能であり、その組織局在は、これまでの形態学的組織所見のみでは限界のあった腫瘍病理学的理解を深化させる極めて有用な所見と考えられるその有用性を確立するのに今後さらなる検討の集積が必要である。

乳房生検は、MALDI 法による顕微質量分析に量的に十分ながん検体が得られ、かつ手術のような腫瘍組織の代謝の変調をきたすような手技が伴わない。実際にヌクレオチド、糖ヌクレオチド、グルタチオン等の良好なイメージングが得られた。支障なく十分量の採材が可能な生検であれば、動物モデルと同様に主要基本経路の代謝物のイメージングの対象となることが示された。知見の確立には今後さらなる検討の集積を要する。

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 11 件)

- ① Yamazaki H, Chijiwa T, Inoue Y, Abe Y, Suemizu H, Kawai K, Wakui M, Furukawa D, Mukai M, Kuwao S, Saegusa M, Nakamura M. Overexpression of the miR-34 family suppresses invasive growth of malignant melanoma with the wild-type p53 gene. *Exp Ther Med.* 3 (5): 793-796, 2012 (査読有り) .
- ② Hayasaka T, Goto-Inoue N, Ushijima M, Yao I, Yuba-Kubo A, Wakui M, Shigeki Kajihara S, Matsuura M, Setou M. Development of imaging mass spectrometry (IMS) dataset extract software, IMS convolution. *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (1): 183-193, 2011 (査読有り) .
- ③ Kubo A, Ohmura M, Wakui M, Takeshita K, Harad T, Kajihara S, Ogawa K, Suemizu H, Nakamura M, Setou M, Suematsu M. Semi-quantitative analyses of metabolic systems of human colon cancer metastatic xenografts in livers of superimmunodeficient NOG mice. *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (7): 1895-1904, 2011 (査読有り) .
- ④ Yamauchi Y, Izumi Y, Asakura K, Fukutomi T, Serizawa A, Kawai K, Wakui M, Suematsu M, Nomori H. Lovastatin and valproic acid additively attenuate cell invasion in ACC-MESO-1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 410 (2): 328-332, 2011 (査読有り) .
- ⑤ Asakura K, Izumi Y, Yamamoto M, Yamauchi Y, Kawai K, Serizawa A, Mizushima T, Ohmura M, Kawamura M, Wakui M, Adachi T, Nakamura M, Suematsu M, Nomori H. The cytostatic effects of lovastatin on ACC-MESO-1 cells. *J. Surg. Res.* 170 (2): e197-209, 2011 (査読有り) .
- ⑥ Hasegawa M, Kawai K, Mitsui T, Taniguchi K, Monnaoi M, Wakui M, Ito M, Suematsu M, Peltz G, Nakamura M, Suemizu M. The reconstituted 'humanized liver' in TK-NOG mice is mature and functional. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 405 (3): 405-410, 2011 (査読有り) .
- ⑦ Ono Y, Kawachi S, Hayashida T, Wakui M, Tanabe M, Itano O, Obara H, Shinoda M, Hibi T, Oshima G, Tani N, Mihara K, Kitagawa Y. The influence of donor age on liver regeneration and hepatic progenitor cell populations. *Surgery.* 150 (2): 154-161, 2011 (査読有り) .
- ⑧ 涌井昌俊、久保亜紀子、大村光代、末松

誠. 質量分析によるがんの分子イメージング. *最新医学* 66 (10): 2321-2329, 2011 (査読無し) .

- ⑨ Matsuyama M, Wakui M, Monnai M, Mizushima T, Nishime C, Kawai K, Ohmura M, Suemizu H, Hishiki T, Suematsu M, Murata M, Chijiwa T, Furukawa D, Ogoshi K, Makuuchi H, Nakamura M. Reduced CD73 expression and its association with altered purine nucleotide metabolism in colorectal cancer cells robustly causing liver metastases. *Oncol. Lett.* 1: 431-436, 2010 (査読有り) .
- ⑩ 涌井昌俊、久保亜紀子、末松誠、村田満. 生命科学・医学領域における質量分析イメージングの展開：臨床検査への応用の可能性. *日本臨床検査自動化学会会誌* 35 (3): 269-276, 2010 (査読無し) .
- ⑪ 涌井昌俊、末水洋志. NOG マウスを用いたヒト化動物モデルの研究展開. *生化学* 82 (4): 314-318, 2010 (査読無し) .

