

平成13年度

# エイズ医薬品等開発研究

## 重点研究報告書

## 第2分野

エイズワクチン等エイズ発症防止薬の  
開発に関する研究

## 潜伏HIV-1の再活性化に関わるアクセサリ遺伝子を標的としたエイズ発症阻止技術の開発

所属 理化学研究所 分子ウイルス学研究ユニット  
研究者 間 陽子

### 分担研究者

- |                           |                  |
|---------------------------|------------------|
| (1) 理化学研究所 分子ウイルス学研究ユニット  | 間 陽子、蒲田 政和、我妻 昭彦 |
| (2) 横浜市立大学 医学部 構造生物学研究室   | 緒方 一博            |
| (4) 大阪府立大学 農学生命科学研究科      | 渡来 仁             |
| (5) 国立感染症研究所 免疫部 感染免疫室    | 横田 恭子            |
| (6) 京都大学 ウイルス研究所 感染病態研究領域 | 三浦 智行            |
| (3) チッソ株式会社 新事業開発室        | 森田 裕             |

### 1. 研究要旨

アポトーシス活性を有する HIV-1Vpr 変異体を利用した遺伝子治療用ベクターを構築し、HIV-1 感染細胞を特異的に破壊することに成功した。Vpr の核移行機序を明らかにすると同時に、新しい機能としてスプライシング阻害効果を発見した。また、エイズ発症阻止技術の効果を感染個体のレベルで評価するアカゲザルの感染実験系を確立した。

### 1. 研究目的

多剤併用療法が有効に作用して、血中のウイルス量が検出限界以下になった HIV 感染者においても、潜伏感染 HIV-1 を完全に排除できていない事実が指摘されている。そこで、多剤併用療法の効果を補うためにも、主たる潜伏感染細胞である静止期 T細胞やマクロファージからのウイルスの再活性化を制御する事による新たなエイズ治療法の実現に取り組むことが本研究の目的である。具体的には、HIV-1Vpr 変異体の強いアポトーシス誘導能によって潜伏感染細胞を排除し、一方、Vpr の核局在能を競合的に阻害するペプチドをコードする発現ベクターによって HIV-1 の感染を阻止する。さらに、ウイルスの再活性化を制御する方法へと結びつく基礎データを得るために、Vpr と Nef の機能発現に関わる細胞内因子の検索とそれらを介して制御されるシグナル伝達の分子機構を解明する。最後に、エイズ治療法開発のためのサルの評価系の確立と有効な遺伝子治療用リポソームベクターを研究開発を目指す。

### 2. 研究方法

- ①Vpr と SAP145 との相互作用の解析： HIV-1 感染性 DNA クローン pNL43 由来の vpr 遺伝子および各種欠失変異体に FLAGtag を連結後、発現ベクターに挿入し、ヒト子宮頸部癌由来 HeLa 細胞に electroporation 法にて一過性に強制発現させた。次に、抗-FLAG 抗体を用いて免疫沈降後、抗-SAP145 抗体でウェスタンブロッティングを行った。
- ②Vpr による  $\alpha$ -globin mRNA 前駆体のスプライシングへの影響： FLAGtag を連結した Vpr および各種欠失変異体発現ベクターを HeLa 細胞に一過性に強制発現させた。 $\alpha$ -globin mRNA 前駆体の配列特異的プライマーを設計し、RT-PCR 法を行い、Vpr の発現により  $\alpha$ -globin mRNA 前駆体中のイントロンが除去されず残るか否かを調べた。
- ③GST-Vpr 蛋白質の発現と精製： GST 融合蛋白発現用ベクター pGEX-5X3 に vpr 遺伝子を挿入し、大腸菌株 ER2566 に transformation して 37°C で培養し、最終濃度 0.1 mM IPTG を加えて発現誘導させた。回収した大腸菌の lysate を glutathione (GSH)-Sepharose 4B beads に吸着させた後、GST-Vpr

