

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590348

研究課題名(和文) 関節リウマチ病態形成における Pin1 分子の役割の検討

研究課題名(英文) Pivotal role of Pin1 in rheumatoid arthritis pathogenesis

研究代表者

青木 一郎 (AOKI ICHIRO)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：00184028

研究成果の概要(和文)：

(1) ヒト滑膜組織における Pin1 分子と浸潤増殖に関する MMP-1、MMP-3、PCNA 分子との発現を免疫染色および滑膜細胞株 (FLS) で検討し、有意の相関を認めた。

(2) TGF- β 1 刺激により Pin1 高発現 RA-FLS に alpha-SMA の発現増強と形態学的な筋線維芽細胞への分化が認められた。

(3) Pin1 と NF- κ B および IL-6 転写制御因子の C/EBP- β との間に正の相関がみられた。

研究成果の概要(英文)：Pin1 expression was significantly higher in RA-ST than in OA-ST. The expression of MMP-1, MMP-3, and PCNA was also significantly elevated in RA-ST. Double immunofluorescent staining revealed co-localization of Pin1 and p53 in the nuclei of RA-ST. Positive correlation with Pin1 and C/EBP- β (a transcription factor of IL6) was also indicated. These results suggest that Pin1 may be involved in the pathogenesis of RA binding with p53 to activate the proteins MMP-1, MMP-3, and PCNA. Therefore, Pin1 may play a pivotal role in the pathogenesis of RA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：骨・関節・筋肉・皮膚・感覚器

1. 研究開始当初の背景

(1) Pin1 はリン酸化 RelA に結合することにより NF- κ B を調節し、腫瘍細胞の活性化に関与する。共同研究者の一人である梁明秀はハーバード大学医学部においてペプチジルプロリルイソメラーゼ Pin1 がリン酸化さ

れた蛋白質に反応性に結合し、シス/トランス構造変化を引き起こすことにより、数多くのリン酸化蛋白質の機能を調節することを明らかにした。タンパク質リン酸化に基づく細胞内シグナル伝達機構は細胞増殖・活性化

に重要であり、その過剰は増殖制御機構を破壊し、細胞を癌化に導いてしまう。前立腺癌、乳癌などにおいて細胞の増殖・浸潤などの形質の発現に Pin1 が重要であり、Pin1 分子と RelA/p65 の結合が NFkappaB 活性化に深く関与し、これら浸潤・増殖などの形質を調節していることを明らかにしている。

(2) 一方、関節リウマチ患者滑膜は正常滑膜とは異なる表現型を示し、腫瘍様の強い浸潤増殖活性をもちパンヌス形成を来すことが知られている。パンヌスは関節リウマチの病態の根幹を形成している。関節リウマチの関節で形成されるパンヌスは関節滑膜細胞、間質細胞、血管、免疫細胞など多彩な細胞から構成されるが増殖浸潤を示し関節だけでなく関節下の軟骨、骨組織も破壊し、関節リウマチの病態の中でもっとも重要な関節の破壊変形を引き起こす。この過程で滑膜細胞は筋線維芽細胞の表現型をもつようになり浸潤増殖しパンヌスの主体となると同時に、MMP など蛋白分解酵素を産生し軟骨を破壊してゆく。そして、最終的には破骨細胞を活性化し骨の破壊を導くと考えられている。また、滑膜組織に浸潤増殖するリンパ球がその病態形成に重要であることもわかってきている。これら細胞の活性化には TNF α 刺激からの NFkappaB 活性化が重要とされている。NFkappaB 活性化と Pin1 分子の関連はすでに前立腺癌、乳癌など悪性腫瘍での研究で明らかであるので、滑膜細胞自体の内的な活性化異常の要因として Pin1 分子の関与があると考えた。

2. 研究の目的

関節リウマチ滑膜のパンヌス形成に至る過程での Pin1 分子の関与について検討し、Pin1 分子の関節リウマチにおける生物学的意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 関節における Pin1 発現の亢進の検討：予備的な免疫染色では関節リウマチ滑膜において高発現細胞の増加を認めている。しかし、関節リウマチの病態は患者により異なり一様ではなく亢進の程度は各患者により様々であるので、症例数を増やしさらに詳細

