

## 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5月22日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790252

研究課題名（和文） 新たな Wnt 経路制御因子 PDZRN3 の機能解析と骨再生療法への応用

研究課題名（英文） Study on the function of a novel Wnt-signaling regulator PDZRN3 and the development of bone regeneration therapy

研究代表者

本田 健 (HONDA TAKESHI)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30457311

研究成果の概要（和文）：

Wnt シグナルは骨分化を促進する主要なシグナル経路であるが、その制御機構は未だ不明な点が多い。本申請者は PDZRN3 蛋白質が Wnt シグナルの新たな制御因子であることを見出した。骨分化における機能解析の結果、PDZRN3 は活性化された LRP6 (Wnt 受容体) に結合し、その蛋白質レベルを抑制することが分かった。即ち PDZRN3 は Wnt シグナルの抑制を通して骨分化を負に調節する働きを持つことが判明した。

研究成果の概要（英文）：

Wnt- $\beta$ -catenin signaling is a major pathway promoting osteoblastic differentiation. However, the exact mechanisms and molecular details regulating Wnt signaling still remain to be elucidated. We found that PDZRN3 is a novel regulator of Wnt- $\beta$ -catenin signaling in the differentiation of C2C12 mouse mesenchymal progenitor cells into osteoblasts. PDZRN3 suppressed the protein level of LRP6, Wnt receptor, in which PDZRN3 binds to the activated (phosphorylated) LRP6. We proposed that PDZRN3 plays an important role in negative feedback control of BMP-2-induced osteoblast differentiation in C2C12 cells through inhibition of Wnt- $\beta$ -catenin signaling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：間葉系幹細胞、骨芽細胞、PDZRN3、Wnt シグナル

1. 研究開始当初の背景

現在、再生医療分野において幹細胞医学が大きな注目を集めている。それに伴い細胞分化の技術開発が盛んに行われているが、その成

否には幹細胞の持つ分化制御の分子機構を詳細に理解することが重要になってくる。Wnt シグナル伝達系はその分化制御に関わる代表的なシグナル経路の一つであり、分化技

術開発における有力な標的経路として期待されている。しかしながら、Wnt 経路を調節する制御システムは未だ不明な点が多く、また、その制御異常は細胞のガン化に関わるため (MacDonald *et al.*, *Dev. Cell*, 17, p9, 2009)、Wnt シグナル制御系の分子基盤を詳細に解明することは、安全な分化技術の開発に極めて重要である。Wnt シグナルの関与する重要な細胞分化の一つに、間葉系幹細胞の骨分化がある (Harada *et al.*, *Nature*, 423: 349-355, 2003)。本申請者は、所属研究室においてクローニングされた PDZRN3 蛋白質が間葉系幹細胞株に多く発現していること、またその筋分化において必須となる蛋白質であることに着目し、骨分化過程における PDZRN3 蛋白質の役割について解析をはじめた。PDZRN3 は、筋組織より新規にクローニングした E3 ユビキチンリガーゼである。その主たる機能は、特定の蛋白質を認識、ユビキチン化し、プロテアソームで分解させるものであり、その標的蛋白質の状態 (コンホメーションや修飾) に応じた認識を示す場合が多く、重要なシグナル制御因子としての位置付けを持つ。PDZRN 蛋白質は、N 端からユビキチンリガーゼ活性を持つ RING ドメイン、蛋白質相互作用に関わる PDZ ドメイン、C 末端の PDZ 結合モチーフから構成される。PDZRN ファミリーは PDZRN1、PDZRN2 または PDZRN3、PDZRN4 に二分され、前者は PDZ ドメインを 4 つ、後者は 2 つ有するといった構造上の違いがある。機能面では、前者は Notch シグナル制御を通して細胞の運命決定機構に関わることが判明しているが、後者の機能解析は著しく遅れている。そのような中、我々は PDZRN3 が間葉系幹細胞の筋分化やマウス骨格筋の再生過程に必須であることを初めて示し (Ko *et al.*, *J. Cell Sci.*, 119: 5106-5113, 2006)、その後、Lu らが神経筋接合部の形成における PDZRN3 の制御機構を報告した (Lu *et al.*, *J. Cell Biol.*, 177: 1077-1089, 2007)。このように骨格筋の分化・成熟過程における PDZRN3 の機能の一端が明らかにされている。本研究では間葉系幹細胞の多能性に着目し、PDZRN3 の機能解析を骨分化へと展開した。前述の通り、骨分化を制御するシグナル経路の一つに Wnt シグナル経路があり、間葉系幹細胞から骨芽細胞および成熟骨細胞への分化を促進する。Wnt 刺激は細胞内に  $\beta$  カテニンを蓄積させ、その結果骨分化マーカーであるアルカリホスファターゼ (ALP) 活性を上昇させる。本研究開始当初の予備実験から、PDZRN3 の発現を抑制した細胞を骨芽細胞へ分化させた場合、対照細胞と比較して ALP 活性が著しく増強することが示された。このことから、PDZRN3 による骨芽細胞分化の新たな制御機構の存在が考えられ、本研究を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

