

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21390474

研究課題名（和文） ゲノミクスとセロミクスを用いた神経芽腫・肝芽腫の発生機序解明と分子標的療法の創出

研究課題名（英文） Elucidation of development mechanism and molecular targets in neuroblastoma and hepatoblastoma using genomics and cellomics

研究代表者

檜山 英三 (HIYAMA EISO)

広島大学・自然科学研究支援開発センター・教授

研究者番号：00218744

研究成果の概要（和文）：

小児がんは、分化異常に起因した腫瘍は予後良好であるが、悪性度の高い腫瘍は分化から逸脱したがん幹細胞が存在するために高頻度に再発する。本研究では、神経芽腫、肝芽腫からがん幹細胞分画を分離し、ゲノム解析と一細胞解析（セロミクス）にてその特徴を解析した。その結果、がん幹細胞では神経分化経路やグルタミン代謝が抑制され、Bim-1 や Notch-1 に加えて発現が上昇した分子を見出し、その中から患者血清中でも上昇した分子を見出した。この分子はがん幹細胞検出の新たなバイオマーカーとしての有用性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In childhood cancers, the tumors derived from abnormal differentiation show favorable outcomes, while highly malignant tumors contain cancer stem cells and have a high frequency of relapse. In the present study, we isolated cancer stem cells from neuroblastoma and hepatoblastoma samples and analyzed their characteristics using genomics and one cell proteomics (Cellomics). In these cancer stem cells, neurodifferentiative pathway and glutamate metabolism were inhibited but several molecules including Bim-1 and Notch-1 were up-regulated. Among these molecules, we identified the molecule which was elevated in serum of the cases with unfavorable outcomes. This molecule is considered as a useful candidate for detecting cancer stem cells in childhood cancer patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2010年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：小児腫瘍学、分子遺伝学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児腫瘍学

キーワード：癌、ゲノム、細胞・組織、発生・分化、トランスレーショナルリサーチ

1. 研究開始当初の背景

小児腫瘍は、分化異常に起因した腫瘍は予後良好であるが、悪性度の高い腫瘍は脱分化し

たがん幹細胞が存在し、高頻度に再発する。とくに、神経芽腫は自然退縮するような予後良好な腫瘍がある一方、寛解しても高頻度に

再発する予後不良の一群があり、肝芽腫も限局例の多くは予後良好であるが、UDSC（未分化小細胞型）は早期でも極めて高率に再発する。我々のテロメラーゼをマーカーとしたがん幹細胞研究から、神経芽腫や肝芽腫ではがん幹細胞（Cancer stem cell）の存在が悪性度を規定していることを推定されている。さらに、本邦の大規模な神経芽腫スクリーニング事業で予後良好な腫瘍を数多く診療した結果として予後不良な腫瘍が減少したことを初めて報告した。同時に、スクリーニング発見例の中で予後不良腫瘍の早期例が判別できないことから、幹細胞からの分化異常によって予後良好な腫瘍が発生し、その一部が脱分化してがん幹細胞が生まれ予後不良な腫瘍となる経路が見えてきた。そこで、正常細胞、予後良好腫瘍の細胞、予後不良腫瘍中のがん幹細胞、の比較で腫瘍の発生、がん幹細胞への形質転換の鍵を握る遺伝子変化が明らかになる。そこで、ゲノミクスと広島大学が結集して開発した一細胞の網羅的蛋白解析法セロミクスを応用して検討することで、画期的成果が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、予後不良な腫瘍からがん幹細胞分画を分離し、予後良好な腫瘍由来の腫瘍細胞（分化異常細胞）、さらに正常細胞の3者の差を一細胞解析（セロミクス）とゲノミクスにて検討し、小児がんのがん幹細胞への変化の鍵を握る遺伝子変化を明らかにする。この分子標的遺伝子の機能を検討するとともに、尿中、血中、さらに骨髄中有望な分子標的からバイオマーカーとなるものを、診断時、経過中に蓄積した検体を用いて検証し、臨床応用をめざす。また、この分子標的を用いた悪性度の高い小児腫瘍の治療法開発への検討を加えることを目的とした。

3. 研究の方法

対象は、同意が得られ広島大学に保存した検体とし、必要に応じ日本小児肝がん、神経芽腫研究グループ（JPLT・JNBSG）にて保存された検体および、これらから樹立した細胞株を使用した。

