

## 医薬品開発と再生医学への応用を目指した細胞成熟制御法の開発

所 属 国立成育医療センター研究所 発生・分化研究部

研究者 藤本 純一郎

### 分担研究者

- |                     |       |
|---------------------|-------|
| (1) 慶應義塾大学医学部       | 山田 健人 |
| (2) 東京理科大学生命科学研究所   | 穂積 信道 |
| (3) エスエス製薬株式会社中央研究所 | 草野 浩二 |

### 要 旨

血小板関連遺伝子プロモーターにより巨核球・血小板への外来遺伝子導入系を完成した。Hu-Bone-SCID マウスによりヒト白血病浸潤・血管新生モデルを開発した。形態形成分子 Notch が間葉系幹細胞の骨分化に関与することを明らかにした。

#### 1. 研究目的

ヒト造血組織を構成する細胞、特に、巨核球、血管、間質細胞および骨に着目し、その成熟制御法開発を通じて医薬品等の開発および再生医学への応用を図ることを目的とする。

#### 2. 研究方法

##### 1) マウス・ヒト造血細胞培養法

マウスおよびヒト骨髓細胞からの B リンパ球、巨核球誘導培養実験は以下のごとく行った。8 週齢の B6 マウス骨髓細胞をマウス骨髓由来間質細胞株 MS5 上で培養した。一部の実験ではこの培養系にマウス IL-7 を添加した。巨核球の誘導はトロンボポイエチン (TPO) 添加培養を基本とした。CD34 陽性ヒト骨髓細胞は、市販品を使用し、マウス骨髓細胞と同様の実験法を採用した。培養後の細胞は、ギムザ染色ならびにフローサイトメーターによる細胞マーカー解析を行った。

##### 2) 巨核球特異的発現ベクター作成と発現実験

マウス gpV 遺伝子の 5'上流域の 500bp をマウス gpV プロモーターとし、これに Green Fluorescence Protein (GFP) 遺伝子を結合させた (pGPVP-EGFP)。また、この発現ベクターの両端にウニ由来インスレーター (独立行政法人・農業生物資源研究所、安江博博士、渡部聡博士から分与) を組み込んだベクター Ins-GPVP-EGFP を作成した。ヒト gpIIb 遺伝子の 5'上流領域は、PCR 増幅して単離しヒト gpIIb プロモーターとし (GPIIb-EGFP)、同様に GFP 遺伝子を組み込んだ。ベクターの活性検討は、ヒト、マウス細胞株、TPO 添加培養によるマウス巨核球へのリポフェクションによる導入と蛍光顕微鏡観察あるいはフローサイトメーター観察で行った。トランスジェニックマウスの作成は常法に従った。

##### 3) Hu-Bone SCID マウス作成とヒト腫瘍移植、ヒト血管新生モデル作成

NOD/SCID マウス皮下へヒト骨組織 (海綿骨部分) を移植し Hu-Bone SCID マウスを作成した。生着したヒト骨内に乳癌手術材料あるいはヒト癌培養細胞株 (乳癌由来 MB231、神経芽腫由来 SK-N-DZ、バーキット型白血病細胞株 Raji、骨髓腫細胞株 IMR32, HS-Sultan) を移植し経時的に観察した。一部の実験では、ヒト骨および同系マウス骨を複数個同時に移植し転移実験に使用した。腫瘍内に伸展する血管の由来については、抗ヒト CD31, 34, HLA-class I モノクローナル抗体等を用いた。

血管新生に関与する分子機構を明らかにするため、以下の方法を用いた。すなわち、VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) 受容体 Flt-1 については細胞外領域と免疫グロブリン Fc のキメラ分子 (Flt-1-Fc)、Angiopoietin 受容体 Tek については細胞外領域と免疫グロブリン Fc のキメラ分子 (Tek-Fc) の発現ベクター (熊本大学須田年生博士より供与) をヒト癌培養細胞株に導入し、Hu-Bone SCID マウス移植骨内へ移植したのち増殖様式を検討した。Raji 細胞の移植には 8Gy 放射線照射した Hu-Bone SCID マウスを用いた。ヒト間質細胞への遺伝子導入は以下の方法に従った。遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子

