

【総説】

第10回 金沢大学十全医学賞受賞論文

論文 フェノール化合物に焦点をあてたアルツハイマー病の予防・治療薬の開発

The development of preventives and therapeutics for Alzheimer's disease with a focus on phenolic compounds

小野賢二郎 (おの けんじろう)

わが国では、高齢者人口が未曾有の速さで増加し、それに伴い認知症を有する高齢者が増え、大きな医療・社会問題となっている。認知症の原因は様々であるが、中でも頻度の高いアルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) は、その成因が未だ十分解明されておらず、また治療法も確立されていないのが実情である。

ADは、アミロイドβ蛋白 (amyloid β-protein: Aβ) を主成分とする老人斑、タウ蛋白を主成分とする神経原線維変化によって特徴づけられる。機序としては、Aβ凝集蓄積が初めに起こり、これが神経原線維変化や神経細胞死などの病変を引き起こして、認知症を発症すると考えられている (アミロイド仮説)¹⁾。現在、世界中でこの仮説に基づいた予防・治療法の開発、すなわち、1) Aβ産生抑制、2) Aβ分解、3) Aβ凝集抑制療法の開発が精力的に行われており、我々の研究グループは、特にAβ凝集抑制にターゲットをしぼって研究を行っている。

I. Aβ凝集とオリゴマー

Aβが凝集していく過程では、無構造のモノマーからβ-シートへの構造変換を起こし、続いて重合核が形成され、プロトファイブリル、さらには成熟線維 (Aβ fibrils: fAβ) が形成される (図1)²⁾。従来、脳アミロイドとして蓄積するfAβが神経毒性を発揮すると考えられていたが、近年、可溶性オリゴマー、特に低分子オリゴマーの研究に注目が集まっている³⁾。

Aβ凝集過程のどの段階の凝集体が一番、毒性が強いかはAβ研究における最大の疑問であったが、可溶性オリゴマーは非常に不安定で生体濃度が低いため、これまで生化学的研究は不可能とされてきた。我々は、Photo-induced cross-linking of unmodified proteins (PICUP) を用いてAβをオリゴマー化し、sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) による電気泳動後、ゲルを切り出し、モノマー、ダイマー、トリマー、テトラマーを分離して抽出し、可溶性オリゴマーを安定化した状態で抽出することに成功した (図2)³⁾。次に各オリゴマーおよび成熟したfAβを円二色性分光法 (蛋白の二次構造)、チオフラビンT法 (シード活性)、電子顕微鏡 (形態)、原子間力顕微鏡 (形態)、神経成長因子にて分化させたpheochromocytoma (PC) 12細胞を用いた3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium

bromide (MTT) metabolism and lactate dehydrogenase (LDH) 活性法 (細胞毒性) を用いてオリゴマーおよび成熟線維の構造-毒性相関を検討した。その結果、ダイマー、トリマー、テトラマーがモノマーに比し、β-シート構造の割合やシーディング効果が増加し、それに伴い、形態学的にも凝集体の形や高さが増大することを明らかにした。さらに細胞実験の結果、オリゴマー毒性の関係は、テトラマー ≥ トリマー > ダイマー = 成熟線維 > モノマーであり、オリゴマーオーダー依存性に細胞毒性も増加し、特にモノマー→ダイマーの過程がADの重要な治療ターゲットになる可能性があることを示した³⁾。我々と同様にTownsendらは、Aβトリマーが最も強力に海馬のlong term potentiation (LTP) を抑制することを報告し⁴⁾、その後、Shankarらが、AD脳の可溶性画分から抽出したAβダイマーがLTPを抑制することを報告し、シナプス毒性の最小単位がダイマーであることを証明した⁵⁾。

