

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 6月15日現在

機関番号:82601

研究種目:基盤研究(C)

研究期間:平成21年度～平成23年度

課題番号:21510074

研究課題名(和文) 造血幹・前駆細胞特異的シグナルによる AhR を介したベンゼンの造血毒性誘発機構

研究課題名(英文) Toxicity mechanism in hematopoietic stem/progenitor-derived signaling via aryl hydrocarbon receptors induced by benzene exposure

研究代表者

井上 達(INOUE TOHRU)

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・客員研究員

研究者番号:50100110

研究成果の概要：最も単純な芳香族炭化水素であるベンゼンが多環芳香族炭化水素受容体(AhR)を介して生体異物応答を引き起こすこと、並びに造血幹・前駆細胞など未分化細胞の発生生物学的維持にかかるニッチ機能の毒性発現に AhR の機能局在が関与する事を初めて見出した。この未分化な造血幹・前駆細胞レベルでの AhR 特異的な対ベンゼン相互作用は、各群毎に特異的な遺伝子発現プロファイル(BICGEP)と、それら群毎のマウスに個別の stochastic な遺伝子発現プロファイル(BISGEP)に分別された。

We have discovered that, first, the simplest and fundamental aromatic hydrocarbon, benzene, can induce xenobiotic responses through the activation of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) and that, second, the functional localization of AhRs affects niche function related to the developmental biological maintenance of undifferentiated progenitor cells. The benzene-induced xenobiotic responses through AhR activation at the primitive hematopoietic/progenitor level can be classified on the basis of the pattern of gene expression profile: benzene-induced common gene expression profiles (BICGEP), which are the specifically and commonly expressed profiles among the test mice in the same group, and benzene-induced stochastic gene expression profiles (BISGEP), which are the stochastic gene expression profiles that are probabilistically different in each of the test mice in the same group.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21年度	1,300,000	0	1,300,000
22年度	1,200,000	0	1,200,000
23年度	1,100,000	0	1,100,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	0	3,600,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：造血幹細胞・幹細胞ニッチ・生体異物相互作用・細胞周期・酸化的ストレス

1. 研究開始当初の背景

当研究者らは、最も単純な芳香族炭化水素であるベンゼンが、多環芳香族炭化水素受容体(AhR)を介して造血障害などの生体異物応答を引き起こすこと(Yoon BI et al. 2002)と、そして AhR の機能局在が、造血幹・前駆細胞

を初めとした未分化細胞の発生生物学的維持にかかるニッチ(niche)の毒性発現に関与すること(Hirabayashi Y et al. 2002/ Hirabayashi Y and Inoue T, 2009)を見いだした。本研究はそれらの研究を発展させてきたことに基づいており、その結果、AhR 欠失の諸関連ミュー

タントマウスを駆使することにより、ベンゼンの造血障害性を、骨髄における Cyp2E1 の発現に伴う、造血幹・前駆細胞に特異的な細胞周期障害と apoptosis の惹起、ならびに、肝などに由来するベンゼン代謝物やこれによる酸化ストレスと、apoptosis や clastogenesis など主として末梢血に対する障害との、双方の局面から成るものとする新しい認識を明らかにした。