高齢化の進む先進国において、高齢者の骨粗鬆症や変形性関節症の罹患率が増加の一途をたどるなか、骨格系疾患に対する治療法の開発が急務となっている。現在最も注目を集める治療戦略の一つに、間葉系幹細胞による骨・軟骨再生が挙げられるが、その細胞分化の制御メカニズムは未解明な点が多く、基礎研究の充実が強く求められている。これらの背景を元に、本研究では PDZRN3 の骨芽細胞分化における役割を分子レベルで解明することを大きな目標とした。そのために、PDZRN3 の相互作用相手を探索することを含め、特に Wnt シグナル経路との関わりを詳細に解析する。また、得られた情報を元に PDZRN3 の機能を人為的にコントロールすることを試み、新たな細胞分化技術即ち骨再生医療に向けた学術的基盤の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

本研究では、PDZRN3 による Wnt- $\beta$  カテニン経路を介した骨芽細胞分化の制御機構を解明するため、PDZRN3 の発現抑制により影響を受ける蛋白質群についてその活性や発現量を解析する。さらに、免疫沈降法により PDZRN3 の新たな結合タンパク質を探索し、その相互作用の機能解析へと展開する。また、PDZRN3 ノックアウトマウスを利用した *in vivo* 解析も含め、PDZRN3 の骨芽細胞分化制御における役割を明らかにしていく。

(1) C2C12 細胞の骨芽細胞分化過程における各種シグナル分子、分化マーカーの解析  
C2C12 細胞は 5% CO<sub>2</sub>, 37°C の条件下で培養した。増殖培地 (growth medium; GM) には 10% 牛胎児血清及び penicillin, streptomycin を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を用いた。骨芽細胞への分化は、細胞がコンフルエントに達した際、分化培地 (differentiation medium; DM) へ置換することで開始した。その組成は 2% 馬血清を含む DMEM に骨形成因子 BMP2 (250mg/ml) を加えたものである。分化刺激後、任意の時間でサンプリングを行い、その後の解析に用いた。C2C12 細胞を 0.3% Triton X-100 を含む Lysis バッファーで回収し、Lowry 法にて蛋白質濃度を測定、規準化後、免疫沈降やウェスタンブロットに用いた。mRNA 発現解析は、細胞から total RNA を抽出して RT-PCR を行い、増幅産物をアガロースゲル電気泳動して検出した。骨芽細胞分化度の指標とした ALP 活性は、細胞ライセートに ALP 発色基質 p-nitrophenolphosphate を添加し、吸光度 (酵素活性) を測定した。また細胞をホルムアルデヒドで固定後、沈着性のアゾ色素基質で細胞を染色し、染色強度による分化度の測定も併せて行った。

PDZRN3 の発現抑制は RNA 干渉により実施した。細胞播種後、PDZRN3 に対する shRNA をコードしたアデノウィルスベクター (10 moi) を 24 時間感染させてノックダウンを行った。先述の shRNA 配列をスクランブルした配列 (Scramb) をコードしたアデノウィルスを感染させた細胞を陰性対照とした。

