

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 20 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591257

研究課題名（和文）TrkB のリン酸化；側坐核における薬物依存習慣化の分子スイッチの機序解明と治療法

研究課題名（英文）The functional significance of TrkB phosphorylation in the rat nucleus accumbens as a molecular switch of habit formation in drug addiction

研究代表者

戸田 重誠（TODA SHIGENOBU）

金沢大学・大学病院・講師

研究者番号：00323006

研究成果の概要（和文）：

神経活動依存性のタンパク質翻訳に関わる分子、TrkB および ribosomal protein S6 (rpS6) のリン酸化は、神経可塑性や学習記憶に関与する。我々はラット側坐核において、TrkB の記憶の統合と獲得にそれぞれ特異的に関与するリン酸化部位、ならびに rpS6 で mTOR 依存性および非依存性に活性化される 2 つのリン酸化部位に注目し、対照群と慢性コカイン投与群で、急性コカイン後にそれぞれ異なった活性化が起きることを確認した。動物のコカイン依存行動を正常化する N-アセチルシステインは、TrkB-mTOR 系のリン酸化に影響しなかった。

研究成果の概要（英文）：

The phosphorylations of TrkB and ribosomal protein S6 that play crucial roles in activity-dependent protein synthesis contribute to neuronal plasticity and learning/memory. In this study, we examined the effect of cocaine challenge on the important phosphorylation sites of TrkB and rpS6 in the rat nucleus accumbens after repeated saline or cocaine administration. As for TrkB, two distinct phosphorylation sites, one is required for memory acquisition, the other is for memory consolidation, were investigated. Likewise, as for rpS6, two distinct phosphorylation sites, one is mTOR-dependent, other is mTOR-independent, were examined. As a result, we found that the pattern of phosphorylation at each site was so distinctively different between control and chronic-cocaine-treated rats. N-acetylcysteine, which is supposed to restore cocaine-seeking behaviors in rodents did not provide any effect on the phosphorylations in TrkB-mTOR pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：精神医学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：精神薬理学、薬物依存

1. 研究開始当初の背景

覚せい剤やコカインなどによる薬物依存

では、常習者の多くは、一度依存が形成されてしまうと、例え尋常でない犠牲を払っても、

あるいは刑法で処罰を与えられても、乱用を繰り返してしまう。依存を形成した動物でも、薬物と同時に電気ショック（＝罰）を与えられても、薬物摂取行動を制止できない。すなわち依存とは、本質的には行動自製の障害である。しかし、依存患者は条件反射的・無意識的・自動的に発動する薬物への渴望および要求行動の出力を自分で制御できない。動物の意思決定では、結果の善し悪しや不利な結果にも関わらず、ある刺激に対して決まった行動を条件反射的、無意識的・自動的に発動する行動様式を「習慣 (habit)」と呼ぶ。習慣の獲得・出力は、感覚運動野から投射を受ける背外側線条体によって担われる。一方、行動の結果に敏感に反応し臨機応変に戦略を修正させる行動様式は、「目的指向性行動 (goal-directed behavior)」と定義され、前頭前野や海馬から投射を受ける腹側線条体（側坐核を含む）によって担われる。この二つの行動様式は、併行する背外側と腹側の線条体回路間の相互抑制によって機能的バランスをとっているが、どちらかの回路を一時的にでも不活化されると、バランスが崩れ、活性の残ったもう片方が強く出力される。薬物依存ではこの回路間バランスが崩れ、背外側線条体の機能が優位となり、例え身体的あるいは社会的に不適切であっても、習慣化した薬物要求行動は訂正不能のまま強迫的に繰り返し出力される、と考えられている。近年、酸化ストレスの防止薬として知られる N-アセチルシステイン (N-acetylcysteine: NAC) に強迫的な薬物欲求行動を抑制する効果があることが、動物およびヒトで確認された。一方、依存モデル動物では様々な分子レベルの変化によって側坐核の機能（可塑性）が低下するが、NAC はこの可塑性を正常化させることから、側坐核の可塑性が直接背外側線条体-側坐核間の回路間バランスに関与すると示唆されている。しかしながら、この可塑性低下状態をもたらす分子スイッチは何か、また NAC がいかに側坐核可塑性を回復させるかの分子機序は不明であった。

