

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26713030

研究課題名(和文) 逆ドラッグデザイン法の確立とポリグルタミン病分子治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of molecular therapy for polyglutamine diseases by reverse structure-based drug design

研究代表者

武内 敏秀 (Takeuchi, Toshihide)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座講師

研究者番号：70600120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,200,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患は、いずれも有効な治療法に乏しい難病である。本研究では、神経変性疾患の一種であるポリグルタミン病に対し、凝集形成抑制による治療法開発を行い、以下の3つの成果を得た。(1)ポリグルタミンタンパク質と凝集阻害化合物の結合様式を明らかにした。(2)分子シャペロンがエクソソームと呼ばれる細胞外小胞を介して細胞間伝播し、神経変性を抑制する機序を明らかにした。(3)薬物を効率的に脳内に送達するためのキャリア分子を開発した。以上の結果は、ポリグルタミン病ならびに神経変性疾患に対する治療法開発に有用な知見を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：Neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease and Parkinson's disease, are brain diseases with no effective therapies established to date. In this study, we aimed to develop therapy for polyglutamine diseases, one of the neurodegenerative diseases, and obtained three results. (1) We performed detailed analysis on the binding mode of disease-associated polyglutamine proteins with the aggregation inhibitor. (2) We found a novel proteostasis machinery that molecular chaperones are secreted from cells and transmitted to the other cells via exosomes, one of the extracellular vesicles, and suppress neurodegeneration in a non-cell autonomous manner. (3) We successfully developed peptide carriers that can pass through the blood-brain barrier, which can be utilized as brain delivery carriers for drugs. These results provide important knowledge for drug development for polyglutamine diseases and neurodegenerative diseases.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ポリグルタミン病 分子シャペロン エクソソーム 脳内送達

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD)、パーキンソン病 (PD)、ポリグルタミン (PolyQ) 病などの神経変性疾患は、脳内の様々な領域における神経細胞群の変性脱落により、多様な精神・神経症状を呈する疾患であり、いずれも有効な治療法に乏しい難病である。超高齢化社会に臨む我が国においては、神経変性疾患の病態解明および診断・治療法の開発は、学術的にも社会的にも喫緊の重要課題である。多くの神経変性疾患では、原因タンパク質の異常凝集や蓄積が疾患発症や病態進行に深く関与することが知られており、凝集体形成の抑制による疾患治療開発が進められている。

## 2. 研究の目的

本研究では、神経変性疾患に対し、原因タンパク質の凝集阻害による治療法の開発を行う。具体的には、PolyQ 病を対象として、(1)異常伸長 PolyQ タンパク質に対する凝集阻害化合物の結合様式を明らかにし、低分子化合物設計のための構造情報を得るとともに、(2)生体が本来有する分子シャペロンの神経変性抑制機序の解明を行う。また、(3)薬物を脳内に効率よく送達させるための脳内移行性キャリア分子の開発を行う。以上から、凝集形成抑制による PolyQ 病治療法開発に資する知見を得る。

## 3. 研究の方法

本研究で用いた PolyQ タンパク質は、チオレドキシニン融合体 (Thio-PolyQ) である。Thio-PolyQ は、37°Cにおいて、経時的、濃度依存的、PolyQ 鎖長依存的に凝集形成するモデル PolyQ タンパク質である。大腸菌発現系により PolyQ 鎖長の異なる Thio-PolyQ タンパク質を合成し、アフィニティークロマトグラフィーならびにイオン交換クロマトグラフィーにより精製し、SDS-PAGE により分子量と純度の確認を行った。また、異常伸長 PolyQ タンパク質に対する特異的リガンドである凝集阻害ペプチド QBP1、ならびに(3)におけるペプチドライブラリーのペプチドは、Fmoc 式固相合成法により合成し、HPLC により精製したのち、MALDI-TOFMS により分子量確認を行った。QBP1 立体構造解析に用いた 15N ラベル化 QBP1 (15N-QBP1) は、15N-QBP1 をチオレドキシニン融合タンパク質として大腸菌発現系により合成し、この融合タンパク質からチオレドキシニン部を酵素的に除去後、HPLC 精製および MS 確認により調製した。