(2) マウス間葉系幹細胞の単離と初代培養  
 生後 1 ヶ月のマウス (C57BL/6) の大腿骨から骨髓を採取し、Soleimani らが構築した手法によって間葉系幹細胞の単離・培養を行った (Soleimani *et al.*, Nature Protoc. 4, p102, 2009)。経代数 P2~P4 および対照細胞 C2C12 の lysate を用い、蛋白質濃度を一致させた上でイムノブロットにより PDZRN3 の発現量を解析した。また、BMP2 によって骨分化刺激を与え、ALP 活性測定によって骨分化能を確認した。

(3) PDZRN3 結合蛋白質の同定  
 C2C12 細胞ライセートを用いて PDZRN3 の免疫沈降を行い、その共沈蛋白質群を SDS-PAGE で分離、CBB 染色した。陰性対照とバンドパターンを比較して、PDZRN3 に特異的な共沈蛋白質を選別し、相当するバンドを切り出した後、トリプシンによりゲル内消化し、ペプチド断片を得た。これを島津 MALDI-TOF-MS/MS・AXIMA-QIT を用いて質量分析を行った。得られたペプチドの質量データを MASCOT 検索システムで解析し、標的蛋白質を同定した。

(4) *in vivo* における蛋白質発現解析  
 生後 0 日~1 ヶ月のマウス (C57BL/6、野生型および PDZRN3<sup>-/-</sup>型) より各臓器を取り出し、ホモジナイズバッファー (0.3 M Sucrose, 5 mM Hepes-NaOH (pH7.4), 2 mM NaF, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 5mM EDTA, 1mg/ml leupeptin, 1mg/ml PMSF) を加え、ポリトロンにてホモジナイズした。Lowry 法にて蛋白質濃度を測定し規準化後、ウェスタンブロットに用いた。

#### 4. 研究成果

まず、骨芽細胞分化過程における PDZRN3 の発現挙動を解析した。蛋白質レベルをイムノブロットで解析したところ、図 1 に示すように BMP2 刺激 12 時間でアップレギュレートされた。また RT-PCR 解析で、mRNA レベルでの増加であることが分かった。この BMP2 刺激に呼応した発現誘導は、BMP2 による分化制御機構に PDZRN3 が何らかの関与を持つことを推測させる。そこで、PDZRN3 の役割を調べるため、これをノックダウンして骨芽細胞への影響を解析した (図 2)。ノックダウンした細胞では、骨芽細胞分化マーカーである ALP

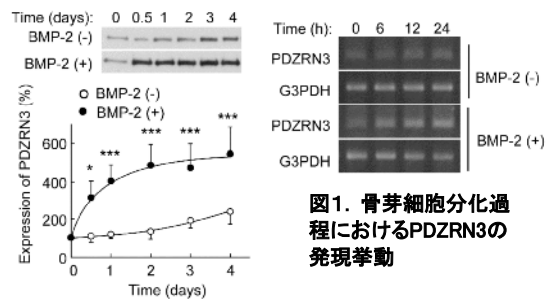


図1. 骨芽細胞分化過程におけるPDZRN3の発現挙動

活性が対照と比較し顕著に増大していることが分かった。骨分化促進の主要転写因子である Runx2 の mRNA レベルでも同様の結果が得られた。ノックダウン細胞に PDZRN3 を発現させると、増加された ALP 活性は陰性対照と同レベルの活性に減少したため、この活性変動は PDZRN3 に起因することが明らかとなった。また GM 中での分化は通常抑制されるにも関わらず、ノックダウン細胞では分化の進行が認められた。以上の結果は、PDZRN3 の BMP2 シグナルへの関与を示唆する。そこで、PDZRN3 の発現量変化が BMP シグナル経路に与える影響を解析した。BMP 経路の主要なシグナル分子や BMP 標的遺伝子について、その発現量を解析したが、予想に反していずれもノックダウンによる変動は見られなかった。詳細は論文に記す (Honda *et al.*, Mol Biol Cell., 21, 3269-3277, 2010)。しかしながら、Runx2 や ALP では PDZRN3 欠損細胞で増加が見られている。そこで、これらは Wnt シグナルの標的遺伝子でもあることに着目した。Wnt シグナルは BMP 経路とクロストークしている骨分化制御シグナルである。まず、Wnt シグナルの阻害因子である Dkk を分化時に作用させると PDZRN3 欠損による ALP 活性の増