2. 研究の目的

薬物依存の習慣化は、依存難治化の最大の要因の一つである。習慣化した行動の出力は、腹側線条体（側坐核）の機能に比べ、背外側線条体の機能が優位な場合に促進される。これまでの本研究グループの予備検討から慢性的にコカインを投与された動物の側坐核では、脳由来神経栄養因子 (BDNF) の受容体である TrkB 下流の機能が、対照群に比べ著しく低下していることが強く示唆されてきた。この事実は側坐核の可塑性、特に単オパ

ク質合成系が低下し、背外側線条体-側坐核間の回路間均衡が、背外側線条体側に傾いている可能性を示唆する。そこで本研究では側坐核 TrkB リン酸化の機能的意義を解明し、慢性コカイン投与動物の側坐核 TrkB リン酸化を正常化することで、依存行動の治療を目指す。

3. 研究の方法

①急性及び慢性コカイン投与がラット側坐核 TrkB にて特定の機能に関与するリン酸化に及ぼす影響の検討; TrkB 及びその下流でリン酸化により活性化される mTOR は、神経活動依存性のタンパク質合成において、重要な役割を担う。我々はこれまでの検討から、対照動物群の側坐核では、急性コカイン投与が約 6 時間かけて長期増強現象 (LTP) に類似したシナプスタンパク質の蓄積、スパイン数の増大、field potential の増強を誘導するが、過去に慢性にコカインを投与された動物では、対照群に比べ早くスパインサイズの増大が誘導される一方（＝早期 LTP の促進）、シナプスタンパク質の増加を伴わないためそれが維持されず一過性に留まり、field potential の増強も起こらず 6 時間後には元の形態に戻る（＝後期 LTP の不成立）ことを確認した (Toda et al, JNS, 2006; Toda et al, JNS, 2009)。これらの知見は、慢性コカイン投与後の側坐核で、後期 LTP の成立に不可欠な神経活動依存性のタンパク質合成系が障害されている可能性を強く示唆する。そこで、本研究では、まず神経活動依存性のタンパク質合成にて主要な役割を担う脳由来神経栄養因子 (BDNF) の受容体、TrkB の活性に着目した。TrkB の複数のリン酸化部位のうち、チロシン 516 残基 (Y516) は Shc が結合し、下流で mTOR が活性化され、記憶の統合（＝後期 LTP に相当）に関与するとされる。一方、チロシン 817 残基 (Y817) は、phospholipase C γ (PLC γ) が結合し、記憶の獲得（＝早期 LTP に相当）に関与するとされる (Musumeci et al, JNS, 2009)。そこで、急性コカイン投与が主に Y817 のリン酸化を誘導する一方、同リン酸化の誘導が慢性コカイン投与後に抑制される、との仮説を立て、これを立証すべく急性及び慢性コカイン投与がラット側坐核 TrkB の Y516 および Y817 のリン酸化に与える影響について生化学的な検討を行った。具体的には、対照動物（雄性ラット）、および慢性にコカインを投与し、その後 3 週間休薬した動物の 2 群を用意し、それぞれに急性にコカインを腹腔内投与し、その 0 分、15 分、45 分、2 時間、6 時間後に動物脳の側坐核を取り出し、細胞分画法を用いてシナプス外面分を精製した。続いてウェスタン法を用いて上記 2 つのリン酸化に関し、急性コカイン投与後変化を対照群の 0 分

