

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

目 次

文献No	課題番号			
20000937A	21008	血管壁細胞の抗血栓性機能の制御機構の解明と新規抗血栓薬の開発	加藤 久雄	1
938A	21019	組織内脂肪蓄積の予防及びGLUT4の発現増加を目指したインスリン抵抗性治療法の研究	江崎 治	14
939A	21045	慢性呼吸器疾患の発症機構の解明と医療への応用	斎藤 博久	18
940A	21052	閉経後骨粗鬆症の発症機構の解明とその予防と治療薬に関する研究	宮浦 千里	25
942A	21067	細菌感染に関与する病原遺伝子の発現機構の解明とその制御法の開発	渡辺 治雄	33
943A	21073	脳循環障害による神経細胞死の発症機序の解析と治療法の開発	内村 英幸	38
944A	21079	疾患モデルマウスを用いたβ-ガラクトシドシスの病態解析と治療への応用	松田潤一郎	46
945A	21081	精神疾患の分子メカニズムの解明と新しい診断・治療法の開発への応用	西川 徹	53
946A	21086	新しい生体防御調節物質の機能と作用の解析	鈴木 和男	60
948A	21089	感染症が誘発する自己免疫疾患病態の解明とその医療への応用に関する研究	大川原明子	68
949A	21092	生体膜脂質を介する細胞機能調節機構の解明とその医療への応用	西島 正弘	80
950A	21096	免疫・内分泌系による神経系の障害機構の解明とその制御	田平 武	88
951A	21102	移植免疫寛容とマイクロキメリズムに関する基礎的研究	木村 廣光	92
952A	21104	G蛋白質共役型受容体の個体レベルでのゲノム機能評価	辻本 豪三	98
953A	21107	難治性腎疾患の病態解明と医療への応用に関する研究	藤本純一郎	111
954A	21110	食細胞による感染防御機構の解明と医療への応用	綱脇 祥子	118
955A	21121	抗酸化機能調節に及ぼす運動と栄養の影響に関する研究	樋口 満	126
956A	21130	神経変性疾患における神経細胞死の分子機構の解析	桃井 隆	134
957A	21142	C型肝炎ウイルスに対するインターフェロン(IFN)の治療効果を増強する新薬の開発研究	小長谷昌功	144
958A	21150	グリア細胞の機能調節による神経疾患治療法の開発	高坂 新一	149
959A	21166	新規破骨細胞形成抑制因子(OCIF)とそのリガンドである破骨細胞分化因子(ODF)の生理的役割の解明と医療への応用	高橋 直之	160
960A	21177	コレステロール代謝・動脈硬化関連遺伝子の発現調節因子の検索	松本 明世	167
961A	21179	血圧調節物質・動脈硬化起因物質などに関する分子生物学的、生化学的研究	南野 直人	178
964A	21215	アトピー性皮膚炎自然発症(NC)マウスを用いた皮膚掻痒症の発症機序の解明と新規治療薬の創製	廣田 直美	183
965A	21224	ヒト血液細胞情報伝達の解明とオリゴヌクレオチドを用いた治療法の開発	湯尾 明	193
966A	21225	癌化とウイルス感染を制御する細胞内情報伝達分子を標的とする薬剤の探索	松田 道行	200

20000969A	21228	細胞内シグナル伝達の解明による創薬シーズの探索	上原 至雅	……	204
968A	21234	スフィンゴ脂質の情報伝達の研究と抗血栓症薬開発	望月 直樹	……	208
969A	21279	中枢神経系におけるATP受容体の機能の解析と医療への応用	井上 和秀	……	213
941A	22055	宿主の防御機能動態と感染機構の解明と医療への応用	高津 聖志	……	221
949A	22088	ビタミンE欠乏性脊髄小脳失調症の病態解明と治療法の確立に関する研究	水澤 英洋	……	228
962A	22183	炎症・アレルギー性疾患の発症機構の解明と医療への応用	清水 孝雄	……	233
963A	22194	コレステロール代謝を標的とした抗動脈硬化薬開発のための基盤研究	新井 洋由	……	237

