

平成13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

創薬のための生体機能解析に関する研究

天然物由来シグナル伝達制御物質の探索と創薬への応用に関する研究

所 属 国立感染症研究所 生物活性物質部
研究者 上原 至雅

分担研究者

- | | |
|-----------------------|------|
| (1) キリンピール医薬探索研究所 | 新藤一敏 |
| (2) 慶應義塾大学理工学部 | 井本正哉 |
| (3) 昭和大学薬学部微生物薬品化学教室 | 野瀬 清 |
| (4) 富山県立大学工学部生物工学センター | 古米 保 |
| (5) 玉川大学学術研究所 | 奥田 徹 |

要旨

海産物や微生物由来の天然物の中に細胞内シグナル伝達の特異的阻害剤を探索した。癌細胞の足場非依存増殖や遊走の阻害物質として、 $\beta 2$ adrenoceptor agonist やサイリンドロール F を再発見した。一方、p16 と VEGF 遺伝子転写制御に作用する物質の探索系からもいくつかの活性物質を見出した。

1. 研究目的

細胞内シグナル伝達に作用する薬剤はさまざまな疾病の新しい治療薬になる可能性がある。本研究では、細胞の癌化や遊走等にかかわるシグナル伝達を標的に独自の活性評価系を開発し、海産物や微生物由来の天然物の中に新しい予防・治療薬リードを探索することを目的とした。

2. 研究方法

1) 新しい検索系とシグナル伝達制御物質の探索

(1) polyHEMA 細胞培養法による癌化シグナル特異的阻害剤の探索とその作用機構

癌細胞の足場非依存性増殖を簡便・迅速に定量するために開発した polyHEMA 細胞培養法を用いて、癌化シグナル特異的阻害剤の探索を行った。

(2) 癌細胞遊走阻害物質の探索と小細胞肺癌に選択的な治療薬探索

遊走活性の高いヒト食道癌 EC17 細胞を用い、「傷つけアッセイ」により微生物 2 次代謝産物から探索を行った。また、小細胞肺癌(SCLC)に選択的な治療薬探索には SCLC 株 Ms-1 細胞と Jurkat 細胞に微生物 2 次代謝産物を処理し、Ms-1 細胞にのみ細胞死を誘導する物質を探索した。

(3) 癌細胞浸潤性に関わる遺伝子転写調節物質の探索

ヒト p16 遺伝子の転写制御領域を含む DNA 断片をレポーターのルシフェラーゼ遺伝子に連結し、ヒト骨肉種細胞 (Saos-2) および胃癌培養細胞株 (TMK-1) に G418 耐性遺伝子と共に導入して、これらの遺伝子を安定に保持して発現する細胞クローンを用い、放線菌、糸状菌培養液および生薬成分を用いて 96 穴マイクロプレートによる誘導物質の検索を行った。また、VEGF 遺伝子の転写制御領域で重要と考えられるハイポキシア応答エレメント (HIE) を結合させたルシフェラーゼ遺伝子を構築し、CHO-K1 細胞にネオマイシン耐性遺伝子と共に導入して安定にレポーターを保持し、低酸素状態に応答する細胞株を分離した。この細胞で低酸素状態により上昇するルシフェラーゼ活性を抑制する物質の検索を行った。

2) サンプルの調整と活性物質生産株の大量培養および活性物質の単離精製

(1) 海産物

天然物資源としての探索の歴史が浅く未知の生理活性物質の宝庫である海産物については、海綿エキスを中心とした 800 の海産物エキス (CHCl₃:MeOH(1:1)抽出物及び熱 MeOH 抽出物) を polyHEMA アッセイに供した。

(2) 放線菌

放線菌からは、polyHEMA アッセイにおいてアオキの葉由来放線菌の生産する活性物質 (TT-2149 物質) を見出していたが、生産性が低く単離・精製を困難にしていた。そこで、生産性を高めるための培地検討を行った。TT-2149 物質は、極性の高い脂溶性物質で、複数の活性成分が併産されるが、各成分は HPLC 分析で分別定量できる。そこで、生産培地の炭素源と窒素源に分けて組み合わせて検討し、生産性の高い炭素源と窒素源の組み合わせを調べた。また、新たな探索源として中国産のチップ状乾燥生薬 100 種類、富山県薬用植物園で採集した栽培薬用植物 61 種類、富山県内の野生或いは栽培植物 20 検体から放線菌の分離を行い、得られた放線菌を 3 種類の液体培地で培養し、n-ブタノール抽出エキスを調製した。これに、既に保存してある植物由来の放線菌 98 株を加え、アッセイサンプルを 596 検体調製し polyHEMA アッセイに提供した。