ベンゼン誘発の白血病に関する現時点での認識は、**1】** ベンゼンもその Cyp2E1 代謝物も、Ames の復帰突然変異試験が陰性であること、**2】** ベンゼンそのものや、phenol, hydroquinone などの代謝物が嫌電子性で非親核性であることにより、DNA 結合や DNA 付加体形成を生じないこと、他方 benzene oxide や benzoquinone、trans-trans-muconaldehyde 及び benzene diolepoxide 等は、親電子性でアルブミン付加体形成が認められ、また、benzoquinone についてはさらにその親核性により、DNA 結合や DNA 付加体形成も認められるものの、これら単独の白血病誘発の事実はないことなど、白血病原性を示すデータが得られないことが知られている（尚、benzene oxide などの酸化ストレス産物単独では遺伝子障害性の惹起に不十分で、ベンゼン誘発白血病に至る造血障害を説明し得ない点も知られている）。**3】** 他方、代謝物のうち benzene oxide、phenol、hydroquinone、catechol、p-1,2,4-benzene-triol、trans,trans-muconaldehyde などは全て小核試験陽性であり、これがベンゼンの in vivo における小核形成陽性の遺伝子障害性を裏付けており、**4】** 特に、このうち hydroquinone、catechol、p-benzo-quinone 及び 1,2,4-benzenetriol については、染色体破砕性も知られ、Topoisomerase II の抑制事実と符合しているにもかかわらず、これら単独の白血病原性も証明されていない。**5】** 従って、先の genotoxicity は、p53 欠失マウスでの高発がん性と、Thioredoxin 過剰発現マウスでのベンゼン誘発胸腺リンパ腫発生の消去、即ち、ベンゼン誘発白血病への酸化ストレスの関与の背理的示唆などの情報とは相補的であるものの、上記 **1】** ~ **4】** の結果とは乖離し、代謝物全体の共同作用のようなモデルでも想定しない限りベンゼンの白血病原性は説明できず、正確な白血病発症因果関係は不明と言わざるを得ない。ここにベンゼン白血病の今日的な研究課題として残された最大の焦点がある。

そうした未解明の問題点に対しては、先の染色体の破砕性やこれと関連する Topoisomerase II の抑制に併行して、ベンゼン

の造血障害において、白血病を引き起こし得るだけの付加的要因を明らかにする必要があり、併せて、ベンゼン誘発白血病で認められる「骨髄性白血病」の頻度におけるマウス間の系統差とヒトへの外挿性に関わるデータギャップを埋めること、がある。

当申請者らはこれらを解明するため、C57BL/6 マウスと C3H/He マウスのそれぞれに p53 欠失を導入することにより、C3H/He マウスの p53 欠失群で有意な骨髄性白血病の発症と、C57BL/6 での少数例の骨髄性白血病の発症を惹起することに成功し、潜在性骨髄性白血病発症要因研究のモデル条件を明らかにした (Kawasaki et al. 2009)。また、その基盤を形成する特徴遺伝子プロフィールの抽出も試みた。結果として、細胞周期関連遺伝子として melanoma inhibitory activity 3 (Mia3)、structural maintenance of chromosomes 2-like 1 (Smc2)、再生・血管増生関連因子として chromodomain helicase DNA binding protein 4 (Chd4)、receptor (calcitonin) activity modifying protein 2 (Ramp2)、purine rich element binding protein B (Purb) など、酸化ストレス関連遺伝子として Bach-1 などの修復遺伝子と、integrin alpha 4 (細胞接着)、Ddx6 や centromere protein E (染色体維持機能) など、約 50 種類の遺伝子が、C57BL/6 と C3H/He の双方に共通した発現遺伝子として抽出された。更に、Ing3、Ikbkb、Vcam1 などの接着因子関連遺伝子群、及び B-cell leukemia /lymphoma 2、B-cell stimulating factor 3 (Bsf3)、erythrocyte protein band 4.1-like 2 (Epb4) などが、それぞれ、C57BL/6 ならびに C3H/He 系に特有の、先の現象を裏付ける遺伝子として抽出された。これらの遺伝子変動は、細胞増殖シグナル下流の動きとしてよく理解されるものの、これまでの申請者らのマイクロアレイにおける研究結果 (Yoon BI et al. 2003/ Hirabayashi Y and Inoue T, 2008/ *ibid*, 2005/ Hirabayashi Y et al. 2009) に照らしてみると、ここで観察された遺伝子群には Ivanova らの造血幹細胞特異的遺伝子群の発現 (Ivanova NB et al. 2004) が殆ど含まれておらず、AhR を発現する未熟幹・前駆細胞を介したニッチ機能の変動の理解の為には、これらの構成遺伝子だけではその理解には不十分なものと考えられた。そこで本研究では、更に一歩進めて、造血幹・前駆細胞における AhR の制御とベンゼン暴露の影響の本質をより詳細に明らかにする計画に至った。

