

戦略的国際共同研究プログラム(SICORP)

日本－シンガポール共同研究

終了報告書 概要

1. 研究課題名：「細胞の自己組織化のメカニクスを可視化する新しい光学プラットフォームの開発」
2. 研究期間：2016年1月～2019年3月
3. 主な参加研究者名：
日本側チーム

	氏名	役職	所属	研究分担
研究代表者	大浪 修一	チームリーダー	理化学研究所生命機能科学研究センター	WP2, WP4
主たる共同研究者	岡田 康志	チームリーダー	理化学研究所生命機能科学研究センター	WP1, WP5
主たる共同研究者	柴田 達夫	チームリーダー	理化学研究所生命機能科学研究センター	WP3, WP4
研究参加者	神原 丈敏	上級研究員	理化学研究所生命機能科学研究センター	WP4, WP5
研究参加者	Fu-Lai Wen	研究員	理化学研究所生命機能科学研究センター	WP4
研究参加者	高山 順	研究員	理化学研究所生命システム研究センター (在籍時)	WP2, WP4
研究期間中の全参加研究者数				10名

シンガポール側チーム

	氏名	役職	所属	研究分担
研究代表者	茂木 文夫	主任研究員	Mechanobiology Institute、 Temasek Life Sciences Laboratory National University of Singapore	WP2, WP4
主たる共同研究者	Alexander Bershadsky	主任研究員	Mechanobiology Institute、 National University of Singapore	WP1, WP3, WP5
研究参加者	Samuel Wang	研究員	Temasek Life Sciences Laboratory	WP4
研究参加者	Ravikrishna Ramanujam	研究員	Temasek Life Sciences Laboratory	WP4
研究参加者	Shiqiong Hu	研究員	Mechanobiology Institute、 National University of Singapore	WP5
研究参加者	Yukako	研究員	Mechanobiology	WP5

	Nishimura		Institute、 National University of Singapore	
研究期間中の全参加研究者数			24名	

4. 国際共同研究の概要

本研究は、細胞内のナノスケールの分子動態と細胞に働く力を同時計測する新しい光学システムを開発することを目的とする。具体的には先ず、日本側が独自開発した世界最速の超解像顕微鏡（SDSRM）に、シンガポール側が世界有数の技術を持つ牽引力顕微鏡と、両国が独自の実績を持つレーザー微細手術技術を融合する。次に、この融合顕微鏡システムにより取得される画像データを定量的に解析する計算プラットフォームを開発する。更に、開発したシステムを 1)発生中の胚の前後軸の決定、および 2)線維芽細胞の対掌性の確立、の 2 つの自己組織化現象に適用し、開発した光学システムの性能を立証する。この新規光学システムにより、細胞内分子の動態と細胞内の力の分布の関係、および、サブミクロン・スケールでの細胞内標的の焼灼に対する細胞内分子の効果を、従来の光学顕微鏡の約 2 倍の空間解像度（～100 nm）で高速解析（10 ms/time frame）することが可能になる。このシステムを用いて細胞の自己組織化と物理的な力の関係を解析することにより、器官形成を始めとしたさまざまな現象で保存されている、細胞の自己組織化システムの基本原理が解明されるものと期待される。

5. 国際共同研究の成果

5-1 国際共同研究の学術成果および実施内容

両国が保有する関連技術情報を集約し、SDSRM に、牽引力顕微鏡およびレーザー微細手術装置を装着した第 2 世代の SDSRM 顕微鏡システムを完成した。当該システムにマイクロレンズアレイを追加し、5 倍以上の高感度化に成功した。システムマティックなゲノム編集の実験系の構築に成功し、91 種の胚発生必須遺伝子に対する蛍光標識蛋白質を発現する線虫株を樹立した。開発した顕微鏡システムや蛍光標識蛋白質発現株等を用いて、線虫初期胚の前後軸を誘導する仕組みや組織特異的に起こる左右非対称性を制御する細胞内メカニクスの解明等に成功した。