(neor)を保有するレトロウイルスベクター(MBAE-EGFP)および neor を欠く MSGFP レトロウイルスベクターを作成し常法に従いウイルスを作成した。これをヒト間質細胞に感染させ Hu-Bone SCID マウスに移植した。細胞の生着と分布は、蛍光顕微鏡観察、抗 GFP 抗体反応で行った。

#### 4) 骨形成に関与する分子探索と解析システム

形態形成分子 Notch の細胞質内ドメインのみから成る活性型 Notch-IC/アデノウイルスベクターを作製した。また骨芽細胞分化に関わる新規の Notch 類似の細胞接着分子クローニングは、EGF リピート配列をプローブとして用いて骨芽細胞様細胞株(MC3T3)から作製した cDNA ライブラリー、Preosteoblastic Epidermal Growth Factor-like MAM Domain (POEM) をクローニングした。この POEM プローブを用いて、マウス胎児発生期の in situ Hybridization 実験により遺伝子発現を解析した。軟骨細胞分化における Notch の関与を解析するために使用した軟骨様細胞株(ATDC5)は、インスリン添加により細胞凝集がおこり、軟骨細胞に分化するものである。

上記の MC3T3、ATDC5 細胞から調整した mRNA を基にして、軟骨細胞、骨芽細胞分化に関与する遺伝子のクローニングを試みた。mRNA からランダムプライマーで作製した cDNA 断片を pMX-SST ベクターに挿入して作製したレトロウイルスライブラリーをレトロウイルスパッケージング細胞に遺伝子導入し、回収したウイルスを IL-3 依存性 Ba/F3 細胞に感染させる。cDNA がトロンボポエチンレセプター (mpl) と融合すると、この融合タンパクは膜表面上に発現し、Ba/F3 細胞は IL-3 非依存性の増殖能を示すようになる。増殖した細胞から DNA を抽出し、PCR により cDNA を回収した。

### 3. 研究成果

#### 1) 血球の誘導培養法および成熟制御法の開発

##### 1-1) B リンパ球および巨核球の誘導培養法

マウス骨髓細胞では、MS5 のみで sIgM<sup>-</sup>, B220<sup>+</sup>, Ly-51<sup>-</sup> の pro-B 細胞の誘導を、MS5 と IL-7 添加で sIgM<sup>-</sup>, B220<sup>+</sup>, Ly-51<sup>+</sup> の表面形質を有する Pre-B 細胞の誘導に成功した。ヒト B リンパ球では、MS5 との共培養のみで 15 万個の CD34 陽性細胞から 4 週間後に 130 万個の B リンパ球が誘導できる培養系を確立した。これらの B リンパ球は sIgM<sup>-</sup>, CD19<sup>+</sup> の形質を持つ B 前駆細胞であった。

CD34 陽性ヒト骨髓細胞への TPO 添加培養を 1 週間行った結果、CD41 ならびに CD42 陽性巨核球の出現を見たが、MS5 との共培養を加えると巨核球の出現頻度は大幅に減少した。

##### 1-2) 巨核球成熟制御法の開発

pGPVP-EGFP が細胞株およびマウス骨髓細胞からの成熟誘導培養系で成熟巨核球特異的発現を示すが、TG マウスでは遺伝子発現が見られなかった。そこで、ウニ由来インスレーター遺伝子導入を試みた。Ins-GPVp-EGFP は、ヒト巨核芽球の性質を有する HEL で GPVp-EGFP と同等の発現活性を発揮することを示した。ヒト gpIIb 遺伝子 5' 上流の 1.230 塩基対を PCR 増幅し、塩基配列を決定後ヒト gpIIb プロモーターとした。これに GFP 遺伝子を結合させた GPIIbp-EGFP をヒト HEL 細胞に導入しフローサイトメーター解析を行ったところ GFP 緑色蛍光を示す細胞集団を認めることができた。一方、gpIIb プロモーターを逆向きに GFP 遺伝子と結合した GPIIbp-EGFP-R は HEL 細胞ではまったく活性を示さなかった。マウス巨核芽球性白血病由来株 C2 においても GPIIbp-EGFP は活性を示すことが判明した。TPO で誘導したマウス骨髓巨核球での GPIIbp-EGFP の発現活性を上記と同様に解析した結果、巨核球に明瞭に GFP 発現が見られることを蛍光顕微鏡で確認した。GPIIbp-EGFP を用いた TG マウスは現在作成中である。