を溶出し、限外濾過膜を使って濃縮した。

- ④ SAP145 の発現 : pIVEX2.3 ベクターに SAP145 遺伝子を挿入し、in vitro translation 法で SAP145 を合成し、SDS-PAGE で分離し、抗 SAP145 抗体を用いて Western Bolt を行った。
- ⑤ リポソームの作成条件の検討 : 遺伝子導入効率の高い陽性荷電リポソームの脂質組成の検討、細胞と特異的に融合できるリポソームの検討およびマンノースを持つ人工糖脂質の合成を行った。
- ⑥ C81 発現ベクターの作成とその発現の確認 : pHIV-LTRbsr の LTR 下流に、HIV-1 感染性クローン pNL432 の vpr、C81 変異体、及びコントロールとして、アポトーシスを欠失した C81 のロイシンジッパー変異体である C81I74 を Flag-tag 付きで挿入した。これらのベクターを Tat 発現ベクター CV-1 と HeLa 細胞に electroporation 法にて導入し、Vpr 及び C81、C81I74P の発現を、Flag 染色による免疫蛍光抗体法及びウエスタンブロットで検出した。
- ⑦ C81 発現ベクター封入リポソームの作成 : ベクター封入陽性荷電リポソームとして TMAG リポソームを調整した。TMAG、DOPE、DLPC、それぞれの脂質をモル比 1:2:2 になるように混合し、evaporation を行い、脂質膜を作製する。脂質膜に PBS と DNA を入れ、vortex をかけて、DNA 封入 TMAG リポソームとした。
- ⑧ 抗-gp120 モノクローナル抗体(mAb)結合リポソームの調整 : TMAG、DOPE、DLPC、3 つの脂質と、さらにピリジルジチオ基を結合するため DPT-DPPE を 1:2:2:0.1 の比率で混合し、evaporation を行い、脂質膜を作製した。この脂質膜に PBS と DNA を入れ、vortex をかけて、ピリジルジチオ基結合 DNA 封入 TMAG リポソームとした。一方、抗-gp120mAb は、SPDP でピリジルジチオ基を導入し、DTT で還元し、チオール化を行った。
- ⑨ HIV-1 感染細胞への発現ベクターの導入 : CD4 陽性 T 細胞である CEM 細胞に HIV-1 株の NL432 を感染させ、継代培養後、感染細胞  $2 \times 10^6$  個に対して陽性荷電リポソームに封入した plasmid 0.8  $\mu$ g を混和し、オーバーナイトで培養した。
- ⑩ C81 によるアポトーシス誘導機構の解明 : HeLa 細胞に各種発現ベクターを導入し、36 時間後に細胞抽出液を調製し、Caspase-3、-8 及び-9 の酵素活性を測定した。Mitocapture 試薬を用いてミトコンドリア膜電位の変化を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。ミトコンドリア傷害による cytochrom C の細胞質への流出はミトコンドリアと細胞質画分を分画後、抗-cytochrom C 抗体により Western Blotting を行い測定した。
- ⑪ pull-down assay : N末端側に GST を持つ組換え型マウス Imp  $\alpha$ 2 (GST-Imp  $\alpha$ ) 及びマウス Imp  $\beta$ 1 (GST-Imp  $\beta$ ) を E. coli BL21 (DE3) 株で発現させ、glutathione (GSH)-Sepharose beads にて回収した。野生型及び各種変異型 Vpr 蛋白、或いは Vpr の 2 つの  $\alpha$ -helix ドメインと GFP との融合蛋白 ( $\alpha$ H1-GFP 及び  $\alpha$ H2-GFP) を in vitro translation 或いは酵母発現系で調製した。
- ⑫ nuclear import assay : 核移行解析は Digitonin 処理 HeLa 細胞を用いた nuclear import assay で行った。組換え型 Imp  $\alpha$ 、Imp  $\beta$ 、p62、POM121、NUP153、及び NUP155 を N末端側に GST を持つ融合蛋白として大菌に発現させた。Imp  $\alpha$  及び  $\beta$  は protease にて GST を切断除去した。Vpr の各ドメイン及びそれらの点変異体を、N末端側に GST、C末端側に GFP を持つ融合蛋白として調製した。Energy 供与系としては creatine phosphokinase、creatine phosphate 及び ATP を加えたものを使用した。
- ⑬ 細胞 : Nef を恒常的に発現するヒト T 細胞株 2 種類 (CEM/Nef1.0, CEM/Nef3.7) と対照となる空ベクター導入株 (CEM/EF-BOS) を用いた。末梢血単核球より CD14 陽性細胞を MACS で分離して単球由来マクロファージあるいは樹状細胞を分化誘導した。CD14 陰性非付着細胞より CD4 陽性 T 細胞を分画 (93-95%) した。
- ⑭ Nef 発現ベクター : Nef 発現センダイウイルスベクター (阪大・塩田教授より供与) を T 細胞に感染させた。Tet-off システムの transactivator プラスミド (国立がんセンター・横田部長より供与) を EF promoter に組換えて発現させたアデノウイルス (pAxEF-TA) と T2-Nef 発現ベクターと EGFP を IRES をはさんで発現させたアデノウイルス (pAxT2-nef-IRES-EGFP) を作成した。
- ⑮ 遺伝子発現解析 : Nef 発現によって変化する細胞遺伝子の発現の解析は免疫 DNA アレイメンブラン (東洋紡) を用い、約 800 個の遺伝子の発現プロファイルを解析した。得られた結果から PCR プライマーを作成し、全 RNA より半定量的 RT-PCR を行ってその発現量を解析した。
- ⑯ FACS 解析 : 各標識抗体を用いて、細胞表面の CD4 および MHC class I 抗原を染色した。また

、4% formalin で固定した後 0.5% Saponin/PBS/2%FCS で処理して膜を permeabilize し、モノクローナル抗 Nef 抗体(F3)とヤギ PE 標識抗マウス IgG1 抗体を用いて染色した。

- ⑩ 各種遺伝子改変 SHIV の作製： 各種遺伝子改変 SHIV を作製し、in vitro の培養細胞系における宿主細胞との相互作用の分子機序を解析する。次にアカゲザルに接種実験を行い、in vivo での感染病態について血漿中ウイルス RNA 量、末梢血リンパ球からのウイルス分離、CD4 陽性 T 細胞数の解析、抗体反応およびリンパ系組織における病理組織学的検索等を行なう。

### 3. 研究成果

#### 1) Vpr 蛋白と相互作用する細胞内因子の同定と高次構造解析

最近申請者らが、yeast two-hybrid 法を用いて Vpr 結合性細胞内因子として単離に成功した SAP145 が、細胞内で Vpr と相互作用するか否かを検討した (図 1)。HeLa 細胞を用いて強制発現させた Vpr を免疫沈降した結果、SAP145 の共沈が観察された。次に SAP145 との結合に必要な Vpr 側のドメインの同定を試みた。Vpr は 96 アミノ酸残基からなる分子で 5 つのドメインから構成されるが、その中でも機能の発現に関与する 2 つの  $\alpha$ -helix ドメイン ( $\alpha$ H1:17-34 位、 $\alpha$ H2:46-77 位) およびのアルギニンに富む領域 (77-96 位) を GFP に連結し、HeLa 細胞で同様に免疫沈降を行った。その結果、SAP145 は 77-96 領域でのみ相互作用した。また、Vpr の C 末端欠失変異体 C81 (1-81 位) で同様に実験したところ、SAP145 との結合が検出されなかった。このことから Vpr は SAP145 と Vpr の C 末端領域を介して相互作用している可能性が示された。