## 4. 研究成果

(1) PolyQ タンパク質と凝集阻害ペプチドの複合体解析

一般に、疾患の治療標的 (疾患関連タンパク質等) が明らかな場合、標的の構造情報に基づいて治療薬を合理的に設計するドラッグデザイン創薬手法が有効である。しかし、神経変性疾患においては、原因タンパク質が

溶液中で容易に凝集してしまうため、立体構造解析がきわめて困難であり、治療候補化合物を設計するための構造情報に乏しいのが現状である。一方、PolyQ 病においては、原因となる異常伸長 PolyQ タンパク質に対して選択的結合活性・凝集阻害活性を有するペプチドリガンド QBP1 がファージディスプレイ法により同定されている (Nagai et al, J Biol Chem 2000)。そこで本研究では、PolyQ タンパク質に対する凝集阻害化合物の分子設計に資する構造情報を得ることを目的として、PolyQ タンパク質/QBP1 複合体の解析を行った。

まず、本研究で用いるモデル PolyQ タンパク質 Thio-PolyQ が、既報告と同様に、経時的、濃度依存的、PolyQ 鎖長依存的に凝集体を形成することを確認した (Nagai et al, Nat Struct Mol Biol 2007)。次に PolyQ タンパク質と QBP1 ペプチドとの結合様式について検討を行った。等温滴定型カロリメトリーにより、Thio-Q62 に対する QBP1 の結合定数、結合比を推定した。その結果、 $K_d=2.0 \mu\text{M}$ 、結合比  $n=2.9$  であった。表面プラズモン共鳴を用いた以前の検討では、 $K_d=5.7 \mu\text{M}$  と報告されており (Okamoto, Biochem Biophys Res Commun 2009)、今回の測定値とほぼ合致することが確認された。

次に、Thio-Q62/QBP1 複合体における QBP1 の NMR 立体構造解析を行った。等温滴定型カロリメトリーにより得られた結合モードに基づいて 15N-QBP1 と Thio-Q62 の複合体を形成させ、NMR 測定を試みた。その結果、15N-QBP1 に由来する NMR スペクトルが観測されたものの、著しく減弱しており、15N-QBP1 のみ (Thio-Q62 なし) のスペクトルとほぼ同一であった。これは、15N-QBP1 が NMR 測定中に凝集体に取り込まれた結果であると考えられ、Thio-Q62 は QBP1 存在下においても微細な凝集体を形成し、NMR 測定が困難であることが示唆された。Thio-Q62 の代わりに、より凝集性の低い短鎖 PolyQ タンパク質である Thio-Q45、Thio-Q35 を用いて NMR 測定を行ったが、Thio-Q62 の場合と同様に、やはりスペクトルが著しく減弱していた。405 nm の吸光度を指標とした濁度測定では、QBP1 添加により不溶性凝集形成がほぼ認められないことから、Thio-PolyQ タンパク質は QBP1 の存在下において、濁度測定では検出されない程度の微細な可溶性凝集体を形成していること、また、QBP1 は PolyQ タンパク質を可溶性微細凝集状態に移行させることで、不溶性凝集形成を抑制していることが示唆された。凝集性のより低い PolyQ タンパク質として、チオレドキシニンではなく、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) を用いた PolyQ 融合タンパク質を調製し、測定を進めている。

