

■本資料のご利用にあたって(詳細は「利用条件」をご覧ください)

本資料には、著作権の制限に応じて次のようなマークを付しています。
本資料をご利用する際には、その定めるところに従ってください。

***** : 著作権が第三者に帰属する著作物であり、利用にあたっては、この第三者より直接承諾を得る必要があります。

CC : 著作権が第三者に帰属する第三者の著作物であるが、クリエイティブ・コモンズのライセンスのもとで利用できます。

 : パブリックドメインであり、著作権の制限なく利用できます。

なし : 上記のマークが付されていない場合は、著作権が東京大学及び東京大学の教員等に帰属します。無償で、非営利かつ教育的な目的に限って、次の形で利用することを許諾します。

- I 複製及び複製物の頒布、譲渡、貸与
- II 上映
- III インターネット配信等の公衆送信
- IV 翻訳、編集、その他の変更
- V 本資料をもとに作成された二次的著作物についての I からIV

ご利用にあたっては、次のどちらかのクレジットを明記してください。

東京大学 UTokyo OCW 学術俯瞰講義
Copyright 2015, 飯野正光

The University of Tokyo / UTokyo OCW The Global Focus on Knowledge Lecture Series
Copyright 2015, Masamitsu Iino

学術俯瞰講義

脳の科学ーシナプスから人生の意味まで

第6回(2015年10月22日)

細胞の活動を脳の中で生きたまま見て理解する

東京大学大学院医学系研究科

細胞分子薬理学

飯野正光

<http://calcium.cmp.m.u-tokyo.ac.jp/>

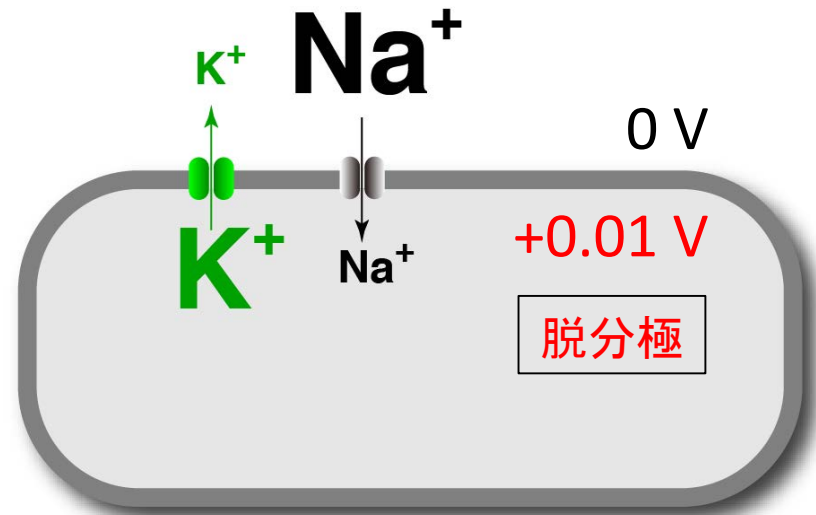
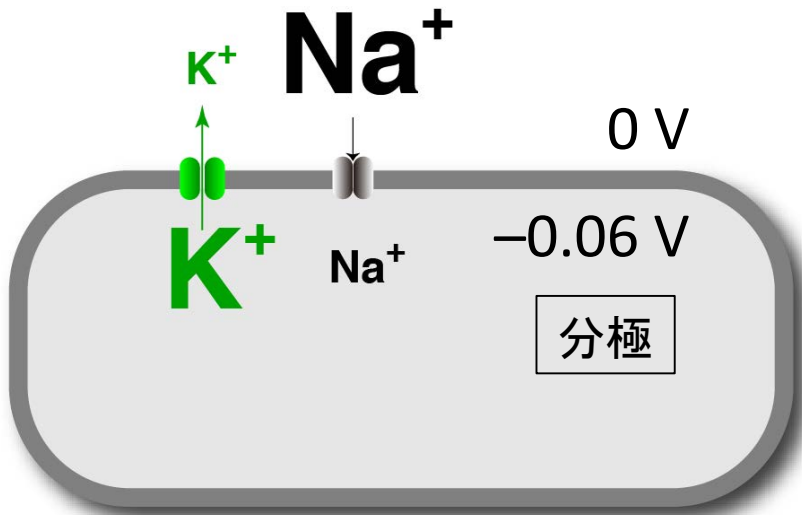
神経細胞の活動を生きたまま目で見する方法は？

神経細胞は活動電位を発生することを利用

活動電位の発生

静止時

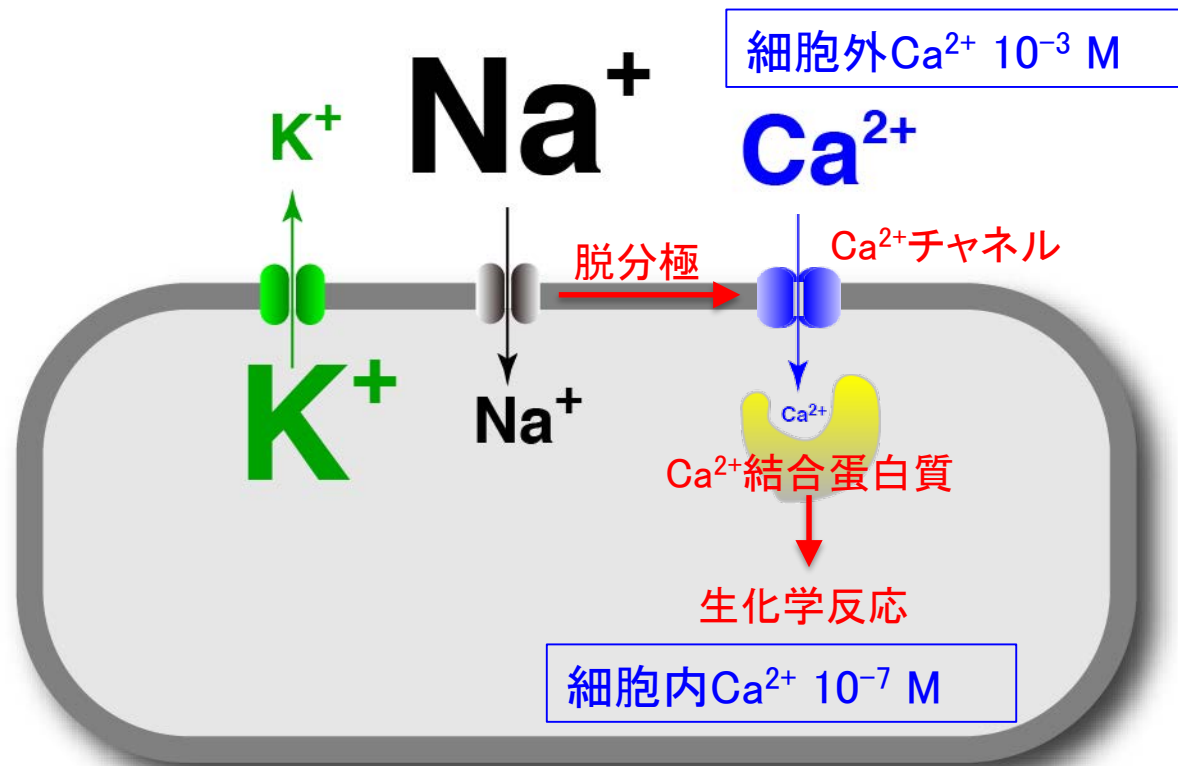
活動時



細胞膜の厚さ: 約10 nm

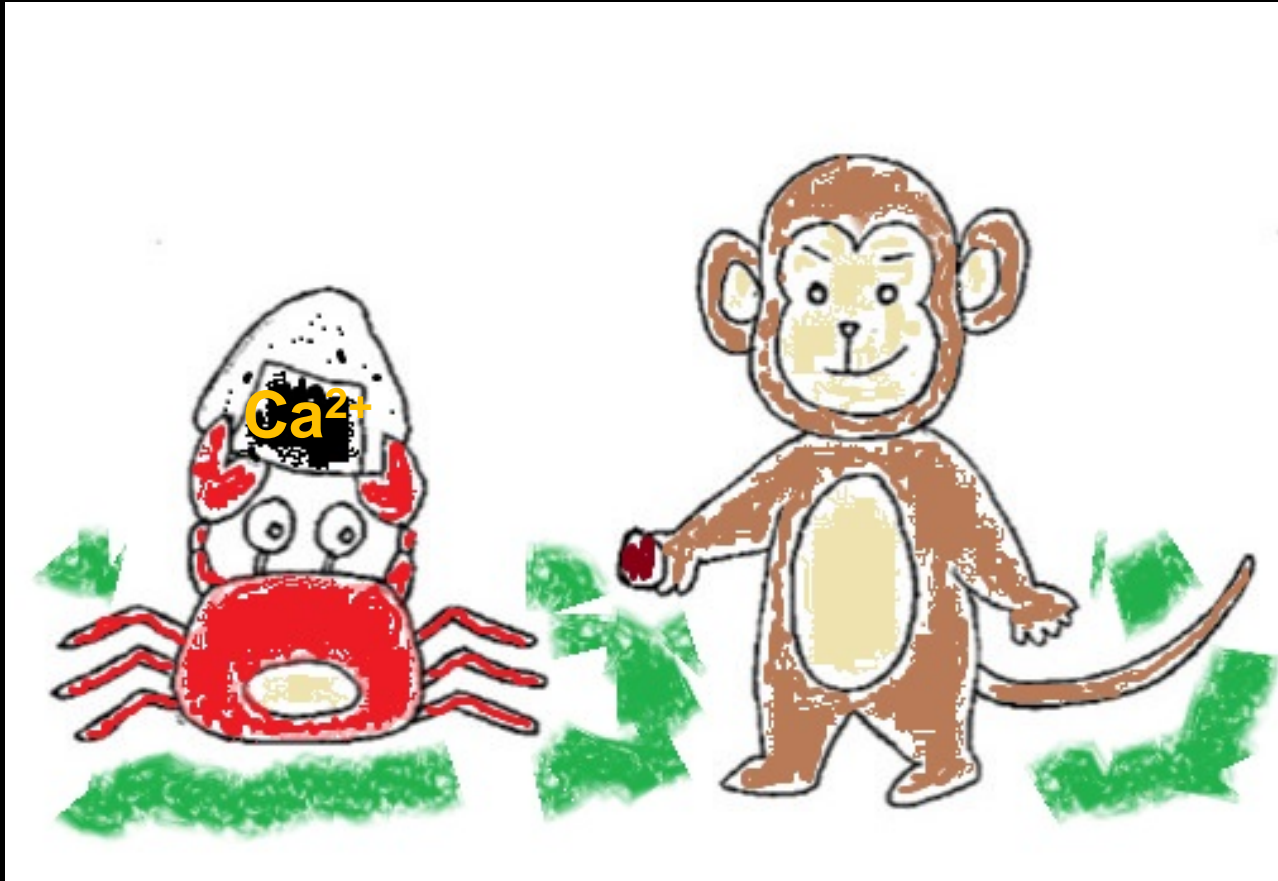
電場の強さ: $0.07 V / 10 \text{ nm} = 0.07 / (10 \times 10^{-9}) \text{ V/m} = 7 \times 10^6 \text{ V/m}$