SAP145 は、スプライシングの際、mRNA 前駆体のブランチ部位に結合する U2snRNP に含まれる SF3b を構成する分子であることから、Vpr との相互作用によりスプライシングに何らかの影響が及ぼされるものと予想される。そこで、 $\alpha$ -globin mRNA 前駆体を材料としてそのスプライシングにおける Vpr の阻害効果を RT-PCR 法で調べた (図 2)。イントロン 1 特異的プライマーを用い、nested-PCR を行った結果、Vpr および C81 導入によりバンドが検出された。また、 $\alpha$ H2 領域および 77-96 領域を導入した場合でも同様のバンドが検出された。このバンドをクローニングし、塩基配列を決定した結果  $\alpha$ -globin mRNA 前駆体からイントロン 2 のみがスプライシングにより除去された分子であった。一方、コントロールベクター導入細胞ではイントロンを含むバンドは検出されなかった。以上の結果から、Vpr は  $\alpha$ -globin mRNA 前駆体のイントロン 1 に対してそのスプライシングを阻害する作用があること、この阻害作用は Vpr の C 末端領域または  $\alpha$ H2 領域が関与する現象であることが明らかとなった。

Vpr の高次構造と機能との関連性を明確にするために、Vpr と SAP145 とが結合した状態での構造解析を最終目標に、Vpr と SAP145 を純度の高い精製蛋白を大量に得るために、大腸菌内で Vpr 及び SAP145 を大量発現させた。その結果、Vpr を GST-Vpr 融合蛋白質として発現させ、GSH-Sepharose beads に吸着させ精製することに成功した。一方、GST-SAP145 を発現させた大腸菌の lysate を SDS-PAGE で分離後し coomassie brilliant blue 染色を行ったが、GST-SAP145 の予想分子量の位置にバンドは認められなかった。また、抗-GST 抗体及び抗-SAP145 抗体を用いて Western Bolt を行なったが、GST-SAP145 蛋白の分子量に一致する位置にバンドは検出されなかった。次に、in vitro translation 法で大量発現を行なうために、pIVEX2.3 ベクターに SAP145 遺伝子を挿入、in vitro translation 法で SAP145 を合成させ、抗-SAP145 抗体を用いて Western Bolt を行った。GST-SAP145 蛋白の予想位置にバンドが検出され、合成が成功していることを確認できた。現在、精製 Vpr の X 線結晶構造解析法を行うための大量精製の準備を進めている。

#### 2) HIV 感染の治療及び予防に有効な Vpr を用いた遺伝子治療用リボソームベクターの開発

HIV-1Vpr の C 末端欠失変異体 C81 の持つ著しいアポトーシス活性を利用した HIV-1 感染の治療および予防に有効な遺伝子治療用リボソームベクターの構築を行なうために、陽性荷電リボソームの条件検討を行った。陽性荷電リボソームにおいて、TMAG:DLPC:DOPE のモル比 1:2:2 からなるリボソームは細胞毒性も無く、最も高い遺伝子封入率と細胞への遺伝子導入効率を示した。また、カルセイン封入 SuCPG-リボソームは、リボソームに含まれる SuCPG の量に依存して細胞との融合能を示し

、カルセインが細胞内に導入された。特に、SuCPG-リポソームはマクロファージ細胞株に対し高い融合能を示した。さらに、還元アミノ化反応により、マンノースを1個、3個ならびに5個結合した人工糖脂質の合成に成功した。

次に、C81 変異体のアポトーシス誘導能を利用した遺伝子治療用ベクターの作成を試みた。HIV-1 Tat の存在下で発現が誘導されるようにするために、HIV-LTR の下流に、HIV-1 の NL432 由来の C81 変異体及び野生型 vpr を連結したベクターを構築した。本発現ベクターを陽性荷電リポソームに封入後、HIV-1 感染 CEM 細胞に導入し、Caspase-3 活性を測定した。Vpr、C81I74P およびコントロールベクターでは、感染および非感染細胞のいずれにおいてほとんど Caspase-3 活性が認められなかった。一方、C81 発現ベクターでは著しく高い Caspase-3 の活性が認められた。以上の結果より、C81 発現ベクターは感染細胞に対して特異的に強くアポトーシスを誘導することが確認された。感染細胞に対するターゲティングを高めるために、抗-gp120mAb 結合リポソームを作製して、HIV-1 感染細胞に上述と同様の方法で導入した (図 3)。Caspase-3 の活性は C81 発現ベクター導入細胞でのみ顕著に検出され、C81 ベクターは HIV-1 感染細胞特異的に破壊できる可能性が示された。