2. 研究の目的

造血幹・前駆細胞における AhR の制御と

ベンゼン暴露の影響の本質をより詳細に明らかにすることを目的とし、造血幹・前駆細胞 (LKS [分化抗原陰性 (Lineage(-)) c-kit 陽性 Stem cell antigen (SCA1)陽性] や、CD34 陰性 Tie2 陽性の side population (SP)細胞亜分画など)での遺伝子発現の検討を、いわゆる造血幹細胞ニッチ・シグナルによる AhR の制御そのものと、ベンゼン暴露の引き起こす影響の両者から解明することを企図していた。

3. 研究の方法

ベンゼン曝露プロトコル：白血病惹起プロトコルとして、本申請者らも関与して開発された5日/週、26週の曝露プログラムの特徴は、幹細胞特異的細胞周期の停止と、曝露休止期(週5日投与直後から次回投与開始までの約3日間)における急速な回復性増生との持続的な振幅に基づいている。本研究では、これに基づいて、2週間の間歇曝露を基本とし、遺伝子発現については非特異的変化が終了し、特異変化が固定された曝露終了後28日目での観察を計画した。

実験動物：ヒトでの骨髄性白血病の好発性の疫学的事象 (evidence) に基づいて、骨髄性白血病の好発系である C3H/He と、一般系統としての C57BL/6 を比較することとした。尚、両者は後述のとおり、AhR の遺伝子亜型が異なることでも知られている。更に、自然発症白血病の高感受性である両系統の p53 遺伝子ヘテロ欠失マウスや、ベンゼン誘発造血器障害がアリアルヒドロカーボン受容体 (AhR) 原性であることに基づいて、野生型と AhR 遺伝子のホモ欠失マウス (筑波大・藤井義明教授由来) との比較なども計画した。

細胞の分画採取：造血幹・前駆細胞としては LKS 分画や、SP 分画など、また造血支持細胞としてはさしあたり造血幹・前駆細胞の維持にかかるニッチの構成分子、Tie2 ligand の Angiopoietin -1 (Ang)や、骨組織マーカーとして知られる ALCAM や Runx などを発現する分画を対象とすることを計画した。

発現遺伝子解析：抽出した RNA による網羅的遺伝子発現解析(Mouse Genome 430 2.0 array [Affymetrix])や、reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)ないしは real time PCR による解析などを行うこととした。

発現遺伝子のデータマイニング：網羅的遺伝子発現の解析に当たっては、系統間相互に共通して発現する遺伝子と系統独自に発現する遺伝子群について、それぞれにおける、発現強度に基づく有意差による群共通に特異的な遺伝子プロファイル (BICGEP) と、群毎のマ

ウス個別の確率論的発現な遺伝子発現プロファイル (BISGEP) とを念頭において解析することとした。SPSS®, GeneSpring GX 7.3.1, Microsoft office excel 2007 などを利用して、前者 BICGEP については、ANOVA 解析や Welch-T 検定など、後者 BISGEP については、主要因解析を遺伝子リストの抽出手段として用い、得られた遺伝子リストについて Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity® Systems, Redwood City, CA) や、KeyMolnet Light ver.5.3 (Institute of Medicinal Molecular Design, Inc. Tokyo, Japan) など、既存のデータベースを利用した gene ontology や pathway analysis などによる解析を行うこととした。

4. 研究成果

(1) AhR の造血器での発現について：造血幹・前駆細胞分画としてセルソータで分取した LKS 分画での遺伝子発現検索を進めた。結果として、AhR の発現は、LKS 分画では明瞭に認められるが、骨髄細胞全体ではトレース程度に留まり、末梢血有核細胞では認められず、造血器における AhR の発現が未分化幹細胞に局限していることが確かめられた(図1)。

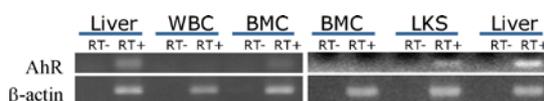


図1: AhR の RT-PCR による発現解析 (WBC:末梢白血球、BMC:骨髄細胞、LKS:造血幹・前駆細胞[分化抗原陰性 c-kit 陽性 Stem cell antigen 陽性]分画、RT-: reverse transcriptase 陰性対照群、RT+: RT 添加群)