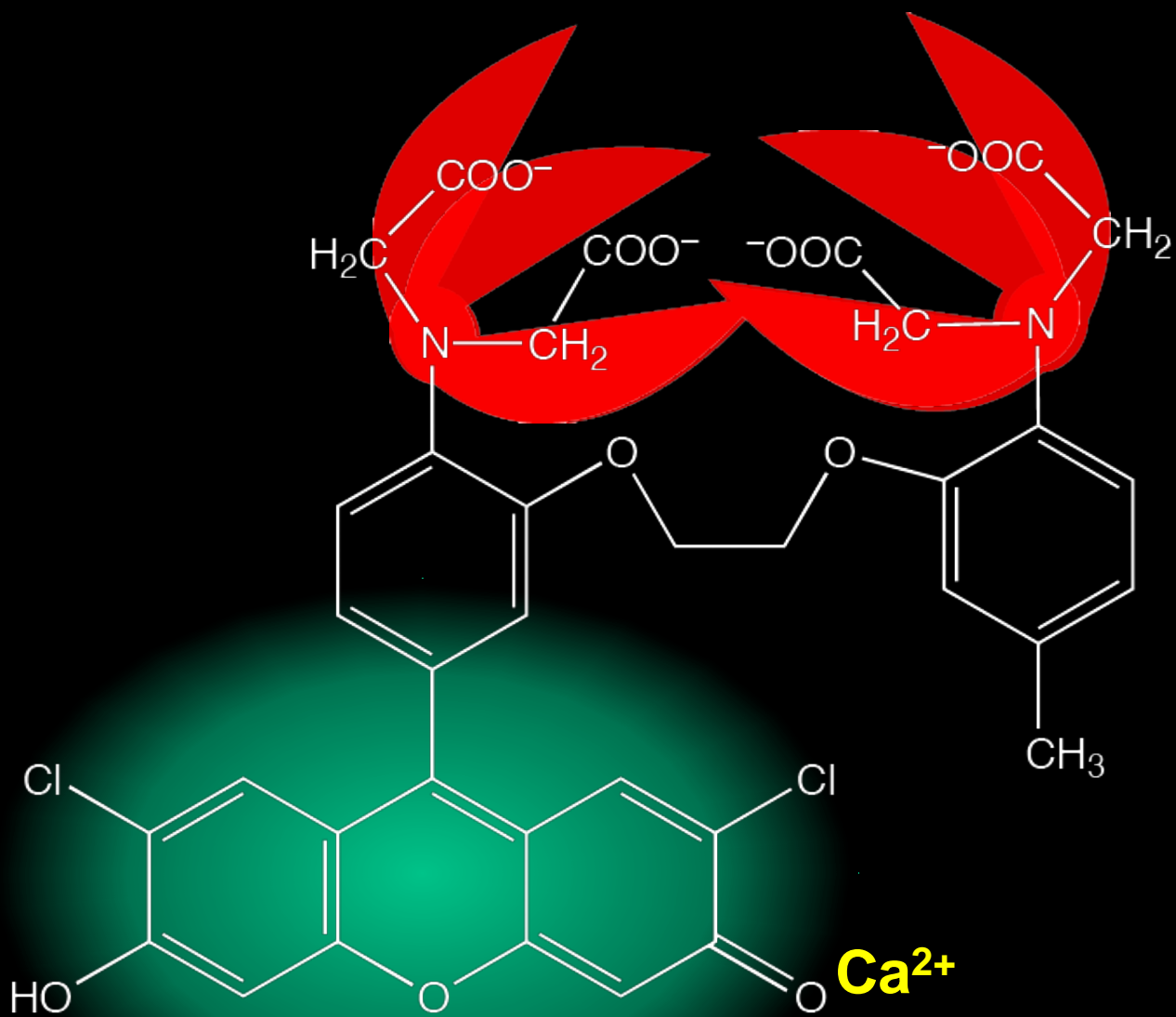
活動電位は細胞内Ca²⁺濃度変化に変換されて情報を伝える



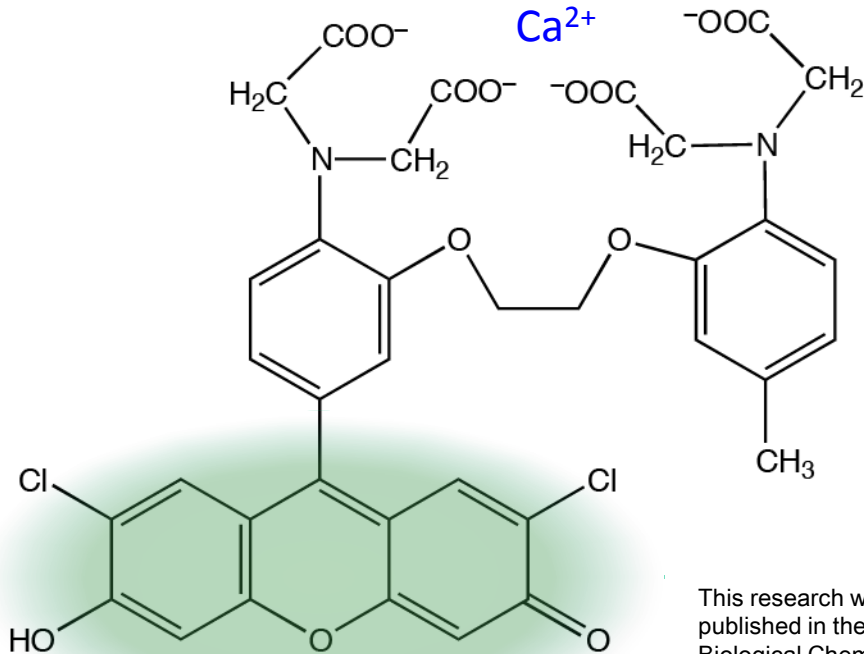
∴ 細胞内Ca²⁺濃度を測定することにより活動する神経細胞を同定できる

細胞内のカルシウム (Ca^{2+}) を
どうやって目で見えるか

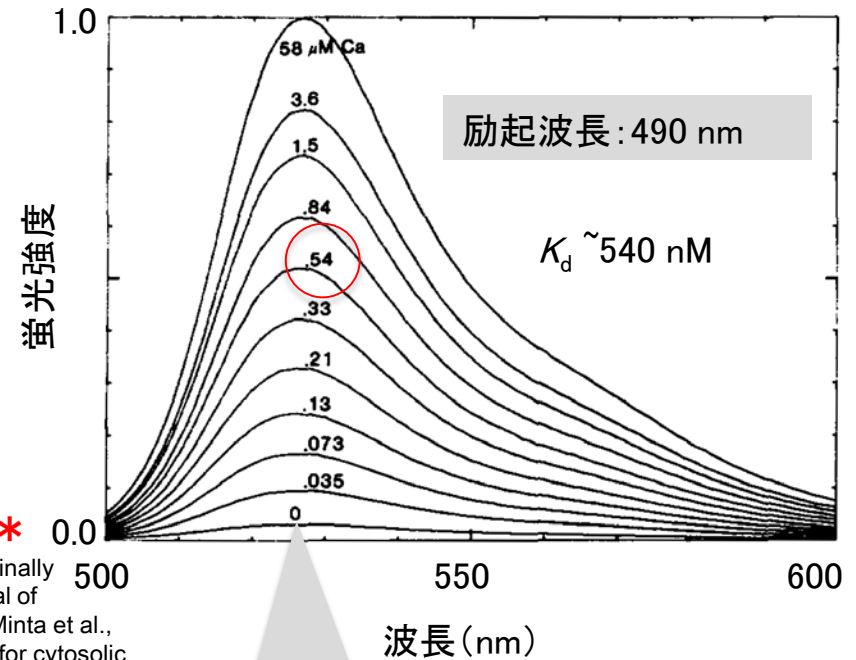




Ca²⁺インジケータ (Fluo-3)



蛍光強度のCa²⁺濃度依存性



*

This research was originally published in the Journal of Biological Chemistry. Minta et al., Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores, *The Journal of Biological Chemistry*, 1989; 264(14):8171-8178, © the American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

Ca²⁺ゼロでは
ほとんど蛍光がない

Minta *et al.* J Biol Chem (1989)

Cf. Grynkiewicz *et al.* J Biol Chem (1985)



性能の良いCa²⁺インジケーターが使えるようになった。

脳の中の神経細胞を直接観察するためには

- 頭蓋骨に窓をあける必要がある。
- 脳の中を観察できる顕微鏡が必要。

Cranial window technique (頭蓋窓)

著作権等の都合により、
ここに挿入されていた画像を削除
しました。

Levasseur et al. (1975) Detailed
Description of a Cranial Window
Technique for Acute and Chronic
Experiments, *Stroke* 6(3): 308-317,
p.311 Fig.3.

ウサギ 手術後6ヶ月

Levasseur et al. *Stroke* (1975)

著作権等の都合により、
ここに挿入されていた画像を削除しました。

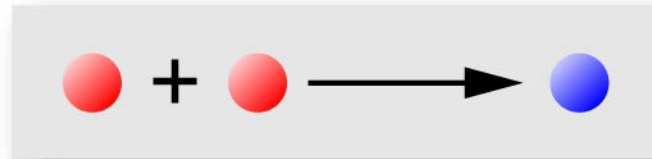
Levasseur et al. (1975) Detailed Description
of a Cranial Window Technique for Acute and
Chronic Experiments, *Stroke* 6(3): 308-317,
p.313 Fig.5.

著作権等の都合により、
ここに挿入されていた画像を削除しました。

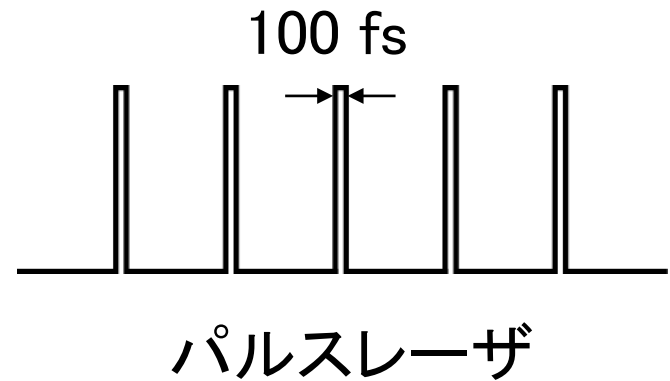
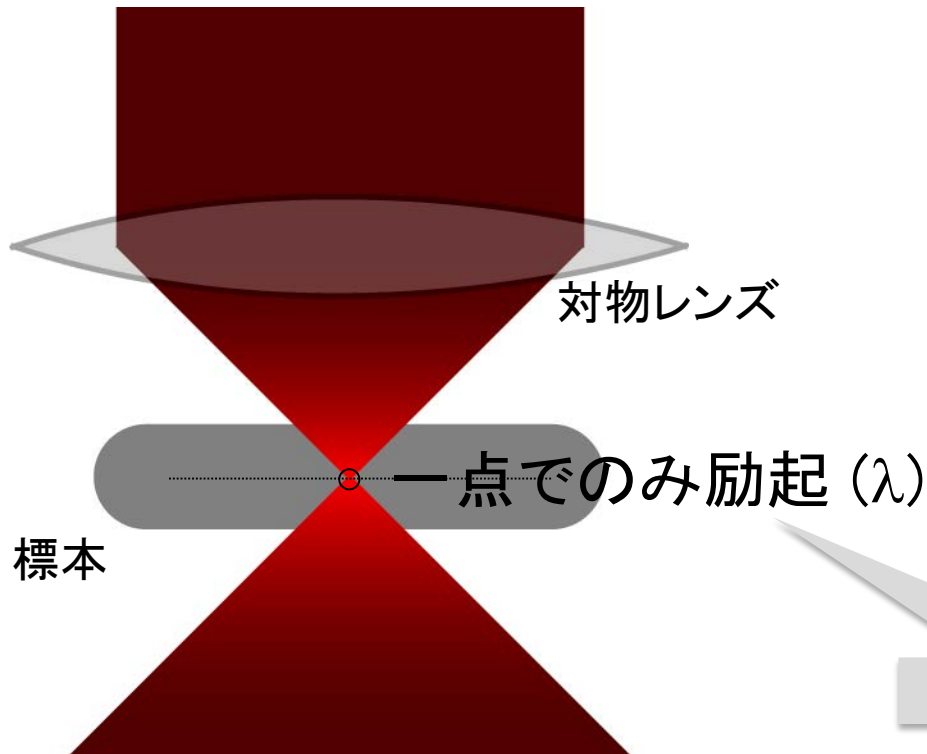
Levasseur et al. (1975) Detailed Description
of a Cranial Window Technique for Acute and
Chronic Experiments, *Stroke* 6(3): 308-317,
p.309 Fig.1, left: Cross-section of implanted
window.

(Forbes 1928)

2光子励起顕微鏡



2λの入射光



100 fs とは？

著作権等の都合により、
ここに挿入されていた画像を削除しました。

スーパーマンのイラスト

1秒間に地球を7回半回れる。 $(3 \times 10^8 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1})$

100 fs = 10^{-13} s では、

$3 \times 10^8 \times 10^{-13} = 3 \times 10^{-5} \text{ (m)} = 30 \text{ }\mu\text{m}$ しか進めない。

2光子励起顕微鏡を用いるもう一つの理由

私の指



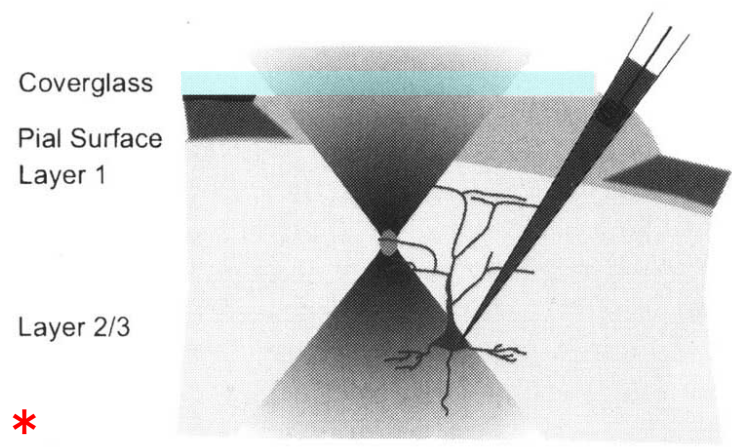
白熱灯にかざした指



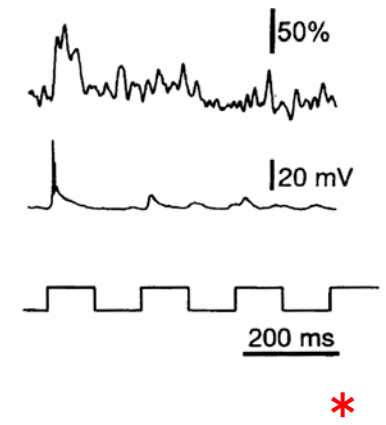
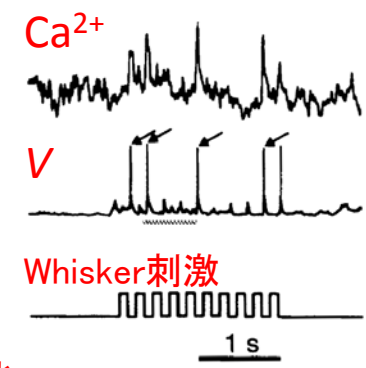
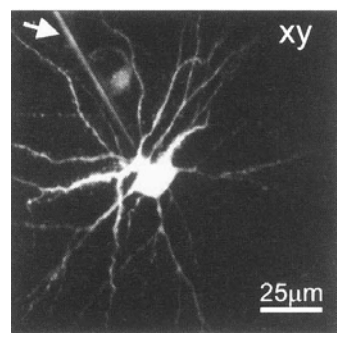
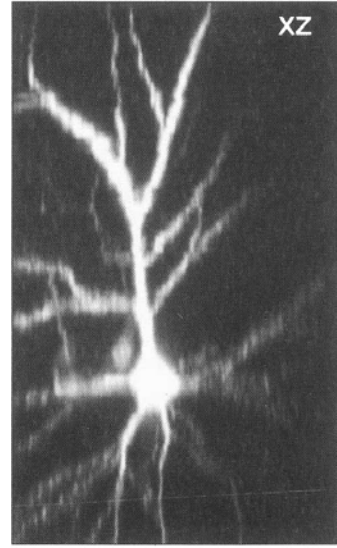
赤外光を用いることにより分厚い標本でも観察できる

いよいよ全ての準備が整った。

頭蓋窓を介した生体内の単一神経細胞Ca²⁺測定



ガラスピペットによるCa²⁺インジケータの神経細胞内導入



Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Svoboda et al.(1997) In vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons, *Nature* 385(6612): 161-165, p.162, Fig.1b, 1c, 1d, 1f, copyright 1997.