(1) がん幹細胞の選別：広島大学にある臨床検体から初代培養細胞（4-5PDL）140 検体と樹立神経芽腫細胞株 14 株・肝芽腫 5 株（予後良好例の初代培養からは通常の正常幹細胞からの腫瘍、樹立株はがん幹細胞が含まれていると推定している。）を用いる。細胞形態に加え、テロメラーゼや TERT (human telomerase reverse transcriptase) 発現、幹細胞のマーカーとして CD133、nestin、SOX6 などを用いて幹細胞を分離する。分離細胞では、コロニー

形成能、さらに NOD/SCID, NOD/Shi-scid, IL-2Rnull (NOG) マウスにおける腫瘍形成性を確認する。

(2) 一細胞解析（セロミクス）：確認されたがん幹細胞が濃縮された分画での細胞 1 個、予後良好な腫瘍の初代培養細胞、さらに患者の正常細胞の細胞レベルでの網羅的蛋白発現を比較する。増殖因子や分化誘導による細胞内の変化も検討し、増殖、退縮、分化へのシグナルの差異などから、新たな分子診断と治療へのバイオマーカーを探索する。

(3) ゲノム解析（ゲノミクス）：神経芽腫、肝芽腫の中でがん幹細胞由来の腫瘍細胞における特徴的な遺伝子変化、遺伝子発現をマイクロアレイで検索し、分子標的の候補を抽出する。

(4) 分子標的の機能解析：得られた遺伝子は、*in vitro* 実験として、がん細胞株での遺伝子導入、ノックダウンによる変化を、*in vivo* 実験としてはマウスの相同遺伝子のノックアウトあるいはトランスジェニックマウスを作製し、機能解析を行なうとともに、これらのマウスの発がんについて観察する。

(5) 分子標的の臨床応用：1,200 を越える臨床腫瘍検体での検証：有望な分子標的の変化を蓄積した検体で検証する。尿中、血中、さらに骨髄中バイオマーカー探索：有望な分子標的からバイオマーカーとなるものを、診断時、経過中に蓄積した検体を用いて検証し、臨床応用をめざす。

4. 研究成果

(1) がん幹細胞分離：細胞株から TERT、CD133 発現とサイドポピュレーション (SP) から得た幹細胞分画（図 1）は、予後不良例の細胞では 4.8-23.4%であったが、予後良好例の細胞では 0-1.2%と極めて低値であった。免疫不全マウスでの腫瘍形成能からがん幹細胞を濃縮したところ、30%異常の SP 分画となった。

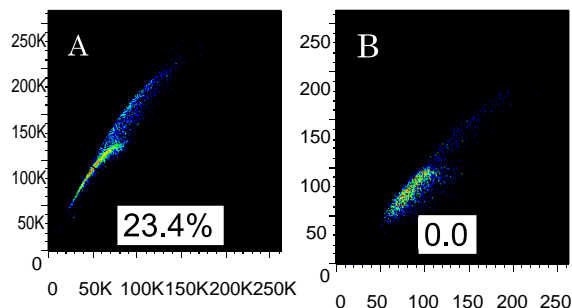


図 1：細胞株のサイドポピュレーション A は予後不良例 23.4%，B は予後良好例でほとんどない。

(2) 一細胞解析 (セロミクス) : がん幹細胞分画を培養し、1 細胞分析を行った。対象として、分化誘導した神経芽腫細胞と正常の線維芽細胞を用いて比較した。分別可能であったピークを比較分析すると、スフィンゴミエリンとグルタミン代謝で有意差を認めた。スフィンゴミエリンや AFP が抑制され、Nestin, c-kit, Bim-1 や Notch-1 の発現が上昇していた。一細胞 PCR 解析では未分化維持因子 Bim-1 が同定された。