#### 2) Hu-Bone SCID マウス作成と血管新生モデル作成

##### 2-1) NOD/SCID マウスでのヒト血管・骨・造血の再構築 (Hu-Bone SCID マウス)

移植したヒト骨組織は 4~6 ヶ月間生着し、ヒト骨芽細胞や破骨細胞が観察された。骨髓腔には 3 系統のヒト造血細胞と前駆細胞、T, B リンパ球が認められ、血清中にヒト免疫グロブリンが検出された。移植骨骨髓内の血管の内皮細胞はヒト CD31, 34, HLA-class I が陽性であり、また、移植骨周囲マウス皮下組織に放射状に伸展する血管もヒト由来のものがあ、マウスの血管と共存していた。

##### 2-2) ヒト腫瘍血管新生モデル

この Hu-Bone SCID マウス皮下移植骨内へ、原発巣より採取した乳癌細胞あるいはヒト癌培養細胞株(乳癌由来 MB231、神経芽腫由来 SK-N-DZ) を移植すると、いずれの癌細胞を移植した場合にも、その腫瘍血管はヒト由来であった。一方、ヒト骨を移植しないで、これらのヒト癌細胞を移植した場合には、腫瘍血管はヒト由来ではなく、マウス由来であった。

## 2-3) Hu-Bone SCID マウスを用いたヒト癌の骨転移モデル

ヒト骨を NOD/SCID マウス皮下に独立に 2ヶ所に、さらに同系統マウスの大腿骨を 1ヶ所に、計 3 個の骨を別々の切開により離して移植した。さらにヒト骨の片方へ、乳癌原発巣および骨転移巣から採取した癌組織を移植し、他の骨への転移について、経時的に観察した。その結果、骨転移巣から採取した乳癌を移植した場合にのみ、全ての症例で、もう一方のヒト移植骨への転移が認められたが、マウス移植骨への転移は、遅い時期にごく一部で見られたのみであった。この時、ヒト骨へ移植した腫瘍では、その血管がヒト由来であり、マウス骨へ移植した腫瘍では、マウス由来の血管が観察された。一方、ヒト癌由来培養細胞株を同様に片方のヒト骨へ移植したが、試みた全ての細胞株において、他方のヒト骨への転移は認められなかった。

## 2-4) ヒト腫瘍血管新生モデルを用いた血管新生の分子機構の解析と抑制法の探索

ヒト癌培養細胞株（乳癌由来 MB231、神経芽腫由来 SK-N-DZ）へ、血管内皮細胞増殖因子 VEGF 受容体 Flt-1 細胞外領域と免疫グロブリン Fc のキメラ分子(Flt-1-Fc)および angiopoietin-1 受容体 Tek の細胞外領域と免疫グロブリン Fc のキメラ分子 (Tek-Fc) の発現ベクターを導入し、安定発現細胞株を得た。これらのクローンと対照クローン（ネオマイシン耐性遺伝子のみ導入）を Hu-Bone SCID マウス移植骨内へ移植したところ、腫瘍移植後 21 日目における腫瘍の重量は、対照群に比して、Flt-1-Fc および Tek-Fc 導入群では、1/4 から 1/20 に減少した。これらの腫瘍血管の密度の減少は、Flt-1-Fc 導入群でより顕著であったが、Tek-Fc 導入群では、Flt-1-Fc 導入群では認められない腫瘍血管の形態異常（不整、血管腔の大型化）が見られた。これらの結果は、VEGF/Flt-1 と Angiopoietin/Tek のシグナル伝達系がいずれも腫瘍血管新生に重要であるとともに、その役割は異なることを示唆する。