スフィンゴ脂質の情報伝達の研究と抗血栓症薬開発

所 属 国立国際医療センター研究所 臨床病理研究部
研究者 望月 直樹

分担研究者

トーアエイヨー株式会社製品開発部 安齋則夫

要 旨

EDG-1 から EDG-5 までの cDNA を単離しそれぞれの受容体を発現する細胞株を樹立した。Erk(MAPキナーゼ)活性化を認めいずれも三量体 GTP 結合蛋白質 Gi を介していた。EDG 受容体関連薬開発のためのスクリーニング系を確立した。

1. 研究目的

血管内皮細胞と血小板の関係は血栓形成とそれに引き続く内皮細胞側の防御機構を考える上で非常に重要な関係である。血小板から分泌される SPP, LPA がどのように血管内皮細胞の増殖や遊走に関わるかを調べることはすなわち EDG 受容体による内皮細胞の制御を調べることに他ならない。本研究では EDG 受容体の細胞内情報伝達系を詳細に調べることと EDG 受容体関連薬（作働薬・拮抗薬）を創薬することを目的としている。予め生物学的作用を十分に検討する必要があると判断し本研究班では情報伝達系の解析と実際の薬物スクリーニングを並行に行っていく。昨年度までに LPA 受容体の Erk 活性化機構を明らかにした。三量体 GTP 結合蛋白質 Gi の α サブユニットに結合する rap1GAPII により GTP-Rap1 が減少し Rap1 が抑制していた Ras/Erk 系が亢進することを示した。本年度はさらに他の EDG 受容体での Erk 活性化機構を検討する。受容体 EDG-3 は三量体 GTP 結合蛋白質 G13 と共役し下流の p115RhoGEF を活性化することで細胞接着を制御すると考えられているが、これまで着目されていないアダプター分子 Crk の関与を検討し接着における役割を明らかにする。実際にスクリーニングを開始するにあたりスクリーニング系の確立と合理的創薬設計ソフトウェアを用いた薬物構造学的検討により候補薬剤を選択していく。

2. 研究方法

(1) EDG-1,2,3,4,5cDNA の単離,発現ベクターの構築と同受容体発現細胞株の樹立

SPP 受容体 EDG-1,3 と -5、リゾフォスファチジン酸 (LPA) 受容体 EDG-2,4 cDNA を human heart cDNA library(Clontech 社)を template にして増幅単離した。それぞれの cDNA を FLAG タグ付の mammalian 発現プラスミドにサブクローニングしてその発現を確認した(pCXN2-FLAG-EDG-1,2,3,4,5)。Signal sequence を持っているため signal sequence がはずれた場合、アミノ末端の FLAG が切れる可能性を考慮して VSV の signal sequence の下流に FLAG タグをつけてさらに signal sequence と考えられるそれぞれのアミノ酸を除いた全長アミノ酸をコードする cDNA を VSV signal sequence の下流に挿入するプラスミドも構築した(pVSV-FLAG-EDG-1,2,3,4,5)。EDG-1,2,3,4, と -5 を発現する HeLa 細胞株を樹立した。EDGcDNA の恒久的導入には neomycin 耐性遺伝子を有するベクターを用いたため neo 選択を行い細胞株を樹立した。EDG-受容体の発現は M2 anti-FLAG モノクローナル抗体(Sigma 社)でイムノブロットにて確認した。またそれぞれの cDNA が細胞に恒久的に integrate されていることをそれぞれの cDNA をプローブにした Southern blot で確認した。

(2) Erk の活性化ならびに Crk 磷酸化の検討

内因性 EDG 受容体刺激による増殖刺激作用の検討は磷酸化 Erk を指標として調べた。NIH3T3 細胞、COS-1 細胞、Hela 細胞を 1 2 時間血清飢餓状態にした後、10 μ M SPP, 1 μ M LPA で刺激した。細胞溶解液 (150mM NaCl, 20mM Tris-HCl PH 7.5, 1% NP-40, 10mM MgCl₂, 1mM PMSF, 3mg/ml Leupeptin) で懸濁し 15,000rpm 10 分間の遠心後の上清を SDS-PAGE 後、PVDF 膜に転写し 3% Ovalbumin (TBS-0.1% tween20) でブロッキングの後、抗磷酸化 Erk 抗体 (New England Biolab 社) を使用してイムノプロットを行った。EDG 受容体下流の細胞接着・遊走機能を調べるため、アダプタ 蛋白質 Crk の磷酸化を検討した。NIH3T3 細胞、COS-1 細胞、HUVEC を血清飢餓の後 SPP あるいは LPA で刺激した。細胞溶解液を 10% SDS-PAGE 後、抗 Crk 抗体 (Transduction Laboratory 社) でイムノプロットを行った。Crk の磷酸化は band シフトの有無により判定した。