に検討する。

(2) Pin1 高発現細胞、抗 Pin1 抗体と各種臨床指標との関連の検討：Pin1 高発現細胞は滑膜上皮細胞、線維芽細胞様滑膜上皮細胞、リンパ球などに分かれ、多様であるので各高発現細胞群について各種臨床指標との関連を検討する。特に、パンヌス形成の程度、活動性と関連のある指標に注目し検討をすすめる。抗 Pin1 抗体についても多数例について検討し、関節リウマチの診断指標となりうるかを検討する。また、滑膜における Pin1 発現との関連を検討する。

(3) Pin1 高発現細胞多様性の解析：予備的解析では Pin1 分子はさまざまな細胞で発現し、滑膜組織における Pin1 高発現細胞の多様性が明らかになっている。そこで、免疫組織学的手法を用いて Pin1 高発現細胞の多様性を検討する。リンパ球系細胞と滑膜、線維芽細胞系細胞に大きく区別して解析を進める。すでに関節リウマチ滑膜で高発現が明らかになっている他のタンパク質 (MMP、TIMP、RANKL など) との発現の相関をみる。滑膜細胞は関節リウマチにおいて筋線維芽細胞様に分化してゆくと考えられているので、 α -smooth muscle actin の発現との関係も明らかにする。

(4) 培養滑膜細胞の樹立：関節リウマチ患者の関節手術時に得られる滑膜組織を凍結保存すると同時に、培養滑膜細胞を樹立し保存する。樹立した細胞を利用し Pin1 分子の関節リウマチ滑膜における役割を解析する。また、日本人由来の培養滑膜細胞は今後のリウマチ研究の貴重なリソースとなると考えられる。特に、分子標的薬開発には欠くことの出来ないリソースとなるであろう。

(5) 滑膜組織、培養滑膜細胞を用いた検討：滑膜組織、培養滑膜細胞においてすでに関節リウマチ滑膜で高発現が明らかになっている他のタンパク質 (MMP、TIMP など) と Pin1 分子の発現との発現の相関をみる。培養滑膜細胞に対しては Pin1 阻害薬である jaglone や Pin1 RNAi を導入し、in vitro での増殖能、浸潤能、MMP 産生能に変化がみられるかを検討する。また、抗 TNF 抗体や NFkappaB 阻害薬との併用効果を検討する。種々サイトカインを用いた筋線維芽細胞への分化誘導実験を行い、Pin1 の関与を検討す

る。

4. 研究成果

(1) Pin1 は、RA 及び OA の滑膜上皮細胞やリンパ球、間質細胞などに発現した。特に滑膜上皮細胞において Pin1 の発現が強陽性または陽性を示したものが、OA で 11 例中 6 例 (55%) に認められたのに対し、RA では 39 例中 35 例 (90%) に認められ、RA で OA より有意に高い発現を認めた。続いて、RA 滑膜組織を、浸潤マーカーである MMP-1、MMP-3 抗体、増殖マーカーである PCNA 抗体、筋線維芽細胞マーカーである alpha-SMA 抗体などで免疫組織染色を行ったところ、Pin1 の高発現した RA 組織では、MMP-1、MMP-3 や PCNA は共に有意に高発現していた。また、alpha-SMA は血管壁周囲だけでなく滑膜上皮細胞にも高発現していた。