## 2-5) ヒト白血病浸潤・血管新生モデル

放射線照射した Hu-Bone SCID マウスへ、小児バーキット型白血病細胞株 Raji を静注した。その結果、2~3 週後に移植骨骨髓内に Raji 細胞の浸潤が認められ、その後、約 5~7 日間でマウスは下半身麻痺が出現し、さらに 3~5 日後に死亡した。そこで Raji 細胞移植 3 週目に移植骨、マウス造血組織（骨髓、脾臓、末梢血）を採取し、組織学的ならびにフローサイトメーターで Raji 細胞の浸潤について解析したところ、Raji 細胞は移植骨骨髓およびマウス大腿骨骨髓での細胞の 85~95% を占め、脾臓、末梢血にも浸潤を示した。この時、Raji 細胞非静注群を陰性対照として、移植骨髄における血管密度を算出したところ、移植骨ドナーに関らず、Raji 細胞静注群での移植骨では、CD34 陽性のヒト血管密度の有意な増加が全例に認められた。またこの Raji 細胞では、VEGF165,181、Angiopoietin-1、Angiopoietin like factor の恒常的な mRNA 発現が検出された。骨髓腫細胞株 IMR32、HS-Sultan の場合は、放射線照射なしで骨髓浸潤がみられ、浸潤とともに著明な血管新生が観察された。これらの骨髓腫細胞では、VEGF165,181,FGF-2,Angiopoietin-1 の mRNA 発現が検出された。

## 2-6) ヒト・ストローマ細胞の分化能

MBAE-EGFP 由来ウイルスを初代ヒトストローマ細胞へ感染させ、Hu-Bone SCID マウスへ静注、移植骨内直接移植したところ、4-8 週後に移植骨内外に GFP 陽性細胞が観察され、一部は内皮細胞へ分化した。この細胞をヒト腫瘍移植マウスに接種したところ、腫瘍間質のみならず腫瘍血管内皮をも再構成した。

## 3) 骨形成に関与する分子探索と解析システム

### 3-1) Notch による骨芽細胞、軟骨細胞の分化振り分け

MC3T3 細胞の骨形成過程における Notch 遺伝子の発現の変化を検討したところ培養初期に発現しているが、骨芽細胞分化の進行にしたがい発現が低下することを明らかにした。つぎに、Notch-IC/アデノウイルスベクターを MC3T3 細胞に導入したところ顕著な石灰化の促進と骨芽細胞分化の指標となる Alkaline Phosphatase (ALP)発現上昇が観察された。さらに軟骨細胞、脂肪細胞、骨芽細胞、筋原細胞に分化する C3H10T1/2 細胞を用いて実験を行った。BMP のタイプ II レセプターの変異体で BMP レセプターからの恒常的なシグナルを伝達する ALK6QD を組み込んだアデノウイルスベクターを Notch-IC と共に導入したところ、いずれかの単独導入と比べはるかに強い石灰化と ALP 発現を誘導した。この骨芽細胞分化の相乗効果はヒト間葉系幹細胞(Osiris Inc)によっても確認された。さらにコラーゲン 2 次元培養系を用いてヒト間葉系幹細胞の分化振り分けを解析した。コラーゲン培養では平面培養系とは異なり細胞間の相互作用、細胞の密度が少なくなる。Notch と ALK6QD を共発現させると細胞の凝集と ALP 発現が相乗的に増加することが明らかとなった。骨芽細胞の場合とは異なり、Notch-IC の ATDC5 細胞への導入は軟骨細胞への分化を抑制することが示された。

### 3-2) POEM の機能解析

骨形成に関与した遺伝子として POEM をクローニングした。この遺伝子は副甲状腺、甲状腺、骨芽細胞、中脳、蝸牛管、腎臓の尿細管で強い発現が観察された。この分子は極めて強力な細胞接着活性を有し、 $\alpha 8\beta 1$  インテグリンのリガンドであることが明らかになった。ただ、 $\alpha 8\beta 1$  インテグリン以外の分子も POEM と会合することを示唆する結果が得られたため、未知の分子探索を開始した。その結果、CD9, CD44, Procollagen a1, Osteoglycin, Vezatin 分子が候補として挙げられた。

### 4. 考 察

ヒトおよびマウスについて B リンパ球の成熟誘導培養法の開発に進歩が見られた。マウスでは Pre-B 細胞までが誘導可能だが、ヒトでは Pro-B 細胞以上には成熟しない。この結果は、他の報告と一致しており、Pre-B 以上の段階に成熟させるには未知のサイトカインあるいは間質細胞が必要であることを示している。巨核球については、TPO により効率よく誘導できることはすでに報告されているが MS5 を併用した場合に巨核球の誘導が抑制される結果は興味深い。新たな間質細胞の探索が必要と考えられる。