の動物を基準に比較検討した。統計には 2-way ANOVA を用いた。

②急性及び慢性コカイン投与がラット側坐核にて ribosomal protein S6 特定の機能に 関与するリン酸化に対する影響の検討；TrkB とその下流の mTOR は神経活動依存性のタンパク質翻訳において主要的な役割を担うと 想定されている。その一方、TrkB-mTOR に非 依存性のタンパク質合成系の存在も神経細胞 にて確認されているが (Ul-Hussain et al, Brain res, 2012)、その機能的な意義は十分 解明されていない。ERK の下流にあり、タン パク質合成に不可欠とされるタンパク質、 ribosomal protein S6 (rpS6) には、 TrkB-mTOR によってリン酸化される ser240-244 と、TrkB-mTOR には非依存的に PKA-DARPP-32 によって活性化されるリン 酸化部位 ser235-236 (Roux et al, JBC, 2007;Valjent et al, Neuropsychopharmacology, 2011) の 2 つが ある。そこでこの二つのリン酸化部位につい て、①と同様の検討を行う。

③リン酸化阻害ペプチドによる側坐核 TrkB の 2 つのリン酸化部位、Y516 と Y817 の機能的 意義の検討；①による検討の結果、Y516 と Y817 の活性化は側坐核のタンパク質合成 依存性の神経可塑性、あるいは側坐核が関与 するコカイン依存行動において、重要な役割 を担う可能性が強く示唆された。そこで、両 リン酸化部位それぞれを特異的に競合阻害 する細胞透過性 TAT ペプチドを作製し、*in vivo* で直接ラット脳側坐核に注入し、各リン 酸化部位のシグナル伝達系の下流を明らか にするとともに、側坐核神経可塑性における 機能的意義を調べる。つづいて、慢性コカイン 投与動物の側坐核神経可塑性を回復させる NAC が、Y516 と Y817 のリン酸化に及ぼす 影響について検証する。最後に、慢性コカイン 投与後動物の異常なリン酸化パターンを、 細胞透過性ペプチドを用いて正常化すること で、上記のシグナル伝達系を回復させ、薬 物依存関連行動を抑制できるか、連帯研究者 の協力を得て行動薬理学的に検討する。

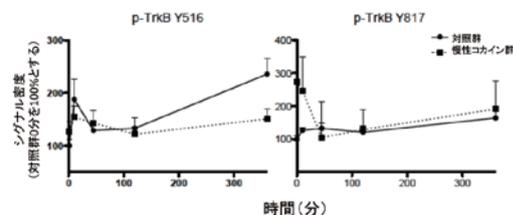
④NAC あるいはドパミン遮断薬が TrkB の下流 あるいは rpS6 のリン酸化に与える影響の検 討；慢性コカイン投与動物のコカイン要求行 動は、主要な抗酸化物質でありなが側坐核の 細胞外グルタミン酸濃度を正常化させる機 能をもつ N-アセチルシステイン (NAC) によ って抑制される。また、NAC は、慢性コカイン 投与によって障害される側坐核の長期増 強現象、あるいは長期抑制現象を正常化する (Kalivas, Nat Rev Neurosci, 2009)。そこ で、NAC の上記作用が①②で確認されたコカ イン投与による mTOR あるいは rpS6 のリン 酸化の変化を正常化することによるものか、生 化学的に検討する。具体的には対照動物ある

いは慢性コカイン投与動物に NAC あるいは溶 媒を動物に腹腔内注射し、その 2.5 時間後に 側坐核を取り出し、ウェスタン法を用いて NAC の影響を検証する。ドパミン遮断薬に着 いても同様の検討を行う。