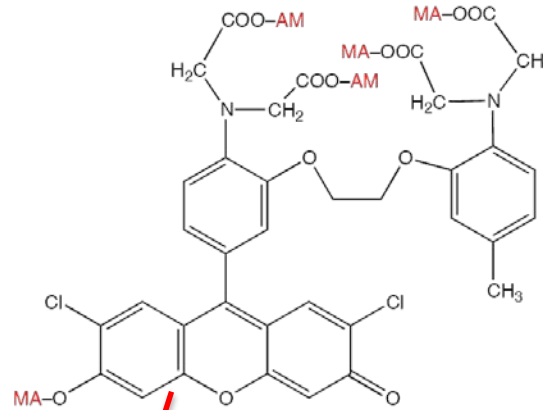
Svoboda *et al.* Nature (1997)

多数の神経細胞の活動を同時に測定したい。

Ca²⁺インジケーターを細胞内に導入する方法

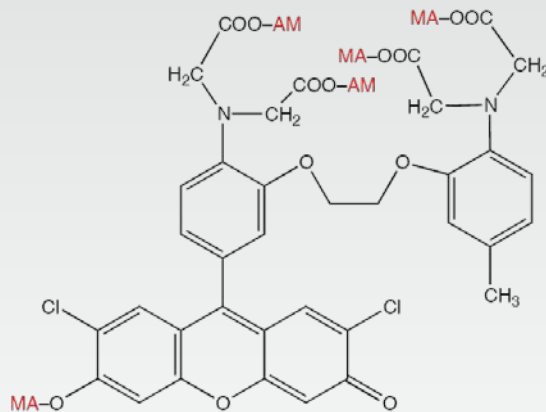
Tsien, Nature (1981)

細胞外



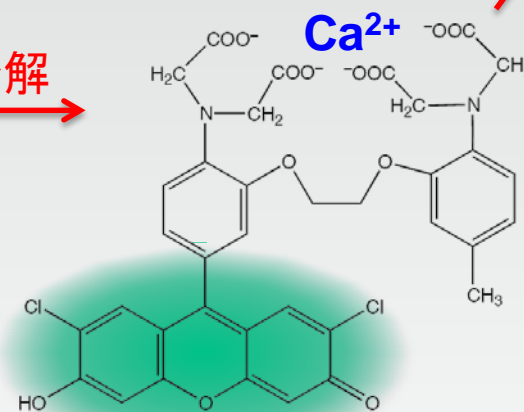
AM = CH₂OCOCH₃

細胞内



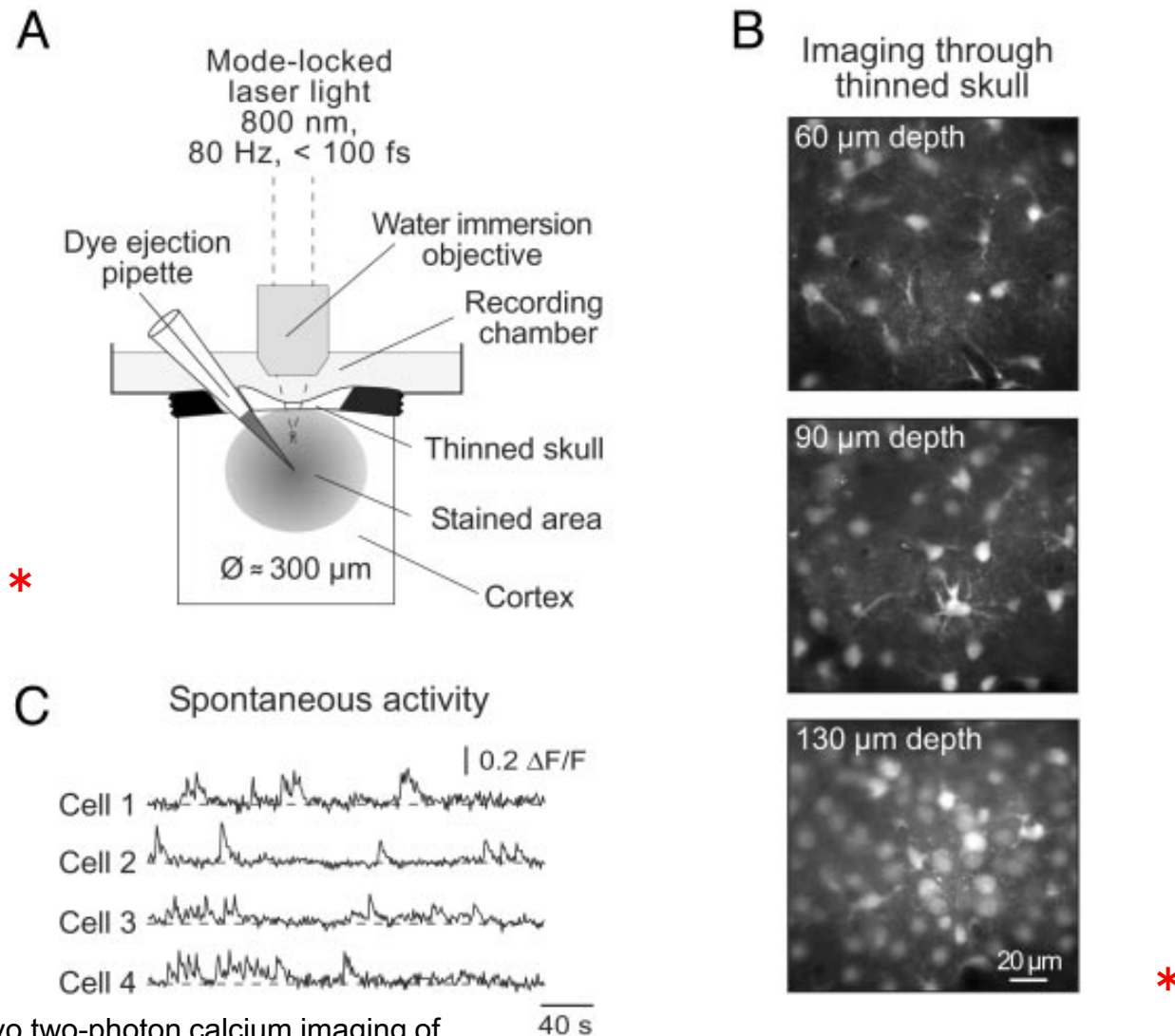
Fluo-3AM

加水分解



Fluo-3

多数の神経細胞活動の同時解析



Stosiek et al. (2003) In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks, *PNAS* 100 (12): 7319–7324, p.7320
 Fig.1: In vivo calcium imaging of neuronal populations.
 Copyright (2003) National Academy of Sciences, U.S.A.

Stosiek *et al.* PNAS (2003)

覚醒している動物の神経活動を測定したい。

覚醒マウスの神経細胞活動解析

Hine Limb Sensory Cortex

著作権等の都合により、
ここに挿入されていた画像を削除しました。

Dombeck et al. (2007) Imaging Large-Scale
Neural Activity with Cellular Resolution in
Awake, Mobile Mice, *Neuron* 56(1): 43–57,
p.44 Fig.1: Two-Photon Microscopy
Experimental Apparatus for Awake Mouse
Imaging.

著作権等の都合により、
ここに挿入されていた画像を削除しました。

Dombeck et al. (2007) Imaging Large-Scale
Neural Activity with Cellular Resolution in
Awake, Mobile Mice, *Neuron* 56(1): 43–57,
p.48 Fig.4A: Imaging Neural Population
Activity in Sensory Cortex of Awake,
Behaving Mice.

著作権等の都合により、
ここに挿入されていた画像を削除しました。

Dombeck et al. (2007) Imaging Large-Scale
Neural Activity with Cellular Resolution in
Awake, Mobile Mice, *Neuron* 56(1): 43–57,
p.48 Fig.4C: Imaging Neural Population
Activity in Sensory Cortex of Awake,
Behaving Mice.

Dombeck *et al.* *Neuron* (2007)

Ca²⁺インジケーターを
いちいち細胞に導入するのは面倒だし、
特定の細胞にだけ導入するのも難しい。

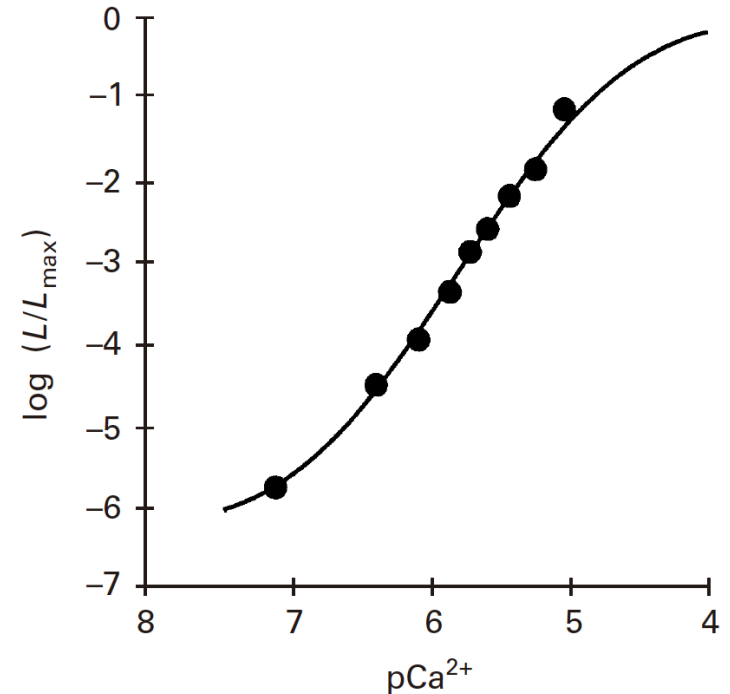
Ca²⁺発光タンパク質 : Aequorine



Image by KENPEI, from
Wikimedia Commons
Ref. 2015/12/08
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aequorea_coerulea_scens1.jpg
CC BY-SA 3.0

著作権等の都合により、
ここに挿入されていた画像を削除しました。

Tsuji et al. (1986) Site-specific
mutagenesis of the calcium-binding
photoprotein aequorin, *PNAS* 83 (21):
8107-8111, p. 8109 Fig. 1.



様々改良されているが、
生体内測定にはまだ改良
の余地あり。

Green Fluorescent Protein (GFP)



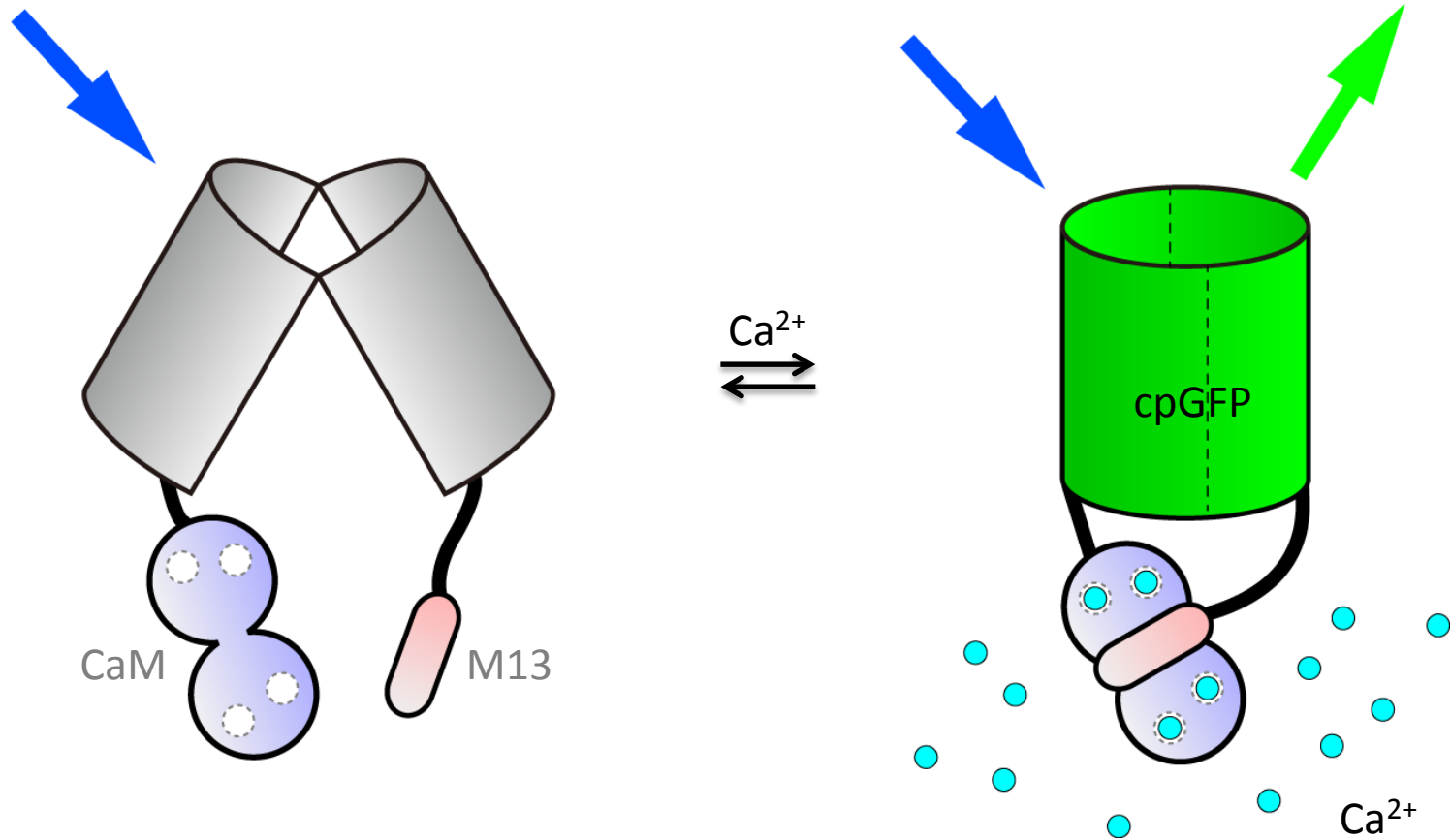
Image by KENPEI, from
Wikimedia Commons
Ref. 2015/12/08
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aequorea_coeruleaescens1.jpg
CC BY-SA 3.0



*

Rendering of a green fluorescent protein (GFP) molecule showing the location of the fluorophore and its encapsulating barrel structure. Rendered by Robert Campbell in the laboratory of Roger Tsien, University of California, San Diego.