巨核球に発現する遺伝子のプロモーター活性を応用した外来遺伝子発現法の開発については、インスレーターを組み込  $gpV$  プロモーターで完成した。インスレーターの利用は、生体の遺伝子発現制御機構を克服できる方法として注目される。また、 $gpIIb$  プロモーターについてはすでに TG マウスが 30 ライン以上生まれており、その解析結果が期待される。来年度は、これらのマウスを用いて TPO と類似の作用を持つ低分子化合物のスクリーニングに取り掛かる。

Hu-Bone-SCID はヒト腫瘍移植系、ヒト血管新生モデルとして注目される。昨年度までに、ヒト血管から構築されたヒト腫瘍移植系の確立、血管新生制御モデル確立を行ったが、本年度は新たに骨髄での白血病増殖にも血管新生が必要であることを示した。また、間質細胞が腫瘍間質のみならず血管内皮に分化することを示した。血管構築は臓器再生の面からも重要な課題でありこのマウスが応用できる研究分野も多いと考えられる。

新規の細胞接着分子(POEM)は $\alpha 8\beta 1$  インテグリンと結合することはすでに報告したが、今年度新たな結合分子候補を挙げることができた。また、形態形成分子である Notch が骨芽細胞分化、骨形成に重要な機能を発揮することが初めて明らかにされた。ヒト間質細胞への Notch 遺伝子の導入は骨形成を促進することが分かり、将来骨粗鬆症などに対する細胞療法の可能性が示唆された。

### 5. まとめ

- 1) マウス骨髄細胞およびヒト CD34 陽性造血幹細胞から、Pro-B 細胞および Pre-B 細胞を成熟させる培養系を確立した。
- 2) マウス  $gpV$  遺伝子プロモーターおよびヒト  $gpIIb$  遺伝子プロモーターを用いて巨核球および血小板のみに GFP を発現する実験系を確立した。
- 3) Hu-Bone-SCID マウスによるヒト血管新生モデルを作成し、血管新生の分子機序、白血病増殖時の血管新生の関与、ヒト間質細胞の血管内皮への分化を明らかにした。
- 4) 形態形成分子 Notch が間葉系細胞の骨分化に重要であること、新規細胞接着分子 POEM が $\alpha 8\beta 1$  インテグリンと結合することを明らかにした。

### 6. 研究発表

- 1) Fujita T, Yamada T, Hashiguchi A, Fukushima S, Fujimoto J, and Hata J. Augmentation of megakaryocytopoiesis by the hematopoietic microenvironment of human granulocyte colony-stimulating factor transgenic mice. *Exp-Hematol*, **29** : 1010-8 (2001).
- 2) Morimura, N., Tezuka, Y., Watanabe, N., Yasuda, M., Miyatani, S., Hozumi, N. and Tezuka, K. Molecular cloning of POEM: A novel adhesion molecule that interacts with  $\alpha 8\beta 1$  integrin. *J. Biol. Chem.* **276**: 42172-42181 (2001).
- 3) Tezuka, K., Yasuda, M., Watanabe, N., Kuroda, K., Miyatani, S. and Hozumi, N. Stimulation of osteoblastic cell differentiation by Notch. *J. Bone Miner. Res.* **17**: 231-239 (2002).
- 4) Yuasa H, Takakura N, Shimomura T, Suenobu S, Yamada T, Nagayama H, Oike Y, Suda T. Analysis of human TIE2 function on hematopoietic stem cells in umbilical cord blood. *Biochem Biophys Res Commun.* **298**:731-737 (2002).