(2) 分子シャペロンのエクソソーム伝播を介した新しい神経変性抑制機構の解明

分子シャペロンは、タンパク質のミスフォ

ールディングや凝集形成を抑制することで、生体内のタンパク質恒常性を維持している。以前より、私たちは分子シャペロンの凝集抑制作用に着目し、PolyQ 病に対して分子シャペロンを用いた遺伝子治療法を開発する試みを進めていた。その過程において、Hsp40 などの分子シャペロンをウイルスベクターにより PolyQ 病モデルマウスの神経細胞に過剰発現させると、ウイルス感染細胞だけでなく、周辺のウイルス非感染細胞においても凝集体形成が抑制されることを見出し、分子シャペロンの個体レベルにおける non-cell autonomous な治療効果を報告した (Popiel et al, PLoS One 2012)。そこで本研究では、上記の分子機序を明らかにするため、培養細胞を用いた検討を行ったところ、Hsp40 をはじめとする細胞質の熱ショックタンパク質などの様々な分子シャペロンが、エクソソームと呼ばれる細胞外小胞の一種により積極的に細胞外分泌されていることを見出した。また、凝集性 PolyQ タンパク質を発現する PolyQ 病モデル細胞に対し、分子シャペロンを含むエクソソームを培地に添加して培養すると、PolyQ タンパク質の凝集形成が顕著に抑制されることがわかった。さらにショウジョウバエ個体を用いた検討から、分子シャペロンがエクソソームを介して細胞非自律的に遠隔組織の神経変性を抑制することを見出した。以上から、分子シャペロンはエクソソームを介して細胞外分泌、細胞間伝播し、他の細胞・組織で神経変性を抑制するという non-cell autonomous な治療効果を発揮することが明らかとなった (Takeuchi et al, PNAS 2015)。本研究の成果により、生体が備える新たな凝集抑制機構の分子機序が明らかとなったとともに、エクソソームに着目した治療法開発の可能性が示された。

### (3) 脳内移行性キャリア分子の開発

脳と末梢組織の間には血液脳関門 (BBB) と呼ばれる物理的障壁が存在し、特定のトランスポーターなどによって積極的に輸送される一部の分子を除き、ほぼ全ての血流中の分子は脳内への移行が制限されている。一般に脳疾患治療薬は脳内で働くことが求められるものの、末梢から投与された場合はやはり BBB により脳内移行が制限されると考えられることから、薬物の脳内移行を促進する汎用的な脳内送達キャリア分子の開発が強く求められている。そこで本研究では、薬物を脳内に効率よくデリバリーするキャリア分子の開発を行った。様々な配列からなる細胞移行性ペプチド PTD のライブラリーを作製し、in vitro で BBB 構造を再現した In vitro BBB kit を用いて網羅的に BBB 透過性を評価した。その結果、複数の BBB 透過性 PTD を同定した。このうち、in vitro で最も高い BBB 透過性が認められた PTD-A について、マウス心臓から in situ brain perfusion 法により灌流し、脳内移行性を評価したところ、脳実質中への

高い移行が認められた。また、PTD-A の脳内移行量は、PTD-A の初期濃度に依存して増大し、今回検討した濃度域では脳内移行量の頭打ち (移行量の飽和) は見られなかった。このことから、PTD-A は何らかのトランスポーターを介して脳内移行しているというよりは、むしろ別の機序により BBB を通過しているものと考えられる。BBB 透過機序に関しては今後も引き続き検討していく予定である。一方、血管内皮細胞株を用いた検討から、今回使用した濃度域での PTD-A の細胞毒性はほとんど認められなかった。以上の検討から、本研究で見出された PTD-A は、マウスにおいて高い脳内移行性を有し、薬物の脳移行性キャリア分子としての応用が高く期待できるものと考えられる (特許出願済み、論文準備中)。現在、PTD-A をマウスに末梢投与した後の全身分布や体内動態を検討している。また、脳内移行性に乏しい薬物と PTD-A をコンジュゲートさせ、末梢投与により脳移行性改善が認められるかどうかについて検討を進めている。

## 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 12 件)

- ① Toshihide Takeuchi, Non-cell Autonomous Maintenance of Proteostasis by Molecular Chaperones and Its Molecular Mechanism. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, in press. 査読あり
- ② Toshihide Takeuchi, and Yoshitaka Nagai. Protein Misfolding and Aggregation as a Therapeutic Target for Polyglutamine Diseases. *Brain Sciences* **7**, 128 (2017). 査読あり  
DOI: 10.3390/brainsci7100128.
- ③ Misao Akishiba, Toshihide Takeuchi, Yoshimasa Kawaguchi, Kentaro Sakamoto, Hao-Hsin Yu, Ikuhiko Nakase, Tomoka Takatani-Nakase, Fatemeh Madani, Astrid Gräslund, and Shiroh Futaki. Cytosolic antibody delivery by lipid-sensitive endosomolytic peptides. *Nature Chemistry* **9**, 751-761 (2017). 査読あり  
DOI: 10.1038/nchem.2779.
- ④ Akihiko Oku, Miki Imanishi, Daisuke Noshiro, Tomo Murayama, Toshihide Takeuchi, Ikuhiko Nakase, Shiroh Futaki. Use of calmodulin EF-hand peptides as  $Ca^{2+}$ -switchable recognition tags. *Biopolymers* **108**, e22937 (2017). 査読あり