(2) それらの滑膜組織から、RA および OA 滑膜細胞の初代培養株 (以下、RA-FLS、および OA-FLS) を複数株樹立した。これらの培養滑膜上皮細胞から可溶性タンパク質を抽出し、ウエスタンブロット法を行ったところ、OA-FLS と比較して RA-FLS において、Pin1 の発現量は有意に高かった。また、Pin1 が特に高発現している RA-FLS では、低発現している RA-FLS や OA-FLS に比べ、MMP-1、MMP-3 や PCNA の発現が有意に高かった。また、複数の RA-FLS に TGF- β 1 (5ng/ml) 刺激を行い、0、12、24、48、72 時間後の各々の Pin1、alpha-SMA の発現について蛍光二重染色やウエスタンブロット法にて検討したところ、TGF- β 1 刺激 24 時間後より、RA-FLS の一部に形態学的に筋線維芽細胞への分化が認められた。蛍光二重染色では、Pin1 と alpha-SMA は筋線維芽細胞の細胞質に共発現していた。Pin1 高発現の RA-FLS では、TGF- β 1 刺激後、経時的に Pin1 の発現が増加するのに伴い、alpha-SMA の発現も増加したが、Pin1 低発現の RA-FLS では、Pin1、alpha-SMA とあまり増加しなかった。

(3) NF- κ B と Pin1 の発現との関連の検討を行った。関節リウマチ病変の形成には破骨細胞の活性化が必須である。また、その活性化には NF- κ B のリン酸化が関与していることが知られている。そこで、筋線維芽細胞からさらに破骨細胞への分化の可能性があるのではないかと考え、その検討を行った。免疫染色、ウエスタン法ともに Pin1 と NF- κ B との間で相関がみられた。しかし、破骨細胞への分化に関連があるとされている RANK-L についても同様の検討を行ったが、これについては明確な相関はみられなかった。

(4) 関節リウマチでの過剰発現が知られている IL-6 に注目し、それと Pin1 分子との関係を検討した。IL-6 の発現を制御する転写因子の 1 つである CAAT/enhancer binding protein- β (C/EBP- β) と Pin1 との関係

を解析した。IL-6 遺伝子のプロモーター/エンハンサー領域 (-179/+12) をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込み、Pin1 と C/EBP- β の発現プラスミドを用いて、ルシフェラーゼアッセイを行い、C/EBP- β の転写活性における Pin1 の働きを解析した。その結果、Pin1 の用量依存的に C/EBP- β の転写活性の増強が認められた。一方で、野生型 Pin1 に代わり WW ドメインに変異を導入した W34A 変異型 Pin1 を用いると、C/EBP- β の転写活性の増強効果は認められなかった。また、GST-Pin1 融合タンパク質を用いてプルダウンアッセイを行った結果 GST-Pin1 と C/EBP- β の結合が認められた。さらに、RA 組織を用いた免疫染色により Pin1 の発現量と C/EBP- β の核内での活性化に正の相関が認められた。以上の結果から、Pin1 が C/EBP- β の活性化に関与する事が示された。

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 14 件)

1. Nagaoka A, Takizawa N, Takeuchi R, Inaba Y, Saito I, Nagashima Y, Saito T, Aoki I: Possible involvement of peptidylprolyl isomerase Pin1 in rheumatoid arthritis. *Pathol Int* 2011, **61** (2): 59-66.

2. Kanzaki S, Yamaguchi A, Yamaguchi K, Kojima Y, Koumitsu N, Nagashima Y, Nagahama K, Ehara M, Hirayasu Y, Ryo A, Aoki I, Yamanaka S: Thymic alterations in GM2 gangliosidosis model mouse. *PLoS One* 2010, **5** (8): pii: e12105.

3. Kato S, Kobayashi N, Kubota K, Kirikoshi H, Watanabe S, Ogawa M, Inamori M, Shimamura T, Tomeno W, Nakajima A, Takeda K, Endo I, Nagashima Y, Aoki I: A duodenal mucosal lesion coming from pancreatic arteriovenous malformation. *Gastrointestinal Endoscopy* 2010, **71** (7): 1299-1300.

4. Kawachi K, Sasaki T, Murakami A, Ishikawa T, Kito A, Ota I, Shimizu D, Nozawa A, Nagashima Y, Machinami R, Aoki I: The topoisomerase II alpha gene status in primary breast cancer is a predictive marker of the response to anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy. *Pathol Res Pract* 2010, **206** (3): 156-162.

5. Kobayashi N, Suzuki K, Murakami H, Kagawa E, Aoki I, Nagashima Y: Chromophobe

renal cell carcinoma with sarcomatoid transformation in a dog. *J Vet Diagn Invest* 2010, **22**(6): 983-987.