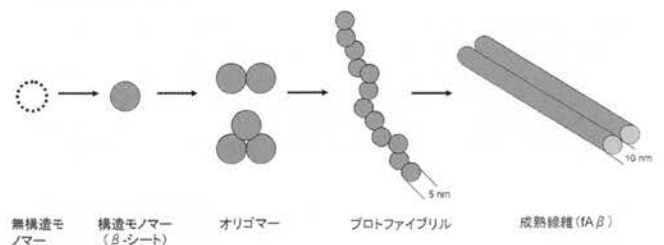


図1: Aβ凝集モデル

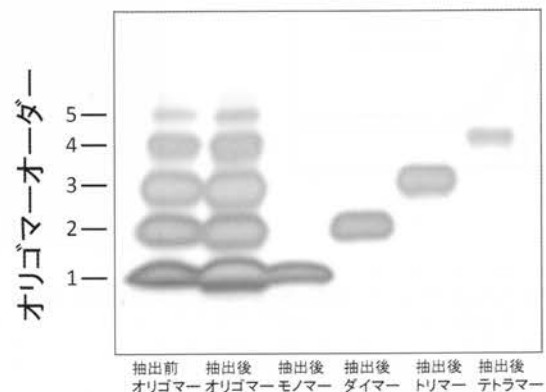


図2: Aβオリゴマーの電気泳動

アミロイド前駆体蛋白遺伝子 (amyloid precursor protein: APP) の変異は常染色体優性のADを引き起こすが、English型及びTottori型変異により、N末端がH6RおよびD7Nに置換されたAβが産生される。我々は、野生型、English変異型及びTottori変異型Aβを合成して、円二色性分光法およびPICUPを用いてこれらの変異がランダムコイルからβ-シートへの2次構造変換及びオリゴマー形成過程に及ぼす影響を調べた。次に各Aβオリゴマーの特性をチオフラビンT法(シード活性)、円二色性分光法(蛋白の2次構造)、電子顕微鏡(形態)、原子間力顕微鏡(形態)、分化型PC12細胞を用いたMTT及びLDH法(細胞毒性)を用いて検討した。その結果、English変異型やTottori変異型のAβは、野生型に比較してオリゴマー形成や2次構造変換が促進された⁶⁾。また、English変異型やTottori変異型のAβオリゴマーは、野生型に比較してβ-シート構造の割合が増加し、それに伴いシードリング効果や細胞毒性も増加し、形態学的にも凝集体の径や高さが増大していることが分かり、English変異やTottori変異のようなN末端の変異は、Aβ凝集過程の

最も早期の段階を促進し、細胞毒性を増強させることを明らかにした⁶⁾。

II. フェノール化合物によるAβ凝集抑制

最近の疫学的研究は、中等度のワイン摂取は、ADの発症率を下げることを示唆している。我々は、Aβ凝集の試験管モデルを構築し、チオフラビンT法、電子顕微鏡を主に用いてミリセチン、ロスマリニン酸、クルクミンをはじめとするフェノール化合物やニコチン、ビタミンAをはじめとする有機化合物が、*in vitro*にてAβ40、Aβ42のいずれにおいても、濃度依存性にfAβ形成・伸長を抑制するだけでなく(図3)、すでに形成されたfAβを不安定化することを明らかにし(図4)、fAβの細胞毒性を軽減させることを明らかにした。これまでの結果から特にフェノール化合物はAβ凝集抑制効果が強く、構造式から1) OH基が多い、2) 極性を持たない、3) 対称性の構造式を持つことが抗アミロイド作用を強める傾向があることを明らかにした⁷⁻¹²⁾。

近年、凝集の中間段階であるオリゴマーこそが最も毒性があるとして注目されているが、我々は、PICUP、円二色性分光法、分子排斥クロマトグラフィー、電子顕微鏡等を用いて、ブドウ種子由来ポリフェノールが、Aβ40及びAβ42凝集の全過程、すなわち、fAβ形成、プロトファイブリル形成、オリゴマー形成、さらに2次構造変換(ランダムコイル→α-ヘリックス→β-シート)の全てを抑制する作用も有することを確認した¹³⁾。また、分化型PC12細胞を用いたMTT及びLDH活性法においてブドウ種子由来ポリフェノールがAβ40及びAβ42凝集の早期、中期、後期段階の凝集体の細胞毒性を全て軽減させることを示した¹³⁾。

さらに我々は、マウントサイナイ病院精神医学Giulio M. Pasinetti教授らのグループとの共同研究にて、6か月及び10か月齢のAPP遺伝子改変動物であるTg2576マウスに5ヶ月間ブドウ種子由来ポリフェノールを経口摂取