(3) EDG アゴニスト及びアンタゴニストのスクリーニングのための評価系の構築

SPP 及び LPA は、三量体 GTP 結合蛋白質 G_q または G_i を介し細胞内 Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) の上昇を誘起することが知られていることから、[Ca²⁺]_i の測定は受容体活性化の評価法として有用であると考えた。使用可能な細胞系を選択する目的で、肺動脈内皮細胞 (PAEC)、肺静脈内皮細胞 (PVEC)、HT1080、Swiss3T3、NIH3T3、CHO、HeLa、HEK293T 及び COS-1 細胞を SPP 及び LPA 刺激した際の [Ca²⁺]_i 内因性の EDG の有無を確認した。使用細胞は SPP あるいは LPA 刺激による [Ca²⁺]_i の増加の反応性が良い細胞を上記細胞群のなかから選択した。本評価系には NIH3T3 細胞を使用した。EDG アゴニストの評価は、試験化合物により NIH3T3 細胞刺激を行い (最大 10⁻⁴M)、その [Ca²⁺]_i の上昇を測定することにより行った。EDG アンタゴニストの評価は、試験化合物をアッセイ 5 分前から室温でインキュベートし、SPP 及び LPA 10⁻⁷M 刺激により誘起される [Ca²⁺]_i 上昇の抑制作用を測定することにより行った (10⁻⁵M)。NIH3T3 細胞は 96 穴マイクロプレートに播種し、DMEM (10% FBS) を用いて 24 時間培養し、MEM[(FBS)-] に交換して更に 24 時間培養後、アッセイに使用した。[Ca²⁺]_i 測定前に蛍光 Ca²⁺ 指示薬 Fluo3-AM (10⁻⁵M) を細胞内に導入し、(室温、60 分)、DPBS (+) に交換後、刺激により誘起される [Ca²⁺]_i の上昇に伴う蛍光強度の変化を蛍光測定装置フルオロスキャンアセント FL (Labsystems 社) を用いて測定した。

(4) EDG 受容体のサブタイプ選択性の評価

EDG-1 または EDG-3 を安定発現した HeLa 細胞を用いて、アゴニストまたはアンタゴニスト活性が認められた化合物について、NIH3T3 細胞の場合と同様の手法を用いることにより、サブタイプ選択性の有無についての評価を行った。EDG-1 または EDG-3 を安定発現する HeLa 細胞は G418 含有 (1 μ g/mL) DMEM (10% FBS) で培養した。なお、蛍光 Ca²⁺ 指示薬は Calcium Green1-AM (Molecular Probes 社) 5 \times 10⁻⁶M を用いた (37 $^{\circ}$ C、60 分)。

(5) 細胞培養と遺伝子導入

細胞培養はいずれの細胞も 10% 牛胎児血清添加 DMEM を使用し、HUVEC はさらに 0.03mg/ml Endothelial Cell Growth Supplement (Sigma 社) を加えた培養液を使用した。細胞への遺伝子導入には NIH3T3、COS-1 には Supefect (QIAGEN 社)、Hela は Lipofectamin2000 (GIBCO-BRL 社) をそれぞれ用いた。

(6) 合成的アプローチによる受容体刺激・拮抗作用の解明とコンピュータによる新規アンタゴニストの探索

SPP のアミノ基や 2 級水酸基及びその立体配置が活性に与える影響を把握すべく、種々関連誘導体の合成を行い、上記測定系でアゴニストまたはアンタゴニスト活性の測定を行った。アンタゴニスト活性を有する新規化合物を見出すべく、上記の関連誘導体から得られた構造活性相関データを基にして、合理的創薬設計ソフトウェア Catalyst v.4.5 (Molecular Simulation I 社) を用いて、SPP の薬