(2) AhR 欠失マウスのベンゼン毒性に対する不応状態：これまでのデータに加え、骨髄の網赤血球を指標とした小核発生頻度も野生型の 1/7 に留まることを明らかとし、障害そのものが生じていないとするこれまでの仮説に合致する結果を得た。また、野生型と比較した AhR 欠失マウス骨髄へのベンゼンの到達量の多寡や代謝の遅延、特異的な代謝物の有無などを検討することを目的に、質量分析による予備的検討を行った。当初懸念された背景データとしてのベンゼンの検出は認められず、代謝物が含まれると考えられるピークが多数得られたものの、現時点で投与に特異的な物質の同定には至っていない。

(3) AhR 遺伝子亜型に基づくベンゼン毒性の系統差：AhR 遺伝子は、マウスの系統によって異なった亜型の存在が知られており、C57BL/6 は b1 型、C3H/He は b2 型である。

双方とも、DBA/2 に代表される d 型とは異なりリガンド結合能は高感受性を示すが、受容体の発現量や Cyp1A2 の誘導能など、受容体の生物活性として、b2 型の C3H/He では、b1 型の C57BL/6 に比べて相対的に不応状態にあることが想定された。ベンゼンによる培養性造血前駆細胞数は、1 日 1 回の 5 日連続経口投与後、C57BL/6 では非投与対照群の 88% まで減少したが、C3H/He では全く減少しなかった。一方、骨髓細胞数や末梢血球数は両系統とも同程度に減少した。これはベンゼンによる造血障害を、ベンゼン代謝物を介した細胞障害機構と、造血幹・前駆細胞特異的な AhR を介した造血障害機構という異なった機序で理解されるとするこれまでの仮説に符合する結果と考えられた。尚、AhR ホモ欠失マウスとは異なり、2 週間の曝露直後の培養性造血前駆細胞数の減少やその後の回復には、系統による差異は見られなかった。

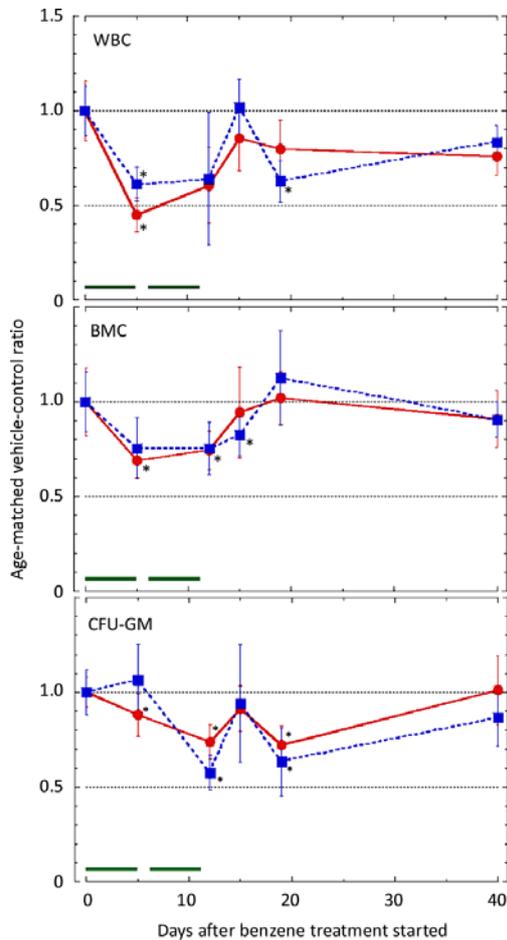


図2:ベンゼン 150mg/bwKg/日、週 5 日、2 週間の経口投与による末梢白血球数(WBC)、骨髓細胞数(BMC)、培養性造血前駆細胞数(CFU-GM)の推移(非投与対照群に対する比率)(●実線:C57BL/6、■破線:C3H-He、横棒:ベンゼン投与日程、エラーバー:WBCとCFU-GMは標準誤差/BMCは標準偏差、*: $p < 0.05$)