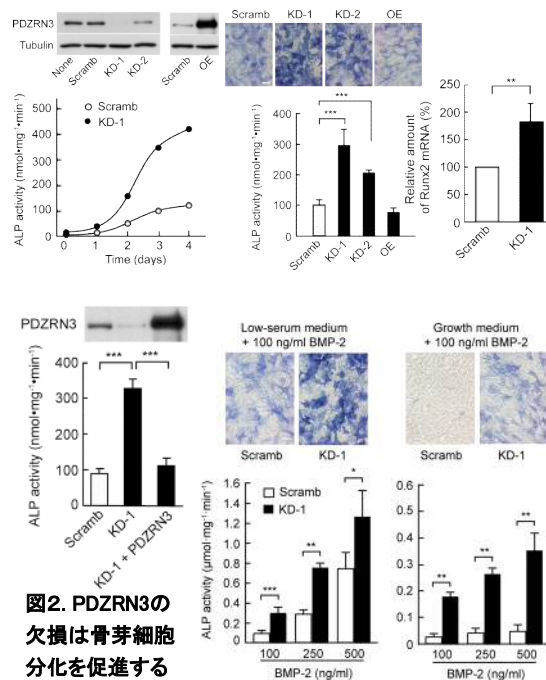


図2. PDZRN3の欠損は骨芽細胞分化を促進する

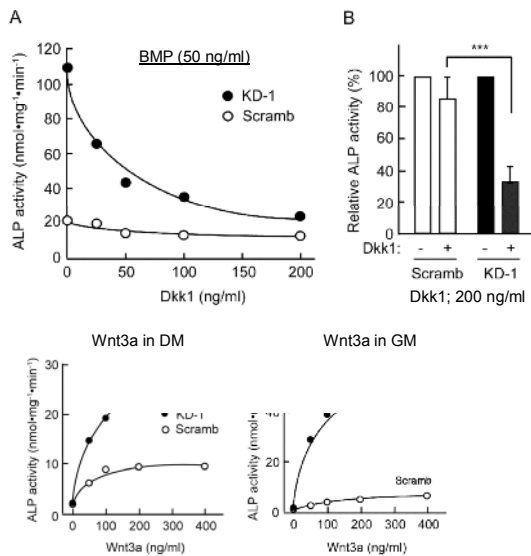


図3. PDZRN3欠損によるALP活性増強効果はWntシグナル経路が関与する

強効果に減弱が認められた。またWnt刺激単独でも骨分化は進むが、Wntアゴニスト(Wnt3a)の添加によるALP活性化においても、PDZRN3ノックダウンによって増強が見られた(図3)。Wntシグナルには複数の経路が存在し、なかでも主要な経路であるβカテンン経路に着目し、これにPDZRN3が関与するかを検討した。この経路では、Wnt刺激によりβカテンンが細胞質内で蓄積されて核内に移行し、転写因子として働く。そこで、βカテンンの細胞質蓄積レベルとルシフェラーゼを用いたレポーター遺伝子アッセイによりβカテンンの転写活性を測定した(図4)。まず、BMP及びWntを作用したときのβカテンン蓄積レベルを図上段に示すが、いずれに

