

平成 27 年 6 月 13 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380170

研究課題名(和文) *in vivo*イメージングによる犬リンパ腫特異的分子の時空間的解析と治療への応用研究課題名(英文) Analysis of the genes expressed in canine lymphoma using *in vitro* and *in vivo* methodology.

研究代表者

水野 拓也 (Takuya, Mizuno)

山口大学・獣医学部・教授

研究者番号：90398826

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：犬のリンパ腫に特異的に発現する遺伝子の*in vitro*および*in vivo*における機能について検討した。解析した3つの分子については、機能解析に有用な抗体を作成した他、ある分子については定量ELISA系も確立した。さらに*in vitro*および*in vivo*において機能を明らかにできたものも存在し、今後の犬のリンパ腫治療に応用できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The genes specifically expressed in canine lymphoma was analyzed *in vitro* and *in vivo*. Especially, three genes were analyzed in detail, and the function was elucidated among some of them. This results would expect that these molecules could be target for lymphoma therapy in the future.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：リンパ腫 犬

1. 研究開始当初の背景

犬のリンパ腫は、犬の血液系腫瘍の中で最も発生が高い重要な疾患である。これまで犬のリンパ腫の発生機序に関する研究は、人のリンパ腫の研究から外挿されたものが多く、T細胞型リンパ腫におけるp16の異常

(Fosmire et al. Vet. Pathol. 2007) 以外に発生機序に迫った研究は知られていない。また、治療は従来通り抗癌剤をもちいた多剤併用療法が主流であり、人医療において用いられる新規治療法(分子標的療法や免疫療法)については、その基盤的研究も含めてほとんど実施されていない。一方、人のリンパ腫に対しては、その病態解析をもとに、抗CD20抗体、HDAC阻害剤などの低分子化合物を用いた治療法が実施され、よい成績を収めている。従って、犬においても癌の3大療法に加えて新規治療法を開発する事が肝要であり、それにより大きな予後の改善につながると考えられる。しかし、これまで犬のリンパ腫について、人医学からの外挿ではなく犬独自のリンパ腫の発症機序や治療ターゲットを探索するという研究についてはほとんど報告されていない。

2. 研究の目的

これまでにマイクロアレイにより同定した犬のリンパ腫特異的に発現する分子の機能を、*in vitro*およびマウス異種移植系を用いて明らかにすることである。また、*in vivo*における機能の同定を時間的(経時的)・空間的(体内の部位)に可能にするために、犬のリンパ腫の腫瘍発生・増殖・浸潤・転移をマウス体内において *in vivo* 発光イメージングを用いて時空間的にモニターできる系を確立する。それにより、リンパ腫特異的分子のリンパ腫発生における役割を明らかにし、その分子に関わる異常を是正する新規治療法を提示することである。

3. 研究の方法

細胞株 各分子の過剰発現またはノックダウンさせるターゲット細胞としては、その後の移植を考えてマウス細胞株EL-4、A20を用いた。またレンチウイルス作製のためHEK293T細胞を用いた。犬のリンパ腫細胞株として、本研究室において樹立したEma、CLC、CLK、共同研究者である辻本より得たUL-1、Nody-1、そのほかの研究室より分与されたCLGL90、CLBL-1、17-71、GL-1を用いた。

Realtime PCR それぞれの細胞より常法にもとづいてtotal RNAを抽出し、RevaTra Aceを用いてcDNAを作製後、QuantiTect SYBR Green PCR Kit(QIAGEN)を用いてそれぞれの遺伝子発現量を定量した。

臨床サンプル リンパ腫症例由来腫瘍細胞については、山口大学動物医療センターおよび東京大学動物医療センターに来院したリンパ腫症例より飼い主の了解を得て、腫瘍細胞を

採取し、RNA抽出まで凍結させたか、そのままフローサイトメトリーによる解析に用いた。**ポリクローナル抗体の作製** IL-37遺伝子については、GSTとの融合蛋白を作製後、TiterMax Goldをアジュバントとして使用しウサギに免疫し、定期的に血清を回収することでポリクローナル抗体を得た。