(3) 糸状菌

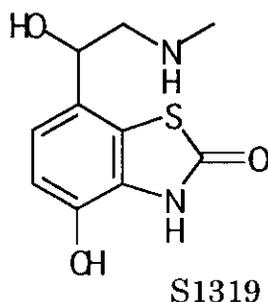
玉川学園内、津軽地方、八丈島などで採集した土壌、泥炭、落葉、朽ち木、キノコなどを用い、洗浄濾過法、表面殺菌法、直接分離法などで菌類を分離し、純粋培養株を確立した。この課程ではとくに内生菌、植物病原菌、落葉分解菌、菌類寄生菌、核菌類をターゲットにした。分離株は、仮同定をして、取捨選択し、10%グリセリン水に懸濁して -80°C で超低温保存した。保存株を適宜スラントに復元し、固体培地 (2 種: 押し麦培地とソバの実を用いた培地) と液体培地 (2 種: グリセリンとペプトン (GP 培地) とでんぷんと大豆粉 (SS 培地)) を 20 g または 20 ml 用い、容器は 250 ml 容三角フラスコを用いて静置培養した。培養温度は 25°C 、培養日数は 12 から 15 日である。培養物は等量のブタノールで抽出し、ブタノール層を 96 穴マイクロプレートに $150\sim 200\ \mu\text{l}$ ずつ分注し、 40°C で減圧濃縮乾固した。これを無酸素下、 -80°C でサンプル・ライブラリーとして保存し、スクリーニングに供試した。

3. 研究成果

1) polyHEMA 細胞培養法による癌化シグナル特異的阻害剤の探索

(1) 海産物からの活性物質

800 エキスのうち、乳がん細胞に特異的に増殖抑制作用を示すものとして、No. 9103206, 9103421, 9103556 が得られた。予備精製 (溶剤抽出、P.TLC 等) の結果、No. 9103556 は各細胞間での特異性が低いことが判明したため、精製は中止した。また物性的挙動から、No. 9103206, 9103421 に含まれる活性物質は同一と判断された。キリン社に在庫のあった 9103206 粉末 15 g から、ブタノール抽出、シリカゲルカラム、逆相 HPLC カラムを用いて活性物質の完全精製を実施した結果、活性本体を S1319 (鈴木、新藤らが $\beta 2$ -adrenoceptor agonist として見出した新規化合物) と同定した。(図) S1319 の乳がん細胞 MDA-MB231 の polyHEMA プレート (足場非依存性増殖) における増殖抑制作用は IC_{50} $10\ \text{ng/ml}$ であった。一方で同じ細胞の plastic プレート (足場依存性増殖) では $10\ \mu\text{g/ml}$ でも全く増殖抑制作用を示さなかった。



(2) 放線菌からの活性物質

TT-2149 物質の複数活性成分は、共通した UV スペクトルを示した。それらの中で、最も生産性が高い成分 (TT-2149-A) を、シリカゲルカラム、逆相シリカゲル中圧カラム、HPLC 分取カラムクロマトグラ

フィーを使い単離した。得られた純粋な TT-2149-A 物質は、癌細胞の足場非存在下での増殖を選択的に阻害した。得られた量は NMR 測定に十分ではなかったが、LC/MS で分子量 1,669 と推定された。また、その UV スペクトルの特徴と分子量より既知抗生物質のデータベース検索を行い、該当する既知化合物が認められなかったため、活性成分の新規性が強く示唆された。次に、この時点での培養条件では構造解析に必要な量の活性物質を単離することが極めて困難であったため、培地組成の検討を行った。その結果、窒素源としてコーンステープリカー、炭素源にマルトースを用いた時に、TT-2149-A 以外の成分として、TT-2149-B と C が約 20 倍の高生産量で得られることが見出された。