DOI: 10.1002/bip.22937.

- ⑤ Yoshimasa Kawaguchi, Toshihide Takeuchi, Keiko Kuwata, Junya Chiba, Yasumaru Hatanaka, Ikuhiko Nakase, and Shiroh Futaki. Syndecan-4 Is a Receptor for Clathrin-mediated Endocytosis of Arginine-rich Cell-penetrating Peptides. *Bioconjugate Chemistry* **27**, 1119-1130 (2016). 査読あり  
DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00082
- ⑥ Coralie M. Backlund, Toshihide Takeuchi, Shiroh Futaki, and Greg Tew. Relating Structure and Internalization for ROMP-based Protein Mimics. *Biochimica et Biophysica Acta* **1858**, 1443-1450 (2016). 査読あり  
DOI: 10.1016/j.bbamem.2016.03.024.
- ⑦ Coralie M. Backlund, Federica Sgolastra, Ronja Otter, Lisa M. Minter, Toshihide Takeuchi, Shiroh Futaki, and Gregory N. Tew. Increased hydrophobic block length of PTDMs promotes protein internalization. *Polymer Chemistry* **7**, 7514-7521 (2016). 査読あり  
DOI: 10.1039/C6PY01615D.
- ⑧ Toshihide Takeuchi and Shiroh Futaki. Current Understanding of Direct Translocation of Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides and its Internalization Mechanisms. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **64**, 1431-1437 (2016). 査読あり  
DOI: 10.1248/cpb.c16-00505
- ⑨ Toshihide Takeuchi, Mari Suzuki, Nobuhiro Fujikake, H. Akiko Popiel, Hisae Kikuchi, Shiroh Futaki, Keiji Wada, and Yoshitaka Nagai. Intercellular Chaperone Transmission via Exosomes Contributes to Maintenance of Protein Homeostasis at the Organismal Level. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, E2497-2506 (2015). 査読あり  
DOI: 10.1073/pnas.1412651112.
- ⑩ Mari Suzuki, Nobuhiro Fujikake, Toshihide Takeuchi, Ayako Kohyama-Koganeya, Kazuki Nakajima, Yoshio Hirabayashi, Keiji Wada, and Yoshitaka Nagai. Glucocerebrosidase Deficiency Accelerates the

Accumulation of Proteinase K-Resistant  $\alpha$ -Synuclein and Aggravates Neurodegeneration in a *Drosophila* Model of Parkinson's disease. *Human Molecular Genetics* **24**, 6675-6686 (2015). 査読あり  
DOI: 10.1093/hmg/ddv372.

- ⑪ Ikuhiko Nakase, Toshihide Takeuchi, and Shiroh Futaki. Cell Penetrating Peptides for Chemical Biological Studies. *Methods in Molecular Biology* **1324**, 387-396 (2015). 査読あり  
DOI: 10.1007/978-1-4939-2806-4\_26.
- ⑫ Toshihide Takeuchi, H. Akiko Popiel, Shiroh Futaki, Keiji Wada, and Yoshitaka Nagai. Peptide-Based Therapeutic Approaches for Treatment of the Polyglutamine Diseases. *Current Medicinal Chemistry* **21**, 2575-2582 (2014). 査読あり  
DOI:10.2174/0929867321666140217124038

[学会発表] (計19件)

