

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：84203

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390097

研究課題名(和文) 遺伝子改変酵素AIDによる発がん

研究課題名(英文) Carcinogenesis by a mutagenic enzyme AID

研究代表者

木下 和生 (Kazuo, Kinoshita)

滋賀県立成人病センター(研究所)・遺伝子研究部門・専門研究員

研究者番号：50293874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,100,000円

研究成果の概要(和文)：がん発症に必要な遺伝子変異が生じる機構には不明な点が多い。遺伝子変異酵素AIDは主にBリンパ球で発現し、抗体の多様化に関わる酵素である。AIDは上皮細胞でも炎症刺激により発現が誘導されること、抗体以外の遺伝子に変異を起こすこと、AIDトランスジェニックマウスではリンパ腫や肝臓癌等がおこることから、ヒトの発がんに関与している可能性がある。マウスの皮膚がんモデルを用いて、化学発がん物質により発症する皮膚腫瘍にも内在性のAIDが関与することを証明した。AIDトランスジェニックマウスの肺の観察から、AID過剰発現が細胞死・組織損傷を惹起し、再生組織でAIDが発現すると癌が発症する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Cancer is known to be caused by gene mutations. However, how gene mutations occur remains unknown. A mutagenic enzyme, activation-induced cytidine deaminase (AID), mainly expressed in B lymphocytes, is required for antibody gene diversification. AID expression is induced in epithelial cells by inflammatory stimuli, can cause mutations in non-antibody genes. AID-transgenic mice develop lymphoma, liver cancer and cancers of other organs. These results suggest involvement of AID in human cancers. In this study, we demonstrated that endogenous AID is involved in chemical-induced skin cancer model in mice. By analyzing the lung of AID-transgenic mice, we observed cell death by AID overexpression, leading to tissue regeneration. Expression of AID in regenerating tissue may be responsible for cancer development in organs under inflammation.

研究分野：腫瘍学、免疫学

キーワード：遺伝子 癌 ゲノム 突然変異

1. 研究開始当初の背景

発がんに関わる遺伝子変化を引き起こす機構の理解はがん撲滅にとって重要であるが、紫外線による皮膚癌、喫煙による肺癌など一部を除いてほとんど理解されていない状況にある。本研究は申請者を含む本庶らのグループのより発見された activation-induced cytidine deaminase (AID) が発がんにおける遺伝子変異の新規責任因子の一つであることを証明する試みとして位置付けられる。AID は抗体遺伝子に変異を導入し、クラススイッチ (DNA 組換えによる抗体クラスの変換) や体細胞突然変異 (点突然変異の誘導による抗原認識の多様化) を引き起こす活性を有している (文献 1)。申請者および他のグループの研究の結果、AID は抗体遺伝子以外にも作用し、発がんの原因になりうる事が明らかとなってきた (文献 2,3,4)。これらの知見を基に生体内でどの細胞が AID を発現し、AID を発現する細胞が迎える運命を調べる事が発がんの理解に貢献するのではないかと着想するに至った。マウス皮膚化学発がんの実験では内在性 AID 依存的な皮膚腫瘍の発症が認められた。しかし、AID がヒトの発がんに関与していることを証明し、AID を標的とした分子治療薬の開発へと発展させるためにはさらなる証拠を積み上げることが必要である。

AID は炎症刺激により発現が誘導される事を考慮すると慢性炎症に関連した発がんに関与している可能性が高い。肝炎ウイルス (肝細胞癌)・EB ウイルス (リンパ腫)・ヘリコバクターピロリ菌 (胃癌) などによる慢性感染症に伴う発がん、アスベスト (中皮腫)・不整歯列 (口腔癌) など慢性物理化学的刺激に伴う発がんへの関与が疑われる。

2. 研究の目的

本研究では蛍光タンパクによる in vivo ラベリング、レーザーマイクロダイセクション技術による腫瘍細胞選択的遺伝子変異・発現解析を駆使し、マウスモデルと臨床検体の両面から AID と発がんの関係を明らかにすることを旨とする。具体的には以下の項目を解析する。

