

令和元年6月6日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07062

研究課題名(和文) PTP を介したSema3A情報伝達と樹状突起発達制御

研究課題名(英文) Sema3A-PTPdelta signaling regulates cortical dendritic growth

研究代表者

中村 史雄 (Nakamura, Fumio)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：10262023

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)：神経ガイド分子Sema3Aの細胞内情報伝達にチロシンホスファターゼPTP が関与することを明らかにした。この機構にはPTP の酵素活性が必要であった。Sema3A^{-/-}や PTP^{-/-}のホモ変異、Sema3A^{-/-}; PTP^{-/-}二重ヘテロ変異マウスでは大脳皮質錐体細胞樹状突起の発達が不良であった。PTP^{-/-}脳ではFynキナーゼのY527が過剰リン酸化されていた。Y527の脱リン酸化はFynを活性化する。Fyn^{-/-}やPTP^{+/-}; Fyn^{+/-}マウスも樹状突起の低形成を示すことから、皮質錐体細胞樹状突起発達にはSema3A-PTP⁻-Fyn経路が関わると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生後の中枢神経系では神経突起やシナプスが発達・成熟する。この異常が様々な神経疾患や高次機能障害の原因となる。入力側の神経突起である樹状突起は入力情報を統合する。その発達は神経機能に深く関わりを持つ。神経ガイド分子Sema3Aは大脳皮質・錐体細胞の樹状突起を発達させる。このSema3Aの作用を媒介する分子としてチロシンホスファターゼPTP を同定した。さらにPTP はチロシンキナーゼFynを介して樹状突起の発達を促進する。自閉症などの神経疾患の原因遺伝子として PTP が同定されていることから、本研究の成果が神経疾患の新たな治療法や治療薬の開発に役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Sema3A, an axon guidance molecule, repels peripheral sensory neurons. Sema3A also facilitates the growth of cortical pyramidal dendrites. We found that PTPdelta (PTPd), one of type IIa protein tyrosine phosphatases, mediates Sema3A-signaling. RNAi against PTPd attenuated Sema3A-induced growth cone collapse response of mouse embryonic sensory neurons. PTPd played a major role in Sema3A-dependent cortical dendritic growth. Ptpd^{-/-}, Sema3a^{-/-} and Ptpd^{+/-}; Sema3a^{+/-} mutant mice exhibited poor arborization of basal dendrites of cortical layer V neurons, indicating the genetic interaction of Sema3A and PTPd. In Ptpd^{-/-} brains, Fyn and Src kinases were hyperphosphorylated at their C-terminal Tyr527 residues. Sema3A induced dephosphorylation of Tyr527 in the cortical dendrites of wild-type but of Ptpd^{-/-}. Arborization of cortical basal dendrites was reduced in Fyn^{-/-} and in Ptpd^{+/-}; Fyn^{+/-} mutants. PTPd mediates Sema3A-signaling through the activation of Fyn by dephosphorylation.

研究分野：神経科学

キーワード：チロシンホスファターゼ リン酸化 PTP Sema3A Fyn 樹状突起 CRMP1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経ガイド分子セマフォリンの一つ Sema3A は脊髄後根神経節(DRG)の神経成長円錐を退縮させる。また大脳皮質錐体細胞の樹状突起発達を促進させる。Sema3A は Neuropilin-1・Plexin-A 受容体複合体に結合し、細胞内情報伝達を活性化する。これら受容体の下流においてチロシンキナーゼ Fyn とセリン・トレオニンキナーゼ Cdk5 が活性化される (Sasaki,2002)。Cdk5 はさらに Sema3A 下流因子の CRMP1/2 をリン酸化して細胞骨格を制御する。大脳皮質錐体細胞において Sema3A と Fyn が遺伝的に連関して樹状突起形成やシナプス形成を促進する (Morita, 2006)。しかし Sema3A 情報伝達における Fyn の活性化機構は不明であった。

この研究に先立ち、CRMP1 がアクチン骨格結合蛋白質の Filamin-A と相互作用することを線虫や初代培養神経細胞を用いた実験から見だし報告した (Nakamura, 2014)。線虫のセマフォリン Sema2A(mab-20)変異体や受容体の plexin-2 (plx-2)変異体で示す神経投射異常が、IIa型チロシンホスファターゼ(PTP)の PTP-3(ptp-3)変異体でも報告された (Ackley, 2005)。哺乳類の IIa 型 PTP は LAR、PTP^α、PTP^β の3つのメンバーで構成される (Stoker,2015)。このうち PTP^β が Sema3A 情報伝達に関わることを RNAi 実験により見いだした。PTP^β は生後発達期の中樞神経系に発現し、記憶学習やシナプス形成・成熟に関与する (Uetani,2000; Takahashi,2013)。これらの背景から線虫における Sema2A-PTP-3、マウスにおける Sema3A-PTP^β 経路の実証を中心に研究を進めた。