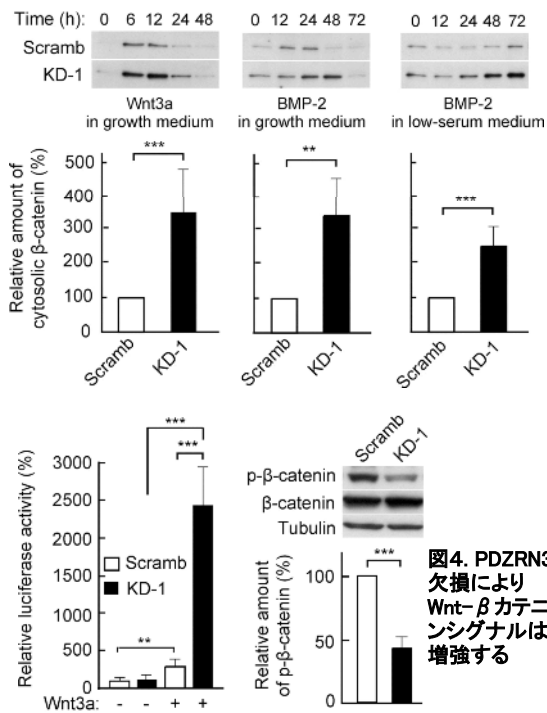


図4. PDZRN3欠損によりWnt-βカテンンシグナルは増強する

おいてもノックダウン細胞では蓄積レベルが増強されることが分かった。図4下段ではβカテンンの転写活性を示すが、対照に比べてノックダウン細胞では著しい増強が確認された。またβカテンンはWnt刺激でそのリン酸化レベルが減少するが、PDZRN3抑制細胞におけるWnt刺激時のリン酸化レベルは対照と比較して減少していることが分かった。これらの結果は、本来PDZRN3はWnt-βカテンン経路を抑制することを示唆する。PDZRN3の作用相手分子を推測した時、Wnt刺激→βカテンン蓄積までのシグナル伝達を構成する因子が候補として挙げられる。そこで、その構成因子群について、刺激前のC2C12にお

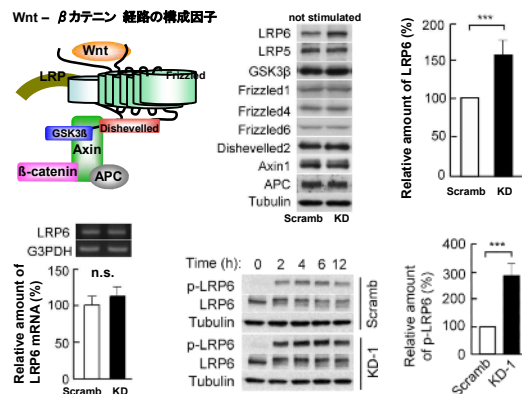


図5. PDZRN3欠損によるLRP6の蛋白質発現およびリン酸化の亢進

る蛋白質発現レベルを解析した(図5)。その結果、Wntの受容体であるLRP6の蛋白質量がノックダウン細胞で増えていることが判明した。またmRNAレベルでの発現亢進は見られず、PDZRN3の発現抑制でLRP6蛋白質の安定性が増している、即ち分解が抑制されていることが示唆された。LRP6はWntにより活性化されると、細胞質内ドメインがリン酸化されるが、図5に示すようにノックダウン細胞ではそのリン酸化レベルも亢進しており、増加したLRP6蛋白質はWntで活性化(リン酸化)される機能的状態にあることが確認された。次に、PDZRN3とLRP6の関係を調べるため、両者の相互作用解析を試みた。抗PDZRN3抗体で免沈し、抗LRP6抗体でウェス