モノクローナル抗体の作製 DEPDC1B遺伝子については哺乳類発現ベクターにくみこみ、Balb/cマウスにelectroporation法をもちいて免疫後、脾臓を採取しモノクローナル抗体を得た。一方、CD70分子についてはラットNRK細胞に過剰発現させ、その細胞をTiterMax Goldをアジュバントとしてラットフットパッドに免疫することで膝窩リンパ節を回収し、常法にもとづきモノクローナル抗体を得た。

各分子を過剰発現させるベクターの構築

分子Aおよび分子Bの機能を確認するために、各分子を過剰発現させたマウス細胞を作成した。方法は、それぞれの分子をコードする遺伝子をレンチウイルスベクター

CSII-CMV-MCS-IRES-Bsdにを組み込み、レンチウイルス感染系を用いてEL-4細胞に導入し、プラスチック存在下で培養することにより EL-4/分子AおよびEL-4/分子Bを得た。

また、分子Bについては、恒常的に過剰発現する細胞に加えて、テトラサイクリンによってその過剰発現を誘導できる細胞も作成した。すなわち、テトラサイクリン誘導性レトロウイルスベクターである pRetroX-TetOn Advanced(Clontech)に分子Bをコードする遺伝子を導入し、pRetroX-T0-Bを得たあと、これをA20細胞にレトロウイルスに導入し puromycin存在下で培養することにより A20/Bを得た。さらに、テトラサイクリン制御ユニットであるpQC-tTS-IN(Clontech)をレトロウイルス感染系を用いて CHM5b-luc に導入し neomycin 存在下で培養することにより、A20/B/T0を得た。

各分子をノックダウンさせるベクターの構築

分子Aをノックダウンさせるために、それぞれの分子に対するshRNAを常法に従い設計し、pSIREN-Retro-Qベクター(Clontech)に組み込み、それぞれをレトロウイルスによりEL-4に導入した。

リンパ系腫瘍の *in vivo* 移植モデル系を用いた分子Bの機能の解析

上記のような遺伝子を導入後、Balb/cマウスへ移植することによりリンパ系腫瘍モデルとした。上記のように作成した腫瘍細胞は 1×10^6 細胞を大腿部に皮下移植した。腫瘍の大きさはキャリパーを用いて経時的に測定した。マウスの一般状態は毎日観察し、28日後に安楽殺後、腫瘍の発生などについて検討した。

4. 研究成果

リンパ腫特異的に発現する遺伝子の同定

以前にマイクロアレイにより同定した約80種の遺伝子の中で、20種については詳細な発現解析を終了しており、犬リンパ系腫瘍細胞

株および犬リンパ腫症例10例のほとんどにおいて健康犬由来 T 細胞より発現増強が認められた遺伝子を同定した。本研究では、残りの 68 種について、同様に症例においても発現増強が認められる遺伝子を同定した。その中で、本研究においては、症例において著しく遺伝子発現が増強していた3つの分子（分子A、分子B、分子C；特許申請および論文作成のために名前を伏せている）について解析を進めた。

リンパ腫特異的に発現する分子に対するモノクローナル抗体の作製

上記で同定した遺伝子A、遺伝子B、遺伝子Cについて詳細な検討を行っていくために、それぞれ抗体の作製を行った

遺伝子Aについては、DNAでマウスに免疫する方法により2回にわたり抗体作製を試みた。その結果、ELISAおよび免疫沈降によって使用可能なモノクローナル抗体は得られたものの、当初の目的であったWestern blottingおよび免疫染色に使用可能な抗体は得られなかった。したがって、当初の目的であった免疫染色によってリンパ腫組織において分子Aが発現しているかについては確認できなかった。

分子Bについては、GSTとの融合蛋白を作製しそれをウサギに免疫することによりポリクローナル抗体を作製し、また一方でラットのフットパッドに免疫することにより、モノクローナル抗体を得た

(1F5-4C2, 1G7-1B7-B8, 3H5-2A8)。これら抗体はそれぞれWestern blottingおよびELISAにもちいることができることが明らかとなった。さらに両抗体をくみあわせてのsandwich ELISA法を確立した。これによってリンパ腫症

例における血清中分子Bの濃度の測定が可能となったが、GST融合蛋白を用いたコントロール実験により感度はそれほど高くないことが判明したため、血清中の微量のものを解析するためには、なんらかの改善が必要であると考えている。実際のリンパ腫症例の血清における濃度の測定は今後実施する予定である。