5-2 国際共同研究による相乗効果

本国際共同研究を効果的に推進するために、プロジェクト開始時に両国で全体ミーティングと研究代表者および主な共同研究者のセミナーを開催、実験を目的としたシンガポール側からの短期滞在研究員の受け入れ、研究代表者間の頻繁なビデオ会議の実施、最終年度にシンポジウムの開催等を実施し、それぞれがプロジェクトの推進のために非常に効果的であったと考えている。また、両国の若手研究者間の交流により、若手研究者の研究に取り組む姿勢に良い変化が見られたこと、研究室として海外との共同研究を推進する基盤が構築され国際共同研究の件数が増加したこと等が、本国際共同研究による相乗効果として挙げられる。

5-3 国際共同研究成果の波及効果と今後の展望

本研究プロジェクトで開発した改良型 SDSRM は製品化された。ゆらぎの定理による力推定手法は知財化が行われた。本共同研究を一つの契機として、日本の若手研究員がシンガポールで Group Leader の職を得た。今後は、本研究プロジェクトで開発したマイクロデバイスを大規模 drug screening に応用する予定であり、それにより SDGs の目標 3 “あらゆる年齢のすべての人々の健康的な生活を確保し、福祉を推進する”に貢献する計画である。

Strategic International Collaborative Research Program (SICORP)
Japan—Singapore Joint Research Program
Executive Summary of Final Report

1. Project title : 「New optical platform to visualize mechanics of cellular self-organization」
2. Research period : January 2016 ~ March 2019
3. Main participants :

Japan-side

	Name	Title	Affiliation	Role in the research project
PI	Shuichi Onami	Team Leader	RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research (BDR)	WP2, WP4
Co-PI	Yasushi Okada	Team Leader	RIKEN BDR	WP1, WP5
Co-PI	Tatsuo Shibata	Team Leader	RIKEN BDR	WP3, WP4
Collaborator	Taketoshi Kambara	Senior Scientist	RIKEN BDR	WP4, WP5
Collaborator	Fu-Lai Wen	Research Scientist	RIKEN BDR	WP4
Collaborator	Jun Takayama	Research Scientist	RIKEN Quantitative Biology Center (When affiliated)	WP2, WP4
Total number of participants throughout the research period: 10				

Singapore-side

	Name	Title	Affiliation	Role in the research project
PI	Fumio Motegi	Principal Investigator	Mechanobiology Institute (MBI), Temasek Life Sciences Laboratory (TLL), National University of Singapore (NUS)	WP2, WP4
Co-PI	Alexander Bershadsky	Principal Investigator	MBI NUS	WP1, WP3, WP5
Co-PI	Samuel Wang	Researcher	TLL	WP4
Collaborator	Ravikrishna Ramanujam	Researcher	TLL	WP4
Collaborator	Shiqiong Hu	Researcher	MBI NUS	WP5
Collaborator	Yukako Nishimura	Researcher	MBI NUS	WP5
Total number of participants throughout the research period: 24				

4. Summary of the international joint research

This project aims to develop a new optical system that allows us to visualize nanometer-scale molecular dynamics and mechanical forces simultaneously within living cells. We will combine “world’s fastest” super resolution microscopy (SDSRM) developed in Japan with traction-force microscopy and laser beam-based microsurgery; for traction-force microscopy, Singapore has world-leading technology, and laser beam-based microsurgery is well established in both countries. We will then develop a computational platform for quantitative analysis of image data taken by this combined microscopy system. We will apply these systems to two cellular self-organizing systems, namely 1) anteroposterior axis specification in developing embryo and 2) establishment of cellular chirality in fibroblasts, to validate the performance of these systems. The new optical system will allow us to analyze the relationship between molecular dynamics and mechanical force distribution within a cell, and the effect of specific ablation of submicron-scale target on cellular molecules with 2x higher spatial resolution than conventional light microscopy (~100 nm) and fast temporal resolution (10 ms/time frame). Through analyzing relationships between cellular self-organization and mechanical force within cells by using this system, we would like to elucidate the basic principles in cellular self-organization, which are expected to be conserved in various phenomena including organogenesis.

5. Outcomes of the international joint research

5-1 Scientific outputs and implemented activities of the joint research

We successfully developed the second-generation SDSRM system by integrating traction-force microscopy and laser beam-based microsurgery systems into SDSRM. We then improved its sensitivity by more than five times by integrating microlens arrays into the system. We developed a systematic experimental system for genome editing and established 91 *C. elegans* strains each of which expresses fluorescently-labelled protein of different essential embryonic genes. By using the developed microscopy systems and strains, we successfully elucidated the mechanism of anteroposterior axis specification in *C. elegans* early embryos and the intracellular mechanics for controlling tissue-specific chirality establishment.