次に、C81 によるアポトーシス誘導機構の解明を試みた。アポトーシス誘導シグナルを受けた場合、細胞は Fas や TNFR を介し Caspase-8 を活性化する pathway、あるいはミトコンドリアを經由し Caspase-9 を活性化する pathway を介して、最終的に Caspase-3 等の活性化を引き起こしてシグナルを下流に伝達してアポトーシスを誘導する。まず、C81 によるアポトーシスが 2 つの pathway の何れを經由して誘導されるかを解析した。HeLa 細胞に C81 及びコントロールベクターを導入し、36 時間後に細胞抽出液を調製し、Caspase-3、-8 及び-9 の活性を測定した (図 4a)。C81 に強いアポトーシス誘導活性が観察され、特に Caspase-3 と-9 の活性が上昇していた。一方、Caspase-8 の活性は変化がなかった。次に、C81 がミトコンドリアの膜電位に変化を与える可能性を考え、Mitocapture 試薬により、ミトコンドリア膜電位の変化を観察した (図 4b)。トランスフェクション後、36 時間に染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、C81 導入細胞では赤い蛍光が消失し、膜電位が低下していることが明らかとなった。さらに、ミトコンドリアと細胞質画分を分画後、抗-cytochrom C 抗体により Western Blotting を行ったところ、C81 導入細胞では cytochrom C が細胞質に流出していることが判明した (図 4c)。以上のように C81 によるアポトーシス誘導はミトコンドリアを經由する pathway を通じて発揮されることが示された。

### 3) PIC の核移行を標的とした抗 HIV 薬の開発

HIV-1 PIC の核移行の阻害技術の開発を最終目標に Vpr の核移行機序の解明を行った。まず、Vpr の  $\alpha$ -helix 1 ( $\alpha$ H1) 及び  $\alpha$ -helix 2 ( $\alpha$ H2) の二つのドメインの点変異体を作成して pME18Neo 発現ベクターに挿入後、それらの細胞内局在を観察した。野生型 Vpr は主として核及び核膜、そして一部細胞質にも局在するが、 $\alpha$ H1 および  $\alpha$ H2 の二つのドメインの点変異体、 $\alpha$ LA ( $\alpha$ H1 変異体) 及び L67P ( $\alpha$ H2 変異体) では、Vpr の核移行能は部分的に影響された。二重変異体 ( $\alpha$ LA/L67P) では Vpr の核移行は完全に消失した。次に、Vpr 蛋白の二つの  $\alpha$ -helix ドメインを各々 EGFP に連結し、その細胞内局在を観察した。 $\alpha$ H1 を EGFP に連結した  $\alpha$ H1-EGFP は核に局在した。一方、 $\alpha$ H2 を連結した  $\alpha$ H2-EGFP は主として核に局在していたが、一部細胞質にも分布していた。Vpr の核局在に重要な 60 位の Ile 或いは 67 位の Leu を Pro に置換した変異体では、 $\alpha$ H2 の核局在能は著しく低下した。また、L67P 点変異体の N 末端 29 アミノ酸を欠失させた N30-L67P では核局在能を完全に消失した。以上の結果は、二つの  $\alpha$ -helix ドメインは互いに異なる細胞内因子と結合する可能性が示唆された。

In vitro translation 及び酵母発現系で作製した野生型および変異型 Vpr 蛋白を用いて pull-down assay を行った。何れの方法で作成した野生型 Vpr 蛋白も Imp  $\alpha$  及び  $\beta$  と結合した。これらは Vpr と直接結合している可能性が示された。 $\alpha$ H2 ドメインに変異を持つ L67P 変異体は Imp  $\alpha$  に対する結合力が減弱したが、 $\alpha$ H1 ドメインに変異を持つ  $\alpha$ LA 変異体では野生型と同程度結合した。 $\alpha$ H1 あるいは  $\alpha$ H2 ドメインのみを連結したキメラ GFP を用いて解析したところ、 $\alpha$ H2 ドメインは Imp  $\alpha$  及び  $\beta$  共に結合できるが、 $\alpha$ H1 ドメインは何れとも結合出来なかった。更に Vpr 発現ベクターを HeLa 細胞に発現させた細胞抽出液を用いた場合、Vpr は  $\alpha$ H1 を介して Imp  $\alpha$  と間接的にも結合しうることが明らかとなった。

さらに、nuclear import assay を行った。Digitonin 処理により HeLa 細胞の細胞膜に穴を開け、

可溶性の因子を全て除去し、GFP との融合蛋白として調製した種々の可溶性因子 (Imp  $\alpha/\beta$ , RanGDP, P10 及び Energy 再生系) 存在下でインキュベートした。Argon レーザーで励起することにより GFP との融合蛋白である基質蛋白の核移行の有無を検出した。また、インキュベート後の細胞を、抗 Flag 抗体及び Cy3 結合二次抗体で蛍光染色することで、核膜への局在を検出した。Vpr の核移行に必要な最小領域である N17C74 および二つの $\alpha$ -helix のドメインに点変異を導入した変異体を用いて、可溶性因子非存在下で解析した (図 12)。N17C74 では、核膜への局在と部分的な核移行が観察された。 $\alpha$ H1 に点変異を導入した場合、核膜局在に変化は見られないが、核内への移行は完全に阻害された。一方、 $\alpha$ H2 に点変異を導入した場合、核膜局在は著しく減弱したが、約 30%の細胞においては、核内への移行が認められた。

二つの $\alpha$ -helix ドメインおよびそれらの点変異体を N 末端側に GST、C 末端側に GFP を持つ融合蛋白として調製し、nuclear import assay を行った (図 5)。約 30%の細胞において、 $\alpha$ H1 の核内への移行が観察された。一方、 $\alpha$ H2 では全ての細胞において、強い核膜局在が観察された。この結果から、 $\alpha$ H1 が核内への移行に、 $\alpha$ H2 が核膜への targeting に寄与することが示された。