理活性モデルを作成し、3次元データベース検索による候補化合物の選択を行った。

3. 研究成果

EDG-1,2,3,4,5cDNA の PCR 法による単離と EDG-1,2,3,4,-5 発現 HeLa 細胞株の樹立

各 EDG 受容体特異的発現細胞は今後 EDG 受容体作働薬・拮抗薬をスクリーニングする際には最終的に必要になると考え1から5までの EDG cDNA をまず PCR 法で単離し細胞発現ベクターに組み込み細胞株を樹立することを試みた。また、SPP 受容体・LPA 受容体に特異的な細胞内情報伝達系の存在もこれまでの報告から示唆されているため本研究には不可欠と判断した。M2 抗 FLAG 抗体では十分に FLAG-タグ付の EDG 受容体が確認できない細胞株もあったため Southern Blot 法で EDG cDNA が細胞株に integrate されたことを確認した。また HeLa 細胞を SPP あるいは LPA で刺激した場合の Erk の活性化程度と EDG 受容体を恒久的に発現する細胞株での SPP,LPA 刺激による活性化の程度を比較することで EDG 受容体が強発現していることが示された。

内因性 EDG 受容体を介した Erk 活性化

NIH3T3細胞、COS-1細胞では SPP、LPA いずれにも反応し刺激後 10 分をピークにして 30 分以内に消退する Erk の活性化を認めた。この Erk の活性化は百日咳毒素による 1 2 時間の前処置で抑制されることから、三量体 G T P 結合蛋白質 Gi 依存性であることが明らかになった。1 2 時間飢餓の後 SPP,LPA で刺激した場合には三量体 G T P 結合蛋白質の $\beta\gamma$ サブユニットからのシグナルを抑制する β ARK (b-adrenergic receptor kinase) のカルボキシ末端の共発現により Erk の活性化が抑制されることから $\beta\gamma$ サブユニットが関与していることが示された。HUVEC 細胞は SPP に対する Erk の活性化は LPA のそれよりも顕著であった。他の細胞と同様にこの Erk の磷酸化は百日咳毒素で抑制された。

Erk 活性化機構の検討

HUVEC を SPP で刺激した際の Erk の活性化機構を調べた。前述のように Erk 活性化は Gi 依存性であり $\beta\gamma$ サブユニットからのカスケードが必要と考えられたのでこれまで他の 7 回膜貫通型受容体で調べられている EGF 受容体の transactivation 機構を調べた。EGF 受容体のチロシンキナーゼ阻害薬 AG1478 では Erk の活性化は阻害されなかった。また、Src キナーゼの阻害薬である PP2 によっても阻害されなかった。また Src のカルボキシ末端 527Y の磷酸化により Src キナーゼを不活性化する Csk のアデノウイルスによる強制発現でも Erk の活性化は阻害されなかった。以上から、SPP 受容体を介した Erk の活性化には $\beta\gamma$ サブユニットから未知の pathway を通る可能性が示唆された。

EDG 受容体を介した Crk の磷酸化

EDG 受容体による細胞接着への効果を調べるためにアダプター分子 Crk の磷酸化を検討した。Crk は細胞接着斑で磷酸化 Cas に結合すると言われていたために SPP,LPA 刺激後の Crk の磷酸化を調べた。COS-1細胞、NIH3T3細胞では SPP,LPA とともに Crk の磷酸化を認めたが HUVEC では SPP 刺激にのみ Crk の磷酸化を認めた。HUVEC は LPA 刺激で弱いながらも Erk の活性化は認めることから Erk の活性化機構とは異なる三量体 G T P 結合蛋白質のサブユニットからのシグナルが Crk の磷酸化に重要であることが示された。

細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定による EDG アゴニスト及びアンタゴニスト評価系の構築及び評価

内因性の EDG を有する各種培養細胞の中から、蛍光 Ca^{2+} 指示薬 Fluo3-AM の細胞内への導入が容易であり、かつ SPP 及び LPA 刺激により誘起される $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が顕著である NIH3T3 細胞を選択し、EDG アゴニスト及びアンタゴニストの評価系を構築した。HeLa-EDG-1 細胞株の $[Ca^{2+}]_i$ 測定を行ったところ親株 HeLa よりも優位に SPP 刺激により $[Ca^{2+}]_i$ が増加することから今後同細胞株を使用することが可能であることが判明した。本方法を用いて種々合成 SPP 関連誘導体のアゴニスト及び