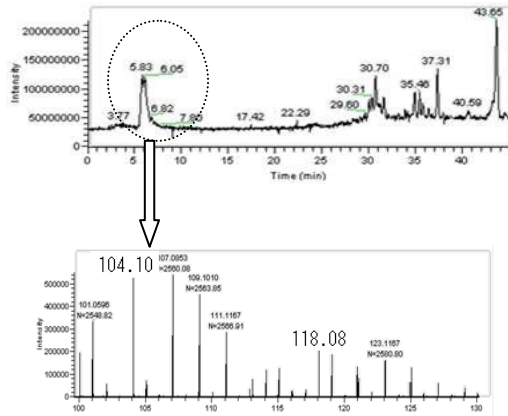


図 2 : 予後不良例のセロミクスの解析

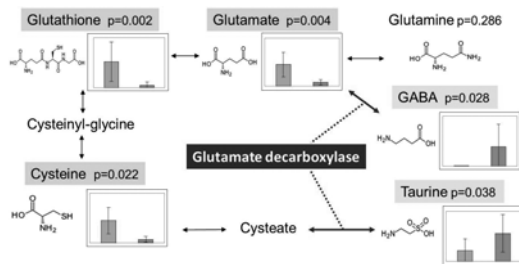


図 3 : グルタミン代謝異常の変動図
神経芽腫のがん幹細胞では Glutamate decarboxylase 発現が低下している

(3) ゲノム解析 (ゲノミクス) : ゲノミクスで、がん幹細胞分画と予後良好例の初代培養細胞の比の DNA, RNA で、マイクロアレイ (SNP 用アレイ) による遺伝子変化では、2、3、11、16、17 番染色体上に高頻度にコピー数の異常を認めた。さらに、遺伝子発現では、がん幹細胞分画で有意に発現上昇していた遺伝子が 237 遺伝子、発現低下していた遺伝子が 420 遺伝子層別された。さらに、数個のがん幹細胞分画をもちいて、microRNA の発現を検討すると、27 個の microRNA で有意に発現の変化をみとめた。さらに、3 個のがん幹細胞分画由来の DNA でプロモーターアレイをもちいてプロモーター領域のメチル化を検討すると、高頻度にメチル化を認めた。遺伝子変化や発現の変化、さらに microRNA の標的遺伝子などを、Pathway 解析にて検討したところ、AKT パスウェイが活性化し、また、Wnt シグナル

と Hedgehog 経路も活性化したが、一方グルタミン代謝経路が抑制されていた。これらの遺伝子経路から、実際に機能を調節している遺伝子を 12 個抽出した。

一方、次世代シーケンサーにて 2 症例由来のがん幹細胞に特有の遺伝子変異を検索したところ、22 の候補部位から特異な変異を 2 カ所見出し、この 2 遺伝子と上記のパスウェイ結果と照合すると上記の Wnt シグナルと Hedgehog 経路が連動していた。

(4) 分子標的の機能解析 : (3) のパスウェイ解析で抽出した 12 遺伝子について神経芽腫と肝芽腫の初代培養細胞へトランスフェクションしたところ、4 遺伝子でやや形態変化とともに明らかな増殖速度の増加をみとめた。一方、siRNA によるノックダウンの検討では、神経芽腫株 3 つの遺伝子の発現抑制にて明らかに分化誘導とともに増殖停止を検出し、その一つが Bim-1 であった。上記の 4 遺伝子とノックダウンで差を認めた Bim-1 以外の 2 遺伝子について、コンストラクトを作成し、遺伝子改変マウスの作成を 2 種のマウスの系統を用いて継続したが、成果を得られるに至らず、さらに継続中である。

(5) 分子標的の臨床応用 : 1, 200 を越える臨床腫瘍検体の中から、血清と尿中でのこれらの分子標的の値について抗体が得られた 3 分子について検索した。

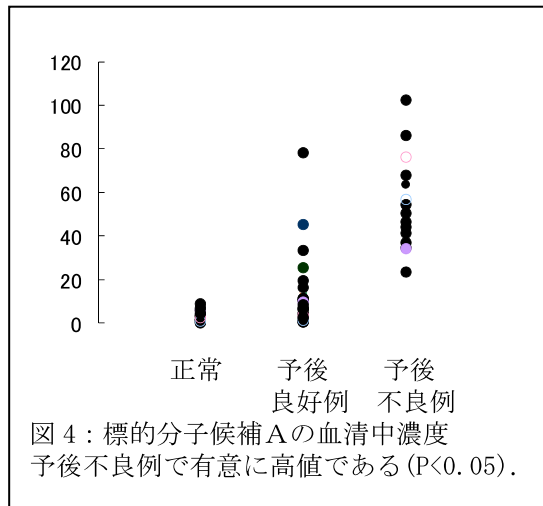


図 4 : 標的分子候補 A の血清中濃度
予後不良例で有意に高値である (P < 0.05)。

その中で、候補分子 A の血中濃度を比較すると、予後不良例で有意に高値であり、有用なバイオマーカーとなりうる事が示唆された (図 4)。

現時点では、上記の研究結果から、小児がんのがん幹細胞のバイオマーカー、Bim-1 に加えて 6 分子見出され、その有用性が示唆された。とくに、候補分子 A は血清中でもモニタリングが可能であり、臨床応用が可能であり、今後、多検体での前向き研究にて実証する予定である。