(3) 糸状菌からの活性物質

合計 3,400 株以上を純粋分離した。このうち、津軽地方の泥炭から分離した *Tolypocladium cylindrosporum*, *Acremonium guillematii*, *Clitocybe* sp. や *Lactarius* sp. から分離した *Hypomyces armeniacus* などは日本新産種である。八丈島の土壌から分離した *Idriella* sp., 八丈島の朽ち木より分離した *Chaetosphaeria* sp. は新種と考えられる。新しい分離法の検討結果、電解水を用いた表面殺菌法を開発した。これにより、植物内生菌のみならず表面に生息する菌も効率よく分離できた。固体培地 2 種、液体培地 2 種を用いて培養した培養物をブタノール抽出し、合計 10,000 サンプル以上のスクリーニングサンプル・ライブラリーを構築した。このライブラリーから 5,440 サンプルを polyHEMA スクリーニングに供試した。その結果、55 サンプル (32 株) に活性が認められた。麦培地で活性を示したものは 24 株、そば培地は 12 株、GP 培地 18 株、SS 培地 12 株であった。アッセイ並びに培養の再現性を示し、予備分画に進めたものは、F 2420、F 2422、F 2469、F 2571、F 2594、F 2595、F 2699、F 2705、F 2711 の合計 9 株であり、いずれも菌類寄生菌の *Hypomyces* 属菌株であった。

2) 微生物が生産する癌細胞遊走阻害物質の探索と生物活性評価

癌細胞遊走阻害物質スクリーニングの結果、カビの一株が遊走阻害物質を生産することを見いだした。そこで活性物質を生産するカビの培養を行い、培養ろ液を等量の酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル抽出液を減圧下、濃縮して得られた残留物から各種クロマトグラフィーを用いて活性成分の精製を行い、0.4mg の活性成分を単離した。構造解析の結果、本化合物はサイリンドロール F であることが判明した。一方、遊走阻害剤として既に見いだしているマイグラストチンの立体絶対構造を明らかにした。さらにマイグラストチンと種々の制ガン剤との併用効果をヒト小細胞肺ガン Ms-1 細胞で検討したところ、Vinblastine(VBL)にのみ効果増強が見られた。この併用効果はマイグラストチンおよび VBL が単独ではアポトーシスを誘導しない濃度で見られた。さらに併用効果を示した VBL の濃度では G2/M 期停止や Bcl-2 のリン酸化を誘導しないが、マイグラストチンとの併用によってもこれらの作用は観察されなかったことから、マイグラストチンは通常の VBL のアポトーシス誘導機構とは異なる経路でアポトーシスを誘導する可能性が示唆された。

3) 小細胞肺癌に選択的な治療薬の探索

SCLC に選択的に効果を示す物質の探索のために、SCLC の Ms-1 細胞と既知の薬剤感受性がほぼ等しいヒト白血球株 Jurkat 細胞を用いてスクリーニングを行った。その結果、カビの 1 菌株の培養液に Ms-1 細胞に選択的に毒性を示す活性を見出した。活性成分の生産菌の培養液から菌体を回収し、有機溶媒による抽出、各種クロマトグラフィーを用いて、活性物質 13.4 mg を得た。活性物質を各種細胞に添加し細胞毒性活性を検討した結果、Ms-1 細胞に最も低濃度で細胞死を誘導したが、SCLC である H69 細胞、Ms-13 細胞に対する細胞毒性効果は低く、活性物質が SCLC に選択的に細胞死を誘導しているわけではないことが示唆された。さらに、活性物質の高分子合成に与える影響を検討したところ、細胞毒性感受性の異なる細胞では DNA 合成阻害濃度に違いがみられた。しかし、RNA 合成及びタンパク質合成阻害濃度は違いはなく、RNA 合成を最も低濃度で阻害していた。よって、薬剤感受性の差が薬剤取り込み量によるものではないことが示唆された。また、この活性物質は Ms-1 細胞にミトコンドリアからの cytochrome c の放出を促し、caspase-3 の活性化を伴うアポトーシスを誘導した。現在は NMR、結晶化による構造解析を行っている。

4) p16/ルシフェラーゼをレポーターとした探索

p16/ルシフェラーゼの系による探索の結果、この遺伝子転写を誘導する薬物として toyocamycin が同定された。この物質は既に抗真菌剤として報告があるが、動物細胞への作用に関する研究は殆どなされて