6. Murakami A, Oshiro H, Kanzaki S, Yamaguchi A, Yamanaka S, Furuya M, Miura S, Kanno H, Nagashima Y, Aoki I, Nagahama K: A novel method for isolating podocytes using magnetic activated cell sorting. *Nephrol Dial Transplant* 2010, **25**(12):3884-3890.

7. Takagawa R, Akimoto K, Ichikawa Y, Akiyama H, Endo I, Kojima Y, Ishiguro H, Inayama Y, Aoki I, Kunisaki C, Nagashima Y, Ohno S: High expression of the atypical protein kinase C λ/ι in gastric cancer is promising prognostic factor for recurrence. *Ann Surg Oncol* 2010, **17**(1): 81-88.

8. Araki N, Ishigami T, Ushio H, Minegishi S, Umemura M, Miyagi Y, Aoki I, Morinaga H, Tamura K, Toya Y, Uchino K, Umemura S. Identification of NPC2 protein as interaction molecule with C2 domain of human Nedd4L. *Biochem Biophys Res Commun* **388**(2):290-296, 2009.

9. Nishi M, Ryo A, Tsurutani N, Ohba K, Sawasaki T, Morishita R, Perrem K, Aoki I, Morikawa Y, Yamamoto N. Requirement for microtubule integrity in the SOCS1-mediated intracellular dynamics of HIV-1 Gag. *FEBS Lett* **583**(8):1243-1250, 2009.

10. Gomi K, Sato Y, Tanaka M, Ijiri R, Kato K, Aoki I, Tanaka Y. Specificity of splenopancratic field abnormality in trisomy 13 syndrome: Macroscopic and histological analysis in 21 autopsy cases. *Pathol Int* **59**(3):147-151, 2009.

11. Kato I, Inayama Y, Yamanaka S, Ohshiro H, Gomi K, Shirai S, Aoki I, Uemura H, Miyoshi Y, Kubota Y, Yao M, Nagashima Y. Epithelioid angiolipoma of the kidney. *Pathol Int* **59**(1): 38-43, 2009.

12. Takeuchi R, Ryo A, Komitsu N, Miku-Takagaki Y, Fukui A, Takagi Y, Shirai S, Morishita S, Yamazaki Y, Kumagai K, Aoki I, Saito T: Low-intensity pulsed ultrasound activates the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt pathway and stimulates the growth of chondrocytes in

three-dimensional cultures: a basic science study. *Arthritis Res Ther* **10**(4): R77, 2008.

13. Kobayashi N, Matsuzaki O, Shirai S, Aoki I, Yao M, Nagashima Y: Collecting duct carcinoma of the kidney: an immunohistochemical evaluation of the use of antibodies for differential diagnosis. *Hum Pathol* **39**(9): 1350-1359, 2008.

14. Kojima Y, Akimoto K, Nagashima Y, Ishiguro H, Shirai S, Chishima T, Ichikawa Y, Ishikawa T, Sasaki T, Kubota Y, Inayama Y, Aoki I, Ohno S, Shimada H: The overexpression and altered localization of the atypical protein kinase C λ/ι in breast correlates with the pathological type of these tumors. *Hum Pathol* **39**(6): 824-831, 2008.

[学会発表] (計 22 件)

1. 大城久, 小野響子, 平沙代子, 海野俊徳, 渡邊眞一郎, 山中正二, 中山崇, 長嶋洋治, 長濱清隆, 村上あゆみ, 青木一郎, 稲山嘉明: 多発性骨髄腫に合併した好酸球性多発性筋炎の剖検例. 第 99 回日本病理学会春季総会, 京王プラザホテル(東京), 2010 年 4 月 27 日.

2. 長嶋洋治, 山中正二, 村上あゆみ, 稲山嘉明, 青木一郎: 胃癌における aPKC λ/ι の高発現は再発の危険因子である. 第 99 回日本病理学会春季総会, 京王プラザホテル(東京), 2010 年 4 月 27 日.