2. 研究の目的

本研究ではセマフォリン情報伝達における PTP の役割を明らかにする。まず線虫を用いて Sema2A, Plexin-2, PTP-3 間の遺伝的相互作用を検証する。次に脊椎動物の Sema3A 情報伝達における IIa 型 PTP、特に PTP^β の役割を明らかにする。Ptp ノックアウト(KO)マウス脳の解析から得られた生体内基質(Fyn, SIRP^β)について、Sema3A 情報伝達への関与を検討する。また CRMP1 が Fyn でリン酸化されること (Buel, 2010)から、このリン酸化と Sema3A 情報伝達との関わりにも検討を加えた。

3. 研究の方法

(1) 線虫 DD/VD 神経投射による Sema2A-PTP-3 情報伝達経路の解析

Sema2A(mab-20), Plexin-2(plx-2), PTP-3(ptp-3)の変異体に DD/VD 神経を GFP で標識する形質 oxIs12(unc47::GFP)を導入し、背側 DD/VD の連続性を評価した。線虫の遺伝学解析において、strong allele の二重変異体では表現型が増強されず、weak allele の二重変異体では表現型が増強される。このことから二重変異体における表現型の増強の有無を評価した。またアルカリホスファターゼ標識を付加した Sema2A を用いて、Plexin-2 や PTP-3 に対する特異的結合を評価した。

(2) マウス初代培養神経細胞による評価

マウス脊髄後根神経節細胞(DRG)の初代培養に、IIa 型 PTP の LAR, PTP^α, PTP^β に対する siRNA を導入する。Sema3 退縮応答に対するそれぞれの RNAi の阻害効果を検証する。Ptp KO DRG における Sema3A 感受性低下の確認や、PTP^β の再発現による退縮応答の回復を検証する。この時 PTP^β 不活性変異体も再発現させ、酵素活性が Sema3A 情報伝達に必要かどうかを検証する。マウス大脳皮質神経細胞の初代培養を用い、PTP^β の樹状突起局在や、Sema3A 依存的な樹状突起の伸長を検証する。また PTP^β 生体内基質として同定した分子 (Fyn/Src, SIRP^β) が、神経細胞において Sema3A 刺激に伴い脱リン酸化されるかどうかをリン酸化部位特異抗体を用いた免疫染色により検証する。

(3) ノックアウトマウスによる検証

Sema3a, Ptp^β, Fyn KO マウスに皮質錐体細胞を GFP でラベルする GFP-M の形質を掛け合わせにより導入する。生後 1 月齢脳標本の冠状断切片において皮質 V 層錐体細胞を共焦点顕微鏡により撮像し、基底樹状突起の伸長や分岐を ImageJ で計測する。KO マウスを交配させ、Sema3a^{+/-}; Ptp^{+/-}あるいは Ptp^{+/-}; Fyn^{+/-}の二重ヘテロ変異マウスを得て、同様の解析を行う。

(4) Fyn による CRMP1 リン酸化と Sema3A 情報伝達

CRMP1 の Tyr504 が Fyn でリン酸化されること (Buel, 2010)から、このリン酸化と Sema3A 情報伝達の関わりを検討する。リン酸化される Tyr を Phe に置換した変異体 (CRMP1-Y504F) を作成し、DRG に導入し Sema3A 退縮応答の阻害効果を検証する。また CRMP1-Y504F をマウス E15 胚の終脳に電気穿孔法を用いて導入し、大脳皮質錐体神経細胞の樹状突起形成に及ぼす効果を検証する。

(5) リン酸化プロテオミクス解析で同定した SIRP^β と Sema3A 情報伝達

Ptp KO マウス脳で顕著なリン酸化の増大を示した SIRP^β について (2)と同様の検証を行う。DRG に SIRP^β の siRNA を導入し、Sema3A 応答に対する抑制効果を検証する。SIRP^β のリン酸化特異抗体を用いて Sema3A 刺激に伴うリン酸化変化を検証する。リン酸化チロシンをフェニルア