(4) ベンゼン曝露 28 日後の骨髓細胞における発現遺伝子の系統差: マウスの系統別に発現強度に応じた有意差によって選別した各群毎に特異的な遺伝子プロファイル (BICGEP: C57BL/6 103 遺伝子、C3H/He 102 遺伝子) と、それら群毎のマウス個別の stochastic な遺伝子発現を主要因分析によって選別したプロファイル (BISGEP: C57BL/6 1,289 遺伝子、C3H/He 907 遺伝子) について、それぞれ既存のデータベースなどを利用してその特性を解析した。その結果、BICGEP では、IPA の機能分類で含まれる遺伝子数が最も多いカテゴリー順に発がん、もしくは細胞死/アポトーシスに関連している点で系統間に共通性があること、BISGEP では Gene ontology にも、予測される支配転写遺伝子にも系統差が認められることなどが明らかとなった。特に C57BL/6 では予測される支配転写因子の候補として AhR の抑制状態が含まれており、その生物学的意義は不明ながら、個体別に異なる転帰に関わる事象として注目された。

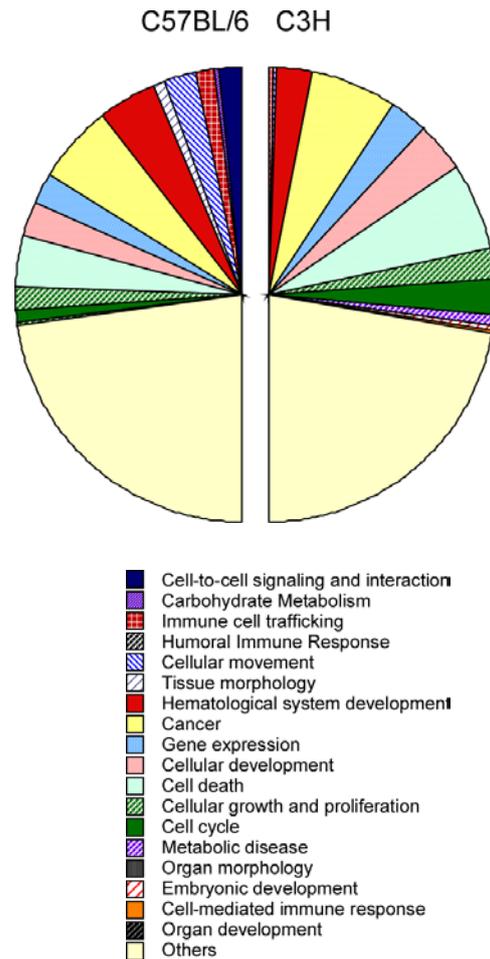


図3: BISGEP の gene ontology による分類

尚、BISGEP の分別には、統計的に多数の動物データが必要であり、結果の証明は不十分である。本研究課題は、各群毎に特異的な遺伝子発現プロファイル(BICGEP)と、それら群毎のマウスに個別の stochastic な遺伝子発現プロファイル(BISGEP)は当研究者らがはじめて見いだした知見に立脚しており、何らかの研究支援を得て、さらに発展させる研究方針である。

(5) LKS 分画でのベンゼンの作用：造血系において AhR の発現が限局的に見られる LKS 分画では、非分画骨髓細胞に比べてベンゼン暴露後 24 時間の非暴露対象群に比べて細胞数の減少率がより大きいことを見出した (LKS 分画：55.8%；骨髓細胞：79.8%)。この LKS 分画での酸化的ストレス状態を DCFH-DA 蛍光色素の蛍光強度で測定したところ、ベンゼン非暴露群に比べて高輝度を示す分画は僅かに観察されるのみであり、AnnexinV 陽性細胞の増加も観察されなかった。さらに、LKS 分画は、ベンゼン投与 2 時間後には、既に非暴露群の 56.0%まで減少していることが明らかとなり、障害を受けた細胞は、表面マーカー上 LKS 分画からは速やかに消失しているものと解釈された。