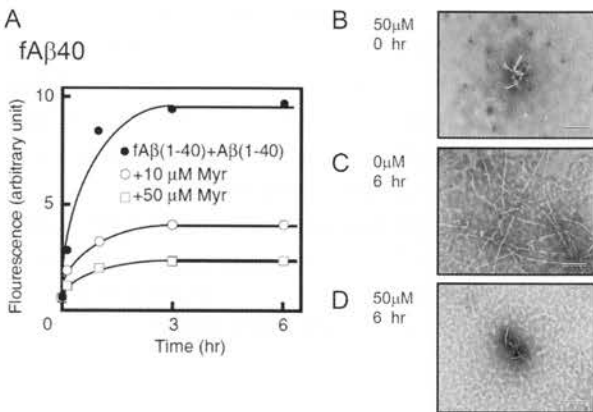


図3: Aβ線維伸長反応におけるミリセチン(Myricetin)の抑制効果 (A-D) Aβを超音波により切断したfAβ(B)と混合して37℃にてインキュベートすると、チオフラビンTの蛍光値が飽和曲線的に増加し、明らかな伸長反応を認める(C)。この混合液にフェノール化合物であるミリセチンを加えるとチオフラビンTの蛍光値が低下し、線維伸長を認めない(D)。スケールバー=250nm。

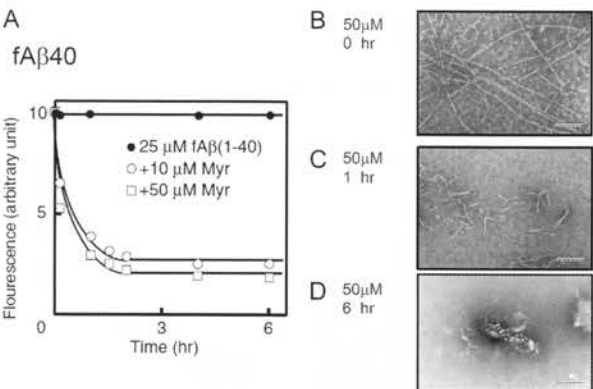


図4: fAβにおけるミリセチン(Myricetin)の不安定化効果 (A-D) freshなfAβは、幅約10nm、200nm周期の螺旋構造をしている(B)。ミリセチンと混合して37℃にてインキュベートすると、チオフラビンTの蛍光値が急激に低下し(A)、1時間後には短く切断された線維が多数観察された(C)。さらに6時間経過するとamorphous aggregatesが多数観察された(D)。スケールバー=250nm。

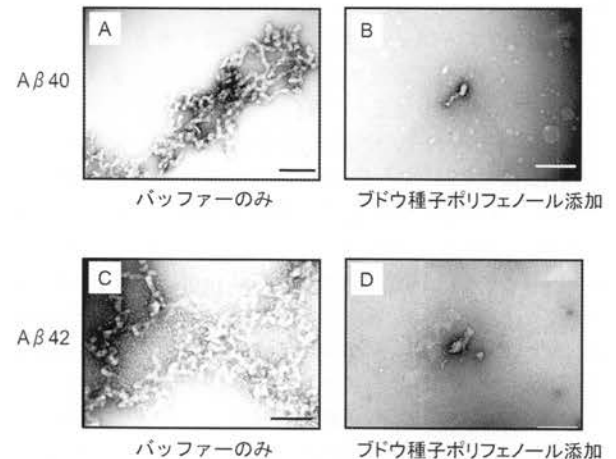


図5: Aβのプロトファイブリル形成におけるブドウ種子由来ポリフェノールの効果 (A-D) Aβ40、またはAβ42溶液を37℃にて10日間、インキュベートした後に分子排斥クロマトグラフィーにて分離すると、幅約7nmのプロトファイブリル形成を認めるようになるが(A, C)、ブドウ種子由来ポリフェノールを加えるとプロトファイブリルはほとんど認められない(B, D)。スケールバー=100nm。