次に、Vpr の核移行能の最小機能ドメインである N17C74 の核移行に必要な可溶性因子を検討した (図 6)。N17C74-GFP は、バッファーのみ (因子なし) でも部分的な核移行が見られたが、大部分は核膜に局在していた。一方、Imp  $\alpha$ 或いは、energy 存在下では、核膜局在はほぼ消失し、核内の量が増加した。次に、可溶性因子欠損下において N17C74-GFP を一旦、30°C、15 分インキュベートすることで核膜に結合させた後、抗 Flag 抗体及び Cy3 結合二次抗体で核膜に結合した N17C74-GFP のみを蛍光染色した。この状態の細胞に、Energy 或いは、Imp  $\alpha$ を添加し、さらに 30°C 15 分インキュベートした (図 7)。その結果、Cy3 由来の赤色の蛍光が核内に観察されるようになった。即ち、核膜に結合した N17C74-GFP が両ファクター依存的に核内移行したことが示された。一方、可溶性因子を入れないものでは、核内に GFP 由来の緑色の蛍光しか観察されなかった。以上の結果、Vpr の核移行の最小機能ドメインである N17C74 は単独で核膜結合しうるが、核内へと効率よく移行するためには Imp  $\alpha$ 或いは Energy が必要である事が明らかとなった。

核膜孔複合体には多く nucleoporin が存在し、それらの多くが FG repeat を有することが報告されている。これまでに、Vpr と結合することが報告されている FG repeat を有する nucleoporin、p62、POM121 および NUP153 の Vpr の核移行における意義を nuclear import assay によって解析した。N17C74 の核膜結合は Imp  $\alpha$ および $\beta$ 存在下で影響されなかったが、p62 の存在下で著しく抑制された (図 8)。同様の結果が POM121 および NUP153 の解析からも得られた。次に、 $\alpha$ H2 領域中に点変異 L67P を導入 (L67P<sub>N17C74</sub>) すると Imp  $\alpha$ 及び $\beta$ との直接結合は保持されていたが、核膜結合能は著しく低下したことから、核膜結合に Imp  $\alpha$ との直接結合は必要ないことが示された (図 9)。一方、 $\alpha$ H1 領域への点変異を導入した $\alpha$ LA<sub>N17C74</sub>では核膜結合並びに Imp  $\alpha$ 及び $\beta$ との直接結合は保持されていたが、Imp  $\alpha$ との間接的な結合は消失し、さらに Imp  $\alpha$ 或いは Energy 依存的な核膜通過能も消失した (図 9)。

#### 4) HIV 潜伏感染細胞におけるウイルスの再活性化に伴う Nef の機能の解析とその制御

潜伏感染した HIV の再活性化に伴って大量に発現する Nef 蛋白により誘導あるいは抑制される T 細胞およびマクロファージ系の機能分子の同定を試みた。Nef を恒常的に発現するヒト T 細胞株 CEM/Nef1.0 と CEM/Nef3.7 は各々 Nef の発現レベルの高いクローンと低いクローンである。これらの細胞株で Nef の発現レベルに相関する細胞遺伝子を検索したところ、脳由来の、神経細胞トポロジーを決定するケモカイン様ファミリーである EphB6 が CEM/EF-BOS に比較して Nef1.0 クローンで 17 倍、Nef3.7 クローンで 5 倍程度発現が増加していた。また、T 細胞受容体からの刺激伝達のアダプターとして重要な LAT の発現もそれぞれ 5 倍、2.5 倍に増加していた。そこで初期培養 T 細胞で同じ遺伝子発現増加が Nef によって誘導されるのかどうかを明らかにするために、まず、Nef 発現センダイウイルスベクターを用い、様々な活性段階における CD4 陽性 T 細胞での Nef 発現について解析した。図 19 はウイルスを moi 2 で感染させた 2 日後の未刺激 CD4 陽性 T 細胞(A)と抗原刺激により活性化して 10 日以上経過した CD4 陽性 T 細胞(B)での CD4 と MHC Class I 抗原の発現を解析したものである。Nef の発現により未刺激 T 細胞では CD4 の発現低下が 16%に認められ、活性化 T 細胞では 30%程度であった。そのうち MHC Class I 抗原の発現は活性化細胞の一部にのみ認められ、

未刺激 T 細胞では全く認められなかった。

潜伏感染した HIV の活性化は T 細胞の活性化に伴って誘導されることから、静止期にある CD4 陽性 T 細胞を固相化した抗 CD3 抗体と抗 CD2 抗体ビーズで刺激し、センダイウイルス野生株と Nef 発現ベクターを moi 10 で感染させて、2 日後に細胞を回収して RNA を抽出した。この RNA よりランダムプライマーで cDNA を作成し、EphB6, Nef および EF-1alpha のプライマーを用いて 35 あるいは 40 サイクルの PCR を行った。図 10 に示すように、EphB6 の発現は Nef 発現センダイウイルス感染によって明らかに増大していた。一方、LAT の発現の差は明らかではなかった。従って EphB6 の発現は特定の T 細胞株に特異的な現象ではなく、Nef 発現により増強される CD4 陽性 T 細胞に共通の分子と考えられた。EphB6 は脳以外にも胸腺や末梢 T 細胞での発現が報告されているが、その機能は不明である。この分子が T 細胞活性化あるいは Nef の発現にどのように関わっているのか、更に検討を要する。