ラニンに置換した SIRP 変異体を強制発現させ Sema3A 応答への効果を検討する。

4. 研究成果

(1) 線虫 Sema2A, Plx-2, Ptp-3 の遺伝的相互作用と神経回路形成

腹側に 19 個の神経細胞体を持つ DD/VD 神経は、交連線維を形成し背側に投射する。これらの線維は背側で 1 本の連続した神経束(dorsal nerve cord)を形成する。ところが Sema2A(mab-20)や受容体 Plexin-2 (plx-2)の変異体では背側で DD/VD 神経束が断裂する。同様の表現型を線虫 IIa 型 PTP の *ptp-3* 変異体が示す(Ackley,2005)。strong allele 変異及び、weak allele 変異の掛け合わせ解析から、Sema2A, Plx-2, PTP-3 間に遺伝的相互作用を認めた(図 1A-C)。さらに培養細胞を用いた結合実験から Sema2A の Plexin-2 への結合を PTP-3 が増強することを見いだした。すなわち PTP-3 は Plexin-2 の受容体構成サブユニットとして関与し、Sema2A 情報伝達に関わると推測された。

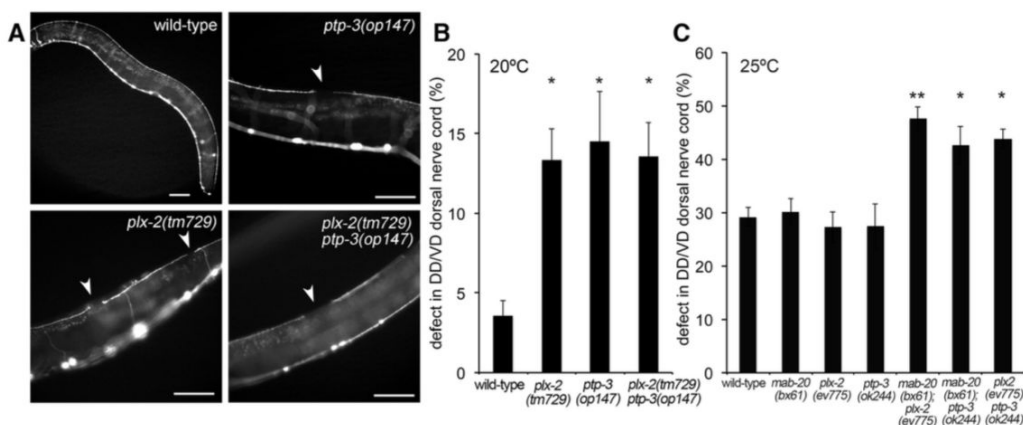


図1 A) 線虫の DD/VD 神経走行。野生型(wild-type)では背側で1本の神経束を形成する。strong allele 変異の *ptp-3(ok147)*, *plx-2(tm729)* 及びその二重変異では背側神経束に切れ目が出現する。これを表現型として計測した。B) strong allele における出現頻度。strong allele の二重変異では一重変異と変わらない。これは 2 つの遺伝子間の相互作用を示唆する。C) weak allele における出現程度。Sema2A(*mab-20(bx-61)*), *plx-2(ev775)*, *ptp-3(ok244)* の weak allele では単独変異では野生型と変わらないが、二重変異では表現型が増強される。なお Sema2A(*mab-20(bx61)*)は温度感受性のため、weak allele の検証は 25 °C で行った。そのため野生型における表現型出現頻度が 20 °C にくらべ増強する。スケールバー 50 μ m。

(2) マウス脊髄後根神経節 (DRG) における PTP の Sema3A 情報伝達への関与

LAR, PTP, PTP のうち PTP の RNAi のみが Sema3A 退縮応答を抑制した(図 2 A, B)。Ptp KO マウスの DRG に PTP を再発現させ、Sema3A 退縮応答を検討した。PTP 野生型(wt)の再発現は Sema3A 応答を回復させるが、酵素不活性型(C/S)の発現は回復させない(図 2C, D)。これは PTP が酵素活性を介して Sema3A 情報伝達を媒介することを示す。