さらに、分子Cに対するモノクローナル抗体も作製した。これは分子Cの過剰発現NRK細胞をラットのフットパッドに免疫することでモノクローナル抗体を得た。その結果、Western blottingだけではなく、細胞表面に存在する分子Cをフローサイトメトリーで検出可能なことがわかった。そのため、本抗体は、今後リンパ腫症例由来腫瘍細胞の細胞表面にお

ける分子Cの発現解析に用いることができることが明らかとなった。

リンパ腫特異的分子とリンパ腫の治療抵抗性および臨床的知見との関係性の検討

前項で同定した分子Aおよび分子Cについては、共同研究者より提供されたリンパ腫由来腫瘍細胞を用いて、発現解析を行うとともに、発現量と予後との関連について検討した。その結果、生存期間の判明している30症例における両分子の発現増強は認められたが、発現の量と生存期間についてはとくに相関は認められなかった。生存期間以外のパラメータについては詳細な解析が必要であるが、現在のところこれら過剰発現している分子の臨床マーカーとしての意義については明らかにはできていない。

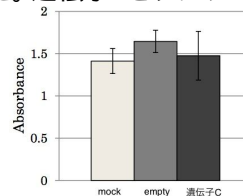
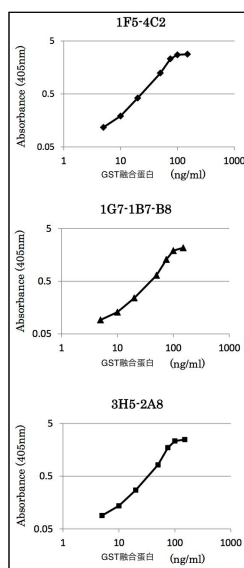
リンパ腫特異的に発現する分子の *in vitro* における機能解析

前項で同定した分子Aおよび分子Bについてはそのリンパ腫細胞における機能を明らかにするために、それぞれ過剰発現およびノックダウン細胞株を作製することとした。

分子Aについては、マウス胸腺腫由来細胞株であるEL-4細胞にレンチウイルスを用いて過剰発現させたあと、細胞増殖、MAPK経路についてWestern blottingによって検討した。その結果、残念ながら細胞増殖については全く変化がみとめられなかった。一方、MAPK経路のうち、Ras Raf MEK ERKの経路については、分子Aの過剰発現により亢進していることが明らかとなった。このことは以前に他の種類の腫瘍細胞株について同様に証明されている結果と一致しており、リンパ腫においても分子AはMAPK経路の亢進によってなんらかの機能を発揮している可能性が示唆された。

一方、分子Aのノックダウン細胞株を作製するために、分子Aに対するshRNAを作製し、レンチウイルスによりEL-4細胞に導入した。分子Aに対するshRNAの効果については、前もってHEK293T細胞に一過性に分子AのshRNAを導入しノックダウンされることを確認した。しかし、EL-4細胞については、分子Aを安定的にノックダウンされた細胞を得ることはできなかった。この理由については、分子AがEL-4細胞の生存に関してなんらかの機能を持っていることを示唆しているのかもしれないが、そこを証明するにはいたっていない。

分子Bについては分子Aと同様に、過剰発現細胞株を作製することにした。遺伝子Bをレンチウイルスベクターをもちいて、マウスリンパ腫細胞株であるEL-4細胞に導入した。その結果、*in vitro*における細胞増殖については何の変化も認められなかった。



したがってすくなくとも分子Bは*in vitro*においてリンパ腫細胞の増殖に対して影響を持たないことが明らかとなった。

つぎに分子Bをドキシサイクリンで発現誘導可能な細胞を作成した。そのためにテトラサイクリン(Tet)応答システムを使用することで、リンパ腫特異的分子のノックダウンを時間的制御可能にした。リンパ腫細胞株A20に、Tet 制御性活性化因子発現遺伝子、Tet 応答配列をもつ発現ベクターをレトロウイルスで導入し、導入 1 日後にそれぞれの薬剤耐性マーカーであるピュロマイシン、ネオマイシンで選択培養することにより、ドキシサイクリンにより分子Bの発現調節が可能