4. 研究成果

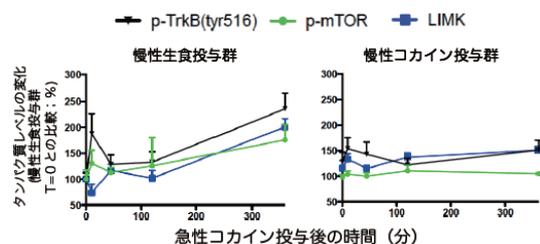
①TrkB の Y516 のリン酸化は、対照動物群では 急性コカイン投与によって投与直後と、6 時 間後までの 2 回誘導された。これに対し、慢 性コカイン投与歴のある動物では、同じ刺激 によっても Y516 のリン酸化は誘導されなかつ た。一方、Y817 のリン酸化は対照動物群では 殆ど観察されなかったが、慢性コカイン投与 動物では、ベースラインが対照群に比べ 2 倍 以上になっており、しかも急性コカイン投与 によって、急速に脱リン酸化が進み、45 分 後にはベースラインに戻った (図 1)。慢性コ

図1 急性コカイン投与後の側坐核TrkBの2つのリン酸化部位の活性化の違い



カイン投与歴のある動物において、急性コカ イン投与は一過性ではあるが側坐核における 障害された神経可塑性を回復させると考えら れており (Kourrich et al, JNS, 2007;Mu et al, JNS, 2010)、Y817 の急性コカイン投与後

図2 TrkBのY516リン酸化と、その下流タンパク質の関係

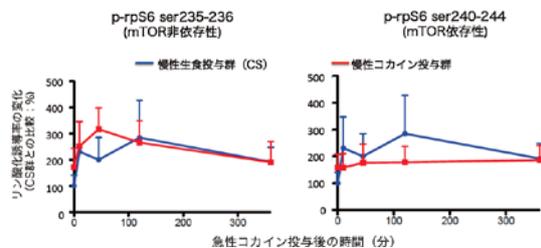


の脱リン酸化は、この仮定に関する可能性 がある。さらに、Y516 のリン酸化の結果とし てリン酸化が誘導される mTOR、さらにその 結果として翻訳されるアクチン重合促進キナ ーゼである LIMK1 (Schratt et al, Nature, 2006) の急性コカイン投与後の誘導パターンを比 較したところ、予想されたように極めて Y516 のリン酸化と符合した結果がみられた (図 2)。以上より、慢性コカイン投与動物における Y516 のリン酸化誘導の障害は、タンパク質翻 訳からアクチン重合促進、スパインの安定な 形成にいたる後期 LTP の成立を阻害すると考 えられ、慢性コカイン投与動物の側坐核で観 察される現象に極めて良く符号する。一方、 慢性コカイン投与動物における Y817 のリン酸

化亢進は、慢性コカイン投与動物の側坐核における神経可塑性障害の一端を担う可能性が示唆された。

②急性及び慢性コカイン投与がラット側坐核にてribosomal protein S6特定の機能に参与するリン酸化に対する影響の検討；mTOR依存性のser240-244は、対照動物群では急性コカ

図3 側坐核rpS6の急性コカイン投与後の2つのリン酸化部位におけるリン酸化誘導



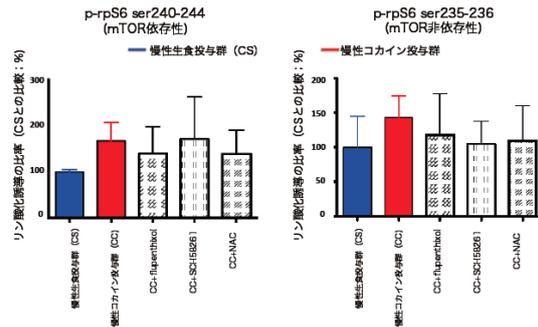
イン投与により、15分後ならびに2時間後の2つのピークを認めた。このパターンはmTORのリン酸化誘導に似るが、mTORが6時間後に2回目のピークを迎えていることは、時間的に一致していない。これに対し慢性コカイン投与群では、ベースラインは有意に上昇していたが、急性コカイン投与による誘導は強く抑制されていた(図3)。一方、mTOR非依存性のser235-236のリン酸化は、対照動物群では、ser240-244と類似したパターンを示したが、慢性コカイン投与群では、ベースラインの優位な上昇を認めた他、退職群でいったん脱リン酸化が誘導される45分後でも引き続きリン酸化の維持を認めた(図3)。