〔学会発表〕 (計 17 件)

- ① Matsuura M, Ushijima M, Yuba-Kubo A, Wakui M, Hosaka K, Hayasaka T, Masaki N, Goto-Inoue N, Miyata S, Yao I, Setou M, Ogawa K, Kajihara S. New software for imaging mass spectrometry data. Presented at the 103rd Annual Meeting of American Association for Cancer Research in Chicago, Illinois, USA, March 31-April 4, 2012.
- ② Kubo A, Ohmura M, Hishiki T, Wakui M, Kawai K, Nishime C, Murata M, Setou M, Suematsu M. Semi-quantitative microscopic MALDI imaging for metabolites in human colon cancer-bearing livers of superimmunodeficient NOG mice. Presented at the 59th American Society for Mass Spectrometry (ASMS) Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics in Denver, Colorado, USA, June 5-9, 2011.
- ③ Ushijima M, Kajihara S, Hosaka K, Hayasaka T, Goto-Inoue N, Yuba-Kubo A, Wakui M, Yao I, Setou M, Matsuura M. Software for peak picking using common peak method for imaging mass spectrometry data. Presented at the 59th American Society for Mass Spectrometry (ASMS) Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics in Denver, Colorado, USA, June 5-9, 2011.
- ④ 久保亜紀子、大村光代、涌井昌俊、小河 潔、瀬藤光利、末松 誠. ヒト大腸ガンの *In vivo* 代謝を質量顕微鏡で観る. 第 63 回