5-2 Synergistic effects of the joint research

To facilitate this joint research, we organized whole group meetings and seminars by PIs and Co-PIs at the beginning of the project. We hosted short-term visiting researchers from Singapore to do experiments in Japan. We frequently had video conference between PIs. We organized a symposium in the last fiscal year. All these activities quite effectively facilitated the project. Furthermore, we can point out the following as synergistic effects of the joint research; exchanges between young researchers across countries positively changed young researcher’s attitude toward research. The joint research established foundations of international collaboration in our laboratory, so that the number of international collaborations is increasing.

5-3 Scientific, industrial or societal impacts/effects of the outputs

The improved SDSRM developed in this project has been commercialized. The method of force measurement by fluctuation theorem has been submitted for patent application. Driven by this project, one young researcher has become a group leader in Singapore. We are planning to apply microdevice system developed in this project to high-throughput drug screen in the future. By doing so, we would like to contribute to the Goal 3 of Sustainable Development Goals (SDGs): “Ensure healthy lives and promote well-being for all at all ages”.

国際共同研究における主要な研究成果リスト

1. 論文発表等

*原著論文（相手側研究チームとの共著論文）

- ・査読有り：発表件数：計 1 件

1. Arata, Y., Hiroshima, M., Pack, C.-G., Ramanujam, R., Motegi, F., Nakazato, K., Shindo, Y., Wiseman, P.W., Sawa, H., Kobayashi, T.J., Brandão, H.B., Shibata, T. and Sako, Y., Cortical polarity of the RING protein PAR-2 Is maintained by exchange rate kinetics at the cortical-cytoplasmic boundary. *Cell Reports*, 16(8), 2156–2168, 2016. doi:10.1016/j.celrep.2016.07.047.

- ・査読無し：発表件数：計 0 件

該当無し

*原著論文（相手側研究チームを含まない日本側研究チームの論文）：発表件数：計 21 件

- ・査読有り：発表件数：計 21 件

1. Chiba K, Chien K, Sobu Y, Hata S, Kato S, Nakaya T, Okada Y, Nairn AC, Kinjo M, Taru H, Wang R, Suzuki T. Phosphorylation of KLC1 modifies interaction with JIP1 and abolishes the enhanced fast velocity of APP transport by kinesin-1. *Mol Biol Cell*, 28:3857-3869, 2017. doi: 10.1091/mbc.E17-05-0303
2. Nozaki T, Imai R, Tanbo M, Nagashima R, Tamura S, Tani T, Joti Y, Tomita M, Hibino K, Kanemaki MT, Wendt KS, Okada Y, Nagai T, Maeshima K. "Dynamic organization of chromatin domains revealed by super-resolution live-cell Imaging." *Mol Cell*. 67:282-293, 2017. doi: 10.1016/j.molcel.2017.06.018
3. Minegishi K, Hashimoto M, Ajima R, Takaoka K, Shinohara K, Ikawa Y, Nishimura H, McMahon AP, Willert K, Okada Y, Sasaki H, Shi D, Fujimori T, Ohtsuka T, Igarashi Y, Yamaguchi TP, Shimono A, Shiratori H, Hamada H. A Wnt5 activity asymmetry and intercellular signaling via PCP proteins polarize node cells for left-right symmetry breaking. *Dev Cell*. 2017 Mar 13;40(5):439-452. doi:10.1016/j.devcel.2017.02.010
4. Wen, Fu-Lai, Yu-Chiun Wang, and Tatsuo Shibata, "Epithelial folding driven by apical or basal-lateral modulation: geometric features, mechanical inference, and boundary effects." *Biophysical Journal* 112 (12): 2683–95. 2017. doi: 10.1016/j.bpj.2017.05.012
5. Hiraiwa, Tetsuya , Kuranaga, Erina, Shibata, Tatsuo , "Wave propagation of junctional remodeling in collective cell movement of epithelial tissue: Numerical simulation study" *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 5, 66, 2017. doi: 10.3389/fcell.2017.00066
6. Azuma, Y., Onami, S.: Biologically constrained optimization based cell membrane segmentation in *C. elegans* embryos. *BMC Bioinformatics* 18, 307 (2017). doi: 10.1186/s12859-017-1717-6
7. Takayama, J., Fujita, M., Onami, S.: In vivo live imaging of calcium waves and other cellular processes during fertilization in *Caenorhabditis elegans*. *Bio-protocol* 7, e2205 (2017). doi: 10.1186/s12859-017-1717-6
8. Ueno A, Omori Y, Sugita Y, Watanabe S, Chaya T, Kozuka T, Kon T, Yoshida S, Matsushita K, Kuwahara R, Kajimura N, Okada Y, Furukawa T. Lrit1, a retinal transmembrane protein, regulates selective synapse formation in cone photoreceptor cells and visual acuity. *Cell Rep*. 2018 Mar 27;22(13):3548-3561. doi: 10.1016/j.celrep.2018.03.007
9. Takeshima T, Takahashi T, Yamashita J, Okada Y, Watanabe S. A multi-emitter fitting algorithm for potential live cell super-resolution imaging over a wide range of molecular densities. *Journal of Microscopy*. doi: 10.1111/jmi.12714
10. Komatsu N, Terai K, Imanishi A, Kamioka Y, Sumiyama K, Jin T, Okada Y, Nagai T, Matsuda M. A platform of BRET-FRET hybrid biosensors for optogenetics, chemical screening, and in vivo imaging. *Scientific Reports* 8: 8984, 2018. DOI: 10.1038/s41598-