アンタゴニスト活性を測定した結果、文献上示唆されている SPP のリン酸基やアミノ基の重要性はもちろんのこと、脂肪鎖側鎖もアゴニスト活性を発現する上で不可欠であることが明らかとなった。一方で、2 級水酸基や二重結合はアゴニスト活性を減弱させるものの、必須ではないことが明らかとなった。また、SPP 受容体に対する親和性は極めてタイトな認識に基づいており、わずかな化学的修飾でもそのアゴニスト活性が消失するケースが多々見受けられたが、その中からアンタゴニスト活性発現に有効な置換基修飾を見出すことができた。

コンピュータケミストリーを活用した新規アンタゴニストの探索

アンタゴニスト活性を有する新規化合物を見出すべく、上記の合成 SPP 関連誘導体から得られた構造活性相関データを基にして、合理的創薬設計ソフトウェア Catalyst v.4.5 を用いて、SPP の薬理活性モデルを作成し、3 次元データベース検索によるアンタゴニスト候補化合物の探索を行った。さらに候補化合物の SPP 受容体親和性評価から SPP 受容体拮抗作用を有する非リン酸低分子化合物を見出した。

4. 考 察

EDG 受容体の細胞内情報伝達系について Erk の活性化機構と、細胞接着に関係すると予想される Crk のリン酸化について検討した。Erk 活性化は EDG-1 から EDG-5 までいずれも百日咳毒素に感受性があることからすべての受容体で Gi が重要であることが判明した。さらに詳細に Erk 活性化経路を調べたところ $\beta\gamma$ サブユニットが重要であるが、これまでの 7 回膜貫通型受容体で共通の $\beta\gamma$ からの EGF 受容体の transactivation 機構は EDG に関する限り認めなかった。Src ファミリー分子も $\beta\gamma$ の下流に位置しないことが示唆され Erk 活性化に関して今後も更に検討する必要があると思われる。アダプター分子 Crk は Src ホモロジー (SH2, SH3) を有する蛋白質でチロシンキナーゼ受容体のチロシンリン酸化部位に SH2 を介して結合あるいは Cas 蛋白質のリン酸化部位にやはり SH2 を介して結合する。この際 Crk の SH3 に結合している C3G あるいは DOCK180 が Crk と共に移動することでその下流にシグナルを伝えると考えられている。DOCK180 は低分子量 GTP 結合蛋白質 Rac の活性化を引き起こし細胞の葉状突起形成に関わる。つまり Crk の活性化に伴い細胞遊走接着が関与すると考えられた。これまでの研究では 7 回膜貫通型受容体から Crk の活性化機構は不明であり、EDG 受容体の下流での Crk を調べるにはその活性化機構を検討する必要がある。本研究では HUVEC の SPP 刺激による Crk リン酸化は百日咳毒素感受性であり、Gi からの情報伝達が不可欠であった。Gi も $\beta\gamma$ からの作用が主であり、しかも Erk の活性化機構と同様に EGF 受容体の transactivation によるものではないことも明らかとなった。Src による Crk のリン酸化に関しては PP2, Csk により Crk リン酸化がやはり同様に減弱しないことから Crk リン酸化機構をさらに解析する必要があると考えられた。Crk リン酸化に関してはさらに興味深い点が明らかになった。HUVEC では SPP 刺激で Erk のリン酸化・Crk リン酸化が Gi 依存性におきるのに対して LPA 刺激では Erk のリン酸化のみしか生じない。これは HUVEC の Gi からの情報伝達系がリガンド依存性に変化することである。

EDG 受容体受容体の作働薬・拮抗薬を開発するにはまずスクリーニング系を構築することが必要であったが、刺激依存性 (SPP あるいは LPA による) 細胞内 Ca の測定により作働薬のスクリーニングを、また、SPP, LPA による細胞内 Ca 上昇の抑制効果を調べることで拮抗薬のスクリーニングをそれぞれ行うことが可能となった。また EDG 受容体サブタイプの各種薬剤の選択性は今後の開発にとって非常に重要であり、Hela-EDG-1 細胞株を用いた実験では親株 Hela 細胞よりも SPP 刺激による Ca 上昇が増加することから同細胞を用いたサブタイプ特異性も今後のスクリーニングに有効であると考えられた。