(1) マウス発がんモデルにおける AID 発現履歴

AID は炎症刺激により誘導される酵素であり、AID が発現し変異を導入した後に AID の発現が消失することが有り得る。そのため AID の発現の履歴を評価する事が、がんと AID の関係を明らかにする上で有意義であると考えられる。そこで癌組織における AID の発現履歴をマウスモデルを用いて検討する。肺癌、皮膚癌、口腔癌、小腸癌の化学発がんモデルを用いる。

(2) AID 発現を生体で観察できる RFP ノックインマウスの解析

発現の履歴にくわえ、リアルタイムに AID の発現を生体で観察できる RFP (赤色蛍光タンパク) ノックインマウスを申請者は最近作出した (未発表)。このマウスを用いれば、免疫染色を施さずとも AID を発現する細胞の同定が可能となり、炎症刺激と AID 発現との関連を組織・細胞レベルでしかも細胞を生かしたまま解析できるようになる。このシステムを用いて AID 発現細胞の局在を組織学的に調べ、さらに FACS およびレーザーマイクロダイセクションにより単離される AID 発現細胞の性質を遺伝子発現プロファイルの観点から明らかにする。

(3) 肺癌および中皮腫における AID の発現
申請者は京都大学消化器内科のグループと共同して胃癌、肝細胞癌、大腸癌、胆管癌において AID の発現を報告してきた。臨床的重要度の点から消化器系に比肩する呼吸器系の腫瘍についてはこれまで報告はない。京都大学呼吸器外科と共同研究を行い、ヒト臨床検体における AID の発現を検討する。申請者が報告した AID トランスジェニックマウスは肺腫瘍の発症が全例に認められることから AID と肺腫瘍の関係が推測される。ヒトの肺癌の一部とくに非喫煙者に発症する肺癌やアスベストによる中皮腫に AID が関与する可能性があると考えられる。

3. 研究の方法

(1) マウス発がんモデルにおける AID 発現履歴

Cre-loxP 組換え系を用いて任意の遺伝子の発現履歴を細胞にマーキングする手法は既に確立しており、神経系や免疫系などにおける細胞分化の運命追跡 (fate mapping) に応用されている。この手法を AID の発現履歴解析に適用する。

AID (遺伝子名 *AICDA*) のプロモーターに Cre 組換え酵素 (loxP 部位での組換えを触媒する) 遺伝子を連結したトランスジーンを用いたトランスジェニックマウス *Aicda-cre* が報告されている (文献 1)。一方、特殊な loxP を巧妙に組み合わせ、Cre が発現すると不可逆的に赤色蛍光タンパク (RFP) 発現のスイッチが入るトランスジェニックマウス ROSA26-tdRFP も報告されている。RFP の発現は組織普遍的な発現をしめす遺伝子 ROSA26 のプロモーターにより発現する (文献 2)。この RFP は二量体化 (tandem dimer) による蛍光強度の増大が図られている tdRFP である。*Aicda-cre* マウスと ROSA26-tdRFP マウスを交配し得られる、ダブルトランスジェニックマウスにおいては、AID を発現する細胞において Cre が発現し、RFP の発現が始まる。その後 AID を誘導する刺激が消失しても RFP は発現し続ける (図 1)。このようにして AID の発現履歴を RFP によりマーキングできる。

この特性を活かして AID 発現履歴を有する細胞を組織学的、分子生物学的に解析することができる。

この遺伝学的実験系を以下のマウス皮膚 2 段階化学発がんモデルに適用し、誘導される腫瘍細胞において AID の発現履歴があるかどうか、発現履歴を有する細胞と履歴のない細胞の遺伝子発現プロファイルにどのような差異が存在するのか (DNA マイクロアレイ) Trp53, KRAS, HRAS, EGFR, APC, CTNNB1 遺伝子変異の頻度に違いがあるのかについて検討する。

皮膚 2 段階化学発がんモデル

背部皮膚を剃毛し、多環式芳香族炭化水素 DMBA を単回塗布し、その後細胞増殖を促進するフォルボールエステル TPA を週 2 回反復投与すると 3~4 カ月後に皮膚のパピローマが形成される。

(2) AID 発現を生体で観察できる RFP ノックインマウスの解析

AID を発現する細胞を免疫染色なしに同定単離できるシステムをノックインマウスの手法で構築する。AID 遺伝子に RFP 遺伝子をノックイン (相同組換えにより遺伝子挿入) したマウス AID-RFP は現在作成中であり、平成 24 年には使用できると見込まれる (図 2)。この RFP は ROSA26-tdRFP で用いられているのと同じ RFP (tdRFP) である。

AID-RFP マウスに化学発がんモデルを適用して、平成 23 年度に明らかにする AID 発現履歴を呈する細胞タイプに特に注目して、どのような刺激により、どの細胞が、どれくらいの期間 AID を発現するのかについて解析し、AID を発現している細胞をフローサイトメーターおよびレーザーマイクロダイセクションにより単離する。得られた細胞について遺伝子発現プロファイルの解析を DNA マイクロアレイにより検討し、分子生物学的解析を行う。また凍結組織切片より、RFP 発現細胞を回収し、組織局在による遺伝子発現の違いを検討する。

(3) 肺癌および中皮腫における AID の発現 AID トランスジェニックマウスは 100% の個体で病理学的にヒトの肺腫瘍の初期病変と考えられている atypical alveolar hyperplasia (AAH) に酷似した肺微小腺腫が発生する。一部には AAH から肺腺癌を発症する個体も見受けられる。AID トランスジェニックマウスは肺癌の初期病変から進行癌に至る病変を見ることが出来る肺癌モデルと考えられる。マウス AAH 様病変は臓側胸膜に集中しており中皮腫との関連も示唆される。したがって、ヒトの肺癌・中皮腫においても、胃癌・肝臓癌・大腸癌と同様、AID の関与を調べる意義があると思われる。その際、上記

(1)(2) の実験で収集される AID 発現細胞の組織内局在、遺伝子発現上の特徴、AID の発現を誘導する因子についての情報を活用する。

滋賀県立成人病センター、京都大学医学部付属病院における肺癌患者 (年間 150 症例以上) より摘出される手術標本のうち、AAH・肺腺癌・中皮腫が含まれるものを抽出する。無固定凍結切片よりレーザーマイクロダイセクション法により腫瘍実質細胞のみを収集し、RNA および DNA を抽出する。非癌部を陰性対照として使用する。AID の発現量定量は RNA に対してリアルタイム RT-PCR 法により、免疫染色はホルマリン固定凍結切片に対して抗 AID モノクローナル抗体 MAID-2 (申請者が作成) を用いて行う。

(4) AID トランスジェニックマウスに生じる肺微小病変の解析 (詳細後述)

4. 研究成果

(1) マウス発がんモデルにおける AID 発現履歴

AID 発現履歴を有する細胞を可視化するトランスジェニックマウス (Aicda-cre x tdRFP) に皮膚癌を誘発する薬剤である TPA を塗布し、AID の発現履歴が現れるか観察した。しかし、皮膚細胞が有する自家蛍光と皮膚特有の免疫染色を困難にする状況が tdRFP タンパクの検出を困難にさせることが分かった。そこで、beta-galactosidase の発現を指標に AID 発現履歴を可視化するトランスジェニックマウス (Aicda-cre x LacZ) を作成した。このマウスの皮膚に 6 週間にわたって週 2 回の頻度で TPA を投与したところ、一部の毛包細胞とそれから上方に連続する核が表皮細胞および角化層に AID の発現履歴が誘導されることが明らかとなった。TPA のみで AID の発現が角化表皮細胞で誘導されることを示しており、これまでの培養細胞を用いた実験と、TPA のみでも低頻度ながら AID 依存的に皮膚腫瘍が誘導される結果と矛盾しない結果であった。AID の発現はすべての毛包にみられるわけではなく、極めて限局的であった。AID の発現履歴を有する細胞の詳細を解析することは極めて困難であり、今後の課題として残された。この皮膚癌マウスモデルを用いた実験で、内在性の AID が発がん化学物質や紫外線暴露により誘導されることを明らかにした。さらに、皮膚腫瘍の発生頻度が AID 遺伝子欠損により低下すること、AID の過剰発現により上昇すること、つまり、AID の発現量に相関して皮膚腫瘍が形成されることを示した。これらの結果はヒトの発がん過程にも AID が関与する可能性を支持する結果である。皮膚癌モデルの研究は米国の学術誌に投稿し、現在改訂作業中である。

マウス肺においては AID 発現履歴を有する細胞が散在している(図1)。形態的には型肺胞上皮細胞のような扁平な細胞である。この細胞はなんら処置を施さないマウスにも存在するが、肺腫瘍を誘発するウレタン投与、炎症刺激を模倣する LPS 投与により増加しない。自然発症の肺腺腫に AID の発現履歴が集中して観察されるケースが1例のみあったが、肺腺腫形成と AID の関連について議論するにはより多くの腫瘍を観察する必要がある。

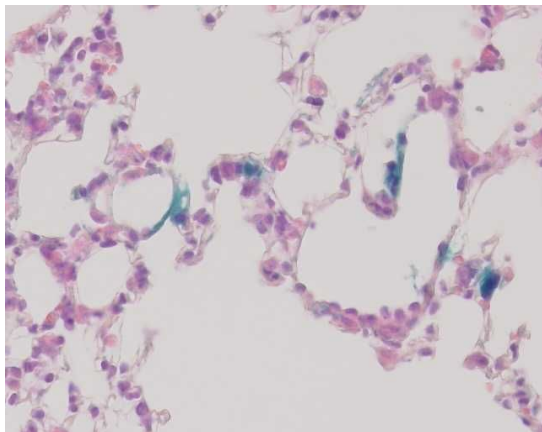


図1 Aicda-cre x LacZ マウスの肺。青色の細胞は AID 発現履歴があることを示す。

(2) AID 発現を生体で観察できる RFP ノックインマウスの解析

AID 遺伝子座に赤色蛍光タンパク RFP をコードする遺伝子をノックインしたマウスを組織学的に解析した。AID を発現する小腸のパイエル板・孤立リンパ小胞・粘膜固有層、脾臓の胚中心の B リンパ球が赤色蛍光タンパクを発現し、生理的な AID の発現を忠実に反映していることが確認できた(図2)。

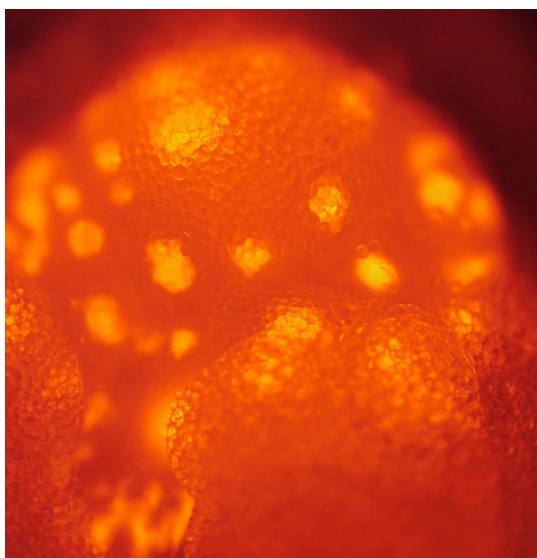


図2 AID 遺伝子に RFP をノックインしたマウスの腸間膜リンパ節。胚中心が赤い蛍光をよく発している。

皮膚癌モデルで RFP が誘導されるか観察を試みたが、上述したように自家蛍光が強いため RFP の発現を蛍光で確認することができず、また、抗 RFP 抗体を用いた免疫染色も困難であった。現在、ホモ接合体を得て、RFP の発現を増強する実験を進めている。

(3) 肺癌における AID の発現

京都大学医学部附属病院における肺癌30症例の検体について、抗ヒト AID 抗体を用いた免疫染色を行った結果、9検体(30%)が陽性であった。これは Shinmura et al. による報告(35.7%)(Shinmura et al., 2011)と同等であった。同一症例の凍結癌組織と凍結非癌部組織から抽出した RNA に含まれる AID の mRNA を qRT-PCR により定量した。その結果、がん組織において非癌部組織より強い AID の発現が見られる傾向があったものの、mRNA 定量値と免疫染色の染色強度の間に相関が認められなかったため、肺癌細胞で AID が発現しているのか、浸潤する B リンパ球細胞の AID 発現を反映しているのか結論づけることができなかった。免疫染色結果と mRNA 定量値の違いに関して、浸潤 B リンパ球の影響以外に、抗体の非特異的結合、および、腫瘍の不均一性に由来する可能性が考察される。

(4) AID トランスジェニックマウスに生じる肺微小病変の解析

AID トランスジェニックマウスの約1割の個体では肺腫瘍が自然発症するが、それに先だって、すべての個体で腺腫様微小病変が出現する。この病変はヒト肺腺癌の前駆病変と考えられている異型腺腫様過形成(atypical adenomatous hyperplasia; AAH)に類する前癌病変と考え、マウス AAH 様病変(mouse AAH-like lesion; MALL)と名付けた(図3)。

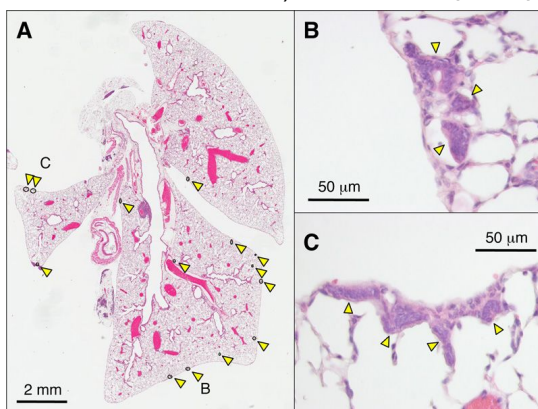


図3 MALL の形態。矢頭で示したのが MALL。

MALL の肺癌関連遺伝子変異を検索するため、レーザーマイクロダイセクションにより MALL を110個単離し、個別の MALL より抽出した DNA を鋳型として p53, EGFR, KRAS 遺伝子を PCR で増幅し、ダイレクトシーケンス法により遺伝子変異を検索した。その結果、

p53 遺伝子には 10.5% に変異が認められたが、EGFR, KRAS 遺伝子には変異は認められなかった。ヒト AAH においては p53 の遺伝子変異が 0-9%, KRAS の遺伝子変異が 27~39%, EGFR の変異が 3~35% であったことからすると MALL の遺伝子変異頻度は概して AAH より低かった。

MALL の分化段階を検討するために 3 種類の肺胞上皮のマーカータンパク質に対する抗体 (podoplanin, SP-C, CC-10) を用いて免疫染色をおこなった。その結果、SP-C のみが MALL の一部に検出された。MALL に 2 型肺胞上皮細胞が含まれる可能性を示唆している。つぎに、近年同定された肺胞上皮の再生マーカータンパク質に対する抗体を用いて検討した。その結果、MALL は再生過程にある肺胞で発現する Np63, keratin 5, keratin 14, E-cadherin, Lgr5, Lgr6 を発現していた。このことは MALL が肺胞再生病変である可能性を示唆していた。

電子顕微鏡で MALL を観察すると細胞の肺胞腔面近傍には分泌顆粒様の小胞が多数存在し、一方、2 型肺胞上皮に存在する層板小体は認められなかった。この小胞は PAS 染色陽性であり、粘液を内包していると考えられた。つまり、MALL は一種の粘液細胞化生であり、未だ解明されていない肺胞再生の中間段階である可能性がある。MALL の一部の細胞は 2 型肺胞上皮細胞へ分化しつつ SP-C を発現してはいるが、層板小体の形成には至っていないと考えられる。

MALL が再生病変であるなら、細胞分裂によって形成された後、一定時間後には通常の上皮を残して消失するはずである。細胞分裂の有無を検討するため、AID トランスジェニックマウスに連続 7 日間 EdU を投与し、DNA に取り込まれるか検討したところ直後には 91% の MALL が EdU を取り込み、7 日間の間にほとんどの MALL が細胞増殖を伴いながら形成されたことを意味する。その 19 日後に再び EdU 陽性率を測定したところ 44% に低下していた。このことは、19 日間の間に MALL の半分が消失したことを意味している。つまり、MALL は一過性に存在する病変であり、再生病変である可能性をより高める結果であった。

AID トランスジェニックで再生病変が観察されるということは、細胞の欠損が頻繁に生じていることを意味している。この可能性を検討するため、組織中の細胞死の頻度を TUNEL 法により検討した。その結果、AID トランスジェニックマウスの肺では野生型マウスに比較して死細胞の数が 5 倍に増加していた。肺のみならず、肝臓においても視細胞は増加の傾向があり、AID トランスジェニックマウスの組織中で細胞死が亢進している可能性が示唆された。この細胞死には AID の突然変異導入活性による細胞毒性が関与

していると推測された。

MALL では AID トランスジェニックからの AID が発現している。そのため、AID による突然変異が継続していると思われる。もし、腫瘍形成を促進する変異が生じると、MALL という再生組織から肺腫瘍が生まれる可能性があり、AID トランスジェニックマウスで高頻度に肺腫瘍が発症する理由が説明できる。ヒトの肺癌細胞株 A549 細胞を炎症性サイトカインである IL-1 や TNF で刺激したところ、8~10 倍 AID mRNA の発現が誘導された。従って、ヒトの肺胞で炎症がおこると組織障害に続いて再生病変が出現する際、炎症刺激により再生組織に AID が発現する可能性がある。実際、上述した AID の発現履歴を可視化するマウスにおいても、肺胞で AID の発現履歴が観察される (図 1)。ヒトの肺胞再生の過程で AID トランスジェニックマウスに見られる MALL のような病変から肺癌に至るプロセスが存在するのかどうか検討する上で、本研究での知見は役立つものと思われる。今後、ヒトの肺胞再生の過程を明らかにし、どのような刺激により AID が再生組織で発現誘導されるのか解明することが、肺癌の発症機構を理解する上で重要となるであろう。以上の結果は PLoS ONE 誌に掲載された (Kitamura et al., 2015)。

Shinmura, K., Igarashi, H., Goto, M., Tao, H., Yamada, H., Matsuura, S., Tajima, M., Matsuda, T., Yamane, A., Funai, K., Tanahashi, M., Niwa, H., Ogawa, H., and Sugimura, H.: "Aberrant Expression and Mutation-Inducing Activity of AID in Human Lung Cancer" *Ann Surg Oncol*, 2011

Kitamura, J., Uemura, M., Kurozumi, M., Sonobe, M., Manabe, T., Hiai, H., Date, H., and Kinoshita, K.: "Chronic lung injury by constitutive expression of activation-induced cytidine deaminase leads to focal mucous cell metaplasia and cancer" *PLoS One*, 10, 2015, e0117986.

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 6 件)

Takai, A., Marusawa, H., Minaki, Y., Watanabe, T., Nakase, H., Kinoshita, K., Tsujimoto, G., and Chiba, T.: "Targeting activation-induced cytidine deaminase prevents colon cancer development despite persistent colonic inflammation" *Oncogene*, 査読有, 31, 2012, 1733-1742.

doi: 10.1038/onc.2011.352

Nguyen, T., Xu, J., Chikuma, S., Hiai, H., Kinoshita, K., Moriya, K., Koike, K., Marcuzzi, G. P., Pfister, H., Honjo, T., and Kobayashi, M.: "Activation-induced cytidine deaminase is dispensable for virus-mediated liver and skin tumor development in mouse models" *Int Immunol*, 査読有, 26, 2014, 397-406.
doi: 10.1093/intimm/dxu040

Kitamura, J., Uemura, M., Kurozumi, M., Sonobe, M., Manabe, T., Hiai, H., Date, H., and Kinoshita, K.: "Chronic lung injury by constitutive expression of activation-induced cytidine deaminase leads to focal mucous cell metaplasia and cancer" *PLoS One*, 査読有, 10, 2015, e0117986.
doi: 10.1371/journal.pone.0117986

Liang, G., Liu, G., Kitamura, K., Wang, Z., Chowdhury, S., Monjurul, A. M., Wakae, K., Koura, M., Shimadu, M., Kinoshita, K., and Muramatsu, M.: "TGF-beta Suppression of HBV RNA through AID-Dependent Recruitment of an RNA Exosome Complex" *PLoS Pathog*, 査読有, 11, 2015, e1004780.
doi: 10.1371/journal.ppat.1004780

喜多村次郎, 植村宗弘, 木下和生: "肺の再生と発がん-ゲノム編集酵素 AID による肺癌仮説-" *THE LUNG perspectives*, 査読無, 20, 2012, 311-317.

喜多村次郎, 木下和生, and 伊達洋至: "核酸編集酵素 AID の発がんへの関与" *日本臨床*, 査読無, 71, Supple 6, 2013, 118-121.

〔学会発表〕(計5件)

喜多村次郎, 植村宗弘, 今村直人, 石川将史, 菊地柳太郎, 小林正嗣, 園部誠, 日合弘, 伊達洋至, 木下和生: 核酸編集酵素 AID による慢性肺障害後の肺組織再生と肺発がん 第71回日本癌学会学術総会 2012/9/20

喜多村次郎, 植村宗弘, 木下和生: Chronic lung injury by constitutive expression of AID leads to focal alveolar regeneration and cancer 文部科学省平成24年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ「個体レベルのがん研究による相乗効果」 2013/2/7

野中太一郎, 植村宗弘, 木下和生: Activation-induced cytidine deaminase promotes oncogenesis of ultraviolet light-independent squamous cell carcinoma of the skin 文部科学省平成24年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ「個体レベルのがん研究による相乗効

果」 2013/2/7

Kitamura, J., Uemura, M., Hiai, H., and Kinoshita, K.: EXPRESSION OF P63 IN ALVEOLAR LESION OF TRANSGENIC MICE EXPRESSING A MUTAGENIC CYTIDINE DEAMINASE, AID 6th p63/p73 International Workshop 2013/9/15

野中太一郎, 植村宗弘, 日合弘, 木下和生: AID は紫外線非依存的に皮膚扁平上皮癌の発生を促進する 第72回日本癌学会学術総会 2013/10/4

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計1件)

名称: レーザーマイクロダイセクション法およびその利用、並びに、油性封入剤

発明者: 木下和生

権利者: 滋賀県

種類: 特許

番号: 特許第5467254号

出願年月日: 平成23年4月1日

取得年月日: 平成26年2月7日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shigamed.jp/divisions/gene.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 和生 (KINOSHITA, Kazuo)

滋賀県立成人病センター研究所・専門研究員

研究者番号: 50293874

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

植村 宗弘 (UEMURA, Munehiro)

滋賀県立成人病センター研究所・主査

研究者番号: 30568390

園部 誠 (SONOBE, Makoto)

京都大学大学院医学研究科胸部外科学・助教

研究者番号: 00432378