3. 稲山嘉明, 山中正二, 村上あゆみ, 中山崇, 大城久, 海野俊徳, 小野響子, 平沙代子, 矢澤卓也, 下山田博明, 奥寺康司, 長嶋洋治, 古屋充子, 長濱清隆, 北村均, 青木一郎: 横浜市立大学におけるバイオバンク室の運営と課題. 第 99 回日本病理学会春季総会, 京王プラザホテル(東京), 2010 年 4 月 27 日.

4. 村上あゆみ, 潘勤雅, 大城久, 山中正二, 古屋充子, 長嶋洋治, 青木一郎, 長濱清隆: Magnet activated cell sorting (MACS) を用いた糸球体上皮細胞の単離. 第 99 回日本病理学会春季総会, 京王プラザホテル(東京), 2010 年 4 月 27 日.

5. 古屋充子, 米山朋那, 宮城悦子, 田中玲子, 上大介, 長濱清隆, 長嶋洋治, 宮城洋平, 稲山嘉明, 青木一郎: 卵巣腫瘍における INF- γ 誘導性ケモカイン受容体 CXCR3 バリアントの解析. 第 99 回日本病理学会春季総会, 京王プラザホテル(東京), 2010 年 4 月 28 日.

6. 古屋充子, 古賀俊輔, 高橋葉子, 田中玲子, 廣島健三, 岡本龍郎, 吉野一郎, 青木一郎, 中谷行雄: Birt-Hogg-Dubé 症候群と判明した多発性肺嚢胞の病理学的特徴. 第 99 回日本病理学会春季総会, 京王プラザホテル(東京), 2010 年 4 月 27 日.

7. 古屋充子, 宮城悦子, 平原史樹, 宮城洋平, 稲山嘉明, 太田一郎, 上大介, 長嶋洋治, 青木一郎: Distinct expression patterns of CXCR3 variants in tumor and tumor-associated inflammatory diseases of the ovary. 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪国際コンベンションセンター(大阪), 2010 年 9 月 22 日.

8. 石黒斉, 秋本和憲, 長嶋洋治, 加川絵理子, 佐々木毅, 佐野仁勇, 高川亮, 佐々木和教, 藤浪潔, 青木一郎, 大野茂男, 窪田吉信, 上村博司: aPKC and IL-6 expression in prostate cancer tissues. 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪国際コンベンションセンター(大阪), 2010 年 9 月 22 日.

9. 長嶋洋治, 松寄理, 青木一郎: Collecting duct carcinoma of the kidney. An immunohistochemical study of 17 cases. 第 98 回日本病理学会総会, 国立京都国際会館(京都), 2009 年 5 月 2 日.

10. 古賀俊輔, 古屋充子, 高橋陽子, 山口淳志, 田中玲子, 安福和弘, 吉野一郎, 廣島健三, 青木一郎, 中谷行雄: BHD 遺伝子異常に基づく多発性肺嚢胞・嚢胞発症機構に関する分子病理学的考察. 第 98 回日本病理学会総会, 国立京都国際会館(京都), 2009 年 5 月 2 日.

11. 上大介, 渡邊昌俊, 長嶋洋治, 青木一郎: ヒト前立腺癌細胞と脂肪細胞との相互作用について. 第 98 回日本病理学会総会, 国立京都国際会館(京都), 2009 年 5 月 3 日.

12. 村上あゆみ, 長濱清隆, 原田知典, 伊藤秀一, 寺西純一, 江中牧子, 田辺美樹子, 河内香江, 佐々木毅, 野澤昭典, 古屋充子, 長嶋洋治, 青木一郎: WT1 遺伝子の exon10 のナンセンス変異を認め腎移植に至った 1 例. 第 98 回日本病理学会総会, 国立京都国際会館(京都), 2009 年 5 月 3 日.

13. 米山朋那, 古屋充子, 宮城悦子, 平原史樹, 宮城洋平, 太田一郎, 西川朱實, 長嶋洋治, 青木一郎: 卵巣腫瘍における血管作動性ケモカイン受容体 CXCR3 とそのリガンドの発現解析. 第 98 回日本病理学会総会, 国立京

都国際会館(京都), 2009 年 5 月 3 日.