な A20/Tet-on/Bを得た。図に示すようにこの細胞株は、ドキシサイクリンを添加

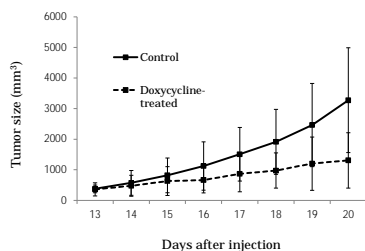
することにより、分子Bの発現誘導が可能な時間的制御可能な細胞である。またこの細胞は、分子Bを発現誘導するとLPSによるTNF の産生が抑制されることがわかった。このことは、分子Bが抗炎症に働く可能性を示唆している。

リンパ腫特異的に発現する遺伝子の *in vivo* 機能解析

つぎにこの細胞株に*in vivo*におけるイメージングモニター可能にするために、Luciferase遺伝子の導入を試みた。しかし、3回の試行を行ったにもかかわらず、分子Aおよび分子Bの過剰発現させた細胞株について目的の細胞を得ることはできなかった。

したがって、発光イメージングなしで、分子Bによるリンパ腫細胞への機能の解析を*in vivo*で実施することとした。Balb/cマウスの後肢大腿部に腫瘍細胞を投与し、腫瘍が一定の大きさになった時点で

、マウスを2群に分け、片方の群にはドキシサイクリンを含んだ餌を、もう片方の群にはコントロールの餌を給餌した。その結果、図に示すように、ドキシサイクリン投与した群、すなわち分子Bが発現した群においては、腫瘍の増大が抑制される傾向にあることがわかった。本結果は、分子Bがリンパ腫に過剰発現しているにもかかわらず、*in vivo*においては、リンパ腫細胞の増殖抑制に働いていることを表しており、予想と異なる結果が得られた。これらの意味するところは現在のところ不明である。



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 18 件)

Igase M, Hwang CC, Coffey M, Okuda M, Noguchi S, Mizuno T. The enclitic effects of reovirus in canine solid tumor cell lines. **J Vet Med Sci**. 2015 Jan 16. [Epub ahead of print] 査読有

Ema Y, Igase M, Takeda Y, Yanase T, Umeki S, Hiraoka H, Okuda M, Mizuno T. Investigation of the cytotoxic effect of flavopiridol in canine lymphoma cell lines. **Vet Comp Oncol**. 2015 Jan 26. doi: 10.1111/vco.12130. [Epub ahead of print] 査読有

Hwang CC, Umeki S, Igase M, Coffey M, Noguchi S, Okuda M, Mizuno T. The effects of oncolytic reovirus in canine lymphoma cell lines. **Vet Comp Oncol**. 2014 Oct 15. doi: 10.1111/vco.12124. [Epub ahead of print] 査読有

Noguchi S, Kumazaki M, Mori T, Baba K, Okuda M, Mizuno T, Akao Y. Analysis of microRNA-203 function in CREB/MITF/RAB27a pathway: comparison between canine and human melanoma cells. **Vet Comp Oncol**. 2014 Oct 3. doi: 10.1111/vco.12118. [Epub ahead of print] 査読有

Nakashima T, Hayashi T, Mizuno T. Regulation of the development of asthmatic inflammation by *in situ* CD4(+)Foxp3(+) T cells in a mouse model of late allergic asthma. **Inflammation**. 2014 Oct;37(5):1642-53. doi: 10.1007/s10753-014-9892-3. 査読有

Hwang CC, Mochizuki M, Maeda K, Okuda M, Mizuno T. Seroepidemiology of Reovirus in Healthy Dogs in Six Prefectures in Japan. **J Vet Med Sci**. 2014 Mar;76(3):471-5. Epub 2013 Nov 27. 査読有

Nakashima T, Hayashi T, Tomoeda S, Yoshino M, Mizuno T. Reovirus type-2-triggered autoimmune cholangitis in extrahepatic bile ducts of weanling DBA/1J mice. **Pediatr Res**. 2014 Jan;75(1-1):29-37. 査読有

Hwang CC, Umeki S, Kubo M, Hayashi T, Shimoda H, Mochizuki M, Maeda K, Baba K, Hiraoka H, Coffey M, Okuda M, Mizuno T. Oncolytic reovirus in canine mast cell tumor. **PLoS ONE**. 2013 Sep 20; 8(9): e73555 査読有