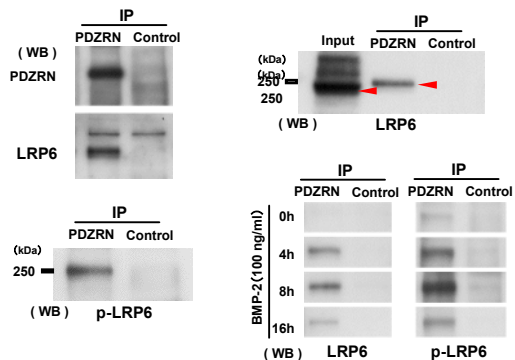


図6. PDZRN3とリン酸化LRP6の相互作用

タンブロットを行った。その結果、PDZRN3 と LRP6 の共沈が確認された (図 6)。さらに共沈した LRP6 に相当するバンドを詳細に解析すると、共沈した LRP6 のバンドは高分子量側にシフトしており、これは活性化された (リン酸化状態の) LRP6 に相当するものと思われる。そこで、リン酸化 LRP6 特異的抗体で確認したところ、やはり PDZRN3 と共沈した LRP6 はリン酸化体であることが明らかとなった。BMP 刺激によって LRP6 は一過性にリン酸化されるが、それに対応して PDZRN3 への LRP6 の共沈量が増加することも認められた (図 6)。次に、骨芽細胞の分化過程における PDZRN3 の LRP6 に対する影響を調べるため、陰性対照および PDZRN3 ノックダウン細胞を用いて、分化誘導時の LRP6 蛋白質の発現レベルをウェスタンブロットで解析した。その結果、対照では分化誘導後に LRP6 の発現量が一過性に増え 12 時間をピークに減少に転じたが、PDZRN3 ノックダウン細胞では LRP6 の発現レベルが減少せずに保持されることが分かった (図 7)。LRP6 mRNA の発現レベルは変わっておらず、蛋白質レベルでの変動ということになる。PDZRN3 の発現抑制が LRP6 の分解抑制を導くことから、本来 PDZRN3 は LRP6 を分解させるように働くと考えられた。PDZRN3 はユビキチンリガーゼであるため、直接 LRP6 をプロテアソーム分解に導いていると想定したが、予想に反して PDZRN3 と共沈した LRP6 は抗ユビキチン抗体で検出されず (data not shown)、PDZRN3 による LRP6 分解促進には別のメカニズムが存在するようである。ここまですを小括すると、PDZRN3 は LRP6 に直接もしくは間接的に結合する、その結合の際 LRP6 は活性化 (リン酸化) 状態にある、それにより PDZRN3 は LRP6 蛋白質の発現量を抑制する、ただしユビキチンリガーゼ活性に依存したものではない、といった示唆が得られた。以上の結果より、PDZRN3 は LRP6 蛋白質レベルの抑制を介して Wnt-β カタニンシグナル経路を減弱させる機能を持ち、骨芽細胞分化においては負の制御因子として働くことが考えられた。

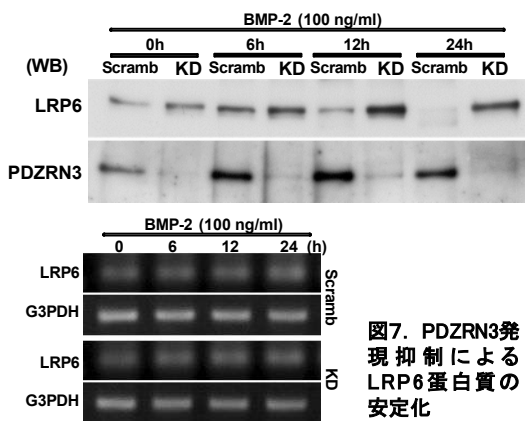
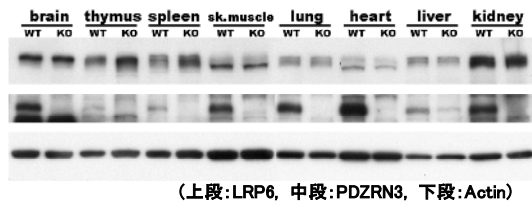


図7. PDZRN3発現抑制による LRP6蛋白質の安定化

ここまで培養細胞系の解析を行ってきたが、*in vivo*における PDZRN3→LRP6 制御システムを検証すべく、まず野生型マウス (WT) と PDZRN3 ノックアウトマウス (KO) の各臓器における LRP6 発現量を解析した。ここでは生後 0 日~1 ヶ月のマウスについて検討した (図 8 は 0 日)。LRP6 は生後 0 日で各臓器において最も明瞭に検出され、特に脳、胸腺、脾臓、骨格筋で多く発現していた。このうち、胸腺、脾臓では PDZRN3 はほとんど発現していないことから、他の臓器に着目したところ、いずれの臓器、成長期間においても、WT と KO 間で有意な差は見られなかった。