いない。toyocamycin は、正常ヒト繊維芽細胞に処理すると p16 mRNA の誘導を起こすだけでなく、細胞の老化形態を誘導し、細胞老化のマーカーである酸性 β -ガラクトシダーゼ活性の上昇も引き起こした。また、toyocamycin による p16 遺伝子誘導に関わる転写制御領域は、ヒト p16 遺伝子 5' 上流-111~-54 bp の領域にあり、この範囲の Sp1 結合配列が転写誘導に重要であることが明らかとなった。正常細胞の老化に伴う p16 遺伝子誘導には、Est-1 配列に関わることが報告されているが、toyocamycin によるこの遺伝子発現は正常の細胞老化とは異なるシグナルにより誘導されると考えられる。

5) VEGF/ルシフェラーゼをレポーターとした探索

VEGF 遺伝子の転写制御領域で重要と考えられるハイポキシア応答エレメント (HIE) を結合させたルシフェラーゼ遺伝子を構築し、CHO-K1 細胞にネオマイシン耐性遺伝子と共に導入して安定にレポーターを保持し、低酸素状態に应答する細胞株を分離した。この細胞で低酸素状態により上昇するルシフェラーゼ活性を抑制する物質の検索を行った。探索用のサンプルとしては放線菌培養液および生薬抽出物を用い、96 穴プレートによるスクリーニングを行った。これまで約 1200 種類の生薬抽出物の活性を評価し、フラボノイド化合物に抑制活性が認められている。この物質は、レポーターの活性化を抑制するだけでなく、低酸素による VEGF mRNA の誘導も抑制し、この物質は *in vitro* の血管内皮細胞の管腔形成を阻害した。血管新生阻害によりがん細胞の浸潤・転移を防止する薬物となることが期待される。

4. 考察

乳がん細胞の増殖を S1319 が抑制する作用を検討するため、市販の β 2 adrenoceptor agonist である salbutamol, isoprenol の作用を検討した結果、これらの化合物にも足場非依存性増殖における増殖抑制作用が認められた。従って、おそらく β 2 adrenoceptor を介したシグナル伝達機構を介して増殖抑制作用を示すと考えられる。このような β 2 adrenoceptor agonist の作用は新知見であり、全く新たな乳がん治療薬の切り口が見つかったのではないかと考えられた。 β 2 agonist 薬剤は心臓への副作用が問題である。特に抗癌剤として使用される場合はシステミックな投与が予想されるためこの点は非常に重要であるが、S1319 は現在臨床で使用されている isoprenol に比較して約 100 倍 β 1/ β 2 選択性 (β 1 adrenoceptor agonist 作用が心臓への副作用の要因) が優れており、副作用も少ないことが期待された。

TT-2149 物質の生産培地検討で、生産性を 20 倍高めることに成功したが、その生産性は未だに低く、大量培養を繰り返し活性成分の単離・精製を行う必要がある。また、HPLC 分析での保持時間と UV 吸収スペクトラムから、類縁体は少なくとも 3 成分は存在し、窒素源を変えることで、生産される成分比が変わることも判明した。加えて、乾燥生薬と栽培薬用植物から放線菌の分離に成功した (我々の知る限り、報告例は無い)。この過程で、10 月以降に採集した栽培薬用植物と野生植物には内生糸状菌が非常に多く、放線菌の分離を困難としていた。このことは、植物に内生する微生物は季節により変動しているとも考えられ、スクリーニングの結果を見ながら、春から夏場の植物内生微生物分離を試みる予定である。

一方、菌類に関しては対象を明確にして効率よい分離法を開発し、新種、日本新産種と思われる菌類を分離できたことは新規物質発見に寄与する大きな一歩と考えられる。また 5,440 サンプルから期待できるヒットが 9 株得られたことは意義があり、しかもいずれも *Hypomyces* 属菌株であったことは興味深い。本属は、菌類寄生菌として知られ、特定の担子菌あるいは子囊菌から発生することから、特殊な代謝活性を有する可能性がある。また分離頻度が低いか培養が困難で研究が遅れており、期待できる属の一つである。最初に活性を示した 55 サンプルの内訳で、生産培地に偏りがなく、1 つの培地のみで活性を示した菌株が多く、3 培地あるいは 4 培地で活性を示した菌株は数株であったことは、これら 4 種の培地を使用する意義があることを示している。