HIV のもう一つの標的細胞である単球/マクロファージ系細胞における Nef 発現の影響を解析するため、テトラサイクリン制御下に Nef を発現するアデノウイルスを作成した。このアデノウイルスは T 細胞には感染しないが、単球由来樹状細胞 (DC) にはドナーによる差はあるものの、moi 500 程度の感染によりほぼ 100% の細胞に Nef 発現を誘導でき、10ng/ml の doxycycline 添加により Nef の発現を完全にシャットオフした。そこで DC に Nef を発現させて DC の分化や機能への影響を検討した。Nef による CD4 の発現低下は認められたが、MHC Class I 分子の低下は高度の Nef 発現細胞においてもそれほど顕著ではないことが明らかとなった。また、DC の抗原提示に重要な役割を果たす MHC Class II, 共刺激分子 CD40, CD86 や成熟化のマーカーである CD83 には全く影響せず、allo-MLR や抗原提示による T 細胞増殖効果も Nef 発現による効果は認められなかった。

#### 5) エイズ発症阻止技術のサルにおける評価系の確立と vpr を用いた遺伝子治療用リポソームベクターの効果検定

新規に開発されたエイズ発症阻止技術の効果を感染個体のレベルで評価するために必要な SHIV によるアカゲザルへの感染・発症動物実験モデル系の確立を試みた。エイズウイルスと宿主液性免疫因子との関連を調べる為、SHIV の nef 遺伝子領域に各種サイトカイン・ケモカインを組み込み、ウイルス増殖への影響を検討したところ、Th2 サイトカインである IL-5 を組み込んだ SHIV では、培養細胞レベル、感染個体レベルともに増殖能が増強された。また、急性発症株 SHIV-89.6P と非発症株 SHIV-NM-3rN について、感染初期における各種サイトカイン・ケモカインの血漿中の動態を調べたところ、IL-2 など病原性に関連して産生が影響される傾向が観察されたものがあつたが、感度良く病原性のマーカーとして使用可能なものは得られなかった。ゲノムの 3' 半分が強病原性 SHIV-89.6P に由来する感染性クローンを作製し、サル感染実験を行ったところ、接種後 2 週目までの一過性のウイルスロードのピークと CD4 陽性細胞数の減少が親株と同様に認められたが、親株と異なり、3 ~ 4 週以降抗体が上昇し、血漿中のウイルス量が減少した (図 11)。また、CD4 陽性細胞が回復傾向を示し、親株の強病原性が再現されなかった。強病原性 89.6P と非病原性 NM-3rN について培養細胞におけるアポトーシス誘導能について検討したところ、両者のアポトーシス誘導能はウイルスの増殖能に強く関係しており、質的な違いは認められなかった。

#### 4. 考察

Vpr は細胞に G2 期 arrest とアポトーシスを誘導する。最近我々は、G2 期 arrest 能を完全に消失しているが、著しいアポトーシス活性を有する Vpr の C 末端欠失変異体をみいだした。本研究の目標は、潜伏あるいは持続 HIV-1 感染細胞を特異的に破壊するために、この変異体を HIV-1 LTR の下流に連結し、更に抗-HIV-1gp120mAb 結合リポソームに封入したベクターを作製することである。我々はまず、C81 及び野生型発現ベクターは HIV-1 Tat の発現に特異的に発現が誘導される事を確認した。次に、この C81 発現ベクターを遺伝子治療に応用で生体への投与した場合を考え、免疫原性が無く、生体に対し安全性の高いリポソームを遺伝子導入ベクターとして選択した。さらに標的細胞へのターゲティングを高めるために、抗-gp120mAb をリポソームに結合させた。この C81 のアポトーシス誘導能を利用した遺伝子治療用ベクターは *in vitro* において HIV-1 感染細胞を特異的にアポ



トーシスさせることが明らかとなった。さらに、本研究において我々は C81 によるアポトーシス誘導はミトコンドリアを経由する pathway を通じて発揮されることを立証した。以上の結果は、C81 変異体を用いて HIV-1 持続感染細胞を特異的に除去できる可能性を示唆するものである。今後、これらのベクターの有効性を SHIV-サルモデル系を用いて解析する予定である。

本研究において我々は Vpr の核移行の機序について、1) 主として核および核膜そして一部細胞質に局在すること、2) Vpr に存在する二つの  $\alpha$ -helix 構造が核移行に共に必須であること、3) これらの領域はおのおの単独であっても核移行シグナルとして機能しうることを明らかにした。4) Vpr は  $\alpha$ H2 を介して Imp  $\alpha$  及び FG リピートを有する nucleoporin と直接的に、さらに  $\alpha$ H1 を介して Imp  $\alpha$  と間接的に結合すること、5)  $\alpha$ H2 は核膜結合に、 $\alpha$ H1 は核内への移行に寄与すること、6) 核膜に結合した Vpr は、Imp  $\alpha$  あるいは Energy といった可溶性因子依存的に核膜を通過すること、7) Vpr の核膜通過には Imp  $\alpha$  との間接結合、ならびに FG repeat を有する nucleoporin との結合のいずれもが必須であることなどを明らかにした。中でも、Imp  $\alpha$  依存的に核膜を通過する分子の存在はこれまで報告がない。核移行能を持つ分子には、その核移行機序が未同定であるものも多く、新規の核移行機序として今後注目されると思われる。本解析結果より、Vpr は極めて特徴的な核移行機序を有することが明らかとなった。特に、核膜結合とその後の核膜通過とが各々独立した反応であるという知見は、Vpr の核移行の制御を通じた PIC 核移行阻害剤開発の上で、標的作用点の多様性といった面からも特に重要である。