させたところ、脳内のA β 沈着だけでなく、可溶性A β オリゴマーも減少させ、さらにMorris water maze testにて高次脳機能障害も改善することを示した¹⁴。我々は、さらに、5か月齢Tg2576モデルマウスに数種類のフェノール化合物(ミリセチン、ロスマリン酸、クルクミン、フェルラ酸、ノルジヒドロゲアイアレチン酸)を10か月間経口投与したところ、ロスマリン酸は、脳内のA β 沈着だけでなく、A β オリゴマーも抑制すること、ミリセチンやクルクミンは、A β オリゴマーを減少させるが、脳内のA β 沈着には効果はないことを発見した¹⁵。一方で、ノルジヒドロゲアイアレチン酸やフェルラ酸には、オリゴマーの減少効果がみられなかった¹⁵。

最近、我々は、更なる機序を明らかにするためフェノール化合物によるA β オリゴマーの細胞及びシナプス毒性への抑制効果を調べた。我々は、PICUP、原子間力顕微鏡、円二色性分光法、human embryonic kidney (HEK) 293細胞を用いたMTT法にてフェノール化合物で

あるミリセチンやロスマリン酸が、A β オリゴマー形成を抑制し、細胞毒性を軽減させることを明らかにした¹⁶。次にミリセチンやロスマリン酸のシナプスレベルにおける保護効果を調べるため、マウスの海馬スライスをを用いてCA1領域の興奮性シナプス後場電位を記録し、PICUPによるオリゴマー化によってLTPは抑制され、Long-term depression (LTD)は増強されるが、ミリセチンやロスマリン酸によってこれらのシナプス毒性は軽減されることを示した¹⁶。また、我々は、¹⁵NでラベルしたA β とフェノール化合物の混合溶液を用いてnuclear magnetic resonance法(NMR)で解析し、フェノール化合物が結合するA β の特定領域を同定し、特にミリセチンでは、Lys16-Val24やIle31-Gly33と多残基にわたって結合していることを明らかにした¹⁶。

また、我々は、ブドウ種子由来ポリフェノールがもう1つの代表的な病変であるタウ病理への効果を有するかに関しても調べた¹⁵。まず、我々は*in vitro*にて電子顕微

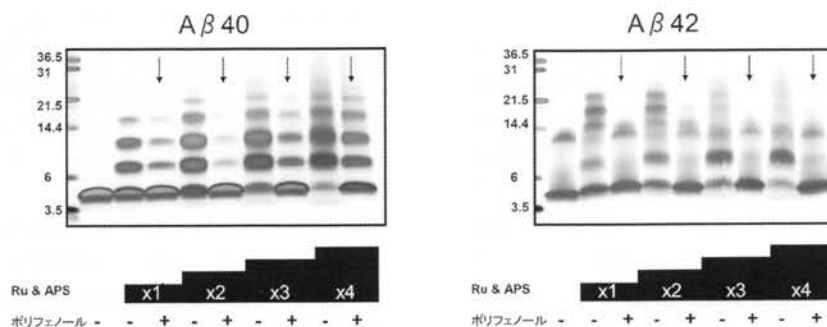


図6: A β オリゴマー形成におけるブドウ種子由来ポリフェノールの効果

A β 40, またはA β 42溶液にammonium persulfate (APS)とtris (2,2'-bipyridyl)dichlororuthenium(II) (Ru)を加え、照射を加える(PICUP)と、A β オリゴマーが形成される。しかし、この反応溶液にブドウ種子由来ポリフェノールを加えると、オリゴマー形成が抑制される。