癌細胞の遊走を阻害する薬剤は、抗転移活性や血管新生阻害活性が期待される。カビ培養液から遊走阻害剤として単離したサイリンドロール F は、ファルネシルトランスフェラーゼの阻害活性が報告されている。また、EC17 細胞は他の食道癌細胞に比べて極めて高い遊走能を持っているが、Ras mRNA の発現量も著しく高かった。このことからことから、EC17 細胞の遊走には Ras の関与が示唆された。一方、小細胞肺癌細胞に選択性を示す薬剤のスクリーニングから見いだされた化合物は、マススペクトルの結果と NMR スペクトルの結果が一致しないことから構造解析は難航している。現在は、結晶化による構造解析を試みている。

癌細胞浸潤性に関わる遺伝子転写調節物質の探索では、今年度は新規の有効物質を見出すことはできなかったが、ここで用いた探索系は迅速でハイスループットの探索系と考えられ、新規の生理活性物質の発見につながるものと考えられる。特に、低酸素応答エレメントを用いたルシフェラーゼレポーターの探索系は世界的にもユニークであり、本年度の探索でも血管新生の抑制物質を植物由来成分からいくつか見出すことができた。このレポーターを用いて同定された活性物質は、ヒト血管内皮細胞の管腔形成も阻害することが明らかとなっており、*in vivo*においても抗腫瘍活性を持つことが期待できる。

5. まとめ

創薬のリード化合物を見出すため、新しい分子標的の研究、活性評価系の開発、活性物質の探索、単離、生物活性の研究を行った。polyHEMA の系を用いて、海産物から新たな抗癌剤を探索した結果、海綿エキス No.9103206 より、乳がんの特異的に増殖抑制作用を有する化合物として S1319 を単離した。本化合物は β 2 adrenoceptor agonist 作用により、増殖抑制作用を示すことが示唆された。一方、放線菌由来の TT-2149 物質の生産培地検討で、生産性を 20 倍高めることに成功し、少なくとも 3 種類の類縁体の併産を確認した。野生及び栽培植物に放線菌が内生するという知見に加え、乾燥生薬、栽培薬用植物からも放線菌の分離に成功した。また、国内各地の様々な基質を採集し、種々の方法で糸状菌を分離した。この過程で、新しい分離法を開発し、また新種、日本新産種を発見することができた。これらの分離菌株を 4 種の培地で培養して、その抽出物のライブラリーを構築した。ライブラリーの抽出物合計 5,440 サンプルをスクリーニングに供試し、55 サンプル (32 株) のヒットを得た。その後の再現性などの検討の結果、期待される 9 株については、単離精製を行っているところである。

癌細胞の遊走阻害物質としてサイリンドロール F を再発見し、また同じく遊走阻害物質のマイグラストチンの絶対構造を明らかにし、マイグラストチンがビンブラスチンのアポトーシス誘導効果を増強することが明らかとなった。一方、小細胞肺癌細胞に選択的アポトーシス誘導物質の探索の過程でカビが生産する活性物質を得た。現在構造解析中である。遺伝子の転写制御領域を持つレポーターの発現を指標とした探索系を構築し、新規抗がん剤の探索から、p16 遺伝子発現誘導物質としては、toyocamycin, cinerubin B が同定された。また、VEGF 遺伝子のハイポキシア応答エレメントの活性を阻害する物質の探索からは、生薬成分のある種のフラボノイドに阻害活性が認められた。この物質は *in vitro* の血管内皮細胞の管腔形成を阻害した。