(上段:LRP6, 中段:PDZRN3, 下段:Actin)

図8. PDZRN3欠損による組織LRP6への影響

PDZRN3 は間葉系幹細胞株や前駆細胞株に高い発現が見られるため、分化の進んだ組織ではなく、未分化細胞を用いた解析に移行した。特に mesenchymal stem cells (MSCs)に着目し、初代培養細胞における PDZRN3→LRP6 制御システムを検証すべく、マウス骨髄より MSC の単離・培養を試みた。これまで、C2C12をはじめ C3H10T1/2, MC3T3E1, 3T3L1 などといった間葉系前駆細胞株では PDZRN3 の高い発現が見られているが、cell line 化していない初代培養細胞では未確認であったため、まず MSC における PDZRN3 の発現解析を行った (図 9)。本手法は MSC の接着性を利用した従来の手法を改良の上、マウス骨髄由来 MSC 単離に最適化されたものである。単離後、経代数 4 (P-4) の細胞を用いて BMP-2 を添加した結果、ALP 活性の上昇が確認できた。また、MSC の PDZRN3 発現を解析したところ、経代を重ね骨髄由来細胞群から MSC が純化されるに従い、PDZRN3 の相対発現量が増加しており、P-4 では C2C12 と同程度の発現量が認められた。初代培養 MSC の単離、培養系を確立できたことに加え、それらの細胞には PDZRN3 蛋白質が高く発現していることを確認できた。本成果に基づき、WT および KO マウスにおける MSC を単離し、今後 PDZRN3→LRP6 制御システムを検証する予定である。

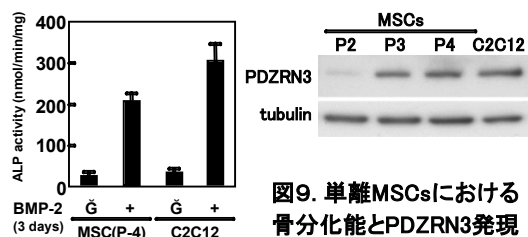


図9. 単離MSCsにおける骨分化能とPDZRN3発現

PDZRN3 はマルチドメイン蛋白質であり、その相互作用相手は複数存在することが推定される。また、より精度の高いシグナル経路解析を行うには PDZRN3 結合蛋白質の情報を増やす必要がある。そこで、PDZRN3 を免疫沈降し、共沈蛋白質を MALDI-TOF-MS/MS で同定することを試みた。PDZRN3 の N 端側にはユビキチンリガーゼ活性を持つ RING ドメインがある。この部位で標的蛋白質を捕捉する可能性は少ないと考え、PDZRN3 結合蛋白質と PDZRN3 の結合を抗体が競合阻害しないよう N 端を認識する抗体を用いて免疫沈降した。C2C12 細胞ライセートを用いて免沈の条件検討を行い、質量分析で解析可能な量の共沈蛋白質を確保した。その共沈蛋白質群を SDS-PAGE で分離し、CBB 染色した結果を図 10 に示す。