Vpr の新しい機能としてスプライシングの阻害効果を発見した。即ち Vpr の過剰発現によって  $\alpha$ -globin mRNA 前駆体からのイントロン 1 のスプライシングが阻害されることを見いだした。この阻害効果は Vpr の C 末端 77-96 領域を導入した場合にも認められた。さらに、免疫沈降において Vpr および 77-96 領域は SAP145 と相互作用することがヒト細胞で確認できた。これらの結果から、Vpr のスプライシング阻害効果は Vpr が C 末端領域を介して SAP145 と相互作用する結果である可能性が考えられた。今後は Vpr によるスプライシング阻害における RNA の配列特異性の有無、スプライシング阻害作用と既知の Vpr の機能との相関および 30 種類以上あるとされる HIV-1 mRNA のスプライスパターンの形成における Vpr の意義について解析して行く予定である。

本研究において我々は、CD4 陽性初期培養 T 細胞を用いて、Nef の発現量がまだ少ないウイルスの増殖初期から Nef による CD4 の発現抑制は認められるのに対し、MHC Class I 分子への影響は Nef の量がかかり高度にならないと認められないことを示した。しかも、強力な抗原提示細胞である DC においては、Nef を高度に発現させても MHC Class I 分子の発現量には変化は少なかった。DC における Nef の発現が、細胞表面のクラス I 分子の発現量に関わらず細胞内の抗原提示の過程を阻害する可能性も考えられ、実際に CD8 陽性 T 細胞の活性化にどのような影響を与えるのかを詳細に検討する必要がある。抗ウイルス療法により HIV-1 の増殖が検出限界以下に抑制されるようになった現在では、抗原刺激に伴って再活性化をいかに制御するかが重要な問題である。Nef を発現するウイルスベクターを用いることにより、この再活性化に伴って高度に発現誘導される Nef 発現が T 細胞および抗原提示細胞の免疫機能に及ぼす影響を初期培養細胞で解析することが可能となった。

今回実験に用いた各種遺伝子改変 SHIV は、遺伝的なバックグラウンドが明らかであり、それらが感染個体レベルで様々な病態を示していることは非常に興味深い。特に 89.6P 由来の感染性クローンは、感染 2 週目までのウイルス増殖能は親株と全く同じであったにもかかわらず親株の強病原性が再現されなかった。強病原性の 89.6P と非病原性の NM-3rN では、感染初期の増殖能が異なるので、病原性の違いは感染初期における個体内での増殖能の違いによる影響が大きいものと考えられるが、クローンウイルスと親株である 89.6P の違いは、細胞障害性、免疫誘導能、増殖標的細胞などの質的違いの可能性が高いものと考えられ、今後、両者を詳細に比較することにより、SHIV による病態解明に大きく寄与するものと期待される。

## 5. まとめ

1) 酵母 two-hybrid 法で Vpr と相互作用する細胞内因子として見出された SAP145 は、ヒト細胞で Vpr の C 末端領域を介して相互作用することが立証した。さらに Vpr の発現により  $\alpha$ -globin mRNA 前駆体のイントロン 1 のスプライシングが阻害されること、この阻害作用は Vpr の C 末端領域

が関与する現象であることを明らかになった。また、Vpr と SAP145 とが結合した状態での構造解析を最終目標に、Vpr 蛋白と SAP145 の発現と精製に成功した。

- 2) HIV-LTR の下流にアポトーシス活性を有する C81 変異体を連結したベクターを構築し、HeLa 細胞に導入した結果、Tat 存在下において発現が誘導された。C81 発現ベクターを陽性荷電リボソームに封入後、HIV-1 感染細胞に導入したところ、感染細胞を特異的に破壊した。C81 発現ベクターを抗-gp120mAb 結合リボソームで封入した結果、HIV-1 感染細胞へのターゲッティングが高まった。C81 はミトコンドリアを経由する pathway を通じてアポトーシスを誘導した。
- 3) Vpr は  $\alpha$ H2 と FG リピート を有する nucleoporin との相互作用を介して核膜に結合後、 $\alpha$ H1 の働きにより核内へと移行すること、その際、 $\alpha$ H1 介した Imp  $\alpha$  の間接結合および FG repeat を有する nucleoporin を介した核膜結合が共に必須であることを明らかにした。Vpr による核移行は極めて特徴的であり、HIV-1 PIC の核移行を Vpr を標的にして制御でき可能性を示している。
- 4) CD4 陽性 T 細胞において、Nef 発現に伴い EphB6 の発現が強く誘導されることが示唆された。抗原提示細胞 (DC) では MHC Class II を介した T 細胞活性化には影響はなかった。
- 5) これまでに作製された種々の遺伝子改変 SHIV の解析結果から、89.6P を静脈内接種した場合に比較的安定して高いレベルのウイルス血症が持続し、急性発症型の免疫不全症を引き起こすことが再確認された。

## 6. 研究発表

(論文発表)