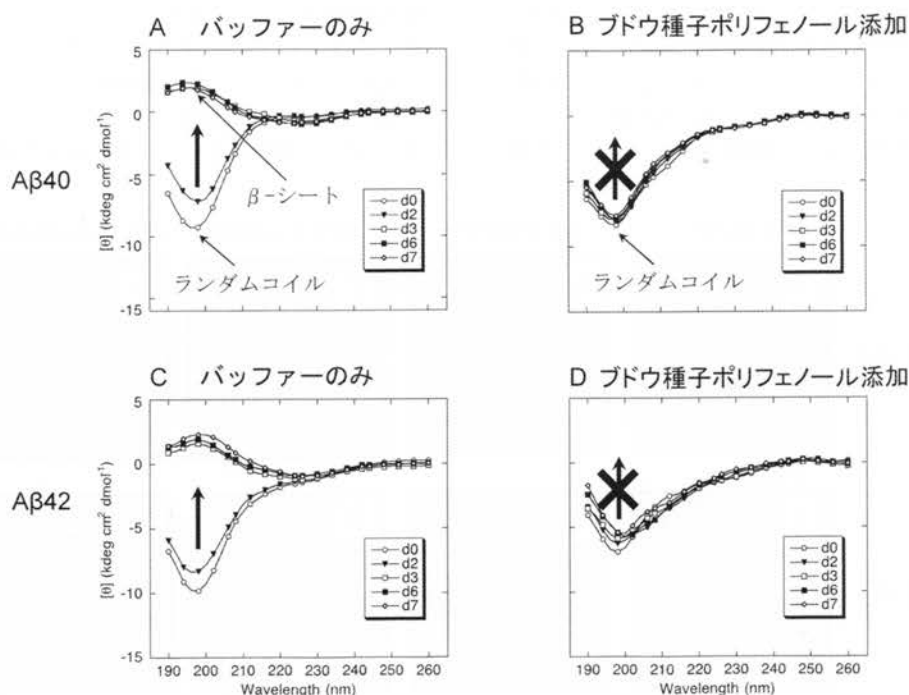


図7: A β の2次構造変換におけるブドウ種子由来ポリフェノールの効果

(A-D) A β 40, またはA β 42溶液を37°Cにてインキュベートすると、ランダムコイルから β -シートへ変換される(A, C)。しかし、この反応溶液にブドウ種子由来ポリフェノールを加えると、この2次構造変換が抑制される(B, D)。

鏡, チオフラビンT法, 円二色性分光法にてtauの凝集およびランダムコイルから β -シートへの2次構造変換を抑制することを明らかにした¹⁷⁾. 次にタウ遺伝子改変動物であるTMHTマウスにタウ病変による神経変性がはじまる前の3ヶ月齢の段階で2ヶ月間ブドウ種子由来ポリフェノールを経口摂取させたところ, タウ病変を改善させ, リン酸化タウも有意に減少させること, さらにこの効果はextracellular signal-receptor kinase (ERK) 1/2 signalingの減少と関わっていることを報告した¹⁷⁾.

現在, 我々は健常者におけるポリフェノールの安全性試験(第1相試験)を行い, 安全性を確認し, 少数のAD患者さんにおけるプラセボ対照の第2相試験(ランダム化二重盲検)を施行中である.

Ⅲ. AD患者試料によるA β 凝集への影響

当教室では, 神経内科外来に「もの忘れ外来」を開設し, もの忘れを主訴とする患者の診療を行いながら, そこで得られた臨床データおよび検体をもとにADの新規診断法の開発や病態解明を目的とした研究を行っている.

その一端として, チオフラビンT法, 電子顕微鏡を主に用いてADおよびコントロール患者の脳脊髄液が試験管内fA β 形成に及ぼす影響を解析した結果, リン酸緩衝生理食塩水(バッファー)での線維形成に比べて脳脊髄液でのfA β 形成反応は, ADおよびコントロール患者のいずれにおいても抑制されるが, コントロール患者の方が抑制効果が強いことが分かった¹⁸⁾. さらにAD患者におけるfA β 40, fA β 42形成の程度は脳脊髄液中のA β 42濃度と有意に負の相関を示し, fA β 42形成の程度は, AD患者における重症度評価法の1つであるClinical Dementia Rating (CDR) と有意に正の相関を示すこと確認した¹⁸⁾. さらに我々は, PICUPを用いてAD患者の脳脊髄液のA β オリゴマー形成に及ぼす影響を解析したところ, ADおよびコントロール患者のいずれの脳脊髄液もオリゴマー形成を抑制するが, コントロール患者患者に比較してAD患者の脳脊髄液はオリゴマー形成を促進する環境を有していることを報告した¹⁹⁾. もし, 髄液中のオリゴマー形成

抑制因子が同定できれば, 我々の生体内にすでに備わっている物質であり, 副作用の点からもADの根本的予防・治療薬開発に向けて有力な基本分子になり得る可能性が高く, 更なる研究を現在, 進めている.