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 55 件)

1. Hiyama E, et al. Clinical feature of ALK mutated neuroblastoma. *Journal of Pediatric Surgery*. In press, 2012. 査読有.
2. Iehara T, Hiyama E, Tajiri T, Yoneda A, Hamazaki M, Fukuzawa M, Hosoi H, Sugimoto T, Sawada T. Is the prognosis of stage 4s neuroblastoma in patients 12 months of age and older really excellent? *European Journal of Cancer*. in press, 2012. 査読有.
3. Tejedor ML, Mizuno H, Tsuyama N, Harada T, Masujima T. In Situ Molecular Analysis of Plant Tissues by Live Single Cell Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. in press, 2012. 査読有.
4. Date S, Mizuno H, Tsuyama N, Harada T, Masujima T. Direct drug metabolism monitoring in a live single hepatic cell by video mass spectrometry. *Analytical Science*. 28(3): 201-203, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.2116/analsci.28.201>. 査読有.
5. Yamaoka E, Hiyama E, Sotomaru Y, Fukuba I, Sudo T, Sueda T, Hiyama K. Neoplastic transformation by TERT in FGF-2-expanded human mesenchymal stem cells. *International Journal of Oncology*. 39(1): 5-11. 2011. DOI: 10.3892/ijo.2011.1029. 査読有.
6. Ueda Y, Hiyama E, Kamimatsuse A, Kamei N, Ogura K, Sueda T. Wnt signaling and telomerase activation of hepatoblastoma: correlation with chemosensitivity and surgical resectability. *Journal of Pediatric Surgery*. 46(12): 2221-2227, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2011.09.003>. 査読有.
7. Kato Y, Murakami Y, Uemura K, Sudo T, Hashimoto Y, Hiyama E, Sueda T. Impact of intratumoral thymidylate synthase expression on prognosis after surgical resection for ampullary carcinoma. *World Journal of Surgical Oncology*. 103(7): 663-668, 2011. DOI: 10.1002/jso.21879. 査読有.
8. Shiozawa S, Kawai K, Okada Y, Tomioka I, Maeda T, Kanda A, Shiohara Sotomaru Y. Gene targeting and subsequent site-specific transgenesis at the β -actin (ACTB) locus in common marmoset embryonic stem cells. *Stem Cells and Development*. 20(9): 1587-1599, 2011. DOI: 10.1089/scd.2010.0351. 査読有.
9. Kojima K, Hiyama E, Otani K, Ohtaki M, Fukuba I, Fukuda E, Sueda T, Hiyama K. Telomerase activation without shortening of telomeric 3'-overhang is a poor prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Science*. 102(2): 330-335, 2011. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01786.x. 査読有.
10. Arai Y, Honda S, Haruta M, Kasai F, Fujiwara Y, Ohshima J, Sasaki F, Nakagawara A, Horie H, Yamaoka H, Hiyama E, Kaneko Y. Genome-wide analysis of allelic imbalances reveals 4q deletions as a poor prognostic factor and MDM4 amplification at 1q32.1 in hepatoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 49(7): 596-609. 2010. DOI: 10.1002/gcc.20770. 査読有.
11. Hishiki T, Matsunaga T, Sasaki F, Yano M, Ida K, Horie H, Kondo S, Watanabe K, Oue T, Tajiri T, Kamimatsuse A, Ohnuma N, Hiyama E. Outcome of hepatoblastomas treated using the Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor (JPLT) protocol-2: report from the JPLT. *Pediatric Surgery International*. 27(1): 1-8, 2011. DOI: 10.1007/s00383-010-2708-0. 査読有.
12. Shalaby T, Hiyama E, Grotzer MA. Telomere Maintenance as Therapeutic Target in Embryonal Tumours. *Anticancer Agents Med Chem*. 10(3): 196-212, 2010. <http://www.benthamdirect.org/pages/content.php?ACAMC/2010/00000010/00000003/0002W.SGM>. 査読有.
13. Ohtaki M, Otani K, Hiyama K, Kamei N, Satoh K, Hiyama E. A robust method for estimating gene expression states using Affymetrix microarray probe level data. *BMC Bioinformatics*. 11: 183-183, 2010. DOI: 10.1186/1471-2105-11-183. 査読有.
14. Tsuyama N, Mizuno H, Masujima T. Mass spectrometry for cellular and tissue analyses in a very small region. *Analytical Sciences*. 27(2): 163-170, 2011. DOI: 10.2116/analsci.27.143. 査読有.
15. Sotomaru Y, Hirakawa R, Shimada A, Shiozawa S, Sugawara A, Oiwa R, Nobukiyo A, Okano H, Tamaoki N, No mura T, Hiyama E, Sasaki E. Preimplantation on development of somatic cell cloned

embryos in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Cloning Stem Cells* 11(4): 575-583, 2009. DOI:10.1089/clo.2009.0005. 査読有.