018-27174-x

11. Gzrybowski M, Taki M, Senda K, Sato Y, Ariyoshi T, Okada Y, Kawakami R, Imamura T, Yamaguchi S. A highly photostable near-infrared labeling agent based on a phosphorhodamine for long-term and deep imaging. *Angew. Chem.* 57:10137-10141, 2018. doi:10.1002/anie.201804731
12. Okamoto K, Germond A, Fujita H, Furusawa C, Okada Y, Watanabe TM. Single cell analysis reveals a biophysical aspect of collective cell-state transition in embryonic stem cell differentiation. *Sci Rep.* 8:11965, 2018. doi:10.1038/s41598-018-30461-2
13. Hayashi K, Tsuchizawa Y, Iwaki M, *Okada Y. Application of the fluctuation theorem for non-invasive force measurement in living neuronal axons. *Mol Biol Cell.* 29:3017-3025, 2018. doi: 10.1091/mbc.E18-01-0022
14. Shima T, Morikawa M, Kaneshiro J, Kambara T, Kamimura S, Yagi T, Iwamoto H, Uemura S, Shigematsu H, Shirouzu M, Ichimura T, Watanabe TM, Nitta R, *Okada Y, Hirokawa N. Kinesin-binding-triggered conformation switching of microtubules contributes to polarized transport. *J Cell Biol.* 217:4164-4183, 2018. doi: 10.1083/jcb.201711178
15. Yosuke Ogura, Fu-Lai Wen, Mustafa M. Sami, Tatsuo Shibata, and Shigeo Hayashi, (2018) “A switch-like activation relay of EGFR-ERK signaling regulates a wave of cellular contractility for epithelial invagination”, *Developmental Cell*, 46(2), 162–172. doi:10.1016/j.devcel.2018.06.004
16. Namba, T., & Shibata, T. (2018). Propagation of regulatory fluctuations induces coordinated switching of flagellar motors in chemotaxis signaling pathway of single bacteria. *Journal of Theoretical Biology*, 454, 367–375. doi:10.1016/j.jtbi.2018.06.023
17. Sekine, R., Shibata, T., & Ebisuya, M. (2018). Synthetic mammalian pattern formation driven by differential diffusivity of Nodal and Lefty. *Nature Communications*, 9(1), 5456. doi:10.1038/s41467-018-07847-x
18. Hörrning, M., & Shibata, T. (2019). Three-dimensional cell geometry controls excitable membrane signaling in *Dictyostelium* Cells. *Biophysj.* 116(2), 372–382. doi:10.1016/j.bpj.2018.12.012
19. Imakubo, M., Takayama, J., Onami, S.: Improvement and evaluation of a mathematical model for fertilization calcium waves in *Ceanorhabditis elegans*. *IPSJ Transactions on Bioinformatics* Vol. 11, 24-30 (2018) doi.org/10.2197/ipsjtbio.11.24
20. Onoue, Y., Kyoda, K., Kioka, M., Baba, K., Onami, S., Koyamada, K.*: Development of an integrated visualization system for phenotype character Networks. *IEEE Pacific Visualization Symposium (PacificVis 2018)*, 21-25 (2018). DOI: 10.1109/PacificVis.2018.00012
21. Hasegawa S, Sagawa T, Ikeda K, OkadaY, Hayashi K: Investigation of multiple-dynein transport of melanosomes by non-invasive force measurement using fluctuation unit X , *Scientific Reports* 9:5099. doi:10.1038/s41598-019-41458-w