蛋白質型Ca²⁺インジケーター

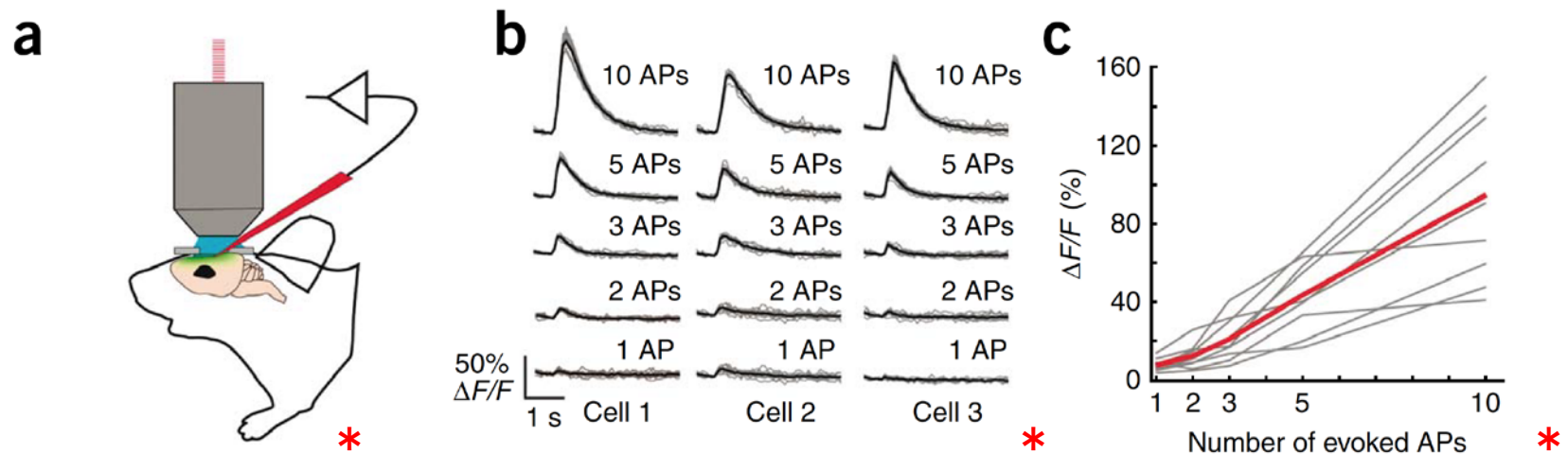


利点: 遺伝子でコードされているので、狙った細胞に発現させることができる。

蛋白質型Ca²⁺インジケータを用いた生体内 神経細胞活動解析

GCaMP3

AAV; *synapsin-1* promoter



Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Tian et al.(2009) Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators, *Nature Methods* 6(12): 875-881, p.880 Fig.6., copyright 2009.

Tian *et al.* Nat Methods (2009)

これまで説明してきた Ca^{2+} インジケータは Ca^{2+} 濃度変化に追随する。

Ca^{2+} 濃度変化を積分できれば、どの神経細胞が活動したかを知ることができる。

蛋白質型Ca²⁺インテグレーター(積分器)を用いた生体内解析

CaMPARI (calcium-modulated photoactivatable ratiometric integrator)

著作権等の都合により、
ここに挿入されていた画像を削除しました。

Fosque et al. (2015) Labeling of active neural circuits in vivo with designed calcium integrators, *Science* 347 (6223): 755-760, p.756 Fig. 1: CaMPARI engineering and in vitro characterization.

著作権等の都合により、
ここに挿入されていた画像を削除しました。

Fosque et al. (2015) Labeling of active neural circuits in vivo with designed calcium integrators, *Science* 347 (6223): 755-760, p.758 Fig. 3: Response in mouse primary visual cortex.

関連する研究手法

Ca²⁺以外のシグナル可視化法

膜電位変化
神経伝達物質
 グルタミン酸

人為的な摂動を加える方法

感覚入力を加えたり、特定の運動をさせる

光遺伝学 (Optogenetics) : 光化学反応と遺伝子導入を組み合わせ、ある波長の光を照射している時だけ、特定の神経細胞の活動を活性化したり、低下させたりする方法

中間まとめ(1)

神経細胞の活動は、

- 活動電位に伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度変化として捉えることができる。
- 脳内で生きたまま観測することができる。
- 多数の神経細胞で同時に観測することができる。

このような測定は、人為的摂動法などと組み合わせることにより、神経細胞ネットワークの機能解明に貢献すると期待されている。

脳細胞の構成

神経細胞 (活動電位を発生する)

グリア細胞 (活動電位を発生しない)

アストロサイト

オリゴデンドロサイト (髄鞘形成)

ミクログリア (免疫系細胞)

高等生物では、アストロサイトの数は神経細胞数を上回る。

古典的なアストロサイトの機能

神経細胞の物理的な支持

神経細胞への栄養の供給

神経細胞周囲のイオン環境などの維持

アストロサイトは脳全体をタイル状に占める

著作権等の都合により、
ここに挿入されていた画像を削除しました。

Pekny and Pekna (2014) Astrocyte Reactivity and
Reactive Astrogliosis: Costs and Benefits, *Physiological
Reviews* Vol. 94 (4): 1077-1098, p. 1080 Fig. 3.

培養アストロサイトにおけるCa²⁺応答の発見

著作権等の都合により、
ここに挿入されていた画像を削除しました。

Cornell-Bell et al. (1990) Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling, *Science* 247 (4941): 470-473, p. 471 Fig. 1.

脳スライス標本：神経細胞刺激に応じたアストロサイトのCa²⁺応答

著作権等の都合により、
ここに挿入されていた画像を削除しました。

Dani et al. (1992) Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks, *Neuron* 8 (3): 429–440, p. 430 Fig. 1.

著作権等の都合により、
ここに挿入されていた画像を削除しました。

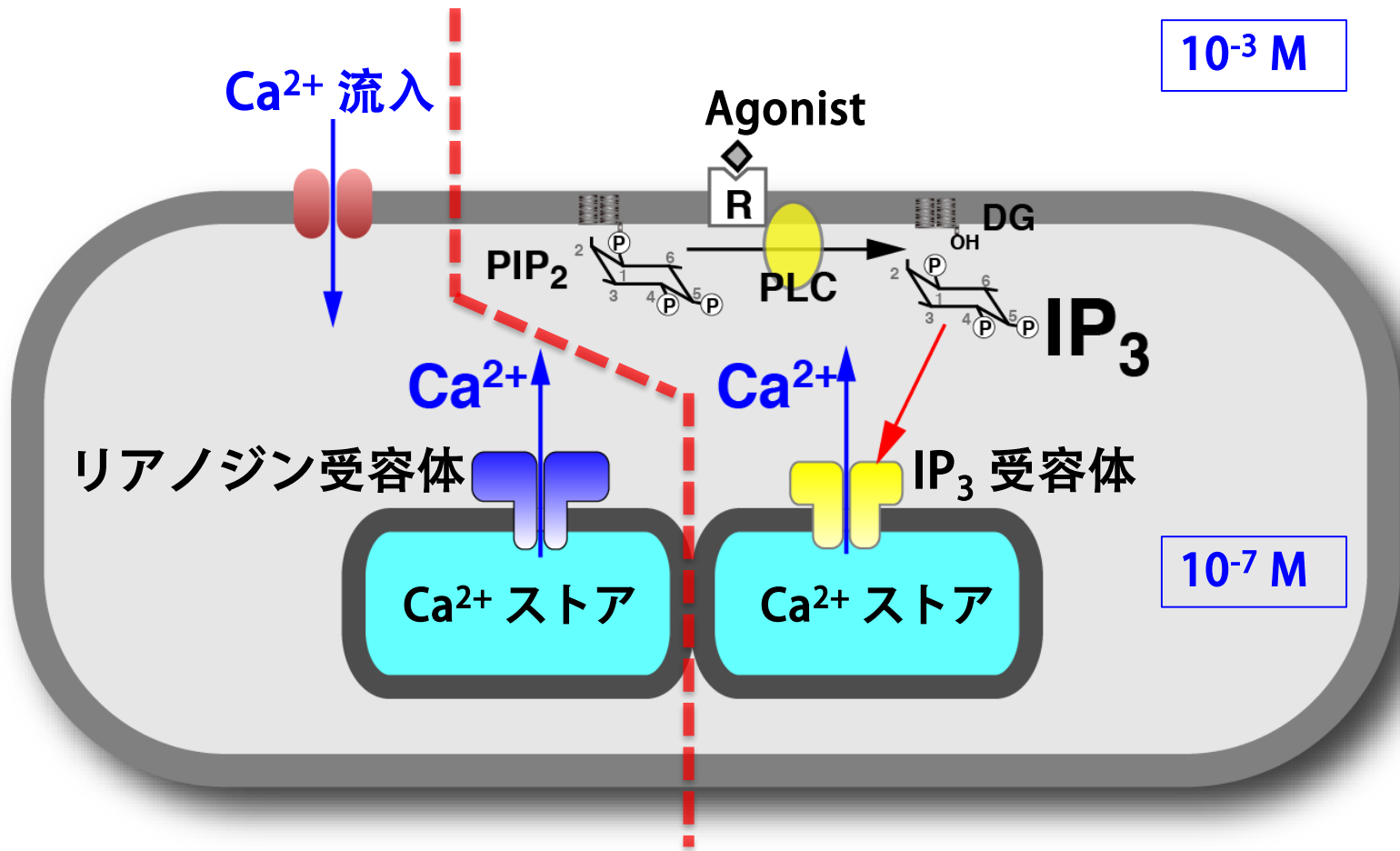
Dani et al. (1992) Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks, *Neuron* 8 (3): 429–440, p. 431 Fig. 2B.

著作権等の都合により、
ここに挿入されていた画像を削除しました。

Dani et al. (1992) Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks, *Neuron* 8 (3): 429–440, p. 432 Fig. 3.

Dani et al. *Neuron* (1992)

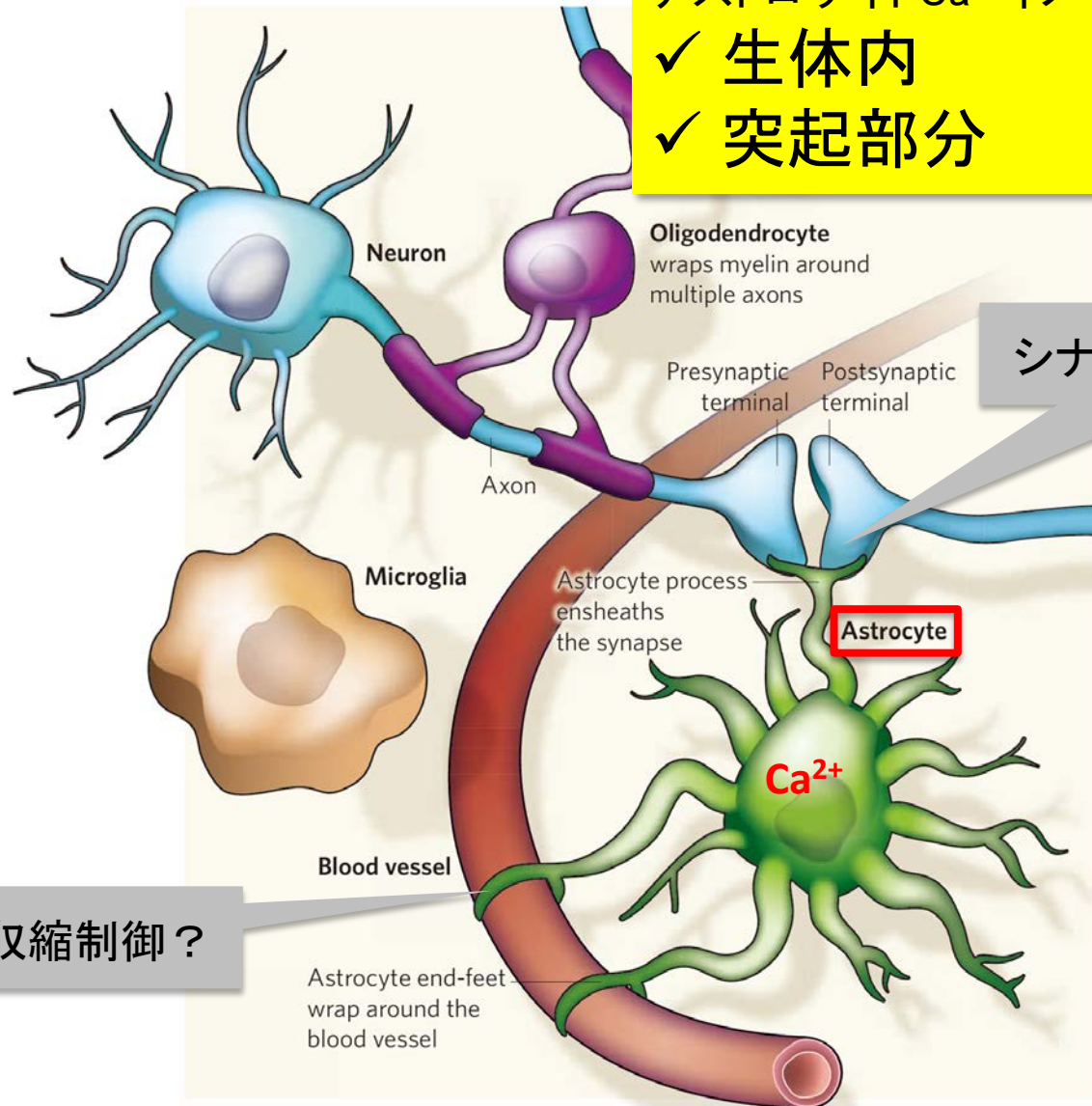
Ca²⁺シグナル機構



アストロサイトはシナプスや血管と接触

アストロサイトCa²⁺イメージング

- ✓ 生体内
- ✓ 突起部分



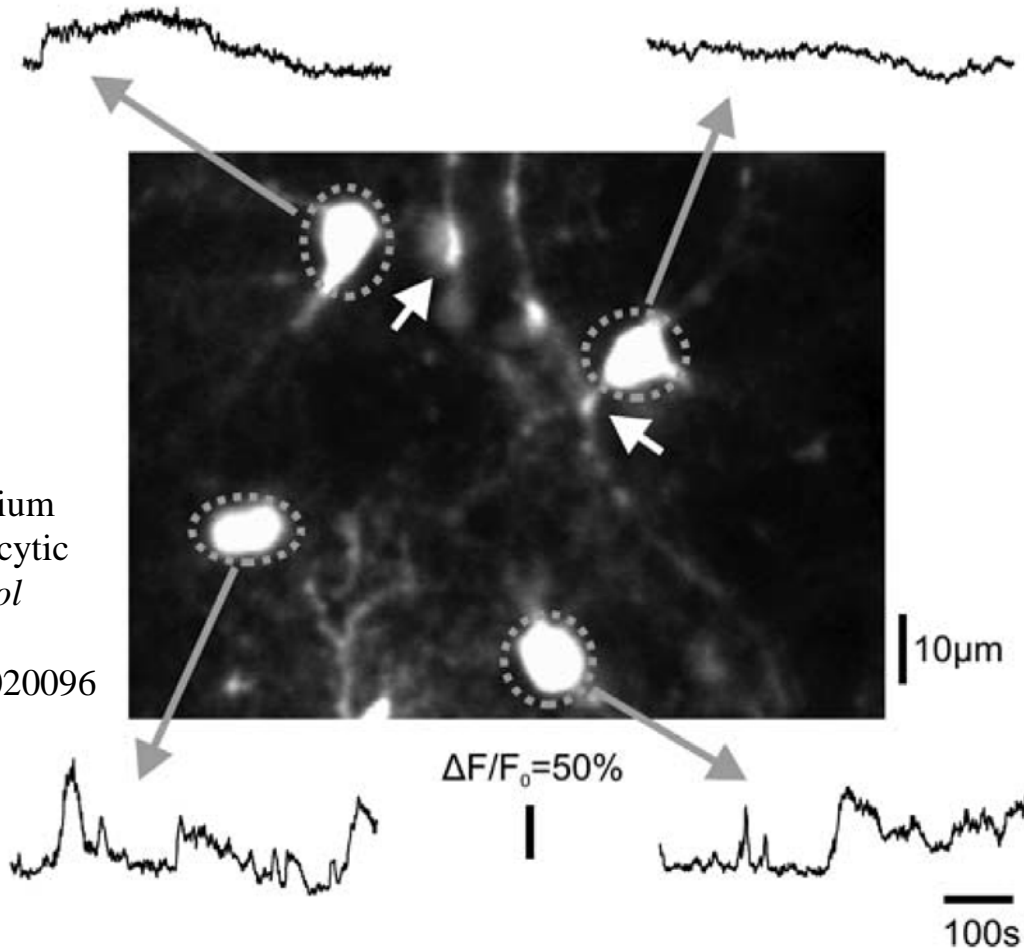
シナプス機能調節？

脳血管収縮制御？

* Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Allen and Barres(2009) Neuroscience: Glia — more than just brain glue, *Nature* 457 (7230): 675-677, p. 675 Fig. 1, copyright 2009.