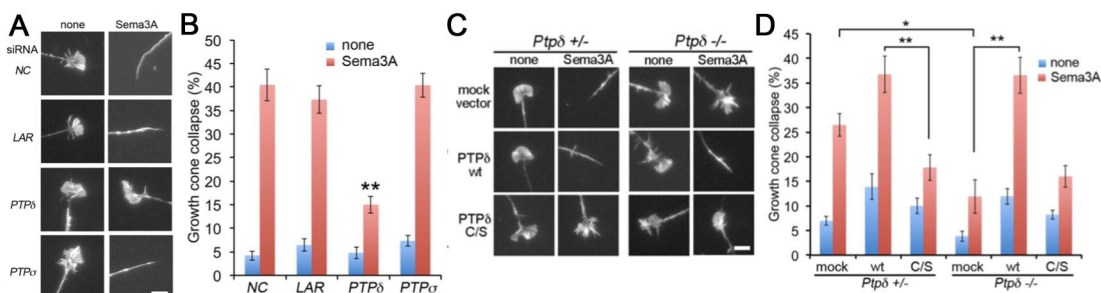


図 2 A, B) IIa 型 PTP RNAi の効果 IIa 型 PTP, LAR PTP, PTP に対する siRNA を導入したマウス E16DRG の Sema3A 退縮応答。PTP の siRNA のみが退縮応答を抑制した。NC は negative control。C, D) PTP ヘテロ(+/-)あるいはホモ(-/-)由来の DRG に PTP を再発現させ、Sema3A 退縮応答を検討した。ホモに PTP 野生型(wt)を発現させると、Sema3A 感受性が回復する。しかし不活性型(C/S)は回復しない。これは PTP の酵素活性が Sema3A 情報伝達に関与することを示す。スケールバー 10 μ m。

(3) Sema3a, Ptp ノックアウトマウス脳の表現型解析

Sema3a, Ptp KO マウスに GFP-M の形質を導入し、皮質錐体細胞の基底樹状突起の分岐や伸長を定量した(図 3 A-F)。野生型の皮質錐体細胞は太く長い基底樹状突起を複数伸長するが(図 3A)、Sema3a^{-/-}や Prp^{-/-}のホモ変異脳では基底樹状突起の発達が悪い(図 3B, C)。Sema3a^{+/-};Ptp^{+/-}二重ヘテロ変異マウスも同様の表現型を示した(図 3F)。また基底樹状突起の Sholl 解析を行い、野生型や単一ヘテロ変異に比して、ホモ変異や、二重ヘテロ変異マウスにおける樹状突起発達の低下を明らかにした(図 3G, H)。基底樹状突起の長さも同様の差を認めた。さらに皮質神経細胞の初代培養において、Sema3A 依存的な樹状突起伸長が PTP ホ