14. Koga S, Furuya M, Yoshino I, Hiroshima K, Aoki I, Nakatani Y. Pathophysiology of the lung cysts caused by BHD mutation in Birt-Hogg-Dubé syndrome patients. 第 68 回日本癌学会学術総会, パシフィコ横浜(横浜), 2009 年 10 月 2 日.

15. Furuya M, Miyagi E, Hirahara F, Miyagi Y, Inayama Y, Ota I, Kami D, Nagashima Y, Aoki I. Expression of CXCR3 variant in ovarian neoplasms. 第 68 回日本癌学会学術総会, パシフィコ横浜(横浜), 2009 年 10 月 3 日.

16. 山口章, 幸光範子, 神崎誠一, 鈴木京子, 青木一郎, 山中正二. GM2 ガングリオシドーシスの中枢神経系における炎症反応メカニズムの解明. 第 32 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜(横浜), 2009 年 12 月 10 日.

17. 神崎誠一, 山口章, 山口佳代子, 小島良績, 鈴木京子, 高井俊行, 青木一郎, 山中正二. GM2 ガングリオシドーシスにおける末梢免疫システムの異常. 第 32 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜(横浜), 2009 年 12 月 10 日.

18. 長嶋洋治, 大城久, 山中正二, 青木一郎, 稲山嘉明: Epithelioid angiomyolipoma. A report of three cases. 第 97 回日本病理学会総会, ホテル日航(金沢), 2008 年 5 月 16 日.

19. Furuya M, Suyama T, Usui H, Tanaka N, Shozu M, Miyagi E, Hirahara F, Nagashima Y, Aoki I: Implication of CXC-chemokines and their receptors for proinflammatory microenvironments of ovarian neoplasms. 第 67 回日本癌学会学術総会, 名古屋国際会議場(名古屋), 2008 年 10 月 28 日.

20. 佐々木毅, 梁明秀, 上村博司, 寺西諄一, 三好康秀, 佐野仁勇, 藤浪潔, 仙賀裕, 青木一郎: 前立腺癌骨転移を予測する新しいバイオマーカー p65/RelA-リン酸化スレオニン 245 抗体. 第 46 回日本癌治療学会総会(名古屋), 2008 年 10 月 30 日. (学会優秀演題)

21. 長嶋洋治, 青木一郎: Collecting duct carcinoma of the kidney. An immunohistochemical study for differential diagnosis. 第 55 回日本臨床検査医学会学術集会, 名古屋国際会議場(名古屋), 2008 年 11 月 14 日.

研究者番号：

22. 鈴木京子、都甲崇、山口章、神崎誠一、幸光範子、勝頼大海、内門大丈、青木一郎、山中正二、平安良雄：Sandhoff 病モデルマウス脳におけるオートファージの検討. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会, ポートアイランド (神戸), 2008 年 12 月 12 日.

[図書] (計 2 件)

1. Nagashima Y, Kobayashi N, Kagawa E, Aoki I, Inayama Y, Yao M. Pathology and molecular biology of renal neoplasms.: recent advances and impacts on pathological classification. Nakamura M (eds.). Molecular mechanism and Morphology in Cancer. Bentham Science Publishers E-Book, pp.12-38, 2009.

2. 長嶋洋治, 青木一郎, 稲山嘉明, 矢尾正祐: RCC の分類-変遷と現状-. 富田善彦, 金山博臣, 植村天受, 篠原信雄 (編), Year book of RCC 2008, メジカルレビュー社, 33-44, 2008.

[その他]

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~byori2/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 一郎 (AOKI ICHIRO)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号：00184028

(2) 研究分担者

長嶋 洋治 (NAGASHIMA YOJI)
横浜市立大学・医学研究科・准教授
研究者番号：10217995

長濱 清隆 (NAGAHAMA KIYOTAKA)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号：00336538

齋藤 知行 (SAITO TOMOYUKI)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号：30170517

梁 明秀 (RYO AKIHIDE)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号：20363814

(3) 連携研究者

()