Ⅳ. α -シヌクレイン蛋白(α S)凝集

パーキンソン病(Parkinson's disease: PD), レビー小体型認知症(Dementia with Lewy bodies: DLB), 多系統萎縮症といった α -シヌクレインパチーの薬物療法は現在, 特効薬はなく, 遺伝学的, 病理学的知見から病態形成上重要な役割を果たしているとされる α -シヌクレイン蛋白(α S)の凝集と神経変性にターゲットをしぼった研究が全世界で精力的に行われている.

α Sも, A β と同様に異常立体構造をとったモノマーからオリゴマー, そしてプロトファイブリルや成熟線維といった, より多量体に凝集することにより神経細胞毒性を獲得するが, 近年, 早期中間体である可溶性オリゴマーこそが最も毒性が強いとされている²⁰⁾.

我々は, チオフラビンS法, 電子顕微鏡, 原子間力顕微鏡等を主に用いて, フェノール化合物やビタミンA類をはじめとする有機化合物等が程度の差こそあれ, α S線維形成を抑制し, さらに既存の α S線維も不安定化させることを明らかにした^{21)~23)}. また, セレギリンをはじめとする抗パーキンソン病薬は α SおよびA β の両蛋白の線維抑制効果を有することを明らかにした²⁴⁾²⁵⁾.

さらに我々は, α Sの早期凝集体であるオリゴマーやプロトファイブリルの形成過程を観察するモデルを開発・確立し, 大阪大学神経内科 望月秀樹教授らとの共同研究により, 睡眠ホルモンの1種であるメラトニンが α S凝集の全過程(2次構造変換, オリゴマー形成, プロトファイブリル形成, 成熟線維形成)を抑制し, α S毒性も軽減させることを明らかにした²⁶⁾. また, プラミベキソールをはじめとする抗パーキンソン病薬が α SおよびA β のオリゴマー形成を抑制することも明らかにしている²⁷⁾. さらに, 最近, 我々はフェノール化合物が α Sオリゴマー凝集および2次構造変換を抑制することを明

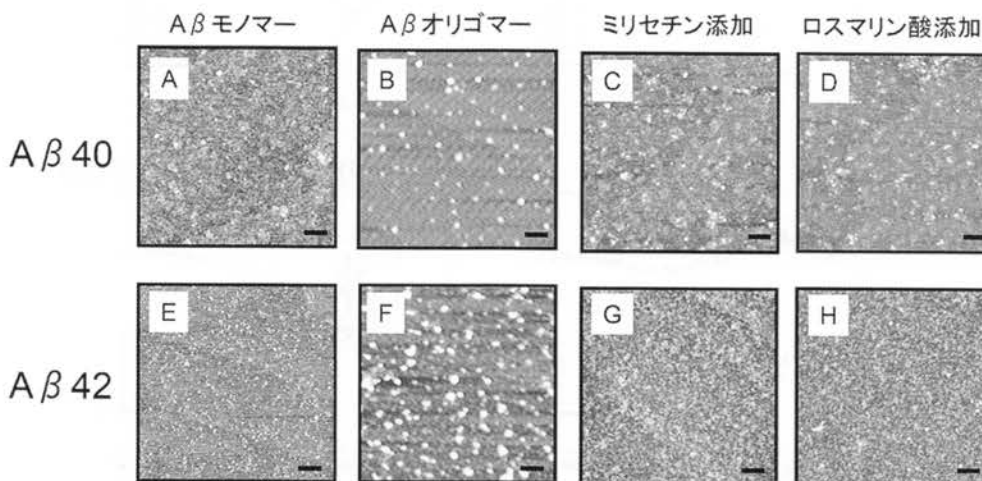


図8: フェノール化合物のA β オリゴマー形成抑制効果

A β 40 (A), またはA β 42 (E) 溶液をPICUPにて光架橋させると高さ0.9~1.4nmのA β オリゴマーが形成される (B, F) が, フェノール化合物であるミルセチン, またはロスマリン酸を添加するとオリゴマー形成が抑制される (C, D, G, H). スケールバー=100nm.