16. Masujima, T. Live single-cell mass spectrometry. *Analytical Sciences*. 25: 953-960, 2009.
17. Kamimatsuse A, Matsuura K, Moriya S, Fukuba I, Yamaoka H, Fukuda E, Kamei N, Hiyama K, Sueda T, Hiyama E. Detection of CpG island hypermethylation of caspase-8 in neuroblastoma using an oligonucleotide array. *Pediatric Blood & Cancer*. 52(7): 777-783. 2009. DOI: 10.1002/pbc.21977. 査読有.
17. Dokhi M, Ohtaki M, Hiyama E. A cure Weibull gamma-frailty survival model and its application to exploring the prognosis factors of neuroblastoma. *Hiroshima Journal of Medical Science*. 58(1): 25-35. 2009. 査読無.
18. Matsuo T, Shay JW, Wright WE, Hiyama E, Shimose S, Kubo T, Sugita T, Yasunaga Y, Ochi M. Telomere-maintenance mechanisms in soft-tissue malignant fibrous histiocytomas. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 91:928-937. 2009. DOI:10.2106/JBJS.G.01390. 査読有.

[学会発表] (計 148 件)

1. Hiyama E, et al. Clinical feature of ALK mutated neuroblastoma. 44th Annual Meeting of Pacific Association of Paediatric Surgeons (PAPS). 2011年4月13日. Cancun, Mexico.
2. Masujima T. Live Single Cell Video-Mass Spectrometry. ICAS2011. 国際分析科学会議2011年5月23日. 京都市
3. Masujima T, et al. Live Single-Cell MS for Direct Analysis of a Lipid Droplet in a Single HepG2 Cell. ICAS2011 国際分析科学会議. 2011年5月24日. 京都市.
4. Masujima T, et al. Simultaneous Molecular Analysis from Different Organelle in a Live Single Cell by Dual Tip Live Single-cell MS. 59th ASMS Conference. 2011年6月6日. Denver市 (米国).
5. Masujima T, et al. Live Single-cell MS Mediated Monitoring of Molecular Diffusion through Gap Junction in Normal Human Cells. 59th ASMS Conference. 2011年6月8日. Denver市 (米国).
6. 檜山 英三, 他. LC-MSによる神経芽細胞腫における新規指標分子の探索. 第59回質量分析総合討論会2011年9月14日吹田市.

7. 升島 努, 他. LC-MSによる血漿中の低分子の網羅的検出. 第59回質量分析総合討論会. 2011年9月14日. 吹田市.

8. 升島 努, 他. Live Single-cell MSによるホスホリピドオーシス特異的分子探索. 第59回質量分析総合討論会. 2011年9月15日. 吹田市.

9. 檜山 英三, 他. 神経芽腫におけるがん幹細胞分離の試み. 第34回日本分子生物学会年会. 2011年12月2日. 横浜市.

10. Hiyama E, et al. Omics analysis and evolution for identification of candidate genes in progression of neuroblastoma. *Advances in Neuroblastoma Research (ANR)2010*. 2010年6月22日. Stockholm, Sweden.

11. Hiyama E, et al. Identification of new candidate genes in progression of neuroblastoma using omics analysis. SIOP 2010. 2010年10月22日. Boston, USA.

12. 上田 祐華, 檜山 英三, 他. 肝芽腫におけるβカテニンの転写調節に関するBRG1およびTERT発現に関する検討. 第26回日本小児がん学会学術集会. 2010年12月17-19日. 大阪市.

13. 亀井 尚美, 檜山 英三, 他. 神経芽腫におけるALK遺伝子活性型変異症例の検討. 第47回日本小児外科学会学術集会. 2010年6月17日. 名古屋市.

14. Wada S, Hiyama E et al. A novel molecular target for anti-cancer drug. 101st Annual Meeting of Am Assoc Cancer Res. 2010年4月19日. Washington DC, USA.