Umeki S, Suzuki R, Ema Y, Shimojima M, Nishimura Y, Okuda M, Mizuno T. Anti-adhesive property of P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) due to steric hindrance effect. **J Cell Biochem**. 2013 Jun;114(6):1271-1285. 査読有

Fujiwara N, Kawasaki H, Yabe R, Christensen DJ, Vitek MP, Mizuno T, Sato K, Ohama T. A Potential Therapeutic Application of SET/I2PP2A Inhibitor OP449 for Canine T-Cell Lymphoma. **J Vet Med Sci**. 2013 Apr 1;75(3):349-354. 査読有

Hara Y, Suzuki J, Noguchi K, Terada Y, Shimoda H, Mizuno T, Maeda K. Function of Feline Signaling Lymphocyte Activation

Molecule as a Receptor of Canine Distemper Virus. **J Vet Med Sci.** 2013 Mar 26; 75(8):1085-1089. 査読有

Shimizu K, Mizuno T, Shinga J, Asakura M, Kakimi K, Ishii Y, Masuda K, Maeda T, Sugahara H, Sato Y, Matsushita H, Nishida K, Hanada KI, Dörrie J, Schaft N, Bickham K, Koike H, Ando T, Nagai R, Fujii SI. Vaccination with antigen-transfected, NKT cell ligand-loaded, human cells elicits robust in situ immune responses by dendritic cells. **Cancer Res.** 2013 Jan 1;73(1):62-73. 査読有

Umeki S, Ema Y, Suzuki R, Kubo M, Hayashi T, Okamura Y, Yamazaki J, Tsujimoto H, Tani K, Hiraoka H, Okuda M, Mizuno T. Establishment of Five Canine Lymphoma Cell Lines and Tumor Formation in a Xenotransplantation Model. **J Vet Med Sci.** 2012 Nov 28;75(4):467-474. 査読有

Nakashima T, Hayashi T, Yamamoto Y, Mizuno T. Administration of interferon (IFN)- α exacerbates Reovirus type-2-triggered autoimmune insulinitis in DBA/1J mice. **Scand J Immunol.** 2012 Oct;76(4):378-386. 査読有

Terada Y, Shiozaki Y, Shimoda H, Mahmoud HY, Noguchi K, Nagao Y, Shimojima M, Iwata H, Mizuno T, Okuda M, Morimoto M, Hayashi T, Tanaka Y, Mochizuki M, Maeda K. Feline infectious peritonitis virus with a large deletion in the 5'-terminal region of the spike gene retains its virulence for cats. **J Gen Virol.** 2012 Sep;93(Pt 9):1930-4. 査読有

Nakashima T, Hayashi T, Mizuno T. Reovirus type-2 infection in newborn DBA/1J mice reduces the development of late allergic asthma. **Int J Exp Pathol.** 2012 Jun;93(3):234-42. 査読有

Baba K, Itamoto K, Amimoto A, Kitagawa K, Hiraoka H, Mizuno T, Sato H, Okuda M. Ehrlichia canis Infection in Two Dogs that Emigrated from Endemic Areas. **J Vet Med Sci.** 2012 Jun;74(6):775-8. 査読有

Okawa T, Hiraoka H, Wada Y, Baba K, Itamoto K, Mizuno T, Okuda M. Development of High-Grade B-Cell Lymphoma Concurrent with T-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia in a Dog. **J Vet Med Sci.** 2012 May;74(5):677-80. 査読有

〔学会発表〕(計 15 件)

犬乳腺腫瘍細胞株に対する腫瘍溶解性ウイルス療法と化学療法の併用による相乗効果の検討 伊賀瀬雅也、Hwang Chung Chew、上林聡之、下川孝子、馬場健司、奥田優、野口俊助、水野拓也(第157回日本獣医学会学術集会 2014年9/10、北海道大学、北海道札幌市)

イヌのPD-1およびPD-L1に対するモノクローナル抗体の作製とその機能の解析 正司麗葉、伊賀瀬雅也、下川孝子、馬場健司、奥田

優、野口俊助、水野拓也(第157回日本獣医学会学術集会 2014年9/10、北海道大学、北海道札幌市)

Reovirus induces apoptotic cell death by the dysregulation of the Ras signaling pathway Hwang Chung Chew、伊賀瀬雅也、下川孝子、馬場健司、奥田優、野口俊助、水野拓也(第157回日本獣医学会学術集会 2014年9/10、北海道大学、北海道札幌市)