モ体で低下した(図 3I)。これらの結果は生体内で Sema3A 情報伝達に PTP が関与することを示す。

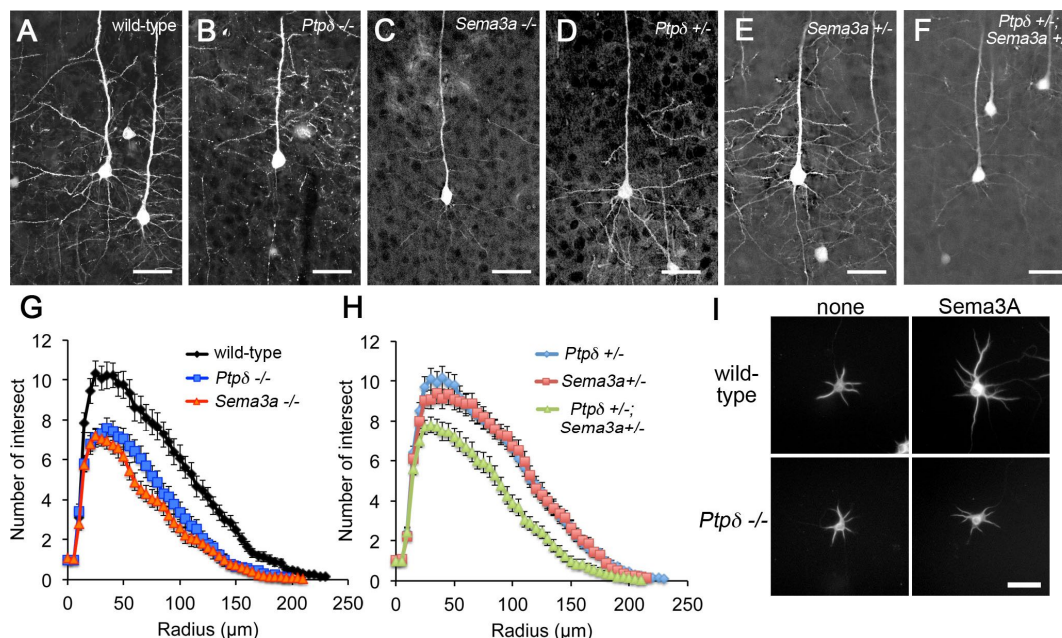


図 3 A-F)野生型及び変異マウスにおける皮質V層錐体細胞の基底樹状突起。A)野生型では基底樹状突起が横方向に発達し分岐する。B, C)PTP や Sema3A ノックアウトのホモ体では基底樹状突起の発達が悪い。D, E)単一ヘテロ変異体では野生型と同様の発達を示すが二重ヘテロ変異では基底樹状突起の発達が悪くなる。G)野生型とホモ体の Sholl analysis。H)ヘテロ変異の Sholl analysis。いずれもホモ体及び二重ヘテロ変異における異常を示す。I) 初代培養した野生型、PTP ホモ体由来の皮質神経細胞。Sema3A による突起伸長が PTP ホモ体の神経では見られない。スケールバー 50 μm。

(4) PTP による Fyn の活性制御

Ptp KO 脳をチロシンリン酸化抗体でプロットすると、ホモ体で 100, 60kDa の過剰リン酸化を認めた(図 4A)。60kDa のチロシンリン酸化タンパク質として Fyn/Src があること、Sema3A 情報伝達に Fyn が関与すること(Morita, 2006)から、Fyn の免疫沈降により過剰リン酸化を確認した。さらに Fyn/ Src のリン酸化特異抗体を用いて検討し、ホモ体において C 末端の Tyr527 の過剰リン酸化を認めた(図 4B)。Tyr527 のリン酸化は Fyn/Src のキナーゼ活性を抑制することから、PTP はこの残基を脱リン酸化して Fyn/Src を活性化すると考えられた。*Fyn*^{-/-} KO や *Ptp*^{+/-}; *Fyn*^{+/-} 二重ヘテロ変異において皮質基底樹状突起の低形成が認められた。また野生型マウス大脳の初代培養系では Sema3A 依存的な Fyn/Src の Tyr527 脱リン酸化が生じるが、*Ptp* KO ホモ体では認められなかった(図 4C, D)。これらの事実から PTP と Fyn は遺伝的に相互作用して Sema3A 情報伝達を媒介すると考えられた。

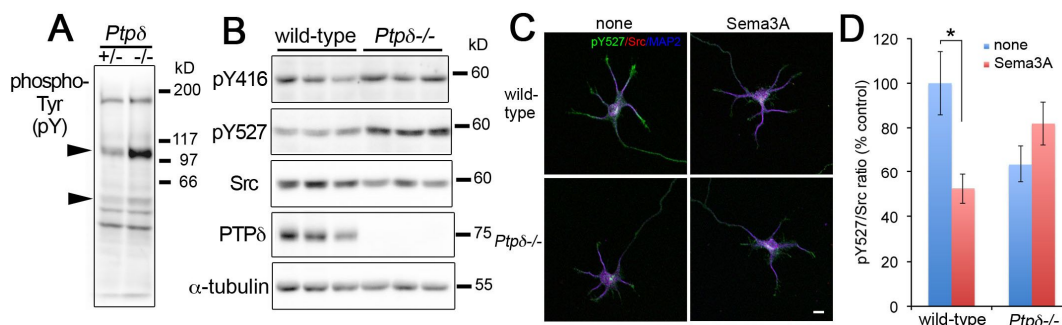


図 4 A) *Ptp* ヘテロ(+/-)、ホモ(-/-)脳のリン酸化抗体プロット。ホモでは 100, 60kDa の過剰リン酸化が認められる。これらは PTP の内在性基質と考えられる。B) Src/Fynリン酸化部位特異抗体によるプロット。*Ptp*^{-/-}では pY527 の過剰リン酸化が認められる。C, D) 初代培養した野生型(wild-type)、*Ptp* ホモ体由来皮質神経細胞の pY527 染色(緑)。Sema3A 刺激に伴い pY527 は野生型において減少するが、ホモ体では変化しない。緑, pY527; 赤, Src; 青, MAP2。スケールバー 10 μm。