・査読無し：発表件数：計 0 件

該当なし

* その他の著作物（相手側研究チームとの共著総説、書籍など）：発表件数：計 0 件

該当なし

* その他の著作物（相手側研究チームを含まない日本側研究チームの総説、書籍など）：発表件数：計 7 件

1. 岡田康志、共焦点顕微鏡の光学系を用いた超解像顕微鏡法、顕微鏡 52(2):62-66, 2017.
2. 岡田康志、超解像顕微鏡で観える生物現象、医学の歩み 262(5): 573-579, 2017.
3. 岡田康志、超解像顕微鏡によるライブイメージング、生体の科学、68(5): 378-379
4. 岡田康志、ライブイメージングのための高速超解像蛍光顕微鏡法、O plus E, 39(2): 174-178, 2017.
5. 岡田康志、超解像・一分子イメージングによる分子動態の計測、森泰生、尾藤晴彦編、

- 脳神経化学、第 30 章、319–329、化学同人
6. Hiraiwa, T., Wen, F.-L., Shibata, T., & Kuranaga, E. (2019). Mathematical modeling of tissue folding and asymmetric tissue flow during epithelial morphogenesis. *Symmetry*, 11(1), 113–10. doi:10.3390/sym11010113
 7. 大浪修一: 生細胞イメージング画像の画像解析. 実験医学, Vol.36, No. 20, 213-214 (2018)

2. 学会発表

* 口頭発表（相手側研究チームとの連名発表）

発表件数：計 1 件（うち招待講演：1 件）

1. Motegi, F., Wang, SC., Low, TYF., Nishimura, Y., Gole, L., Okada, Y., Onami, S., Yu, W. Nanoscale clustering of PAR proteins by cortical forces for embryonic polarization. 第 69 回日本細胞生物学会大会, 仙台, 6/13-15, 2017.

* 口頭発表（相手側研究チームを含まない日本側研究チームの発表）

発表件数：合計 51 件（うち招待講演：51 件）のうち 12 件掲載（全て招待講演）

1. Yasushi Okada, 「Toward the next generation live cell imaging」 ConBio2017, 神戸国際会議場、2017 年 12 月 8 日
2. 柴田達夫、「確率過程が駆動する上皮組織の形態形成、workshop, 必然から偶然に向かう生物学の新潮流」 ConBio2017, 神戸、2017/12/7
3. Shuichi Onami: Bioimage informatics enables data-driven cell biology. ConBio2017 (Consortium of Biological Sciences 2017), Kobe, Dec 6-9, 2017.
4. Shuichi Onami: SSBD: a database for biological dynamics and microscopy images. Global BiolImaging Exchange of Experience II, Bangalore, India, Sep 15-16, 2017.
5. Shuichi Onami: SSBD: Systems science of biological dynamics database. 12th Annual OME Users Meeting, Dundee, UK, May 31- June 1, 2017.
6. Yasushi Okada、「Development and application of high-speed super-resolution and single-molecule imaging for cell biology studies」 SPIE BioS, Moscone convention center (San Francisco)、2018 年 1 月 29 日
7. Yasushi Okada, Mechanisms of axonal transport investigated by high-speed and high-resolution imaging. 15th Annual German-Japanese Colloquium, Harnack-Haus, Berlin, Germany, 2019 年 2 月 8 日
8. Yasushi Okada, “Imaging based approaches to the mechanobiology of the fast axonal transport”, UBI-MBI Joint Symposium, NUS, Singapore, 2018 年 4 月 15 日
9. Yasushi Okada、「Development and application of high-speed super-resolution and single-molecule imaging for cell biology studies」 SPIE BioS, Moscone convention center (San Francisco)、2018 年 1 月 29 日
10. Tatsuo Shibata, Three-dimensional excitable wave dynamics depend on the cell geometry in Dictyotellum cells. 2018 Annual Meeting of the Society for Mathematical Biology & the Japanese Society for Mathematical Biology, July 8-12, Sydney Australia
11. Onami S., Koyamada K.: Data-driven analysis of the mechanism of animal development. DATAIA-JST International Symposium on Data Science and AI, Paris, France, July 11, 2018
12. Onami, S.: Integration of big image and omics data for modeling of animal development. The 5th RIKEN-KI/SciLifeLab Joint Symposium Artificial Intelligence Meets Life Sciences, Stockholm, Sweden, Sep 20, 2018