イヌCD20分子に対するモノクローナル抗体の作製および特性解明 種本真理、藪健史、中西照幸、巨敏広、水野拓也、加納壘(第157回日本獣医学会学術集会 2014年9/10、北海道大学、北海道札幌市)

Reovirus infection dysregulates the Ras signaling pathway in canine mast cell tumor cells Hwang CC, Coffery M, Noguchi S, Okuda M, Mizuno T. (23rd Biennial Congress of the EUROPEAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH 2014年 7/5-8, Munich, Germany)

日本国内の主要犬種における犬白血球抗原 I 型の遺伝子解析 中谷亮太、井上公美、川野浩志、奥田優、水野拓也(第 156 回日本獣医学会学術集会 2013 年 9/21、岐阜大学(岐阜県岐阜市))

レオウイルスによる犬の各種腫瘍細胞株に対する細胞死の誘導 伊賀瀬雅也、Chung Chew Hwang、奥田優、水野拓也(第 156 回日本獣医学会学術集会 2013 年 9/21、岐阜大学(岐阜県岐阜市))

Reovirus effectively induces oncolysis in canine mast cell tumor in vivo and ex vivo Chung Chew Hwang、梅城沙織、伊賀瀬雅也、久保正仁、林俊春、奥田優、水野拓也(第 156 回日本獣医学会学術集会 2013 年 9/21、岐阜大学(岐阜県岐阜市))

イヌインターフェロンガンマによる犬腫瘍細胞株の増殖抑制効果の検討 濱村友紀、奥田優、水野拓也(第 156 回日本獣医学会学術集会 2013 年 9/21、岐阜大学(岐阜県岐阜市)) イヌのリンパ腫において過剰発現する遺伝子 IL-37 の解析 片山貴朗、柳瀬拓磨、藤原亜紀、辻本元、奥田優、水野拓也(第 156 回日本獣医学会学術集会 2013 年 9/21、岐阜大学(岐阜県岐阜市))

人工アジュバントベクター細胞を用いた犬の腫瘍免疫療法の前臨床試験 水野拓也、清水佳奈子、垣見和宏、藤井眞一郎(獣医ア

トピー・アレルギー・免疫学会 第7回シンポジウム 症例報告 2013年1/13、国際ファッションセンター3F KFC ホールアネックス (東京都墨田区)

イヌのリンパ腫において過剰発現する遺伝子の解析 柳瀬拓磨、梅城沙織、酒井治、平岡博子、藤原亜紀、辻本元、奥田優、水野拓也 (第154回日本獣医学会学術集会 2012年9/15、岩手大学 (岩手県盛岡市))

イヌのWT-1に対する抗体の特異性の解析 酒井治、中谷亮太、梅城沙織、酒井洋樹、久保正仁、森本将弘、林俊春、平岡博子、奥田優、水野拓也 (第154回日本獣医学会学術集会 2012年9/15、岩手大学 (岩手県盛岡市))

新しく樹立したイヌリンパ腫細胞株の in vitro および in vivo における性状解析 梅城沙織、江馬康夫、鈴木綾一、久保正仁、林俊春、岡村泰彦、山崎淳平、辻本元、谷健二、平岡博子、奥田優、水野拓也 (第154回日本獣医学会学術集会 2012年9/15、岩手大学 (岩手県盛岡市))

Discovering the oncolytic potential of reovirus in veterinary medicine : reovirus-induced cell death in canine lymphoma and mast cell tumor cell lines Hwang Chung Chew、梅城沙織、中川貴之、下田宙、望月雅美、前田健、平岡博子、奥田優、水野拓也 (第154回日本獣医学会学術集会 2012年9/15、岩手大学 (岩手県盛岡市))

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://web.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~vintmed/mizuno/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 拓也 (MIZUNO, Takuya)
山口大学・共同獣医学部・教授
研究者番号：90398826

(2) 研究分担者

辻本 元 (TSUJIMOTO, Hajime)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号：60163804

清水 加奈子 (SHIMIZU, Kanako)

統合生命医科学研究センター・上級研究員
研究者番号：20391980

(3) 連携研究者

()

研究者番号：