(5) Fyn による CRMP1 リン酸化と Sema3A 情報伝達

CRMP1 の Tyr504 が Fyn でリン酸化されること(Buel, 2010)から、このリン酸化と Sema3A 情報伝達の関わりを検討した。CRMP1 の Tyr504 を Phe に置換した変異体(CRMP1-Y504F)は DRG において Sema3A 退縮応答を阻害した。また CRMP1-Y504F は大脳皮質錐体神経細胞

胞の樹状突起形成を抑制した。一方野生型の CRMP1 は抑制しなかった。神経細胞において Tyr504 のリン酸化は Sema3A 刺激に伴い一過性に上昇した。CRMP1/2 は Cdk5 によりリン酸化される Ser522 が Sema3A 情報伝達に関わることが示されている。このことから CRMP1 においては Tyr504 と Ser522 と二重リン酸化が Sema3A 情報伝達に必要と推測された。

(6) *Ptp* KO マウス脳におけるチロシンリン酸化プロテオミクス解析

Ptp ホモ体において 100kDa の SIRP が過剰にチロシンリン酸化されていた(図 4A)。SIRP の RNAi 発現抑制を DRG で行うと、Sema3A 退縮応答が抑制された。ところが SIRP の 4 箇所(438, 460, 477, 501)に Phe 置換を導入した変異体の過剰発現は Sema3A 退縮応答を抑制しなかった。SIRP はチロシンリン酸化/脱リン酸化とは異なる機構で Sema3A 情報伝達に関わると考えられた。

当初はリン酸化のライブイメージングを行う計画であったが、Sema3A-PTP 情報伝達の解析に時間を要したことから研究機関を異動したことにより、リン酸化動態は固定標本での検証とのみとなった。同様に病理検体の解析も行えなかった。しかし研究途中で見いだした、(5) *Fyn* による CRMP1 のチロシンリン酸化は、Sema3A-PTP -*Fyn* 経路を補強するものであり、現在も研究を進めている。今後は *Ptp* KO マウスで新たに見いだした軸索投射の異常と、(6) SIRP など PTP 生体内基質の関わりを検討する。

引用文献

- Ackley BD et al. J Neurosci 25:7517-28 (2005).
Buel GR et al, J Cell Biochem 111:20-28 (2010).
Morita A et al. J Neurosci 26:2971-80 (2006).
Nakamura F et al. Nat Commun doi: 10.1038/ncomms6325. (2014).
Sasaki Y et al. Neuron 516:360-75 (2002).
Stoker AW Semin Cell Dev Biol 37:90-97 (2015).
Takahashi H and Craig AM Trends Neurosci 36:522-34(2013)
Uetani N et al. EMBO J 19:2775-85 (2000).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計12件)

- 1) Watanabe K, Nomoto M, Nakamura F, Hachuda S, Sakata A, Watanabe T, Goshima Y, Baba T. Label-free and spectral-analysis-free detection of neuropsychiatric disease biomarkers using an ion-sensitive GaInAsP nanolaser biosensor. Biosens Bioelectron. 117:161-167 (2018). doi: 10.1016/j.bios.2018.05.059. 査読有
- 2) Nakamura H, Takahashi-Jitsuki A, Nakamura F 他 (9 番目・13 人) Proteome and behavioral alterations in phosphorylation-deficient mutant Collapsin Response Mediator Protein2 knock-in mice. Neurochem Int. 119:207-217 (2018). doi: 10.1016/j.neuint.2018.04.009. 査読有
- 3) Niwa S, Nakamura F, Tomabechi Y, Aoki M, Shigematsu H, Matsumoto T, Yamagata A, Fukai S, Hirokawa N, Goshima Y, Shirouzu M, Nitta R. Structural basis for CRMP2-induced axonal microtubule formation. Sci Rep. 2017 Sep 6;7(1):10681. doi: 10.1038/s41598-017-11031-4. 査読有
- 4) Nakamura F, Okada T, Shishikura M, Uetani N, Taniguchi M, Yagi T, Iwakura Y, Ohshima T, Goshima Y, Strittmatter SM. Protein Tyrosine Phosphatase δ Mediates the Sema3A-Induced Cortical Basal Dendritic Arborization through the Activation of Fyn Tyrosine Kinase. J Neurosci. 37(30):7125-7139 (2017). doi: 10.1523/JNEUROSCI.2519-16.2017. 査読有
- 5) Tobe BT, Crain AM, Nakamura F 他(15 番目・51 人) Probing the lithium-response pathway in hiPSCs implicates the phosphoregulatory set-point for a cytoskeletal modulator in bipolar pathogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 114(22):E4462-E4471 (2017). doi: 10.1073/pnas.1700111114. 査読有
- 6) Yamane M, Yamashita N, Hida T, Kamiya Y, Nakamura F, Kolattukudy P, Goshima Y. A functional coupling between CRMP1 and Nav1.7 for retrograde propagation of Semaphorin3A signaling. J Cell Sci. 130(8):1393-1403 (2017). doi: 10.1242/jcs.199737. 査読有
- 7) Takaya R, Nagai J, Nakamura F, 他 (7 番目・11 人) CRMP1 and CRMP4 are required for proper orientation of dendrites of cerebral pyramidal neurons in the developing mouse