③Y516ならびにY817のリン酸化・脱リン酸化の特異的阻害システムの確立；Y516とY817のリン酸化・脱リン酸化をそれぞれ特異的に阻害する細胞膜透過性TATペプチドを設計・合成し、in vivoでの実験を開始した。具体的には、リン酸化阻害の目的には同じリン酸化部位を含む前後約10アミノ酸配列に、細胞透過性を保証するTAT配列を連結したペプチドを設計、合成した。脱リン酸化阻害実験には、リン酸化部位が既にリン酸化された状態のペプチドを合成し、脱リン酸化酵素の基質を飽和させることで側坐核内TrkBリン酸化の脱リン酸化阻害を試みた。対称実験には、リン酸化部位を挟む前後の配列を逆転させたものを用いた。ペプチドは定位脳手術を行い、ラット側坐核にガイドカニューラを移植した動物を用意し、手術の1週間後にペプチド溶液の微小注入を行い、その30分後に側坐核を取り出してウェスタン法によりペプチドの効果を確認した。しかしながらこれらのペプチドは期待された効果を示さず、残念ながら行動実験に進むことができなかった。また、mTORの阻害剤、ラパマイシンを直接ラット腹腔内

に注射し、慢性コカイン投与群で観察されるY516およびmTORリン酸化誘導の障害を薬理的に模倣することを試みたが、ラパマイシンが脳血液関門を通過しなかったらしく、脳内での効果は確認できなかった。

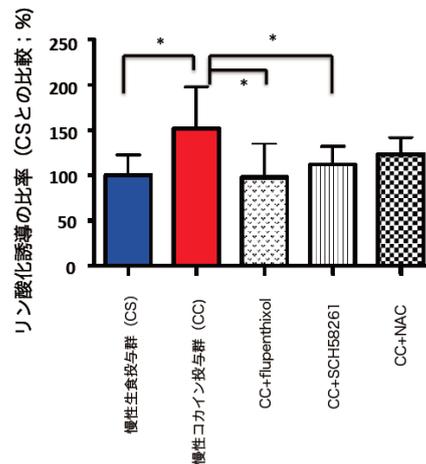
④NACあるいはドパミン遮断薬がTrkBの下流あるいはrpS6のリン酸化に与える影響の検討；NACはY516とY817のいずれのリン酸化レベルにも影響を与えなかった。またドパミンD1/D2遮断薬のflupenthixol、アデノシンA2A遮断薬のSCH58261も同様であった(図4)。

図4 rpS6の2つのリン酸化部位に対するNACやドパミン遮断薬等の影響



同様に、NACはTrkBのY817とmTORのリン酸化にも影響を与えなかった(図5；mTORはデータ省略)。しかし、TrkBのY817のリン酸化はflupenthixolとSCH58261によって正常化された。このことから同リン酸化の誘導は、ドパミンおよびアデノシン、特にD2受容体とアデノシンA2A受容体を同時に発現しているD2受容体陽性細胞で起きている可能性が示唆された(図5)。

図5 p-TrkB Y817に対するNACやドパミン遮断薬等の影響



考察；以上の結果より、慢性にコカインを投与された動物では、タンパク質合成系は、TrkB-mTOR依存性から、非依存性にシフトすることが示唆された。また、NACはTrkB依存性、非依存性に関わらず、タンパク質合成系を介してコカイン要求行動を抑制している可能性は極めて低いと推察された。本研究グループによる別の研究より、NACは慢性コカイン投与動物では、シナプス関連タンパク質