(6) LKS 分画による発現遺伝子解析について： LKS 分画は、定常状態では骨髓の約 0.05%程度であること、当研究者らが安定的に RNA を回収できる細胞数は、約 5×10^4 程度であること、などの予備検討結果を踏まえ、3~5 匹分の骨髓細胞から LKS 分画を分取して RNA を回収し、解析することとした。また、DNA chip を用いた解析には、鋳型として回収した RNA を増幅する処置が必要であることが明らかとなったため、骨髓細胞由来の RNA の増幅の有無による 2 検体、及び、幹細胞分画由来の RNA の増幅検体による予備的 Gene chip 解析をおこなった。その結果、主要因解析の第 1 要因で、RNA の増幅の有無が分別要因となることから、幹細胞分画由来の RNA の増幅検体による発現遺伝子を骨髓細胞のそれと比較する際には、従来のデータは基本的には使えず、同一手法で調整した検体のデータを新たに用意する必要があることが明らかとなった。更に第 2 要因で LKS 分画は骨髓と分離したが、contribution score が 0.98 より大、若しくは-0.98 未満であった 388 probe sets のうち、幹細胞分画での発現遺伝子リスト(Ivanova, 2002)との重複は 20 probe sets に留まった。以上の解析からは、群共通に特異的な遺伝子プロファイル(BICGEP)が得られる可能性はあるものの、白血病発症頻度などに

鑑みた個別別の転帰を反映する確率論的な遺伝子発現プロファイル(BISGEP)は得られないことから、当初の目的を達成するには至らなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Inoue T, Hirabayashi Y. 2010. Hematopoietic neoplastic diseases develop in C3H/He and C57BL/6 mice after benzene exposure: strain differences in bone marrow tissue responses observed using microarrays. *Chem Biol Interact.* 184(1-2):240-5 査読有り
2. Hirabayashi Y, Inoue T. 2010. Benzene-induced bone-marrow toxicity: a hematopoietic stem-cell-specific, aryl hydrocarbon receptor-mediated adverse effect. *Chem Biol Interact.* 184(1-2): 252-258. 査読有り
3. Hirabayashi Y, Inoue T. 2009. Aryl hydrocarbon receptor biology and xenobiotic responses in hematopoietic progenitor cells. *Biochem Pharmacol* 77(4): 521-535. 査読有り
4. Kawasaki Y, Hirabayashi Y, Kaneko T, Kanno J, Kodama Y, Matsushima Y, Ogawa Y, Saitoh M, Sekita K, Uchida O, Umemura T, Yoon BI, Inoue T. 2009. Benzene-induced hematopoietic neoplasms including myeloid leukemia in Trp53-deficient C57BL/6 and C3H/He mice. *Toxicol Sci.* 110(2):293-306. 査読有り
5. Hirabayashi Y, Tsuboi I, Kitada K, Igarashi K, Kodama Y, Kanno J, Yoshida K, Dainiak N, Inoue T. 2009. Comparison of murine gene expression profiles between spontaneous and radiation-induced myelogenous leukemias: stochastic and probabilistic expression variances in the former vs. radiation-specific expression commonalities in the latter. *Exp Hematol* 37(2): 195-205. 査読有り

[学会発表] (計 4 1 件)

1. Hirabayashi Y, Li GX, Igarashi K, Kanno J, Yodoi J, Inoue T: Comparison of microarray gene expression profiles corresponding to xenobiotic responses to oxidative stresses induced by ionizing radiation and benzene treatment. Society of Toxicology 51st Annual Meeting & ToxExpo (2012.3.14) San Francisco, CA, USA
2. Inoue T, Otsuka K, Tsuboi I, Aizawa S, Hirabayashi Y: Hematopoietic stroma and niches form a generation-age structure, based on the stem/progenitor cell differentiation, separated by heterogeneous functional compartment. Society of Toxicology 51st Annual Meeting & ToxExpo (2012.3.12) San Francisco, CA, USA