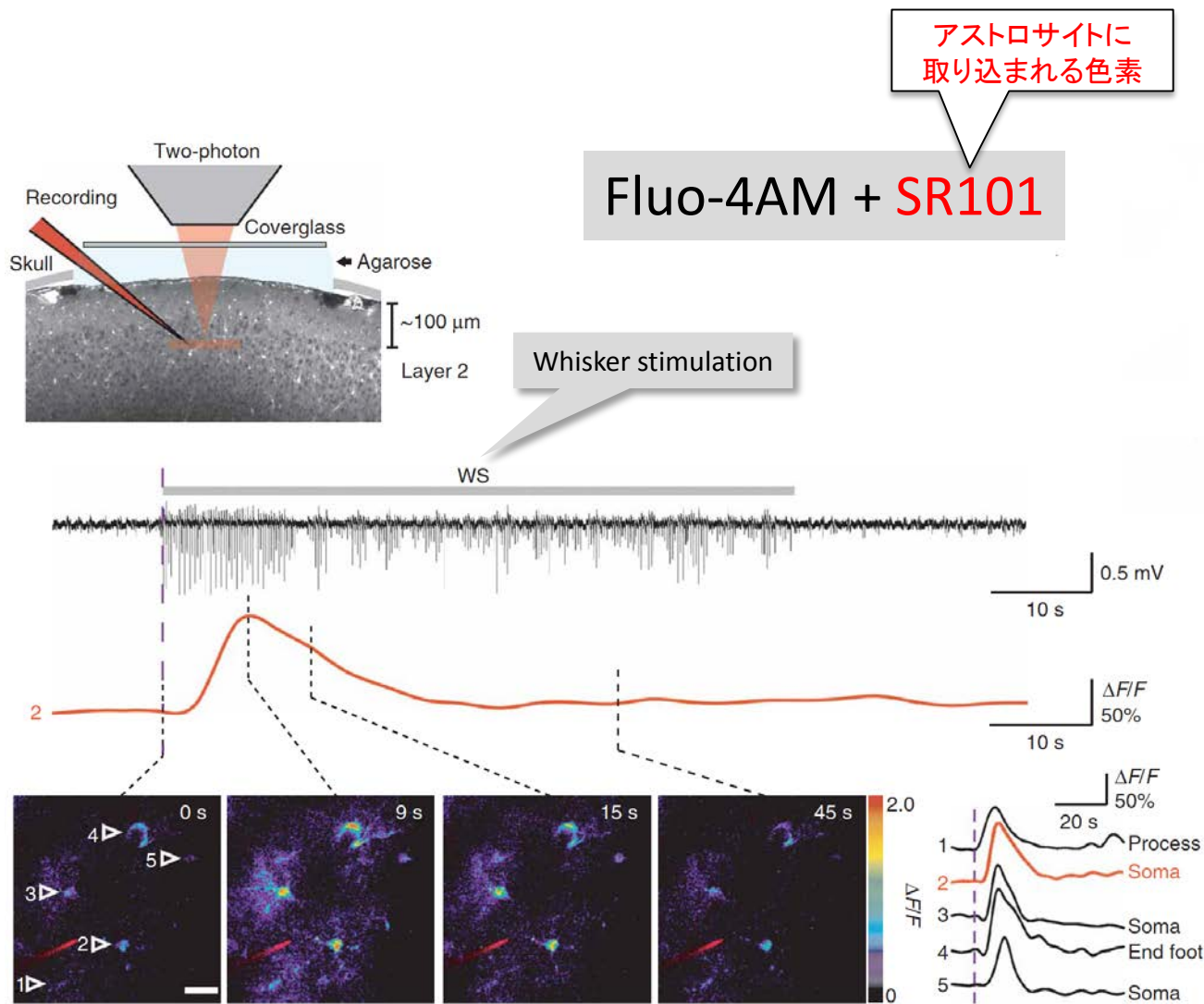
生体内アストロサイトCa²⁺測定

Fluo-4AM



Hirase H. et al. (2004) Calcium Dynamics of Cortical Astrocytic Networks In Vivo. *PLoS Biol* 2(4): e96.
doi:10.1371/journal.pbio.0020096
CC BY 4.0

感覚入力に伴うアストロサイトのCa²⁺応答

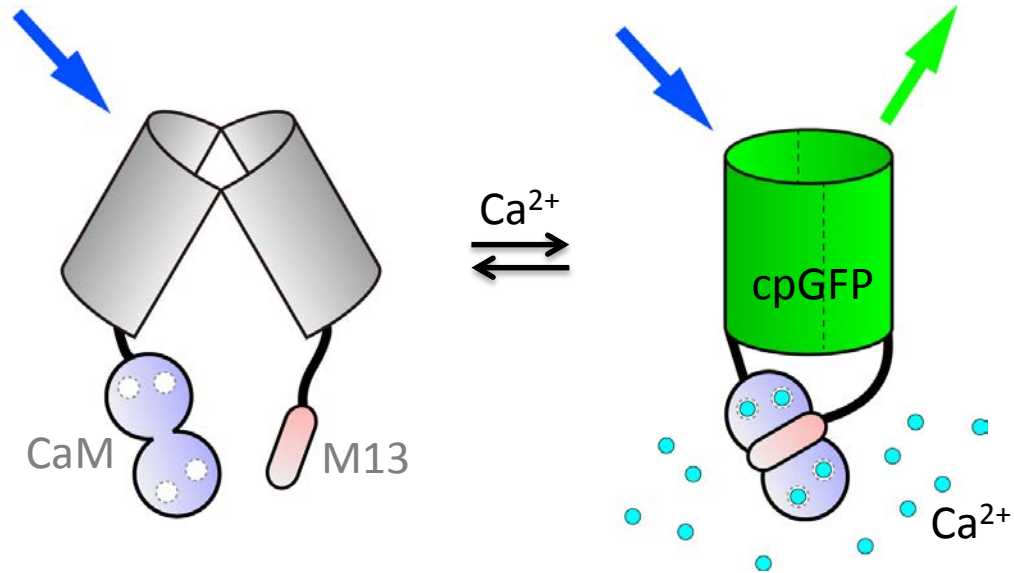


*
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Allen and Wang et al. (2006) *Astrocytic Ca²⁺ signaling evoked by sensory stimulation in vivo*, *Nature Neuroscience* 9 (6): 816 - 823, p. 817 Fig. 1, copyright 2006.

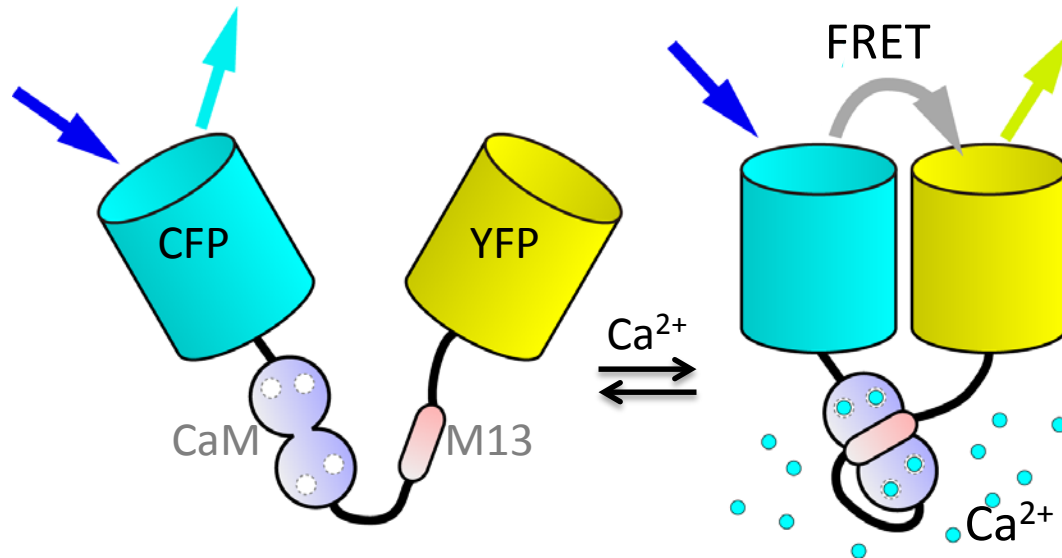
これまでの測定法では、アストロサイトの突起部分のCa²⁺シグナルは十分に観測できない。

蛋白質型Ca²⁺インジケーター

GCaMP family



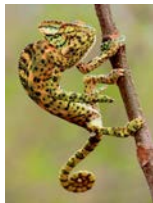
Cameleon family



YC-Nano50

Miyawaki *et al.* Nature (1997)

Image by Shantanu Kuveskar, from Wikimedia Commons
 Ref. 2015/12/14
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Indian_Chameleon_%28Chamaeleo_zeulanicus%29_Photo_graph_By_Shantanu_Kuveskar.jpg
 CC BY-SA 4.0