- ① ○武内敏秀、永井義隆「エクソソーム分泌の生体保護的役割」2017年度生命科学系学会合同年次大会ワークショップ「プロテオスタシス制御の新展開と疾患」、神戸、平成29年12月7日
- ② ○Toshihide Takeuchi, Masahiro Kanai, Kohji Ueda, Kazuaki Takafuji, Satoko Sakai, Yoshitaka Nagai. Induction of exosome secretion and its proteomic changes in the polyglutamine disease models. World Congress of Neurology 2017, Kyoto, Sep 20, 2017.
- ③ ○武内敏秀「エクソソームを介した生体恒常性維持と神経変性疾患」第6回神経難病フォーラム、大阪、平成29年8月19日
- ④ ○武内敏秀「細胞非自律的な細胞機能制御機構の解明」平成29年度日本薬学会奨励賞受賞講演、日本薬学会第137回年会、仙台、平成29年3月25日
- ⑤ 飯野真丈、○武内敏秀、渡辺健介、坂井聖子、河野健一、中瀬生彦、二木史朗「ペプチドタグを用いた膜タンパク質のヘテロ二量体形成制御」日本薬学会第137回年会、仙台、平成29年3月26日
- ⑥ ○Toshihide Takeuchi, Mari Suzuki, Nobuhiro Fujikake, H. Akiko Popiel, Hisae Kikuchi, Satoko Sakai, Shiroh Futaki, Keiji Wada, Yoshitaka Nagai.

Intercellular transmission of molecular chaperones via exosomes contributes to maintenance of organismal protein homeostasis. 2016 CSH Asia meeting: Biology & Function of Extracellular Vesicles: Exosomes, Microvesicles & Beyond, Suzhou, China, December 12-16, 2016.

- ⑦ ○武内敏秀、永井義隆「エクソソームを介した細胞非自律的タンパク質恒常性維持機構」第14回神経科学研究会、東京、平成28年10月1日
- ⑧ ○武内敏秀、永井義隆「シャペロンのエクソソーム分泌による細胞非自律的プロテオスタシス調節機構」第89回日本生化学会大会シンポジウム「プロテオスタシス制御の分子機構」、仙台、平成28年9月26日
- ⑨ ○武内敏秀、鈴木マリ、坂井聖子、二木史朗、和田圭司、永井義隆「Hsp70の機能欠損体が示す細胞非自律的な変性抑制効果」第8回日本RNAi研究会/第3回日本細胞外小胞学会、広島、平成28年9月1日
- ⑩ ○武内敏秀、鈴木マリ、藤掛伸宏、ポピエル明子、菊地寿枝、二木史朗、和田圭司、永井義隆「Non-cell autonomous therapeutic effects on polyQ disease models by exosomal chaperone transmission」第57回日本神経学会学術大会、神戸、平成28年5月18日
- ⑪ ○武内敏秀、鈴木マリ、坂井聖子、二木史朗、和田圭司、永井義隆「Hsp70の機能欠損体が示す細胞非自律的な変性抑制」日本薬学会第136回年会、横浜、平成28年3月27日
- ⑫ ○ Toshihide Takeuchi, Yoshimasa Kawaguchi, Keiko Kuwata, Shiroh Futaki. Syndecan-4 as a Possible Octaarginine Receptor for its Clathrin-Mediated Endocytic Uptake. 統合物質創製化学推進事業 第5回国際シンポジウム、名古屋、平成28年1月29日
- ⑬ ○武内敏秀、鈴木マリ、藤掛伸宏、ポピエル明子、菊地寿枝、二木史朗、和田圭司、永井義隆「分子シャペロンのエクソソームを介した細胞間伝播による細胞非自律的なタンパク質の恒常性維持機構」第10回臨床ストレス応答学会大会、東京、平成27年11月6日
- ⑭ ○武内敏秀、永井義隆「分子シャペロン