の分解誘導に関わることが示唆されている。したがって本課題の結果と合わせて考察すると、①NAC の効果は、タンパク質合成系への影響ではなく、分解系への影響であること、②NACはTrkBおよびその下流には直接影響を与えていない、と結論された。NAC の効果が一時的であることを考えるなら、NAC と TrkB のリン酸化を正常化できる薬剤を併用することで、タンパク質の合成系、分解系をそれぞれターゲットとしてより長期的な効果をもつ依存症治療薬の開発が可能かもしれない。一方、rpS6 ser235-236 のリン酸化はドパミン D2 受容体陽性の中型有棘神経細胞 (=D2-MSM; 間接路) が、ドパミン D2 受容体アンタゴニストであるハロペリドールを投与された時活性化されると報告されており (Valjent et al, Neuropsychopharmacology, 2011)、慢性コカイン投与歴のある動物で間接路が“不活化”されていることを示唆しており、最近の報告と一致するのみならず (Bock et al, Nat Neurosci, 2013)、間接路の“不活化”にはタンパク質翻訳系の活性化が関与している可能性を示唆している。すなわち、同タンパク質翻訳経路を遮断することで、間接路の“不活化”が解除され、依存行動の正常化が期待できる可能性があり、今後依存症治療薬の開発に役立つ可能性がある。本研究の成果は、他の研究の成果と、幾つかの追加実験の結果と合わせ、現在投稿準備中である。

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 3 件)

(1) Shen H, Moussawi K, Zhou W, Toda S, Kalivas PW. Heroin relapse requires long-term potentiation-like plasticity mediated by NMDA2b-containing receptors. Proc Natl Acad Sci USA 査読有, 2011, 108:19407-12. doi:10.1073/pnas.1112052108.

(2) S Toda, Haowei Shen, and Peter W Kalivas. Inhibition of actin polymerization prevents cocaine-induced changes in spine morphology in the nucleus accumbens. Neurotoxicity Research 査読有, 2010, 18:410-415. doi:10.1007/s12640-010-9193-z.

(3) 戸田重誠、「線条体ドーパミンと精神機能 (疾患)」北陸神経精神医学雑誌、査読なし、2010, 24:7-17.

[学会発表] (計 17 件)

(1) Shigenobu Toda The Relevance of Glutamate and Glutathione Homeostasis in Decision-Making and Cocaine Addiction.

第35回日本神経科学学会 (招待講演), 2012年09月18日~2012年09月21日, 名古屋国際会議場 (愛知)

(2) Yoshio Iguchi, Sakurako Kosugi, Yoshio Minabe, Shigenobu Toda Cocaine differently affects redox status in the rat nucleus accumbens and dorsal striatum. 第35回日本神経科学学会, 2012年09月18日~2012年09月21日, 名古屋国際会議場 (愛知)

(3) Shigenobu Toda, Sakurako Kosugi, Yoshio Iguchi, Yoshio Minabe Dopamine antagonist induces reductions in PSD proteins in the rat nucleus accumbens after repeated cocaine administration. Annual meeting of Society for Neuroscience, 2011年11月13日, Convention Center, DC (USA)

(4) 戸田重誠, 「覚せい剤精神病」, 第21回日本臨床精神神経薬理学会・第41回日本神経薬理学会合同年会, 2011年10月27日, 京王プラザホテル (東京)

(5) Shigenobu Toda, Sakurako Kosugi, Yoshio Iguchi, and Yoshio Minabe Glutamate-independent effects of N-acetylcysteine on synaptic protein turnover in the rat nucleus accumbens after repeated cocaine administration. 第32回内藤コンファレンス「こころの機能と疾患の分子機構」, 2011年10月20日, 八ヶ岳ロイヤルホテル (山梨)

(6) 戸田重誠, 「コカイン依存における側坐核の役割; ドーパミン、グルタミン酸、そして酸化ストレス」, アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会, 2011年10月14日, 愛知県産業労働センター (愛知)

(7) 戸田重誠, 「側坐核の可塑性と薬物依存; ドーパミン、グルタミン酸に続く因子」, 情動研究会「感覚刺激・薬物による快・不快情動生成機構とその破綻」, 2011年10月6日, 国立岡崎生理学研究所 (愛知)