6. 研究発表

1. Takemoto, Y., Nakae, K., Kawatani, M., Takahashi, Y., Naganawa, H. and Imoto, M. Migrastatin, a novel 14-membered ring macroride, inhibits anchorage-independent growth of human small cell lung carcinoma Ms-1 cells. *J. Antibiotics* 54: 1104-1107, 2001.
2. Nishiya, N., Tachibana, K., Shibanuma, M., Mashimo, J., and Nose, K. Hic-5 reduced cell spreading on fibronectin: Competitive effects between paxillin and Hic-5 through interaction with focal adhesion kinase. *Mol. Cell. Biol.* 21: 5332-5345, 2001.
3. Shibanuma, M., Ishono, K., Sakamoto, N., Nose, K. Accumulation of focal adhesion protein Hic-5 in the nucleus by hydrogen peroxide. *Acta Histochem. Cytochem.* 34:259-264, 2001.
4. Okuda, T., Yajima, K., Yamamoto, K., Watanabe, K. and Ueki, K. Current status of natural product screening activities in Japan – including some of our experience. *Proceedings of 4th Asia-Pacific Biotechnology Congress, Waterfront Cebu City Hotel, Philippines, May 16-18* 19-29pp. 2001.
5. Hori, H., Kajiura, T., Igarashi, Y., Furumai, T., Higashi, K., Ishiyama, T., Uramoto, M., Uehara, Y. and Oki, T. Biosynthesis of hibarimicins. I. ¹³C-Labeling Experiments. *J. Antibiotics* 55, 46-52, 2002.
6. Kajiura, T., Furumai, T., Igarashi, Y., Hori, H., Higashi, K., Ishiyama, T., Uramoto, M., Uehara, Y. and Oki, T. Biosynthesis of hibarimicins. II. Elucidation of biosynthetic pathway by cosynthesis using blocked mutants. *J. Antibiotics* 55, 53-60, 2002.

7. Igarashi, Y., Kajiura, T., Furumai, T., Hori, H., Higashi, K., Ishiyama, T., Uramoto, M., Uehara, Y. and Oki, T. Biosynthesis of hibarimicins. III. Structures of new hibarimicin-related metabolites produced by blocked mutants. *J. Antibiotics* 55, 61-70, 2002.
8. Cho, S. I., Fukazawa, H., Honma, Y., Kajiura, T., Hori, H., Igarashi, Y., Furumai, T., Oki, T. and Uehara, Y. Effects of hibarimicins and hibarimicin-related compounds produced by *Microbispora* on v-src kinase activity and growth and differentiation of human myeloid leukemia HL-60 cells. *J. Antibiotics* 55, 270-278, 2002.
9. Yamada, T., Iwamoto, C., Yamagaki, N., Yamanouchi, T., Minoura, K., Yamori, T., Uehara, Y., Andoh, T., Umemura, K. and Numata, A. Leptosins M-N₁, cytotoxic metabolites from *Leptosphaeria* species separated from a marine alga. Structure determination and biological activities. *Tetrahedron* 58, 479-487, 2002.
10. Umeyama, T., Nagai, Y., Niimi, M and Uehara, Y. Construction of FLAG tagging vectors for *Candida albicans*. *Yeast* 19, 611-618, 2002.
11. Igarashi, Y., Sekine, A., Fukazawa, H., Uehara, Y., Yamaguchi, K., Endo, Y., Furumai, T. and Oki, T. Anicequol, a novel inhibitor for anchorage-independent growth of tumor cells from *Penicillium* sp. TP-F0213. *J. Antibiotics*, in press.
12. Fukazawa, H., Noguchi, K., Murakami, Y., and Uehara, Y. Mek Inhibitors restore anoikis-sensitivity in human breast cancer cell lines with constitutively activated Erk pathway. *Mol Cancer Therap.* in press.
13. Murakami, Y., Fukazawa, H., Kobatake, T., Yamagoe, S., Takebe, Y., Tobiume, M., Matsuda, M., and Uehara, Y. A mammalian two-hybrid screening system for inhibitors of interaction between HIV Nef and the cellular tyrosine kinase Hck. *Antiviral Res.* in press.
14. Shintani, M., Okazaki, A., Masuda, T., Kawada, M., Ishizuka, M., Doki, Y., Weinstein, I. B. and Imoto, M. : Overexpression of Cyclin D1 Contributes to Malignant Properties of Esophageal Tumor Cells by Increasing VEGF Production and Decreasing Fas Expression. *Anticancer Res.* in press.
15. Shibanuma, M., Iwabuchi, Y. and Nose, K. Possible involvement of Hic-5, a focal adhesion protein, in the differentiation process of C2C12 myoblasts. *Cell Str. Functions*, in press.
16. Egawa, K., Kurihara, Y., Ito, T., Matsumoto, M. and Nose, K. Induction of p16^{INK4a} transcription and of cellular senescence by aclacinomycin-derivatives and cardiac glycosides. *Biol. Pharm. Bullet.* in press.

7. 知的所有権の取得状況

なし

平成13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

創薬のための生体機能解析に関する研究

平成14年9月10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