SPP の構造解析に基づいて SPP のアミノ基や 2 級水酸基及びその立体配置が活性に与える影響を検討したところ同部位は受容体刺激には必須ではないものの様々な置換により活性を低下させること

が明らかになったため今後の検討課題となった。しかし、数多くの置換体をスクリーニングしていった過程で有効活性を有する置換体を本研究で得ることができたため今後同薬剤に対してのさらなる修飾・置換を繰り返していくことを計画している。合理的創薬設計ソフトウェアを用いて、SPPの薬理活性モデルを作成し、3次元データベース検索によるアンタゴニスト候補化合物の探索を行ったが、同データベースに登録されている薬剤のなかでSPPに構造類似の薬剤を選択でき、実際に同薬剤を用いて $[Ca^{2+}]_i$ 測定を行ったところSPP刺激にたいしての拮抗作用を有することが明らかになった。本研究でとったマススクリーニング系ではなくある程度構造類似に基づいた薬剤の選択を始めに行うことの有効性が証明された。マススクリーニング系では脂溶性物質は省かれていることが多くEDG受容体に関しては脂溶性であってもその受容体の特性から省くことは避けるべきであると考えた。今後構造類似の薬剤を解析し同薬剤を用いた $[Ca^{2+}]_i$ 測定を繰り返すことでよりEDG受容体に選択性のある薬剤が合成可能であると考えられた。

5. 結 論

EDG-1からEDG-5までの細胞株を樹立し、薬剤前処理あるいは薬剤刺激により細胞内Caを測定することにより拮抗薬・作働薬をスクリーニングする系を確立した。合理的創薬設計ソフトウェアを用いてSPPの構造から薬理活性モデルを作成し、3次元データベース検索によるアンタゴニスト候補化合物の探索を行い実際にEDG受容体が反応する候補薬剤を選択できた。EDG受容体からの細胞内情報伝達系として増殖刺激の指標であるErkの活性化と接着・遊走に関わる分子Crkの磷酸化を認めた。

6. 研究発表

1. Mochizuki N, Ohba Y, Kobayashi S, Otsuka N, Graybiel A. M. Tanaka S, and Matsuda M. Crk Activation of JNK via C3G and R-Ras. **J Biol Chem** 275:12667-12671, 2000.
2. Ohba Y, Mochizuki N, Yamashita S, Chan AM, Schrader JW, Hattori S, Nagashima K, and Matsuda M. Regulatory proteins of R-Ras, TC21/R-Ras2, and M-Ras/R-Ras3. **J Biol Chem** 275:20020-20026, 2000.
3. Ohba Y, Mochizuki N, Matsuo K, Yamashita S, Nakaya M, Hashimoto Y, Hamaguchi M, Kurata T, Nagashima K, and Matsuda M. Rap2 as a Slowly Responding Molecular Switch in the Rap1 Signaling Cascade. **Mol Cell Biol** 20:6074-6083, 2000.
4. Yamashita S, Mochizuki N, Ohba Y, Tobiume M, Okada Y, Sawa H, Nagashima K, and Matsuda M. CalDAG-GEFIII activation of Ras, R-Ras, and Rap1. **J Biol Chem** 275:25488-25493, 2000.
5. Yanai, K., Saito, T., Kakinuma, Y., Kon, Y., Hirota, K., Taniguchi-Yanai, K., Nishijo, N., Shigematsu, Y., Horiguchi, H., Kasuya, Y., Sugiyama, F., Yagami, K., Murakami, K., and Fukamizu, A. Renin-dependent Cardiovascular and -independent Brain Functions Revealed by Renin-deficient Mice. **J. Biol. Chem.** 275, 5-8, 2000.
6. Miyagishi, M., Fujii, R., Hatta, M., Yoshida, E., Araya, N., Nagafuchi, A., Ishihara, S., Nakajima, T., and Fukamizu, A. Regulation of Lef-mediated transcription and p53-dependent pathway by associating b-catenin with CBP/p300. **J. Biol. Chem.** 275, 35170-35175, 2000.

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社