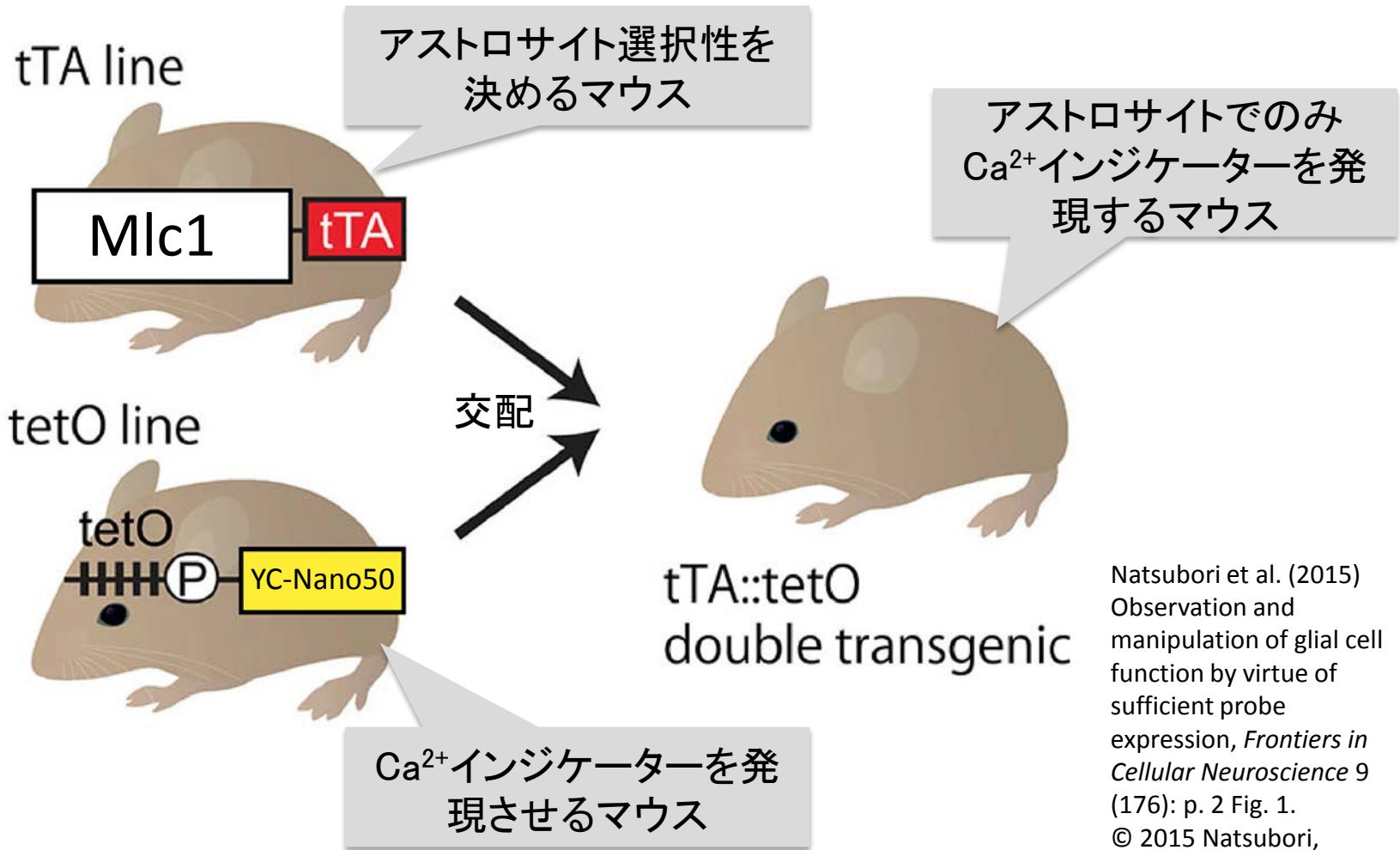
生体内Ca²⁺測定のための遺伝子導入法

電気穿孔法

ウイルス

遺伝子改変動物

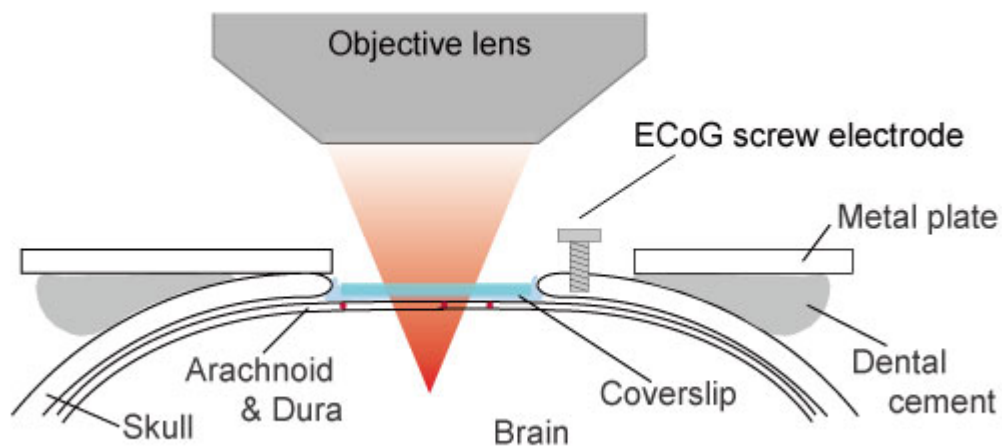
アストロサイト特異的 YC-Nano50 発現マウス



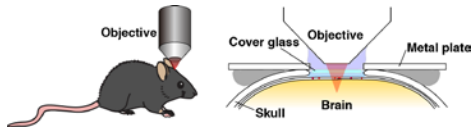
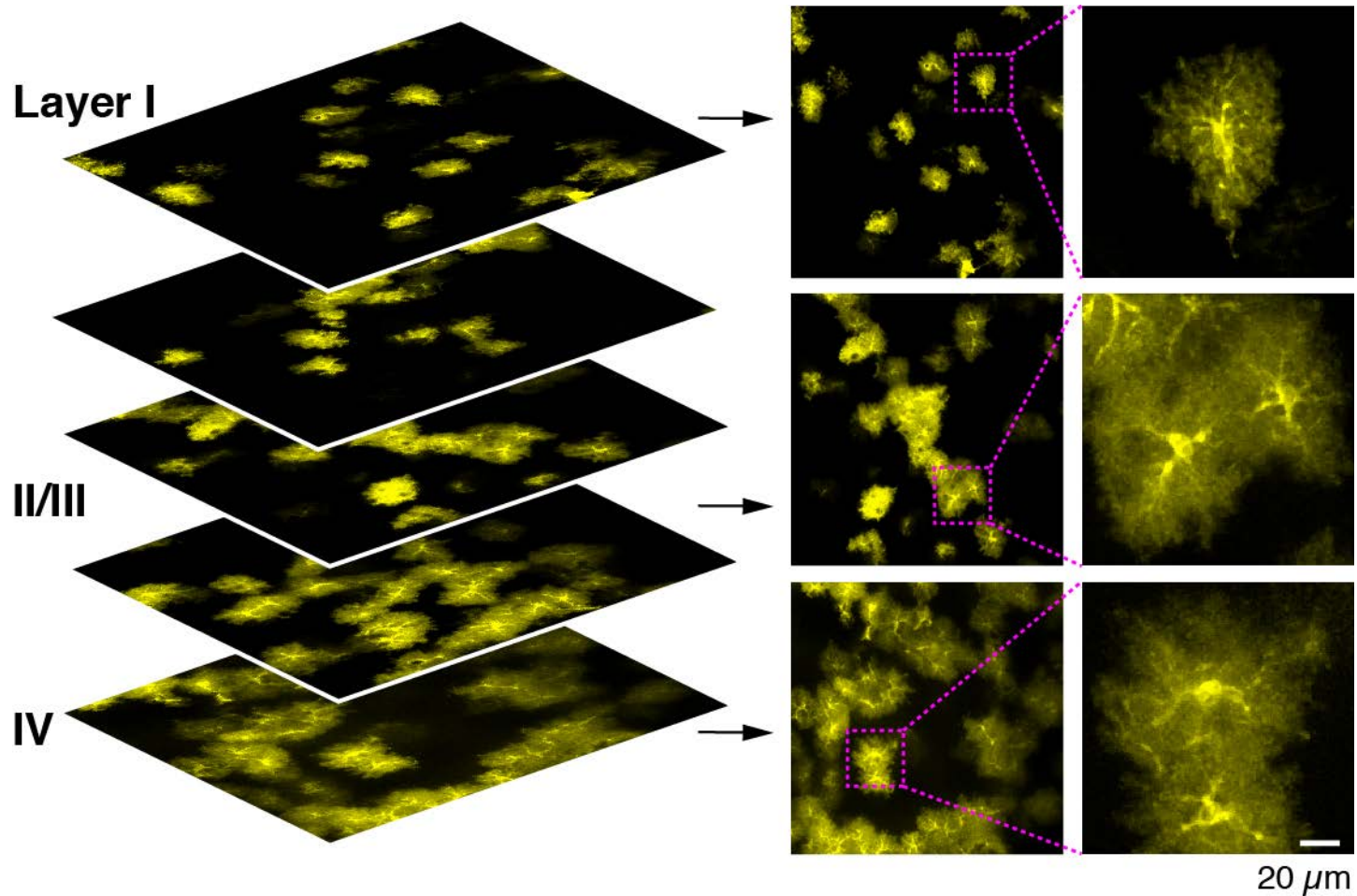
Natsubori et al. (2015)
Observation and manipulation of glial cell function by virtue of sufficient probe expression, *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9 (176): p. 2 Fig. 1.
© 2015 Natsubori, Takata and Tanaka.
CC BY 4.0

頭蓋窓 (cranial window) を介した生体内Ca²⁺イメージング

ここに挿入されていた画像を削除しました。



YC-Nano50 発現アストロサイト: 2光子励起顕微鏡観察



Kanemaru et al. (2014) In Vivo Visualization of Subtle, Transient, and Local Activity of Astrocytes Using an Ultrasensitive Ca²⁺ Indicator, *Cell Reports* 8 (1): 311–318, p. 313 Fig. 2A.

DOI: 10.1016/j.celrep.2014.05.056

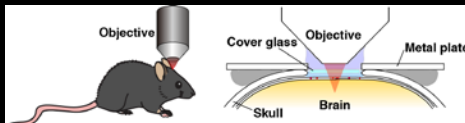
CC BY-NC-ND 3.0

YC-Nano50 発現アストロサイト: 2光子励起顕微鏡観察

YFP channel

0 μm (depth)

100 μm



Kanemaru et al. (2014) In Vivo Visualization of Subtle, Transient, and Local Activity of Astrocytes Using an Ultrasensitive Ca^{2+} Indicator, *Cell Reports* 8 (1): 311–318, Movie S1. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.05.056

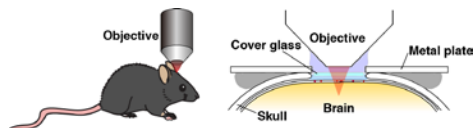
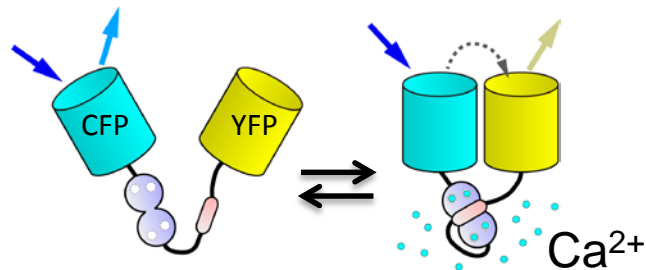
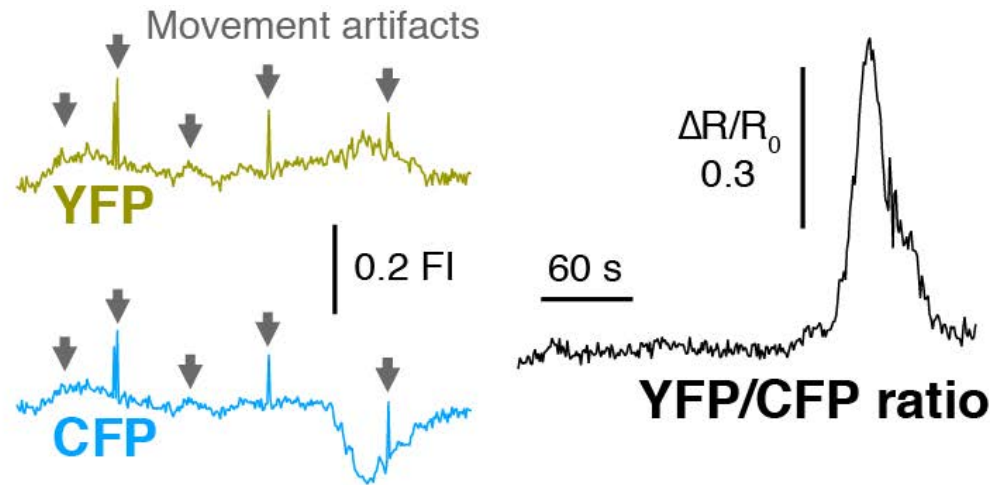
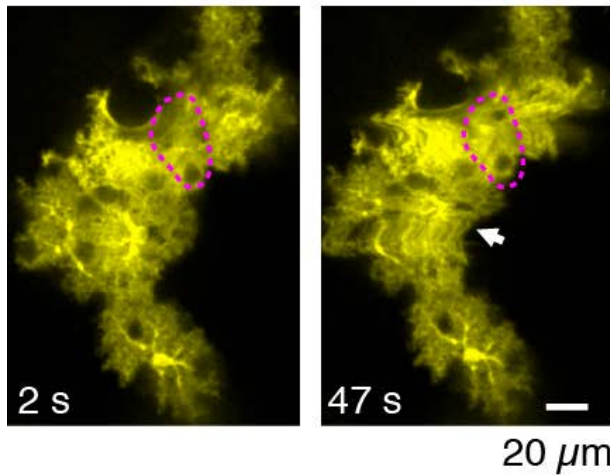
CC BY-NC-ND 3.0

YC-nano50による生体内Ca²⁺イメージング

Kanemaru et al. (2014) In Vivo Visualization of Subtle, Transient, and Local Activity of Astrocytes Using an Ultrasensitive Ca²⁺ Indicator, *Cell Reports* 8 (1): 311–318, p. 313 Fig. 2B.

DOI: 10.1016/j.celrep.2014.05.056

CC BY-NC-ND 3.0



Kanemaru *et al.* Cell Rep (2014)

YC-nano50によるCa²⁺イメージング法の利点

1. 超高Ca²⁺感受性 ($K_d \sim 50$ nM)
→ 微弱なCa²⁺シグナルの測定が可能
2. 2波長蛍光強度比によるCa²⁺測定
→ 動きによるアーチファクトの軽減
3. 静止時でも強い蛍光 (Ca²⁺濃度変化により色が変化)
→ 細胞の形態 (突起を含む) を確認しやすい

アストロサイトの自発 Ca^{2+} シグナル (Ca^{2+} twinkle)

00:00

Pseudocolored Ca^{2+} signals

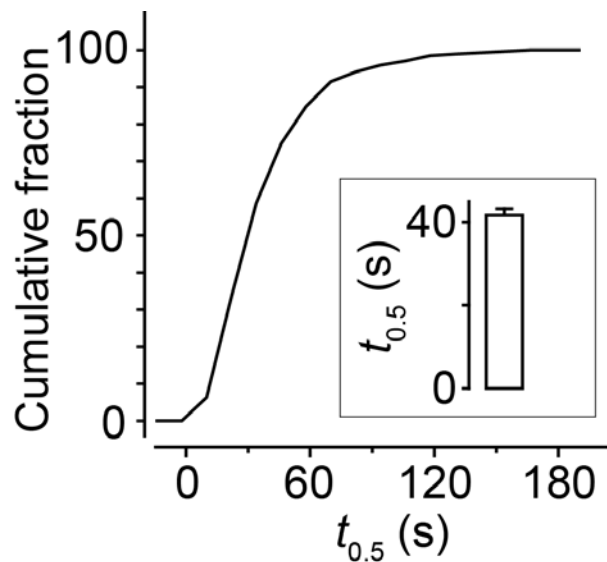
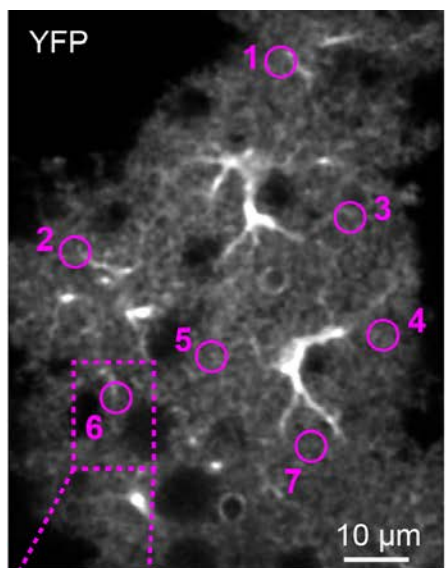
10 μm

Ca^{2+} signals (magenta)
and
astrocyte morphology (white)