- 日本細胞生物学会大会、北海道、2011年6月27日～29日。
- ⑤ 久保亜紀子、大村光代、涌井昌俊、小河 潔、瀬藤光利、末松 誠. 質量顕微鏡 (MALDI-IT-TOFMS) と CE-MS を用いたヒト大腸がん肝転移モデルの局所代謝解析. 第38回 BMS コンファレンス (BMS2011)、神奈川県、2011年7月10日～12日。
- ⑥ 牛嶋大、梶原茂樹、保坂蔵人、宮田敏、早坂孝宏、井上菜穂子、正木紀隆、久保亜紀子、涌井昌俊、矢尾育子、小河潔、瀬藤光利、松浦正明. イメージング質量分析に基づいて領域を判別するソフトウェアの開発. 第59回日本質量分析学会総合討論会、大阪府、2011年9月13日～15日。
- ⑦ 久保亜紀子、大村光代、涌井昌俊、小河 潔、瀬藤 光利、末松 誠. 質量顕微鏡と CE-MS を用いたヒト大腸がん肝転移モデルの *in vivo* flux 解析の試み. 第36回日本医用マスペクトル学会年会、大阪府、2011年9月15日～16日。
- ⑧ Matsuyama M, Wakui M, Monnai M, Mizushima T, Nishime C, Kawai K, Ohmura M, Suemizu H, Hishiki T, Suematsu M, Murata M, Chijiwa T, Furukawa D², Ogoshi K, Makuuchi H, Nakamura M. Reduced ecto-5' -nucleotidase CD73 expression and altered purine nucleotide metabolism in colorectal cancer cells robustly causing liver metastases. Presented at the 101st Annual Meeting of American Association for Cancer Research in Washington, DC, USA, April 17-21, 2010.
- ⑨ Mizushima T, Kawai K, Nishime C, Ohmura M, Hayakawa E, Matsuyama M, Asakura K, Izumi Y, Suemizu H, Ohnishi Y, Nakamura M, Suematsu M, Wakui M. Adaptation of cancer cells to hypoxic environments for tumor progression. Presented at the 101st Annual Meeting of American Association for Cancer Research in Washington, DC, USA, April 17-21, 2010.
- ⑩ Ohmura M, Handa K, Nishime C, Mizushima T, Kawai K, Hishiki T, Yamamoto T, Wakui M, Suemizu H, Namakura M, Kiyagawa Y, Suematsu M. Metabolomic profiling of the liver bearing human colon cancer metastasis in superimmunodeficient NOG mice. Experimental Biology 2010, Anaheim, California, USA, April 24-28, 2010.
- ⑪ Yasuno M, Kajihara S, Morinaga H, Ikegami M, Ogawa K, Kubo A, Wakui M, Hayasaka T, Setou M. A novel method to display the structural features included in the mass spectrometry imaging dataset. Presented at the 58th American Society for Mass Spectrometry (ASMS) Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics in Salt Lake City, Utah, USA, May 23-27, 2010.
- ⑫ Kubo A, Ohmura M, Wakui M, Kawai K, Nishime C, Hishiki T, Murata M, Ogawa K, Setou M, Suematsu M. Microscopic imaging mass spectrometry on hepatic micrometastasis of human colon cancer xenografts in superimmunodeficient NOG mice. Presented at the 58th American Society for Mass Spectrometry (ASMS) Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics in Salt Lake City, Utah, USA, May 23-27, 2010.
- ⑬ Ohmura M, Kubo A, Handa K, Nishime C, Mizushima T, Kawai K, Hishiki T, Yamamoto T, Wakui M, Suemizu H, Nakamura M, Kitagawa Y, Setou M, Suematsu M. Transportal metastasis of human colon cancer impairs gluconeogenesis in superimmunodeficient NOG mice. The 9th World Congress for Microcirculation, Paris, France, Sept 26-28, 2010.
- ⑭ 森永浩子、梶原茂樹、安野元英、池上将弘、小河潔、久保亜紀子、涌井昌俊、早坂孝宏、瀬藤光利. Imaging Mass Spectrometry データにおける構造解析ソフトの開発. 第58回日本質量分析学会総合討論会/第1回アジア・オセアニア質量分析会議、茨城県、2010年6月16日～18日。
- ⑮ 久保亜紀子、大村光代、涌井昌俊、末松誠. 質量顕微鏡と CE-MS による担がん肝の局所代謝解析. 第35回日本医用マスペクトル学会年会、愛知県、2010年9月9日～10日。
- ⑯ 大村光代、久保亜紀子、菱木貴子、川井健司、涌井昌俊、末水洋志、中村雅登、小河潔、瀬藤光利、末松誠. 高分解能質量顕微鏡を用いたがん転移肝のエネルギー代謝変動の解明. 第5回メタボロームシンポジウム、山形県、2010年9月9日～11日。
- ⑰ 大村光代、久保亜紀子、菱木貴子、川井健司、涌井昌俊、末水洋志、中村雅登、瀬藤光利、末松誠. 高分解能質量顕微鏡によるがん転移肝の代謝プロファイルの解明. 第83回日本生化学会大会、兵庫県、2010年12月7日～10日。

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

①名称：質量分析データ処理方法及び装置
発明者：松浦 正明、牛嶋 大、涌井昌俊、
瀬藤光利、梶原茂樹、小河 潔
権利者：公益財団法人がん研究会、株式会社
島津製作所、国立大学法人浜松医科大学、
学校法人慶應義塾
種類：特許
番号：特願 2012-102636、特開 2012-237753
出願年月日：2012 年 4 月 27 日
国内外の別：国内

②名称：MASS-ANALYSIS DATA PROCESSING
METHOD AND SYSTEM
発明者：Masaaki Matsuura, Masaru
Ushijima, Masatoshi Wakui, Mitsutoshi
Setou, Shigeki Kajihara, Kiyoshi Ogawa
権利者：JAPANESE FOUNDATION FOR CANCER
RESEARCH, SHIMADZU CORPORATION,
National University Corporation
Hamamatsu University Of Medicine, KEIO
UNIVERSITY
種類：特許
番号：US. Patent Application
NO.13/458,850; US. Patent Application
Publication NO.US2012/0278037 A1
出願年月日：2012 年 4 月 27 日
国内外の別：国外

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

涌井 昌俊 (WAKUI MASATOSHI)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：90240465

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし