

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 4 月 28 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460175

研究課題名(和文) 毒性金属曝露に対する細胞の生存と死を決定するストレスシグナル伝達機構

研究課題名(英文) Stress signaling pathways responsible for the cell survival and death following exposure to toxic metals

研究代表者

松岡 雅人 (MATSUOKA, Masato)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：50209516

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：毒性金属カドミウムは、近位尿細管細胞のNotch1シグナル伝達経路を活性化し、その結果生じるE-カドヘリン発現抑制因子Snailの発現誘導が細胞間接着を障害して、細胞障害を引き起こす。また、カドミウムによるNotch1シグナル活性化は、肺癌細胞の増殖および悪性形質変化に関わる。小胞体ストレス軽減剤サルブリナルは、毒性金属など有害物質による細胞障害を抑制する。線虫およびゼブラフィッシュは、毒性金属や神経毒性物質による小胞体ストレス応答解析のモデル生物として有用である。他の有害化学物質(フッ素、銀ナノ粒子、アクリルアミド)による毒性発現に関わる細胞内シグナル伝達系への影響も認められた。

研究成果の概要(英文)：The toxic metal, cadmium, induces the activation of Notch1 signaling in renal proximal tubular cells and the resultant expression of Snail, a repressor of E-cadherin expression, leads to cellular damage by decreasing cell-cell adhesion. Cadmium-induced activation of Notch1 signaling also plays a role in the proliferation and malignant progression of lung cancer cells. Endoplasmic reticulum (ER) stress inhibitor salubrinal can protect cells from the damage induced by a wide range of xenotoxins including toxic metals. *Caenorhabditis elegans* and zebrafish are a useful model for the analysis of the toxic metal or neurotoxic chemical-induced ER stress responses. In addition, effects of other toxic chemicals, including fluoride, silver nanoparticle, and acrylamide, on the intracellular signaling pathways responsible for their cytotoxicity were revealed in this study.

研究分野：環境衛生学、分子毒性学

キーワード：毒性金属 細胞死 細胞生存 シグナル伝達 小胞体ストレス カドミウム

### 1. 研究開始当初の背景

生体は、物理化学的ストレスや生物的ストレスなどによる環境変化に対して、多彩なシグナル伝達機構を介して、環境応答・適応し、恒常性を維持しようとする。このストレスシグナル伝達機構は、ストレス感知(センシング)、シグナル伝達経路活性化(シグナリング)、ストレス応答(レスポンス)から成り、各段階における分子機構を解明することが重要である。近年、このストレスシグナル伝達機構の破綻が、神経変性疾患、代謝性疾患や癌など多彩な疾患の原因となりうるということが明らかになっている。一方、代表的な環境汚染物質である重金属の曝露においても、ストレスシグナル伝達機構が細胞毒性発現、特に細胞の生存と死の決定、に重要な役割を果たす可能性があるものの、その分子基盤についてはこれまでに十分に解明されていない。

細胞の生存と死を制御する重要なシグナル伝達経路として、MAPキナーゼ(mitogen-activated protein kinase)カスケードと小胞体ストレス応答(unfolded protein response)が挙げられる。セリン/スレオニンキナーゼであるMAPキナーゼは、extracellular signal-regulated protein kinase (ERK)、c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK)とp38の3つの主要なサブファミリーからなり、その活性化は転写調節因子リン酸化を介した標的遺伝子の発現誘導をもたらす。細胞増殖・分化およびアポトーシスなどの多様な細胞応答を引き起こす。一方、小胞体ストレス応答では、蛋白質の品質管理を担う小胞体内に異常な折り畳み構造を持つ蛋白質が蓄積すると、順次、蛋白質の翻訳抑制、異常蛋白質の蓄積を回避する小胞体シャペロン分子の発現誘導、異常蛋白質の分解促進、最終的手段としてのアポトーシスが生じる。

申請者は、これまでに、このストレスシグナル伝達機構に着目し、代表的な環境汚染重金属であるカドミウム、無機水銀およびトリブチルスズを曝露した各標的細胞において、MAPキナーゼカスケードが活性化されることを報告してきた(Biochem Biophys Res Commun 1998; Biochem Pharmacol 2000; Toxicol Sci 2000; Toxicol Appl Pharmacol 2004; Toxicol Lett 2004; Environ Toxicol Pharmacol 2007; J Cell Biochem 2008; Toxicol Appl Pharmacol 2011)。また、重金属曝露による小胞体シャペロン分子 Grp78 および転写因子 GADD153 (CHOP) の発現誘導も明らかにした(Environ Health Perspect 2006; Environ Toxicol Pharmacol 2009)。さらに、カドミウムを曝露した近位尿管由来上皮細胞において、化学物質サルプリナルを用いて小胞体ストレス応答を抑制すると、MAPキナーゼ活性化とアポトーシスが共に抑制されることを見出した(Arch Toxicol 2012)。この結果は、小胞体が重金属曝露ストレスセ

ンサーとなり、小胞体ストレス応答とMAPキナーゼカスケードとの相互作用(クロストーク)により、毒性金属曝露細胞の生存と死が決定されることを示唆している。

### 2. 研究の目的

本研究では、毒性元素(カドミウム、フッ素)、金属ナノ粒子や神経毒性物質(アクリルアミド)を曝露した細胞における小胞体ストレス応答に加えて、他のストレスシグナル伝達経路、そのMAPキナーゼカスケードとの相互作用の解析、そして、細胞の生存と死を決定するシグナル伝達経路および分子を同定する。さらに、ゼブラフィッシュおよび線虫をモデル動物とし、個体レベルでの毒性金属・有害化学物質曝露に対する細胞の生存と死を決定するシグナル伝達機構の毒性学的意義を明らかにする。そこで、(1)小胞体ストレス応答と細胞死、(2)毒性金属に応答するシグナル伝達系の機能、(3)金属ナノ粒子によるリソソーム機能障害、(4)モデル生物を用いた個体レベルでの小胞体ストレス応答、について研究を行った。

### 3. 研究の方法

(1)神経毒性物質アクリルアミドによる小胞体ストレス応答を介した細胞死

アクリルアミドモノマーを曝露したヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞における小胞体ストレス応答分子とアポトーシス誘導因子をウェスタンブロット、逆転写PCRまたはリアルタイムPCR法にて測定する。また、細胞死をWST-8アッセイ、アポトーシスをTUNEL法および切断型PARPレベルにより測定する。さらに、活性酸素種除去剤および小胞体ストレス軽減剤を処理したSH-SY5Y細胞におけるアクリルアミドによる細胞死およびアポトーシスを評価する。

(2)カドミウムによるNotch1経路を介した細胞死

塩化カドミウムを曝露したHK-2ヒト近位尿管由来上皮細胞におけるNotch1シグナル伝達系関連分子とE-カドヘリンレベルをウェスタンブロットにて測定する。また、細胞死をトリパンブルー色素排除アッセイにより定量する。さらに、Notch1、Notch1リガンドおよびSnailノックダウンHK-2細胞と-セクレターゼ阻害剤を処理したHK-2細胞におけるカドミウムによる細胞障害の形態学的観察および細胞死の定量を行う。カドミウム曝露によるNotch1経路活性化をA549ヒト肺癌上皮腺癌細胞、SH-SY5Y細胞、HepG2ヒト肝癌由来細胞株でも検討する。

(3)カドミウムによるNotch1シグナル経路を介した細胞増殖・悪性形質変化

塩化カドミウムを長期間(10週間)曝露したA549細胞における上皮間葉転換に関連する分子とNotch1シグナル伝達系関連分子レ

ベルをウェスタンブロットにて測定する。細胞死をトリパンブルー色素排除アッセイにより定量する。また、細胞増殖(スクラッチアッセイほか)、ストレスファイバーの形成や抗癌剤(シスプラチン)抵抗性を測定する。Notch1 ノックダウン A549 細胞におけるカドミウムによる上皮間葉転換による上記項目の変化を評価する。

#### (4) カドミウムによる SGK1 経路を介した細胞応答

塩化カドミウムを HK-2 細胞に曝露し、血清グルココルチコイド誘導性プロテインキナーゼ (SGK1、SGK2、SGK3) および SGK1 の基質である N-myc 下流制御遺伝子 1 (N-myc downstream regulated 1、NDRG1) の発現およびそのリン酸化レベルをウェスタンブロットにより定量する。SGK1 特異的阻害剤 EMD638683 および SGK1 siRNA を用いて、SGK1 発現の生理機能についても検討する。

#### (5) MAP キナーゼ活性化/c-Fos 発現の骨毒性発現における役割

フッ化ナトリウムを曝露した MC3T3-E1 マウス骨芽細胞における Fos ファミリー蛋白 (c-Fos、FosB、Fra-1、Fra-2) の発現レベルをウェスタンブロットにより定量する。Fos ファミリー蛋白の上流キナーゼである MAP キナーゼ (ERK1/2、ERK5、JNK、p38) に特異的な阻害剤処理を行い、Fos 蛋白の発現を制御するキナーゼを明らかにする。次に、RNA 干渉により Fos 遺伝子を抑制し、Fos 蛋白の発現と AP-1 活性化の関連について評価する。また、PCR アレイを用いて、フッ化ナトリウムによる細胞毒性に関わる遺伝子群において、Fos が発現に関与している標的遺伝子を見出し、その毒性学的意義を検討する。

#### (6) 金属ナノ粒子によるリソソーム機能障害とオートファジー阻害

20 nm サイズの銀ナノ粒子とリソソーム内への H<sup>+</sup>流入を制御する vacuole-ATPase の阻害剤バフィロマイシン A1 をそれぞれ 24 時間、A549 細胞に曝露した後、細胞毒性を WST-8 アッセイで評価する。リソソーム、核、ミトコンドリアをオルガネラマーカーで蛍光標識し、銀ナノ粒子の細胞内分布を共焦点レーザー顕微鏡で観察する。細胞内の銀ナノ粒子を ICP-MS で分離定量する。

#### (7) モデル生物を用いた個体レベルでの小胞体ストレス応答

ゼブラフィッシュ幼生を用いたアクリルアミドによる小胞体ストレス応答を上記 (1) と同様に評価する。また、線虫を用いたカドミウムによる小胞体ストレス応答を介する生育影響では、小胞体ストレス応答分子機能欠損変異体におけるカドミウム曝露による生育阻害を野生型個体と実体顕微鏡下で比較定量化する。

## 4. 研究成果

### (1) 小胞体ストレス応答と細胞死

小胞体ストレス軽減剤サルプリナルによる細胞死抑制

化学物質サルプリナルは、転写開始因子 eIF2 の脱リン酸化抑制により、小胞体ストレスによる細胞死を抑制することが知られている。そこで、毒性(半)金属(カドミウム、ヒ素)および他の環境汚染化学物質や薬剤による細胞死に対するサルプリナルの効果とその機序について文献レビューした。その結果、サルプリナルは小胞体ストレス応答 UPR の PERK/eIF2 経路のみならず、IRE1/TRAF2 経路を介した細胞死抑制効果を有することを示した。本研究成果は、International Journal of Molecular Sciences 誌に論文発表した(2015年)。

神経毒性物質アクリルアミドによる小胞体ストレス応答を介した細胞死

これまでに、環境汚染化合物トリブチルスズの曝露により、神経細胞において小胞体ストレス応答が生じることを明らかにした(Environ Toxicol Pharmacol 2009)。そこで、本研究では、代表的な神経毒性物質であるアクリルアミドを曝露した SH-SY5Y 細胞において、小胞体ストレス応答経路のうち PERK-eIF2 経路が活性化すること、アポトーシス誘導因子 CHOP の発現亢進とアポトーシスが誘導されることを認めた。また、活性酸素種除去剤 N-アセチルシステインおよび小胞体ストレス軽減剤 4-フェニルブチル酸により、アクリルアミドによる神経細胞死が抑制された。アクリルアミド曝露により、酸化ストレスによる小胞体ストレス応答を介して、アポトーシスが誘導されることを示した。本研究成果は、Toxicology and Applied Pharmacology 誌に論文発表した(2016年)。

### (2) カドミウムストレスに応答するシグナル伝達系の機能

カドミウムによる Notch1 経路を介した細胞死

カドミウム曝露 HK-2 細胞において、Notch1 受容体が切断された結果生じる細胞内ドメインの NICD レベルは上昇し、核内に蓄積した。Notch1 ノックダウンおよび -セクレターゼ阻害剤は、カドミウム曝露細胞の形態変化と生存率の低下を抑制した。Notch1 受容体のリガンドである Jagged1 および Jagged2 のノックダウンは、カドミウム曝露による細胞障害を抑制した。Notch1 発現抑制は、カドミウム曝露による E-カドヘリン発現の低下と Snail 発現の上昇を抑制した。Snail ノックダウンは、カドミウム曝露による E-カドヘリン発現の低下と細胞障害を抑制した。カドミウムは HK-2 細胞の Notch1 シグナル伝達経路を活性化し、その結果生じる E-カドヘリン発現抑制因子である Snail の発現誘導が細胞間

接着を障害することにより、細胞障害を引き起こすと考えられた。さらに、カドミウム曝露による Notch1 経路活性化が HK-2 細胞のほか、A549 細胞、SH-SY5Y 細胞、HepG2 細胞でも生じることを明らかにした。本研究成果は、Cell Death & Disease 誌に論文発表した(2014年)。

カドミウムによる Notch1 シグナル経路を介した肺癌細胞増殖・悪性形質変化

カドミウムは、肺癌の発症へ関与することが実験的および疫学的研究から示唆されている。カドミウムを曝露した A549 細胞では、上皮間葉転換、ストレスファイバーの形成や抗癌剤に対する抵抗性が認められた。また、Notch1 活性化型である Notch1-ICD の発現量、Notch1 の下流標的転写因子である Snail および Slug の発現量が上昇した。さらに、Notch1 を siRNA により機能阻害すると、カドミウム曝露による上記の影響が抑制された。カドミウム曝露による Notch1 シグナル伝達経路活性化が肺癌細胞の増殖および悪性形質変化に関わっていることを明らかにした。本研究成果は、The Journal of Biological Chemistry 誌に論文発表した(2017年)。

カドミウムによる SGK1 経路を介した細胞応答

血清グルココルチコイド誘導性プロテインキナーゼ (SGK) は、細胞生存および細胞死に関わる。カドミウム曝露 HK-2 細胞において、SGK2、SGK3 に比し、SGK1 発現とそのリン酸化レベルが著明に上昇した。SGK1 シグナルを阻害剤および siRNA にて抑制すると、リン酸化型 NDRG1 レベルの減少が認められた。SGK1 は、NDRG1 のみならず、細胞ストレス応答に関わるシグナル分子の調節に関わるほか、尿細管におけるイオンチャンネルと輸送体の活性を調節している。今後、カドミウム曝露による近位尿細管障害における SGK1 誘導の毒性学的意義について検討する。本研究成果は、Environmental Toxicology and Pharmacology 誌に論文発表した(2014年)。

MAP キナーゼ活性化/c-Fos 発現の骨毒性発現における役割

これまでに、骨毒性を有するカドミウムが MAP キナーゼ活性化を介して c-Fos や c-Jun の発現誘導することを報告してきた (Toxicol Appl Pharmacol 2011)。同じく骨毒性を有するフッ素曝露により MAP キナーゼファミリーの ERK1/2、ERK5、JNK、p38 のリン酸化型蛋白レベルの増加を認めた。MEK1/2 および ERK5 阻害剤により c-Fos 蛋白レベルの増加が抑制されたことから、フッ素曝露による c-Fos 蛋白発現誘導は、主に ERK1/2 と ERK5 経路を介していることが明らかとなった。さらに、c-Fos 遺伝子発現抑制により、フッ素曝露時に上昇する破骨細胞分化抑制因子オステオプロテジェリン (OPG) レベル

の更なる上昇が認められたことから、c-Fos はフッ素曝露による OPG 発現上昇に抑制的に働く可能性が示唆された。本研究成果は、Toxicology Mechanisms and Methods 誌に論文発表した(2016年)。

(3) 金属ナノ粒子によるリソソーム機能障害とオートファジー阻害

代表的な金属ナノ材料である銀ナノ粒子は、A549 細胞において、リソソーム内 pH 上昇を介したリソソーム内への銀ナノ粒子凝集とそれに伴う細胞死を誘導することを明らかにした。リソソーム内への H<sup>+</sup>流入を阻害するバフィロマイシン A1 を処理した A549 細胞では、銀ナノ粒子の細胞毒性が増大し、銀ナノ粒子のほとんどが不溶性画分に存在する一方、可溶性画分に存在する銀イオン量は減少した。銀ナノ粒子を曝露した A549 細胞では、リソソーム pH 維持機構が破綻し、銀ナノ粒子が凝集体として蓄積することで細胞毒性が出現する可能性が考えられた。引き続き、銀ナノ粒子や他の金属ナノ粒子が肺癌上皮細胞のオートファジー・リソソーム経路へおよび影響について明らかにする予定である。本研究成果は、Journal of Occupational Medicine and Toxicology 誌に論文発表した(2016年)。

(4) モデル生物を用いた個体レベルでの小胞体ストレス応答

ゼブラフィッシュを用いたアクリルアミドによる小胞体ストレス応答

代表的な神経毒性物質であるアクリルアミドを曝露した受精後6日目のゼブラフィッシュ幼生脳の神経細胞においても、小胞体ストレス応答を介する CHOP 発現とアポトーシスを認めた。ゼブラフィッシュは、固体レベルでの小胞体ストレス応答のモデル生物として有用であることを示した。本研究成果は、Toxicology and Applied Pharmacology 誌に論文発表した(2016年)。

線虫を用いたカドミウムによる小胞体ストレス応答を介した生育影響

モデル動物として線虫を用い、小胞体ストレス応答分子の生存・死への関わりを検討した。その結果、小胞体ストレス応答分子 IRE-1 ホモログ *ire-1(v33)* 機能欠損変異体では、カドミウム曝露により、野生型 N2 個体に比し約 40%の生育阻害を認めた。引き続き、線虫をモデル生物として、毒性金属による小胞体ストレス応答の意義を明らかにするために、生育影響とそれに関わる分子を同定する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

Fujiki K, Inamura H, Miyayama T, Matsuoka M, Involvement of Notch1 signaling in malignant progression of A549

cells subjected to prolonged cadmium exposure, *The Journal of Biological Chemistry*, 292:7942-7953, 2017 (査読有)  
DOI:10.1074/jbc.M116.759134

松岡雅人、蔭池勇太、藤木恒太、宮山貴光、化学物質の毒性発現機構-最近のシグナル伝達研究から-、*産業医学ジャーナル*、40:61-65, 2017 (査読無)  
<http://www.zsisz.or.jp/shop/periodical/2017/01/-16-39-6229.html>

Komoike Y, Matsuoka M, Endoplasmic reticulum stress-mediated neuronal apoptosis by acrylamide exposure, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 310:68-77, 2016 (査読有)  
DOI:10.1016/j.taap.2016.09.005

Iwatsuki M, Matsuoka M, Fluoride-induced c-Fos expression in MC3T3-E1 osteoblastic cells, *Toxicology Mechanisms and Methods*, 26:132-138, 2016 (査読有)  
DOI: 10.3109/15376516.2015.1129570

Miyayama T, Matsuoka M, Involvement of lysosomal dysfunction in silver nanoparticle-induced cellular damage in A549 human lung alveolar epithelial cells, *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 11:1-6, 2016 (査読有)  
DOI: 10.1186/s12995-016-0090-0

Matsuoka M, Komoike Y, Experimental evidence shows salubrinal, an eIF2 dephosphorylation inhibitor, reduces xenotoxicant-induced cellular damage, *International Journal of Molecular Sciences*, 16:16275-16287, 2015 (査読有)  
DOI: 10.3390/ijms160716275

Miyayama T, Matsuoka M, Increased expression and activation of serum- and glucocorticoid-inducible kinase-1 (SGK1) by cadmium in HK-2 renal proximal tubular epithelial cells, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 38:374-378, 2014 (査読有)  
DOI: 10.1016/j.etap.2014.07.004

Fujiki K, Inamura H, Matsuoka M, Detrimental effects of Notch1 signaling activated by cadmium in renal proximal tubular epithelial cells, *Cell Death & Disease*, 5:e1378, 2014 (査読有)  
DOI: 10.1038/cddis.2014.339

[学会発表](計 11 件)

蔭池勇太、松岡雅人、アクリルアミドの

神経毒性に関する解析：小胞体ストレス応答の関与、第 87 回日本衛生学会学術総会、2017 年 3 月 28 日、フェニックス・シーガイア・リゾート(宮崎県・宮崎市)

宮山貴光、松岡雅人、銀ナノ粒子によるオートファジー阻害と細胞毒性発現の分子機構、第 87 回日本衛生学会学術総会、2017 年 3 月 27 日、フェニックス・シーガイア・リゾート(宮崎県・宮崎市)

藤木恒太、松岡雅人、慢性カドミウム曝露による肺癌細胞の悪性化、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 1 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

宮山貴光、松岡雅人、銀ナノ粒子による A549 細胞障害とリソソーム pH 破綻、第 23 回日本免疫毒性学会学術年会、2016 年 9 月 7 日、北九州国際会議場(福岡県・北九州市)

蔭池勇太、松岡雅人、ヒト神経芽細胞株とゼブラフィッシュを用いたアクリルアミドの神経毒性に関する解析、第 86 回日本衛生学会学術総会、2016 年 5 月 13 日、旭川市民文化会館(北海道・旭川市)

宮山貴光、松岡雅人、銀ナノ粒子を曝露したヒト肺胞上皮細胞におけるリソソーム機能の破綻、第 86 回日本衛生学会学術総会、2016 年 5 月 13 日、(北海道・旭川市)

藤木恒太、松岡雅人、カドミウム慢性曝露による肺癌細胞の悪性化と Notch1 の役割、第 86 回日本衛生学会学術総会、2016 年 5 月 13 日、(北海道・旭川市)

藤木恒太、松岡雅人、肺癌細胞に対するカドミウム慢性曝露の影響と Notch1 の役割、第 38 回日本分子生物学会年会第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015 年 12 月 2 日、神戸ポートアイランド 神戸国際展示場(兵庫県・神戸市)

宮山貴光、松岡雅人、リソソーム pH 変動による銀ナノ粒子の細胞内分布と毒性、メタルバイオサイエンス研究会 2015、2015 年 8 月 28 日、名古屋国際センター(愛知県・名古屋市)

藤木恒太、松岡雅人、Notch1 シグナルを介したカドミウムによる近位尿管障害、メタルバイオサイエンス研究会 2015、2015 年 8 月 27 日、名古屋国際センター(愛知県・名古屋市)

藤木恒太、松岡雅人、Notch1 シグナルを介したカドミウムによる近位尿管細胞障害、第 85 回日本衛生学会学術総会、2015 年 3 月 28 日、和歌山県民文化会館(和歌山県・

和歌山市)

〔その他〕

東京女子医科大学衛生学公衆衛生学(一)ホームページ

<http://www.twmu.ac.jp/Basic/hygiene1/index.html>

東京女子医科大学研究業績データベース衛生学公衆衛生学(一)

<http://gyoseki.twmu.ac.jp/twmhp/KgApp?k ozac=C11100000000&year=2016>

<http://gyoseki.twmu.ac.jp/twmhp/KgApp?k ozac=C11100000000&year=2015>

<http://gyoseki.twmu.ac.jp/twmhp/KgApp?k ozac=C11100000000&year=2014>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松岡 雅人 (MATSUOKA, Masato)  
東京女子医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 50209516

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

蔭池 勇太 (KOMOIKE, Yuta)  
東京女子医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 70386556

藤木 恒太 (FUJIKI, Koto)  
東京女子医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 80632504

### (4) 研究協力者

宮山 貴光 (MIYAYAMA, Takamitsu)

岩月 麻美子 (IWATSUKI, Mamiko)

稲村 尚子 (INAMURA, Hisako)

松村 賢一 (MATSUMURA, Kenichi)