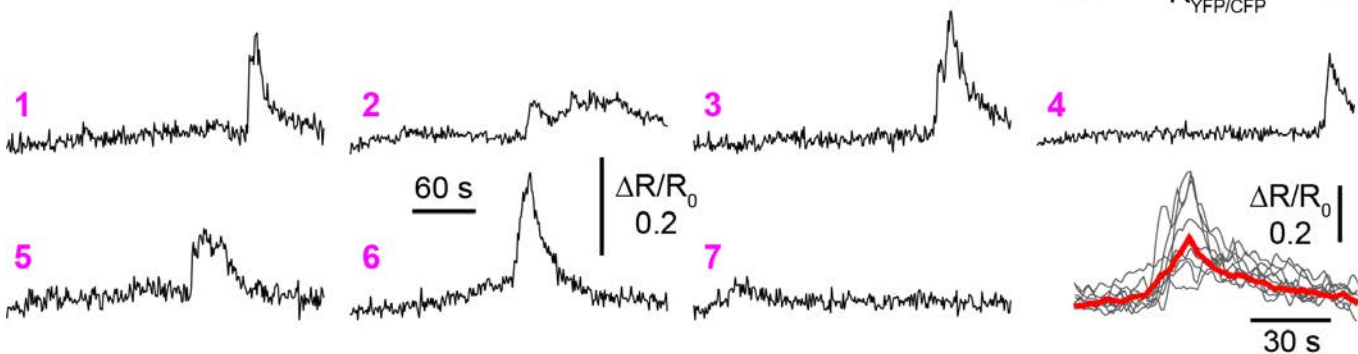
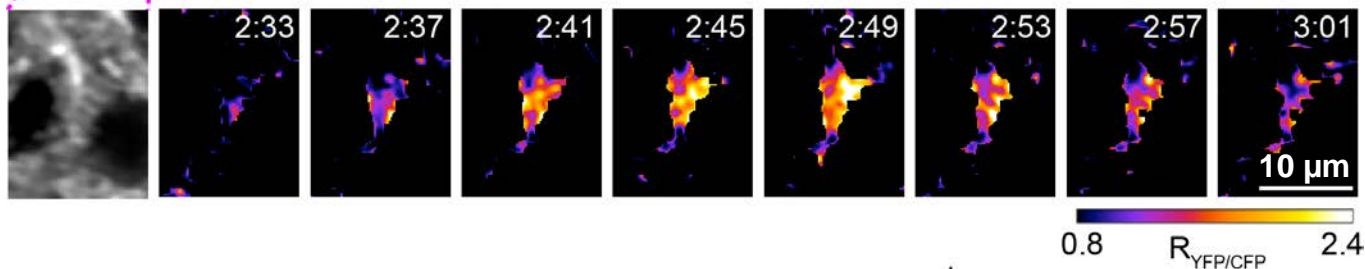
Kanemaru et al. (2014) In Vivo Visualization of Subtle, Transient, and Local Activity of Astrocytes Using an Ultrasensitive Ca^{2+} Indicator, *Cell Reports* 8 (1): 311–318, Movie S2. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.05.056

CC BY-NC-ND 3.0

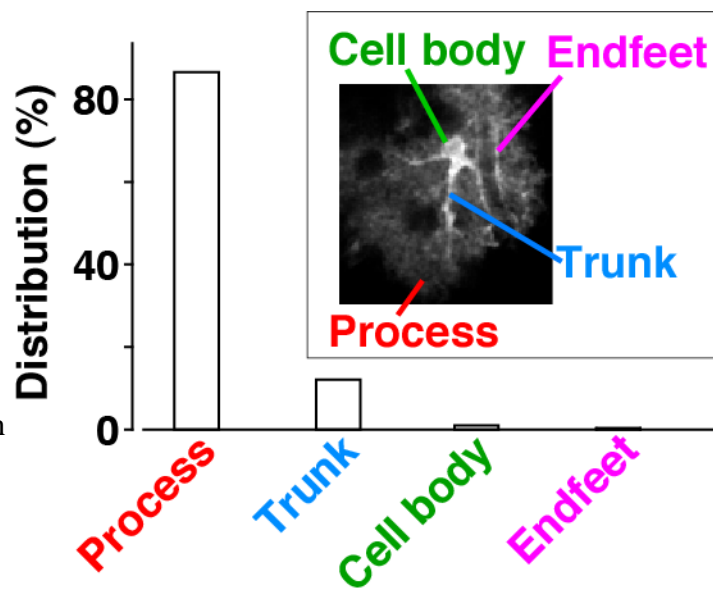
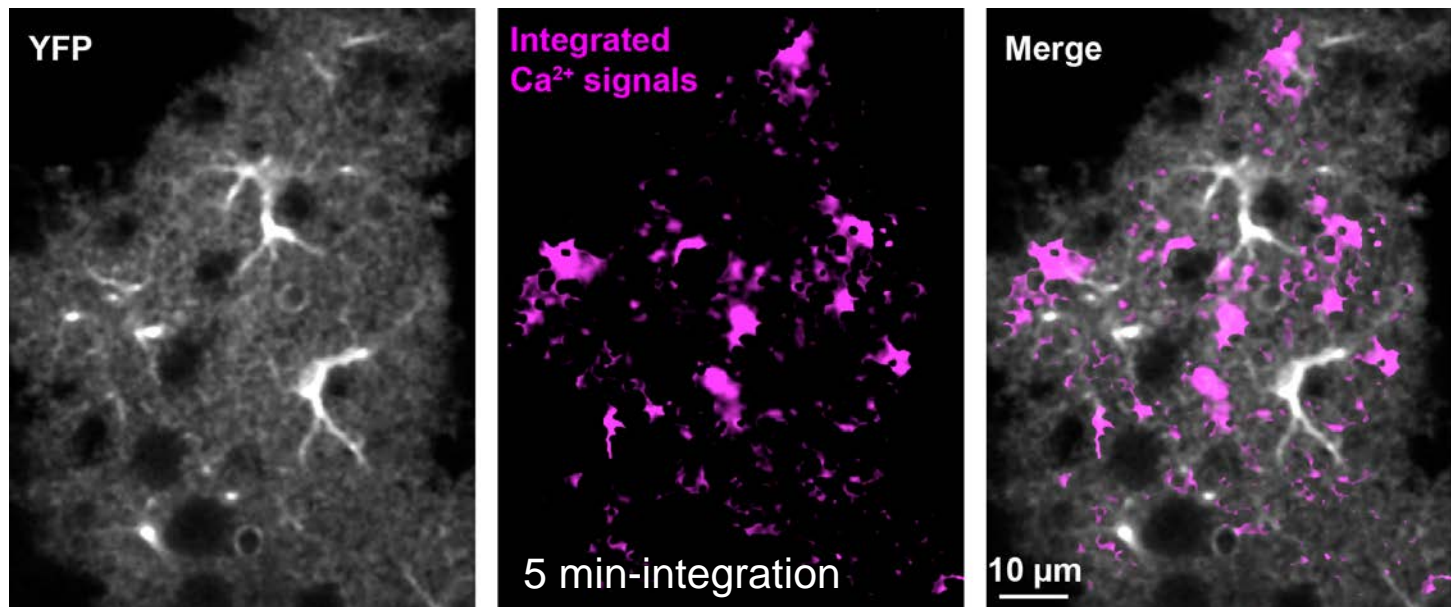
Ca²⁺ twinkle の時空間動態



Kanemaru et al.
(2014) In Vivo
Visualization of
Subtle, Transient,
and Local Activity
of Astrocytes
Using an
Ultrasensitive
Ca²⁺ Indicator,
Cell Reports 8 (1):
311–318, p. 314
Fig. 3A, 3B.



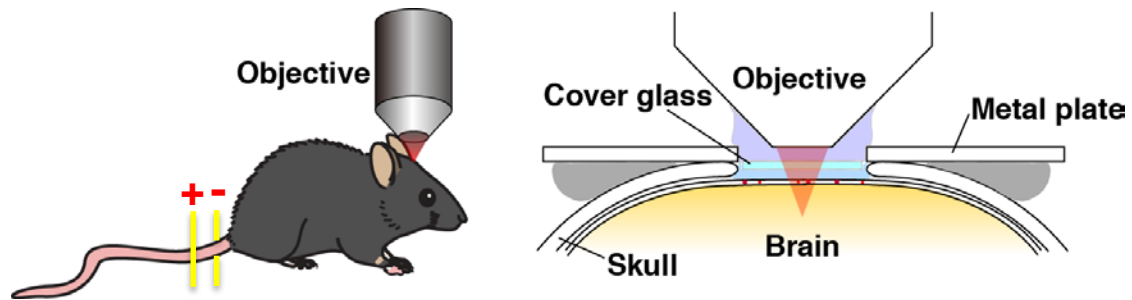
Ca²⁺ twinkle の細胞内分布



参照)

Kanemaru et al. (2014) In Vivo Visualization of Subtle, Transient, and Local Activity of Astrocytes Using an Ultrasensitive Ca²⁺ Indicator, *Cell Reports* 8 (1): 311–318.
DOI: 10.1016/j.celrep.2014.05.056

尾の電気刺激



尾電気刺激に対するアストロサイトのCa²⁺応答

00:00

Pseudocolored Ca²⁺ signals

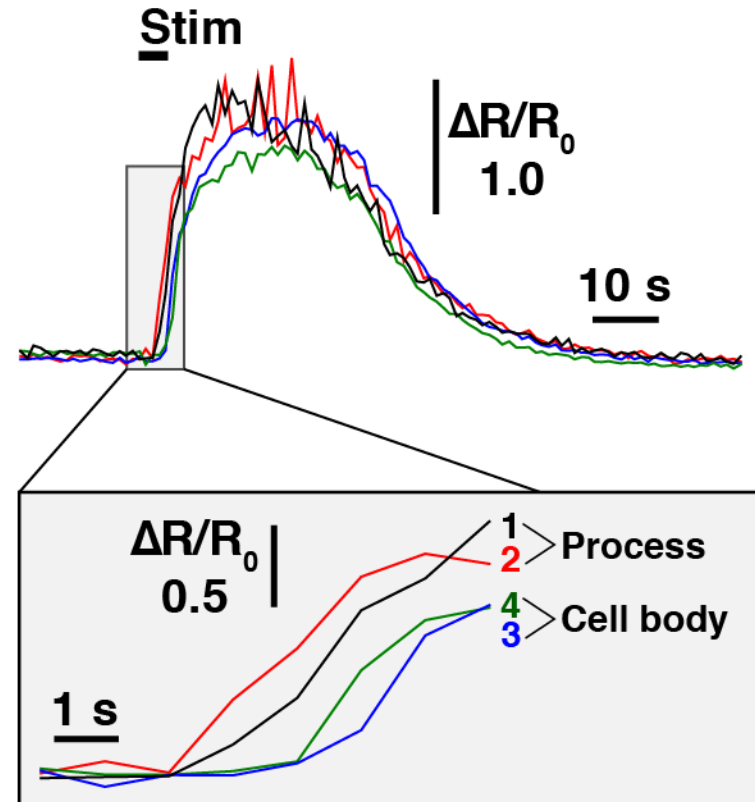
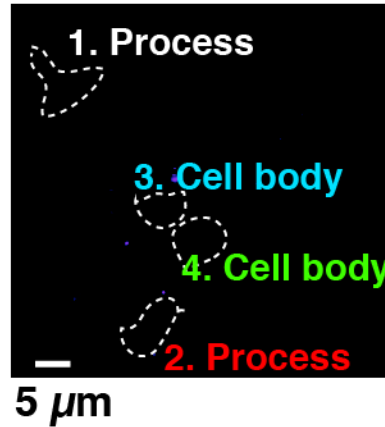
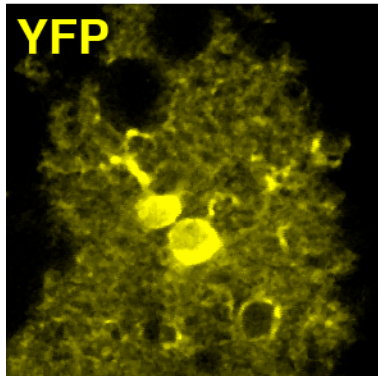
10 μ m

Ca²⁺ signals (magenta)
and
astrocyte morphology (green)

Kanemaru et al. (2014) In Vivo Visualization of Subtle, Transient, and Local Activity of Astrocytes Using an Ultrasensitive Ca²⁺ Indicator, *Cell Reports* 8 (1): 311–318, Movie S4. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.05.056

CC BY-NC-ND 3.0

尾刺激によるCa²⁺応答は細胞周辺から細胞体へ



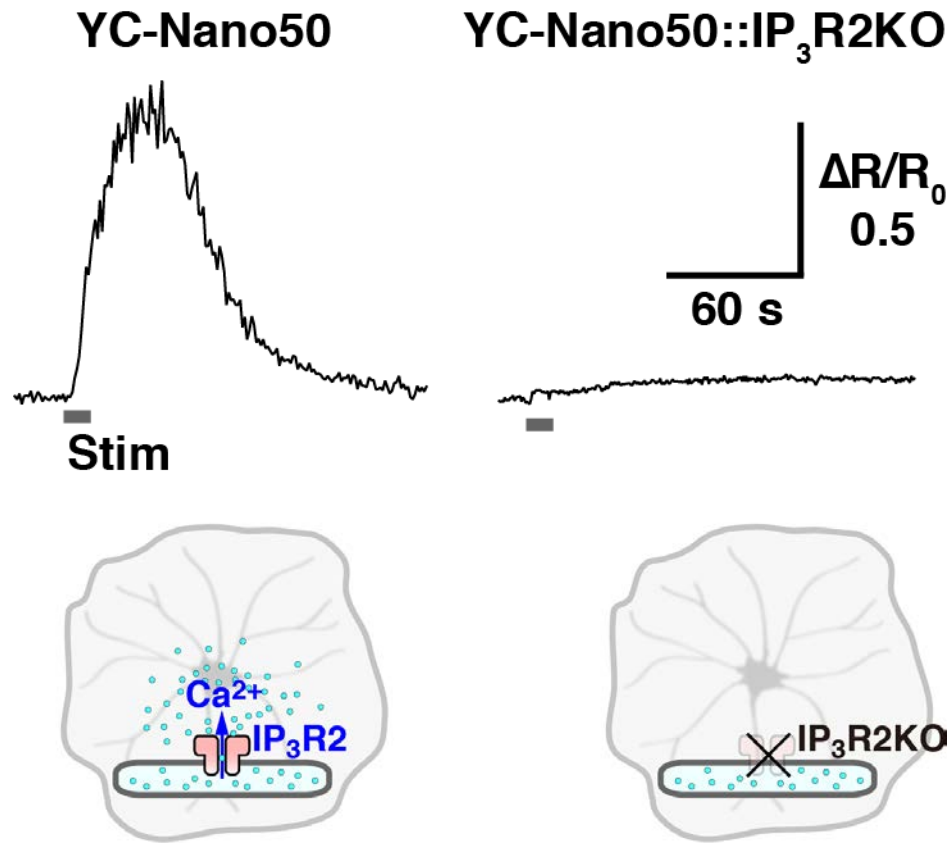
Wave speed: ~15 μm/s

参照)

Kanemaru et al. (2014) In Vivo Visualization of Subtle, Transient, and Local Activity of Astrocytes Using an Ultrasensitive Ca²⁺ Indicator, *Cell Reports* 8 (1): 311–318.

DOI: 10.1016/j.celrep.2014.05.056

IP₃R2 KOマウスでは刺激に対するCa²⁺応答なし



参照)

Kanemaru et al. (2014) In Vivo Visualization of Subtle, Transient, and Local Activity of Astrocytes Using an Ultrasensitive Ca²⁺ Indicator, *Cell Reports* 8 (1): 311–318.

DOI: 10.1016/j.celrep.2014.05.056

無麻酔条件下でのアストロサイトのCa²⁺応答

ここに挿入されていた画像・動画を削除しました。

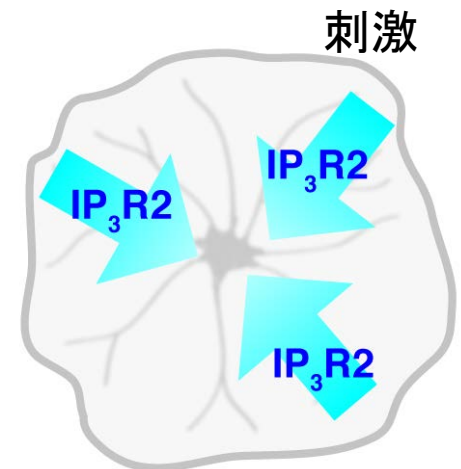
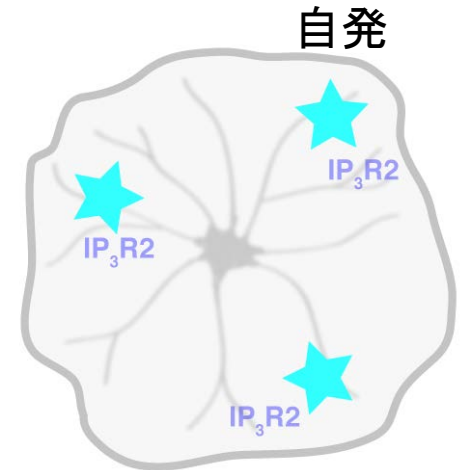
無麻酔条件下でのアストロサイトのCa²⁺応答

ここに挿入されていた画像・動画を削除しました。

中間まとめ(2)

アストロサイトは、

- 突起において自発 Ca^{2+} シグナル(Ca^{2+} twinkle)を発生している
- 刺激に伴い、突起から細胞体へ伝播する Ca^{2+} シグナルを発生する($\text{IP}_3\text{R2}$ を介した Ca^{2+} 放出による)



アストロサイトCa²⁺シグナルの 病態生理学的意義

YC-Nano50 発現マウスを用いた脳傷害に対するアストロサイト応答の解析

脳傷害は活性化アストログリアーシスを起こす

著作権等の都合により、
ここに挿入されていた画像を削除しました。

Pekny et al. (2014) The dual role of astrocyte activation
and reactive gliosis, *Neuroscience Letters* 565: 30–38,
p. 32 Fig. 1

脳傷害モデル

局所レーザー光照射後のアストロサイトのCa²⁺応答

ここに挿入されていた画像・動画を削除しました。

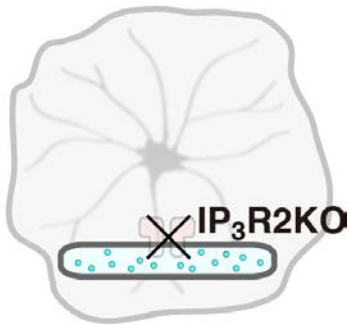
局所レーザー光照射後のアストロサイトのCa²⁺応答

ここに挿入されていた画像を削除しました。



IP₃R2 KO マウスではCa²⁺応答なし

ここに挿入されていた画像を削除しました。

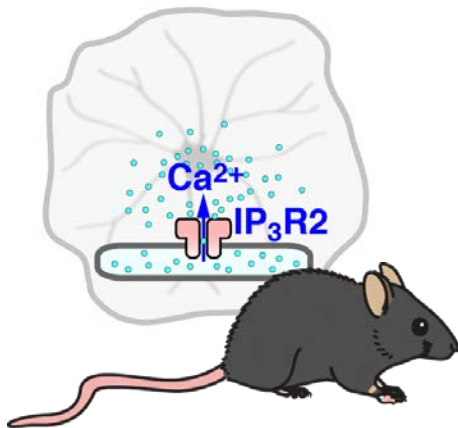


Question

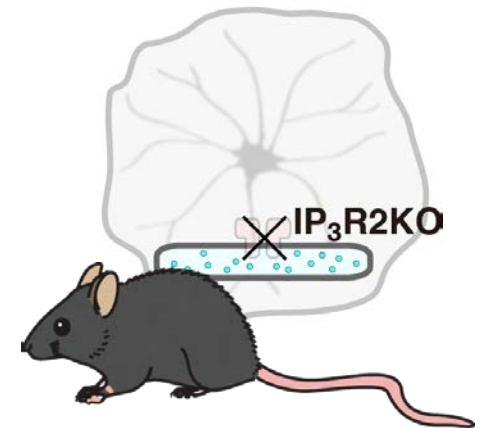
アストロサイトのCa²⁺応答は活性化に必要か？

著作権等の都合により、
ここに挿入されていた画像を削除しました。

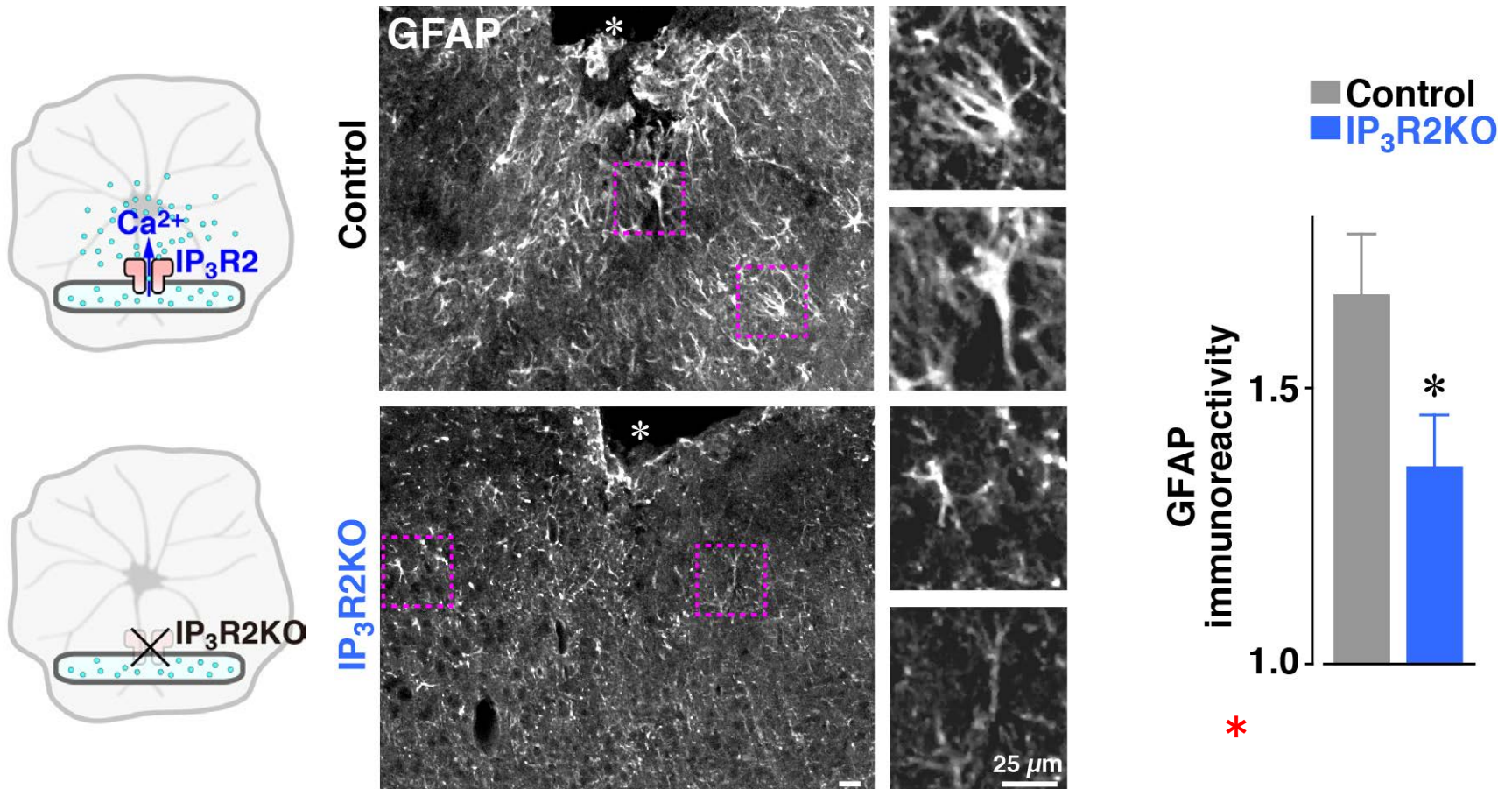
Pekny et al. (2014) The dual role of astrocyte activation
and reactive gliosis, *Neuroscience Letters* 565: 30–38,
p. 32 Fig. 1



WT と IP₃R2-KO マウスを比較する



活性化アストログリオーシスは Ca^{2+} シグナル欠損で低下

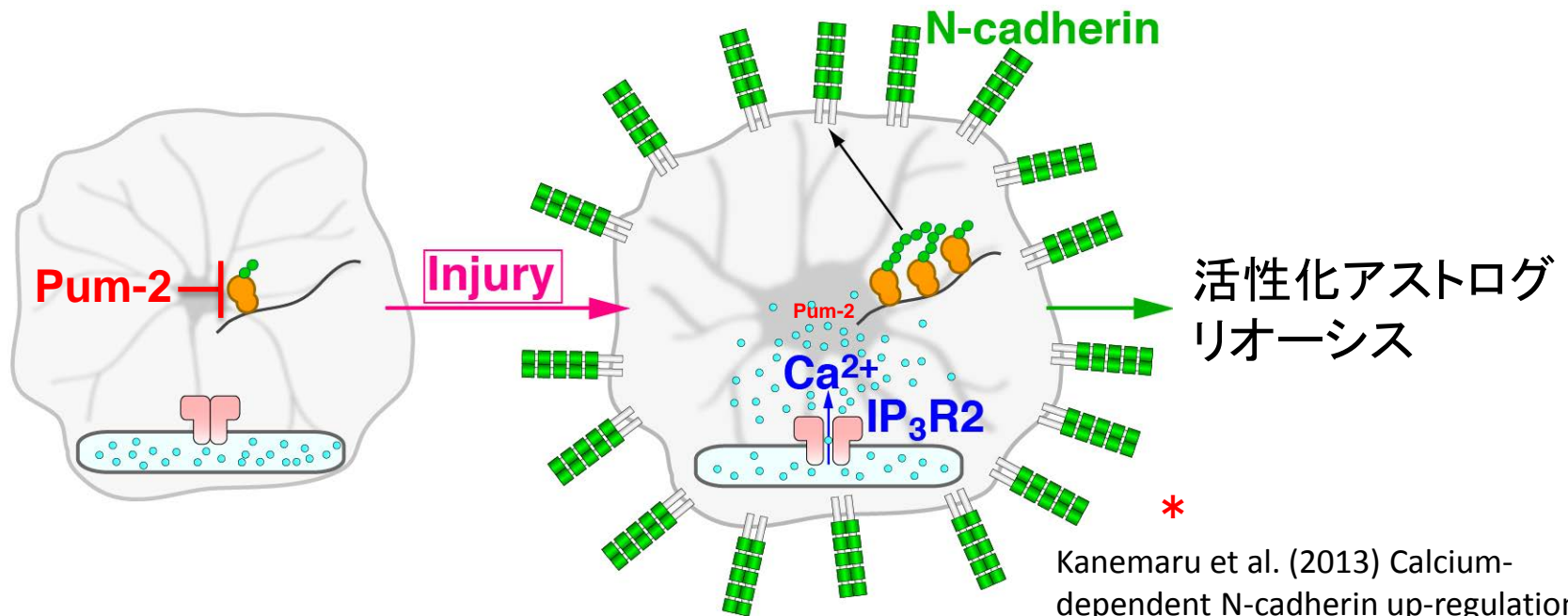


*

Kanemaru et al. (2013) Calcium-dependent N-cadherin up-regulation mediates reactive astrogliosis and neuroprotection after brain injury, *PNAS* 110 (28): 11612–11617, p. 11613 Fig. 1B.

中間まとめ(3)

アストロサイトのCa²⁺シグナルは、病態にも関与している。



* Kanemaru et al. (2013) Calcium-dependent N-cadherin up-regulation mediates reactive astroglial reactivity and neuroprotection after brain injury, *PNAS* 110 (28): 11612–11617, p. 11617 Fig. 5.

Pum2 ダウンレギュレーションを介して N-cadherin発現上昇を起こし、活性化アストログリオーシスを惹起する。

まとめ

細胞の活動を脳の中で生きたまま見て理解する

- 神経細胞およびアストロサイトの活動を、脳の中で生きたまま見ることが、マウスなどで可能になった。
- これを応用して、脳機能を理解するための試みがこれから急速に進むと期待される。(学際的な研究が必要)
- 生理的な機能だけでなく、病態における機能も今後理解が進むと期待される。

共同研究者

東京大・医・薬理

山澤徳志子
廣瀬謙造（東京大・医）
笠井靖代
竹島 浩（京都大・薬）
竹島美幸
櫻井 隆（順天堂大・医）
志牟田美佐
宮川知也
斎藤直人
橋本彰子
浅田行紀
門脇嗣郎
並木繁行
瀧澤あずさ
東岡雅也
大口恵子
藤原明子
井上尊生（Johns Hopkins大・医）
大久保洋平
柿澤 昌（京都大・薬）
上田泰己（東京大・医）

東京大・医・薬理

富田太一郎
水島亜希子
石井清朗
橋戸政哉
金丸和典
林 健二
白根大資
中村直俊
古谷和春
関谷 敬
菅生厚太郎
飯沼 将
間下雅士
稻生大輔
久保田 淳
三上義礼
鈴木純二
西川 翼
佐藤 要
高木美貴
北島奈美

東京大・医

埼玉医大
遠藤 實
池本隆昭
東京大・医
清水孝雄
三品昌美
門脇 孝
河西春郎
狩野方伸
斉藤延人
伊藤明博
東京大・薬
池谷裕二
小山隆太
柴田和輝
長野哲雄
余郷能紀

慶応大

田中謙二
理研(横浜)／大阪大
黒崎知博
馬場義裕
京都大・工
森 泰生
昭和大・医
小口勝司
小山田英人
順天堂大・医
小川靖男
村山 尚
東京都臨床研
芝崎 太
医科歯科大・難治研
萩原 正敏
神戸大・バイオシグナル研セ
齋藤 尚亮
北大／鳥取大
太田 利男
テキサス大
Ilya Bezprozvanny