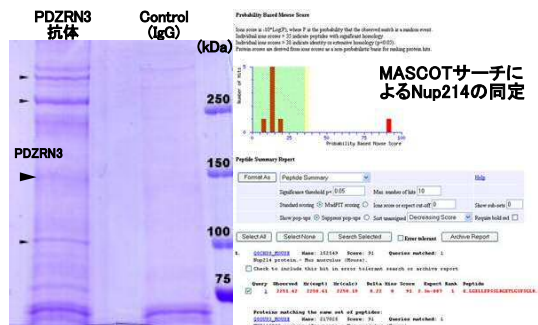


図10. PDZRN3結合蛋白質の同定

陰性対照とバンドパターンを比較して、300, 250, 110kDa 付近の (LRP6 以外の) 蛋白質を選別した。その後、質量分析で同定した結果、300kDa の蛋白質は EDD1 (308 kDa)、250kDa の蛋白質は Nup214 (213kDa)、110kDa の蛋白質は CRM1 (123kDa) であった。EDD1、CRM1 に関しては、それらの抗体によるイムノプロットで確認できた。(Nup214 に関しては適当な抗体が入手できず、現在検討中である。) まず、EDD1 は HECT 型ユビキチンリガーゼであり、現在知られているその標的蛋白質は興味深いことに Wnt シグナルの構成因子である APC であった (Ohshima *et al*, Genes Cells, 12, p1339, 2007; Hay-Koren *et al*, Mol. Biol. Cell, 22, p399, 2011)。分化誘導前の APC 発現量には PDZRN3 を抑制しても変動が認められなかったが (図 5)、PDZRN3 $\rightleftharpoons$ EDD1 間に何らかの機能的関係があれば、例えば BMP や Wnt などの刺激応答性によって APC 発現量が変動する可能性もあり、PDZRN3 ノックダウンによる Wnt シグナル亢進に絡む機構が存在するかもしれない。Nup214 は核膜孔の構成蛋白質である。Wnt シグナルメディエーターである  $\beta$  カテニンの核局在を促す核膜孔蛋白質に RanBP2/Nup358 があるが、興味深いことに Nup214 はその複合体と機能的にリンクするという報告がある (Bernad *et al*, Mol. Cell. Biol. 24, p2373, 2004; Shitashige *et al*, Gastroenterology, 134, p1961, 2008)。このことは PDZRN3 $\rightleftharpoons$ Nup214 間に機能的なシグナル伝

達の繋がりを想起させ、PDZRN3 発現抑制による  $\beta$  カテニン転写活性亢進の一因となるかもしれない。CRM1 (Exportin1) は、核外移行蛋白質であり、Nup214 に直接結合することが知られているため (Fornerod *et al*, EMBO J, 16, p807, 1997)、CRM1/Nup214 複合体が共沈・検出されたものと思われる。以上のように、PDZRN3 と相互作用する蛋白質が新規に同定され、それらの中には Wnt シグナルと深く関わる蛋白質も含まれていた。これらは PDZRN3 を軸とした Wnt シグナル制御システム解明に向けて、大変有用な情報をもたらす意義深い成果であると考えられる。

## 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 1 件)

① Honda T, Yamamoto H, Ishii A, Inui M. PDZRN3 negatively regulates BMP-2-induced osteoblast differentiation through inhibition of Wnt signaling., Mol. Biol. Cell, 査読有、21, 2010, 3269-3277.

[学会発表] (計 5 件)

① Takeshi Honda, Ishii Aiko, Makoto Inui, Regulation of adipocyte differentiation by PDZRN3 protein, 第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 16 日 (京都市 国立京都国際会館)

② 石井愛子、本田健、乾 誠、脂肪細胞分化における PDZRN3 の役割, 第 117 回山口大学医学会、2012 年 2 月 18 日 (宇部市、山口大学霜仁会館)

③ 石井愛子、本田健、乾 誠、脂肪細胞分化における PDZRN3 の役割, 第 64 回日本薬理学会西南部会、2011 年 11 月 20 日 (福岡市 KKR ホテル博多)

④ Takeshi Honda, Ishii Aiko, Hisato Yamamoto, Makoto Inui, Negative regulation of Wnt signaling by PDZRN3 protein in osteoblastic differentiation, 第 84 回日本薬理学会年会、2011 年 3 月 (横浜市 パシフィコ横浜)

\* 東日本大震災により開催中止

⑤ 本田 健、石井 愛子、山本 久人、乾 誠、Wnt シグナルを介した PDZRN3 による骨芽細胞分化の制御, 第 63 回日本薬理学会西南部会、2010 年 11 月 26 日 (鹿児島市 かごしま県民交流センター)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

本田 健 (HONDA TAKESHI)

山口大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：30457311