はエクソソーム細胞間伝播により細胞非自律的な治療効果を発揮する」第34回日本認知症学会学術集会、青森、平成27年10月2日

- ⑮ ○武内敏秀、鈴木マリ、藤掛伸宏、ポピエル明子、菊地寿枝、二木史朗、和田圭司、永井義隆「分子シャペロンはエクソソームを介した細胞間伝播により個体レベルのプロテオスタシス維持に寄与している」第7回日本RNAi研究会・第2回日本細胞外小胞学会、広島、平成27年8月27日
- ⑯ ○武内敏秀、鈴木マリ、藤掛伸宏、ポピエル明子、菊地寿枝、二木史朗、和田圭司、永井義隆「Intercellular chaperone transmission via exosomes contributes to non-cell autonomous therapeutic effects on polyglutamine disease models」第38回日本神経科学大会、神戸、平成27年7月28日
- ⑰ ○武内敏秀、秋柴美沙穂、川口祥正、二木史朗「抗体の細胞内送達を実現する天然毒素ペプチドの配列改変」日本ケミカルバイオロジー学会 第10回年会、仙台、平成27年6月11日
- ⑱ ○武内敏秀、鈴木マリ、藤掛伸宏、ポピエル明子、菊地寿枝、和田圭司、永井義隆「シャペロン伝播による細胞非自律的なタンパク質恒常性維持機構」日本薬学会 第135年会、神戸、平成27年3月26日
- ⑲ ○武内敏秀、鈴木マリ、藤掛伸宏、ポピエル明子、菊地寿枝、和田圭司、永井義隆「Maintenance of organismal proteostasis by intercellular transmission of Hsp40 through exosomes」第11回日本ショウジョウバエ研究会、金沢、平成26年6月5日

[図書] (計6件)

- ① 武内敏秀、永井義隆「神経変性疾患におけるエクソソームの役割」パラダイムシフトをもたらすエクソソーム機能研究最前線(落谷孝広監修、エヌ・ティー・エス出版) pp. 89-97 (2017).
- ② Gen Tanaka, Yoshimasa Kawaguchi, Keiko Kuwata, Toshihide Takeuchi, Ikuhiko Nakase, and Shiroh Futaki. Photoaffinity Labeling Methods to Explore Internalization Mechanisms of Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides. *Photoaffinity Labeling for Structural Probing Within Protein* (Hatanaka Y. and Hashimoto M. Ed.,

Springer Publishers, Inc.) pp. 225-240 (2017).

- ③ 武内敏秀、永井義隆「エクソソームによる生体内のタンパク質恒常性の維持」*月刊細胞 The CELL* (ニューサイエンス社) vol. 48, No. 1, pp. 5-8 (2016).
- ④ 武内敏秀、永井義隆「エクソソームを介したプロテオスターシス維持機構と神経変性疾患」*Dementia Japan* (日本認知症学会誌) vol. 30, No. 3, pp. 368-376 (2016).
- ⑤ Nobuhiro Fujikake, Toshihide Takeuchi, and Yoshitaka Nagai. HSF1 Activation by Small Chemical Compounds for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Heat Shock Factor* (Nakai A. Ed., Springer Publishers, Inc.) pp. 277-292 (2016).
- ⑥ 武内敏秀「細胞非自律的な細胞機能制御」*Peptide Newsletter Japan* (日本ペプチド学会) No. 101, pp. 9-11 (2016).

[産業財産権]

○出願状況 (計3件)

①

名称: TDP-43 の発現量を調節するアンチセンスオリゴヌクレオチド及びその用途

発明者: 永井義隆、前田和宏、武内敏秀、関正博、藤原健志、松田誠司、祖父江元、石垣診祐、佐橋健太郎

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2017-134890

出願年月日: 2017年7月10日

国内外の別: 国内

②

名称: 血液脳関門透過性ペプチド

発明者: 武内敏秀、永井義隆、中川慎介、丹羽正美、道具伸也、片岡泰文、高田芙友子

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2015-052967, PCT/JP2016/058406

出願年月日: 2015年3月17日

国内外の別: 国内

③

名称: 細胞質送達ペプチド

発明者: 二木史朗、秋柴美沙穂、川口祥正、武内敏秀

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2014-198741, PCT/JP2015/077395

出願年月日: 2014年9月29日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武内 敏秀 (TAKEUCHI, Toshihide)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座

講師

研究者番号: 70600120