15. 神田 暁史, 外丸 祐介 他. Establishment of ES cells of inbred strain mice by dual inhibition (2i). 第34回日本分子生物学会総会. 2010年12月10日. 神戸市

16. 升島 努. Live Single-cell Video-Mass Spectrometry. 参天製薬セミナー. 2009年5月12日. 奈良県生駒市.

17. 升島 努. 生体微小域のMS. 第57回質量分析総合討論会. 2009年5月13日. 大阪府大阪市.

18. 津山 尚, 升島 努, 他. Live Single-cell Video-Mass Spectrometry for Cell Profiling. 第57回質量分析総合討論会. 2009年5月13日. 大阪府大阪市.

19. 原田 隆範, 升島 努, 他. イオンシミュレーションによる三重極イオンモビリティ質量分析計の性能に関する研究. 第57回質量分析総合討論会. 2009年5月13日. 大阪府大阪市.

20. 平井 由記奈, 升島 努, 他. 網羅的変動分子探索のためのディファレンシャルMSディスプレイの開発. 第70回分析化学討論

会. 2009年5月16日. 和歌山県和歌山市.

21. 升島 努. Live single cell video-mass spectrometry for straightforward analysis of cellular pathways. 57th ASMS Conference on Mass Spectrometry. 2009年6月1日. Philadelphia, USA.

22. 津山 尚宏, 升島 努, 他. Embryonic cell metabolite profiling during neuronal differentiation by single cell mass spectrometry. 57th ASMS Conference on Mass Spectrometry. 2009年6月1日. Philadelphia, USA.

23. 山岡 裕明, 他. 小児肝癌の国際的標準治療法の確立に関する研究. 第25回日本小児がん学会総会. 2009年11月29日. 千葉県舞浜市.

24. 檜山 英三, 他. 神経芽腫マスキニングの再評価と今後の方向性第25回日本小児がん学会総会. 2009年11月29日. 千葉県舞浜市.

25. Hiyama E, et al. Telomere reset mechanism and efficiency in human stem cells. JST-CIRM (California Institute for Regenerative Medicine) Workshop. 2009年6月8日. San Francisco, USA.

26. Hiyama E. Telomere biology in neuroblastoma: Focusing on telomere binding proteins and alternative strengthening of telomere. 42th Annual Meeting of Pacific Association of Pediatric Surgeons. 2009年5月13日. Hong Kong, China.

27. Hiyama E, et al. Refractory and relapse hepatoblastoma - from the experience of JPLT (Japanese Study Group of Pediatric Liver Tumor) study. SIOP Brazil-2009. 2009年10月8日. Sao Paulo, Brazil.

[図書] (計8件)

1. 升島 努 (共著). 南江堂. パートナー分析化学I, 297, 2012.

2. 升島 努, 他. 丸善出版. 試料分析講座「創薬の分析化学」. 309, 2011.

3. 升島 努 (共著). 南江堂. パートナー分析化学II. 328, 2011.

4. Hiyama K et al. Transworld Research Network. Public database useful for molecular diagnosis. 1 ed. 345, 2011.

5. 檜山 桂子, NPO法人 脳の世紀推進会議編(共著) 株式会社クバプロ. こころの働きと病・覚醒剤～脳科学研究に応用される遺伝子改変動物の作り方. 146, 2009.

6. 檜山 桂子, 日本薬学会物理系薬学部会・分析化学担当教員会議編集 共著. 株式会社じほう. 200, 2009.

7. Hiyama E, et al. Hamana Press. Telomere and telomerase for the regulation

of stem cells. 601, 2009.

8. Hiyama E, et al. Transworld Research Network. Clinical application of Molecular Diagnosis, 220, 2009.

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

檜山 英三 (HIYAMA EISO)

広島大学・自然科学研究支援開発センター・教授

研究者番号: 00218744

(2) 研究分担者

升島 努 (MASUJIMA TSUTOMU)

広島大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 10136054

外丸 祐介 (SOTOMARU YUSUKE)

広島大学・自然科学研究支援開発センター・教授

研究者番号: 90309352

上松瀬 新 (KAMIMATSUSE ARATA)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号: 90569887

(H21→)

山岡 裕明 (YAMAOKA HIROAKI)

広島大学・病院・講師

研究者番号: 90311810

(H21→H21)

檜山 桂子 (HIYAMA KEIKO)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・准教授

研究者番号: 60253069

(H21→H22)

(3) 連携研究者

大瀧 慈 (OOTAKI MEGU)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号: 20110463

中川原 章 (NAKAGAWARA AKIRA)

千葉県がんセンター(研究所)・研究局・局長

研究者番号: 50117181