- 5) Tezuka, K., Yasuda, M., Watanabe, N., Kuroda, K., Miyatani, S. and Hozumi, N. Stimulation of osteoblastic cell differentiation by Notch. *J. Bone Miner. Res.* **17**: 231-239 (2002).
- 6) Watanabe, N., Tezuka, Y., Matsuno, K., Miyatani, S., Morimura, N., Yasuda, M., Fujimaki, R., Kuroda, K., Hiraki, Y., Hozumi, N. and Tezuka, K. Suppression of differentiation and proliferation of early chondrogenic cells by Notch. *J. Bone Miner. Metab.* (in press).
- 7) 山田健人. ヒト腫瘍血管モデルとヒトがんの浸潤・転移モデル. *病理と臨床* **19**: 753-759 (2001).
- 8) 山田健人、秦 順一. ヒト腫瘍血管モデルとその分子機構. *Surgery Frontier* **8**: 36-41 (2001).
- 9) 山田健人. 造血管腫瘍と血管新生. 増刊号「造血管腫瘍」. *臨床検査* **46**: 1481-1483 (2002).
- 10) 山田健人. 腫瘍血管新生モデルの癌治療への応用. *血液・腫瘍科* **45**:162-168 (2002).
- 11) 山田健人、穂積信道、杜ぶん林、橋口明典、須田年生、秦 順一. in vivo ヒト腫瘍血管新生モデルとその分子機構. 第 60 回日本癌学会総会 (横浜) 2001 年 9 月.
- 12) 杜ぶん林、山田健人、橋口明典、穂積信道、Robert Hawley、秦 順一. ヒト骨髄ストローマ細胞を用いた遺伝子治療法の開発: Hu-Bone SCID マウスを用いて. 第 90 回日本病理学会総会、2001 年 4 月 (東京).
- 13) Taketo YAMADA, Nobumichi HOZUMI, Toshio SUDA, Wenlin DU, Akinori HASHIGUCHI, Kensuke KONDOH, Yuchen HAN, and Jun-ichi HATA In Vivo Model for Human Tumor Angiogenesis. The Keystone Symposium, Banff, Canada, pp137, February, 2002
- 14) Hozumi N, Yasuda M, Morimura N, Watanabe N, Fujimaki R, Hata J, Yamada T and Tezuka K Enhanced Calcification and Osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells by Notch. The 5th Tissue Engineering Society International, Kobe, Dec. 8-10th, 2002.
- 15) Yamada T, Kensuke K, Hashiguchi A, Hozumi N, Suda T, Sakamoto M, Hata J In Vivo Model for Human Tumor Angiogenesis in Leukemia/Lymphoma or Multiple Myeloma and the Tumor Regression by Anti-Angiogenic Gene Therapy. American Society of Hematology, Philadelphia, USA, December, 2002.
- 16) Mori T, Sugita K, Kimura K, Fuke T, Miura T, Kiyokawa N and Fujimoto J. Isolated central nervous system relapse in a case of childhood systemic anaplastic large cell lymphoma without initial involvement. *J Pediatr Hematol Oncol*, in press.
- 17) Mimori K, Kiyokawa N, Taguchi T, Suzuki T, Sekino T, Nakajima H, Saito M, Katagiri-U Y, Isoyama K, Yamada K, Matsuo Y and Fujimoto J. Co-stimulatory signals distinctively affect CD20- and B-cell-antigen-receptor-mediated apoptosis in Burkitt's lymphoma/leukemia cells. *Leukemia*, in press.
- 18) Mori T, Kiyokawa N, Shimada H, Miyauchi J and Fujimoto J. Anaplastic large cell lymphoma in Japanese children: Retrospective analysis of 34 patients diagnosed at the National Research Institute for Child Health and Development. *Br-J-Haematol*, in press.
- 19) Taguchi T, Kiyokawa N, Mimori K, Suzuki T, Sekino T, Nakajima H, Saito M, Katagiri-U Y, Matsuo N, Matsuo Y, Karasuyama H and Fujimoto J. Pre-BCR-mediated signal inhibits CD24-induced apoptosis in human pre-B cells. *J-Immunol*, **170**:252-260, 2003.
- 20) Saito M, Kiyokawa N, Taguchi T, Suzuki K, Sekino T, Mimori K, Suzuki T, Nakajima H, Katagiri-U Y, Fujimura J, Fujita H, Ishimoto K, Yamashiro Y and Fujimoto J. Granulocyte Colony-stimulating Factor Directly Affects Human Monocytes and Modulates Cytokine Secretion. *Exp-Hematol*, **30**: 1115-23, 2002.
- 21) Matsuoka K, Kiyokawa N, Taguchi T, Matsui J, Suzuki T, Mimori K, Nakajima H, Takenouchi H, Wey-rang T, Katagiri-U Y and Fujimoto J. Rum1, an inhibitor of cyclin-dependant kinase in fission yeast, is negatively regulated by mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation at Ser and Thr residues. *Eur-J-Biochem*, **269**:3511-21, 2002.

## 7. 知的所有権の取得状況

該当なし。