brain. Brain Res. 1655:161-167 (2017). doi: 10.1016/j.brainres.2016.11.003. 査読有

8) Nakamura H, Yamashita N, Nakamura F 他 (12 番目・14 人) Comprehensive behavioral study and proteomic analyses of CRMP2-deficient mice. Genes Cells. 21(10):1059-1079 (2016). doi: 10.1111/gtc.12403. 査読有

9) Makihara H, Nakai S, Nakamura F, 他 (5 番目・13 人) CRMP1 and CRMP2 have synergistic but distinct roles in dendritic development. Genes Cells. 21(9):994-1005 (2016). doi: 10.1111/gtc.12399. 査読有

10) Goshima Y, Yamashita N, Nakamura F, Sasaki Y. Regulation of dendritic development by semaphorin 3A through novel intracellular remote signaling. Cell Adh Migr. 10(6):627-640 (2016). 査読有

11) Sato S, Nakamura F, Hiroshima Y, Nagashima Y, Kato I, Yamashita N, Goshima Y, Endo I. Caerulein-induced pancreatitis augments the expression and phosphorylation of collapsin response mediator protein 4. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 23(7):422-31 (2016). doi: 10.1002/jhbp.361. 査読有

12) Shishikura M, Nakamura F, Yamashita N, Uetani N, Iwakura Y, Goshima Y. Expression of receptor protein tyrosine phosphatase δ , PTP δ , in mouse central nervous system. Brain Res. 1642:244-254 (2016). doi: 10.1016/j.brainres.2016.03.030. 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

1) Shishikura M, Nakamura F, Goshima Y., Layer and region specific expression of receptor protein tyrosine phosphatase , PTP , in mouse central nervous system.
第 39 回日本神経科学大会 2016 年 7 月 20 日～22 日 パシフィコ横浜 横浜

2) Nakamura F, Goshima Y, Strittmatter SM., Protein Tyrosine Phosphatase mediates Sema3A-induced cortical basal dendritic arborization through the activation of Fyn tyrosine kinase. Axon guidance, synapse formation & regeneration 2016 年 9 月 20 日～24 日 Cold Spring Harbor Lab. New York U.S.A.

3) Kawashima T, Nakamura F, Goshima Y. The involvement of Fyn phosphorylation of Collapsin Response Mediator Protein 1 (CRMP1) in Semaphorin 3A signaling.
第 40 回日本神経科学大会 2017 年 7 月 20 日～23 日 幕張メッセ 幕張

4) 河嶋 岳、中村 史雄、五嶋 良郎 Fyn による CRMP1 Tyr504 のリン酸化は Semaphorin 3A 情報伝達に参与する。2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年 12 月 6 日～9 日 神戸ポートアイランド 神戸

5) Kawashima T, Goshima Y, Nakamura F., CRMP1 phosphorylation at Tyr 504 participates in Sema3A-signaling Molecular Mechanisms of Neuronal Connectivity. 2018 年 9 月 25 日～29 日 Cold Spring Harbor Lab. New York U.S.A.

6) Nakamura F. Protein tyrosine phosphatase d mediates Semaphorin-3A-induced dendritic growth of cortical pyramidal neurons. Workshop on Frontiers in Phosphatase Research and Drug Discovery (ICPP13) 2018 年 10 月 23 日 東京医科歯科大学 東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし。

(2) 研究協力者

實木 葵 Jitsuki Aoi

穴倉 まりあ Shishikura Maria

河嶋 岳 Kawashima Takeshi

岡田 貴子 Okada Takako

五嶋 良郎 Goshima Yoshio