らかにし、NMR法にて結合機序を明らかにするとともにシナプス毒性の軽減効果を検討している。

おわりに

我々の研究も含めて、現在、A β 凝集抑制薬候補として、*in vitro*だけでなく、*in vivo*実験系においても凝集抑制効果を示し、臨床試験まで進んでいる化合物が報告されている。また、 α S凝集抑制薬開発の研究も近年、精力的に行われている。A β および α S凝集抑制薬は、ADおよび α -シヌクレイノパチーの根本治療において重要な位置を占める可能性がある。

謝辞

第10回金沢大学十全医学賞にあたり、本賞の運営に携わっておられます選考委員および関係者の皆様方に心より深謝します。本研究は、多くの先生方のご協力、ご助言等の支えによって行われました。特に3人のかけがえのない恩師、青二才の僕をアミロイド研究に導き育てあげていただき、いまま陰になり、日向になり、臨床・研究両面で応援して下さっている金沢大学脳老化・神経病態学(神経内科)山田正仁教授、アミロイド研究を含む基礎研究のABCを叩き込んで下さり、いま、なお、適切なアドバイスを下さる福井大学分子病理学内木宏延教授、全く英語が話せない僕を矢面にたつてまで引き上げ続けてくれ、ロサンゼルスで最高の思い出をプレゼントして頂いたカリフォルニア大学ロサンゼルス校神経学 David B. Teplow教授に深く感謝します。上述の3人のボス以外に、マウントサイナイ病院精神医学 Giulio M. Pasinetti教授、ケースウエスタンリザーブ大学化学 Michael G. Zagorski教授、大阪大学大学院神経内科 望月秀樹教授、富山大学大学院システム情報科学 西条寿夫教授、高村雄策先生、国立長寿医療研究センター研究所 高島明彦先生、吉池裕二先生、金沢大学電子顕微鏡センター 高野淳子さん、金沢大学大学院脳老化・神経病態学(神経内科学) 浜口毅先生(動物実験)、篠原もえ子先生(臨床治験)、佐村木美晴先生、森永章義先生、池田篤平先生、高橋良一先生、高崎純一君他医局員の先生方、横野愛実さん(臨床検査技師)に深く感謝します。最後に僕を長い間支えてくれている両親、家内の玲子と2人の娘(真優、桃花)に感謝します。

文献

- Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297: 353-356, 2002
- Ono K, Yamada M: Low-n oligomers as therapeutic targets of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 117: 19-28, 2011
- Ono K, Condrón MM, Teplow DB. Structure-neurotoxicity relationships of amyloid β -protein oligomers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 14745-14750, 2009
- Townsend M, Shankar GM, Mehta T, et al. Effects of secreted oligomers of amyloid β -protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers. *J Physiol* 572: 477-492, 2006
- Shankar GM, Li S, Mehta TH, et al. Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 14: 837-842, 2008
- Ono K, Condrón MM, Teplow DB. Effects of the English (H6R) and Tottori (D7N) familial Alzheimer disease mutations on amyloid β -protein assembly and toxicity. *J Biol Chem* 285: 23186-23197, 2010.
- Ono K, Hasegawa K, Yoshiike Y, et al. Nordihydroguaiaretic acid potently breaks down pre-formed Alzheimer's β -amyloid fibrils *in vitro*. *J Neurochem* 81: 434-440, 2002

- Ono K, Hasegawa K, Yamada M, et al. Nicotine breaks down preformed Alzheimer's β -amyloid fibrils *in vitro*. *Biol Psychiatry* 52: 880-886, 2002
- Ono K, Yoshiike Y, Takashima A, et al. Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols *in vitro*: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 87: 172-181, 2003
- Ono K, Hasegawa K, Naiki H, et al. Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's β -amyloid fibrils *in vitro*. *J Neurosci Res* 75: 742-750, 2004
- Ono K, Hasegawa K, Naiki H, et al. Anti-amyloidogenic activity of tannic acid and its activity to destabilize Alzheimer's β -amyloid fibrils *in vitro*. *Biochim Biophys Acta* 1690: 193-202, 2004
- Yamin G, Ono K, Inayathullah M, et al. Amyloid β -protein assembly as a therapeutic target of Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des* 14: 3231-3246, 2008
- Ono K, Condrón MM, Ho L, et al: Effects of grape seed-derived polyphenols on amyloid β -protein self-assembly and cytotoxicity. *J Biol Chem* 283: 32176-32187, 2008
- Wang J, Ho L, Zhao W, et al: Grape seed extract MegaNatural-AZ prevents A β oligomerization and attenuates cognitive deterioration in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 28: 6388-6392, 2008
- Hamaguchi T, Ono K, Murase A, et al: Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the amyloid β aggregation pathway. *Am J Pathol* 175: 2557-2565, 2009
- Ono K, Li L, Takamura Y, et al. Phenolic compounds prevent amyloid β -protein oligomerization and synaptic dysfunction by site-specific binding. *J Biol Chem* 287: 14631-14643, 2012
- Wang J, Santa-Maria I, Ho L, et al. Grape derived polyphenols attenuate tau neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 22: 653-661, 2010
- Ono K, Noguchi M, Matsumoto Y, et al. Cerebrospinal fluid of Alzheimer patients promotes β -amyloid fibril formation *in vitro*. *Neurobiol Dis* 20: 233-240, 2005
- Ikeda T, Ono K, Elashoff D, et al. Cerebrospinal Fluid from Alzheimer's disease patients promotes amyloid β -protein oligomerization. *J Alzheimers Dis* 21: 81-86, 2010
- Volles MJ, Lansbury PT Jr. Zeroing in on the pathogenic form of α -synuclein and its mechanism of neurotoxicity in Parkinson's disease. *Biochemistry* 42: 7871-7878, 2003
- Ono K, Yamada M. Antioxidant compounds have potent anti-fibrillogenic and fibril-destabilizing effects for α -synuclein fibrils *in vitro*. *J Neurochem* 97: 105-115, 2006
- Ono K, Yamada M. Vitamin A potently destabilizes preformed α -synuclein fibrils *in vitro*: implications for Lewy body diseases. *Neurobiol Dis* 25: 446-454, 2007
- Ono K, Hirohata M, Yamada M. α -synuclein assembly as a therapeutic target of Parkinson's disease and related disorders. *Curr Pharm Des* 14: 3247-3266, 2008
- Ono K, Hasegawa K, Naiki H, et al. Anti-Parkinsonian agents have anti-amyloidogenic activity for Alzheimer's β -amyloid fibrils *in vitro*. *Neurochem Int* 48: 275-285, 2006
- Ono K, Hirohata M, Yamada M. Anti-fibrillogenic and fibril-destabilizing activities of anti-Parkinsonian agents for α -synuclein fibrils *in vitro*. *J Neurosci Res* 85: 1547-1557, 2007
- Ono K, Mochizuki H, Ikeda T, et al. Effect of melatonin on α -synuclein self-assembly and cytotoxicity. *Neurobiol Aging* 33: 2172-2185, 2012
- Ono K, Takasaki J, Takahashi R, et al. Effects of antiparkinsonian agents on β -amyloid and α -synuclein oligomer formation *in vitro*. *J Neurosci Res* 91: 1371-1381, 2013



Profile

略歴 平成9年3月 昭和大学医学部卒業
 平成14年9月 金沢大学大学院医学系研究科博士課程修了
 平成15年4月 金沢西病院脳神経センター神経内科医長
 平成17年6月 金沢大学医学部附属病院神経内科助手
 平成19年4月 カリフォルニア大学ロサンゼルス校博士研究員
 平成21年4月 金沢大学附属病院神経内科助教
 平成23年4月～金沢大学附属病院神経内科講師

今後の抱負：臨床教室で、基礎研究を続けるのは難しく、今回の受賞も国内外の沢山の方々のサポートがなくてはあり得なかったとつくづく思います。いつの日か、自分をサポートしてくれた方々へほんの少しでも恩返しができることを夢見ています。