* ポスター発表（相手側研究チームとの連名発表）

発表件数：計 0 件

* ポスター発表（相手側研究チームを含まない日本側研究チームの発表）

発表件数：計 0 件

3. 主催したワークショップ・セミナー・シンポジウム等の開催

1. QBiC Seminar, Compartmentalization of *C. elegans* zygotes, Fumio Motegi, 主催者：大浪修一（理研 QBiC・チームリーダー）、理研 QBiC、吹田、日本、2016年2月29日、参加人数40名程
2. QBiC Seminar, Self-organization of cellular actomyosin cytoskeleton, Alexander Bershadsky, 主催者：大浪修一（理研 QBiC・チームリーダー）、理研 QBiC、吹田、日本、2016年2月29日、参加人数40名程
3. MBI Seminar, Large collection of quantitative data on spatiotemporal dynamics of embryo and its applications to data-driven modeling of embryogenesis, Shuichi Onami. 主催者：Fumio Motegi (MBI, Principal Investigator) and Alexander Bershadsky (MBI, Principal Investigator), Mechanobiology Institute, Singapore, 2016年5月17日、参加人数80名程
4. MBI Seminar, Yasushi Okada. 主催者：Fumio Motegi (MBI, Principal Investigator) and Alexander Bershadsky (MBI, Principal Investigator), Mechanobiology Institute, Singapore, 2016年5月16日、参加人数80名程
5. MBI Seminar, Biophysical model of pattern formation on the cellular cortex, Tatsuo Shibata. 主催者：Fumio Motegi (MBI, Principal Investigator) and Alexander Bershadsky (MBI, Principal Investigator), Mechanobiology Institute, Singapore, 2016年5月17日、参加人数80名程
6. MBI Seminar, Biophysical model of pattern formation on the cellular cortex, Tatsuo Shibata. 主催者：Fumio Motegi (MBI, Principal Investigator) and Alexander Bershadsky (MBI, Principal Investigator), Mechanobiology Institute, Singapore, 2016年5月17日、参加人数80名程
7. 第55回日本生物物理学会年会、シンポジウム「動的不均一性がもたらす多細胞社会の秩序形」、主催者：柴田達夫（理研 QBiC・チームリーダー）、松崎文雄（理研 CDB・チームリーダー）、熊本大学、熊本、日本、2017年5月20日、参加人数100名程度
8. The 56th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, The symposium “Mechanical self-organization in cellular morphogenesis”、主催者：Shuichi Onami (RIKEN BDR), Fumio Motegi (MBI/TLL/NUS), Okayama University, Okayama, Japan, 2018年9月16日、参加人数200名程

4. 研究交流の実績（主要な実績）

【全体ミーティング】

- ・2016年2月28日～3月2日：全体ミーティング、理研 QBiC、吹田、日本
- ・2016年5月16日～18日：全体ミーティング、MBI、Singapore、Singapore

【学生・研究者の派遣、受入】

- ・2016年2月～3月：シンガポールから研究員1名が、3日間、理研 QBiC に滞在し、全体ミーティングでの議論や、QBiC セミナーでの議論を聴講した
- ・2016年7月：シンガポールから研究員研究員1名と学生1名を3日間、理研 QBiC に受け入れ、実験を行なった。
- ・2017年5月：シンガポールから研究員1名を7日間、理研 QBiC に受け入れ、実験を行なった。

5. 特許出願

研究期間累積出願件数：0 件

6. 受賞・新聞報道等

- 文部科学大臣表彰科学技術賞、岡田康志、2017 年 4 月 19 日

7. その他

特になし