3. Hirabayashi Y, Yoon B-I, Li G-X, Igarashi K, Ogawa Y, Kanno J, Yodoi J, Inoue T. A comparison of microarray gene expressions at leukemogenic doses between ionizing radiation and benzene exposure. 第34回日本分子生物学会年会 (2011.12.15) 横浜
 4. Hirabayashi Y, Yoon B-I, Li G-X, Igarashi K, Fujii-Kuriyama Y, Kanno J. A hematopoietic stem-cell-specific aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated benzene-induced adverse effect. 第70回日本癌学会総会 (2011.10.4) 名古屋
 5. Inoue T, Hirabayashi Y: Commonality and stochasticity in gene expression profiles during aging process. Society of Toxicology 50th Annual Meeting & ToxExpo (2011.3.7) Washington DC, USA.
 6. Inoue T, Hirabayashi Y: Commonality and stochasticity in gene expression profiles during aging. BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会) (2010.12.10) 神戸
 7. Hirabayashi Y, Yoon BI, Igarashi K, Kodama Y, Sekita K, Kaneko T, Kanno J, Inoue T: Strain differences of the effect of benzene exposure: microarray study of the bone marrow in C57BL/6 and C3H/He mice. IUTOX 2010-XII International Congress of Toxicology (2010.7.21) Barcelona, Spain
 8. Inoue T: Biological Safety Testing in the 21st Century: Overview of the past and prospects for the future. The 10th Annual Commemorative Drug Nonclinical Safety Academic Conference, National Center for Safety Evaluation of Drugs Foundation (NCSEDF) (2009.12.2) Beijing, China
 9. Inoue T: Benzene Induced Myeloid leukemia Revisited, Based on Induction of Thioredoxin. 2009 Autumn Symposium, Korean Society of Toxicology/ Korean Society of Environmental Mutagens and Carcinogens/ Korean Society of Environmental Toxicology (2009. 11.13) Seoul, South Korea
 10. Inoue T, Hirabayashi Y: Thioredoxin-over-expression mice prevent benzene-induced lymphoma/leukemias: Experimental model for possible beneficial role in anti-oxidative stress by broccoli (Sulforaphan). Asia Pacific Symposium on Food Safety 2009 (2009.11. 13) Seoul, South Korea
 11. Inoue T: Gene expression profile of the bone marrow after benzene exposure in C57BL/6 and C3H/He mice: the common gene expression and the stochastic gene expression. FDA-China International Forum and Workshop Microarray-Bioinformatics-Next-Generation Sequencing in Safety Assessment and Biomarker discovery (2009.9.26) Shanghai, China
 12. Inoue T: Hematopoietic neoplastic diseases in C3H/He and C57BL/6 mice after benzene exposure. Differences observed using microarrays. *Benzene 2009: Health Effects and Mechanisms of Bone Marrow Toxicity, Implication for t-AML and the Mode of Action Framework.* (2009.9.10) Munich, Germany.
- 〔図書〕 (計2件)
1. Hirabayashi Y, Inoue T. 2011. Commonality and Stochasticity in Systems Toxicology. In: Handbook of Systems Toxicology, Vol. 1, (Casciano DA, Sahu SC, eds). Hoboken, NJ John Wiley & Sons, Ltd., 432-460.
 2. Hirabayashi Y, Yoon BI, Li GX, Kaneko T, Kanno J, Fujii-Kuriyama Y, Inoue T. Aryl hydrocarbon receptor suppresses spontaneous neoplasms thereby extends life span. In: Morita M, ed. Persistent Organic Pollutants (POPs) Research in Asia. Tsukuba: Dioxin2007, 2008:326-31
- 〔産業財産権〕
- 出願状況 (計0件)
 - 取得状況 (計0件)
- 〔その他〕
- 該当しない
- ## 6. 研究組織
- (1) 研究代表者
井上 達 (INOUE TOHRU)
国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・客員研究員
研究者番号：50100110
- (2) 研究分担者
平林 容子 (HIRABAYASHI YOKO)
国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター毒性部・室長
研究者番号：30291115