(8) Shigenobu Toda, How do drugs of addiction alter the neuronal functions in the nucleus accumbens?: implications of oxidative stress. 日本神経化学学会大会, 2011年9月27日, 瑠璃光 (石川)

(9) Shigenobu Toda, Sakurako Kosugi, Yoshio Iguchi, Yoshio Minabe Dopamine antagonist induces reductions in PSD proteins in the rat nucleus accumbens after repeated cocaine administration 日本神経科学大会, 2011年9月17日, パシフィコ横浜 (神奈川)

(10) Shigenobu Toda, Sakurako Kosugi, Yoshio Iguchi, Yoshio Minabe How do drugs of addiction alter the neuronal functions in the rat nucleus accumbens?:

implications of oxidative stress. Gordon Research Conference, "Catecholamine" Aug 10th 2011, Bates College, Maine (USA)

(11) Shigenobu Toda, Sakurako Kosugi, Haowei Shen, Yoshio Iguchi, Tetsu Hirosawa, Yoshio Minabe, Peter W Kalivas

Role of PSD structure sustained by action and dopamine in the rat nucleus accumbens after repeated cocaine administration.

Annual meeting of society for neuroscience, 2010年11月17日, Convention Center, San Diego (USA)

(12) Sakurako Kosugi, Yoshio Iguchi, Tetsu Hirosawa, Yoshio Minabe, Shigenobu Toda Differential subcellular localization of GluR1 and GluR2 in the nucleus accumbens after repeated cocaine administration; implications for the role of glutamatergic tone in protein turnover. 2010年11月17日, Convention Center, San Diego (USA)

(13) Sakurako Kosugi, Yoshio Iguchi, Tetsu Hirosawa, Yoshio Minabe, Shigenobu Toda Differential subcellular localization of GluR1 and GluR2 in the nucleus accumbens after repeated cocaine administration; implications for the role of glutamatergic tone in protein turnover. Molecular and cellular cognitive society, 2010年11月11日, Convention Center, San Diego (USA)

(14) Shigenobu Toda, Sakurako Kosugi, Haowei Shen, Yoshio Iguchi, Tetsu Hirosawa, Yoshio Minabe, Peter W Kalivas

Cocaine-induced metaplasticity may be based on the altered balance between protein translation and protein elimination in the rat nucleus accumbens; implications of glutamatergic tone for protein turnover. Aquitaine conference on neuroscience, 2010年10月14日, Palais des Congres, Archachon (France)

(15) 戸田重誠, 「物質依存」第20回日本臨床精神神経薬理学会・第40回日本神経精神薬理学会 合同年会 (招待講演)、2010年9月14日、仙台国際会議場 (宮城)

(16) Sakurako Kosugi, Yoshio Iguchi, Yoshio Minabe, Shigenobu Toda Subcellular localization of GluR1 and GluR2 and their regulatory factors in the nucleus accumbens of repeatedly cocaine-administrated rats; implications for the role of glutamatergic tone in synaptic protein degradation.

第33回日本神経科学学会, 2010年9月4日, 神戸コンベンションセンター (兵庫)

(17) Shigenobu Toda, Sakurako Kosugi, Haowei Shen, Yoshio Iguchi, Tetsu Hirosawa,

Yoshio Minabe, Peter W Kalivas
Role of PSD structure sustained by action and tonic dopamine in the rat nucleus accumbens of repeatedly cocaine-administrated rats.

第33回日本神経科学学会, 2010年9月4日, 神戸コンベンションセンター (兵庫)

[図書] (計1件)

(1) 戸田重誠, 医学書院「線条体と依存症」
Brain and Nerve, 64, 2012, 7

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸田 重誠 (TODA SHIGENOBU)
金沢大学・大学病院・講師
研究者番号: 00323006

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

中原 大一郎 (NAKAHARA DAIICHIROH)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号: 80128389