- 1) Yoshizawa, I., Soda, Y., Mizuochi, Y., Yasuda, S., Mizuochi, T., Rizvi, T. A., Takemori, T. and Tsunetsugu-Yokota, Y. Mucosal Immune response against HIV-1 gag enhanced by DNA immunization. *Vaccine*, **19**, 2995-3003, 2001
- 2) Kozyrev, I. L., Ibuki, K., Shimada, T., Kuwata, T., Takemura, T., Hayami, M. and Miura, T. Characterization of less pathogenic infectious molecular clones derived from acute-pathogenic SHIV-89.6P stock virus. *Virology*, **282**, 6-13, 2001
- 3) Kwofie, T. B., Haga, T., Iida, T., Hayami, M. and Miura, T. Cytokine kinetics in the plasma of monkeys infected with pathogenic and non-pathogenic simian and human immunodeficiency chimeric viruses at an early stage of infection. *Microbiol. Immunol.*, **45**, 399-402, 2001
- 4) Kozyrev, I., Miura, T., Haga, T., Kuwata, T. and Hayami, M. Construction of SIV/HIV-1 chimeric viruses having the IL-5 gene and determination of their ability to replicate and produce IL-5. *Arch. Virol.*, **146**, 1051-1062, 2001
- 5) Takehisa, J., Harada, Y., Ndembi, N., Mboudjeka, I., Taniguchi, Y., Ngansop, C., Kuate, S., Zekeng, L., Ibuki, K., Shimada, T., Bikandou, B., Yamaguchi-Kabata, Y., Miura, T., Ikeda, M., Ichimura, H., Kaptue, L., and Hayami, M. Natural infection of wild-born mandrills (*Mandrillus sphinx*) with two different types of simian immunodeficiency virus. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **17**, 1143-1154, 2001
- 6) Iida, T., Kita, M., Kuwata, T., Miura, T., Ibuki, K., Ui, M., Hayami, M., and Imanishi, J. Apoptosis induced by in vitro infection with simian/human immunodeficiency chimeric virus in macaque and human PBMC. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **17**, 1387-1397, 2001
- 7) Kuwata, T., Miura, T., and Hayami, M. Chimeric simian and human immunodeficiency virus for development of an anti-HIV-1 live attenuated vaccine. *Trends in Microbiology*, **9**, 475-480, 2001
- 8) Tahirov, T.H., Inoue, T., Sasaki, M., Kimura, K., Morii, H., Fujikawa, A., Shiina, M., Sato, K., Kumasaka, T., Yamamoto, M., Ishii, S. and Ogata, K. Structural analyses of DNA recognition by the AML1/Runx-1 Runt domain and its allosteric control by CBF $\beta$ . *Cell*, **104**, 755-767, 2001
- 9) Tahirov, T.H., Inoue, T., Sasaki, M., Shiina, M., Kimura, K., Sato, K., Kumasaka, T., Yamamoto, M., Kamiya, N. and Ogata, K. Crystallization and preliminary X-ray analyses of quaternary, ternary and binary protein-DNA complexes with involvement of AML1/Runx-1/CBF $\alpha$  Runt domain, CBF $\beta$  and the C/EBP $\beta$  bZip region. *Acta Cryst.*, **D57**, 850-853, 2001
- 10) Tahirov, T.H., Inoue, T., Sasaki, M., Fujikawa, A., Kimura, K., Sato, K., Adachi, S., Kamiya, N. and Ogata, K. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the C/EBP $\beta$  C-terminal region in complex with DNA. *Acta Cryst.*, **D57**, 854-856, 2001

- 11) Tahirov, T.H., Sasaki, M., Inoue, T., Fujikawa, A., Sato, K., Kumasaka, T., Yamamoto, M. and Ogata, K. Crystals of ternary protein-DNA complexes composed of DNA binding domains of c-Myb or v-Myb, C/EBPa or C/EBPb, and tom-1A promoter fragment. *Acta Cryst.*, **D57**, 1655-1658, 2001
- 12) Lassalle, M.W., Yamada, H., Morii, H., Ogata, K., Sarai, A. and Akasaka, K. Cavity volume estimation by high pressure NMR. The c-Myb R2 subdomain. *Proteins*, **45**, 96-101, 2001
- 13) Fukutome, K., Watarai, S., Mukamoto, M., and Kodama, H Intestinal Mucosal Immune Response in Chickens Following Intraocular Immunization with Liposome-Associated *Salmonella Enterica* Serovar Enteritidis Antigen. *Dev. Comp. Immunol.*, **25**, 475-484, 2001
- 14) Takeshima, S., Ikegami, M., Morita, M., Nakai, Y. and Aida, Y. Identification of new bovine BoLA-DRB3 alleles by sequence-based typing. *Immunogenetics*, **53**, 74-81, 2001
- 15) Yasuda, J., Miyao, T., Kamata, M., Aida, Y. and Iwakura, Y. T cell apoptosis causes peripheral T cell depletion in mice transgenic for the HIV-1 vpr gene. *Virology*, **285**, 181-192, 2001
- 16) 渡来 仁, リポソーム型経粘膜ワクチンによる鶏サルモネラ症 (鶏パラチフス) の予防. 食肉に関する助成研究調査成果報告書, **19**, 54-61, 2001
- 17) 緒方一博, Tahirov, T. H., 転写因子 Runx-1/AML1 の CBF<sub>1</sub> によるアロステリック制御細胞工学, **20**, 488-489, 2001
- 18) 間陽子, 農学領域におけるゲノムサイエンスの展開 (Part 2) ウシゲノム解析と抗病性 [1] 農業および園芸, **76**, 1187-1193, 2001
- 19) 間陽子, 農学領域におけるゲノムサイエンスの展開 (Part 2) ウシゲノム解析と抗病性 [2] 農業および園芸, **76**, 1289-1294, 2001
- 20) 竹嶋伸之輔, 中井裕, 太田實, 間陽子, ウシ主要組織適合抗原のタイピング法 川渡農場報告, **17**, 19-28, 2001
- 21) 森田 裕, 某乳業会社の事件について感じたこと (エッセイ) 防菌防黴, **29**, 66, 2001
- 22) 森田 裕, 微生物検出キット以外の食品検査キットの AOAC バリデーション 防菌防黴, **29**, 471-476, 2001
- 23) Tajima, S. and Aida, Y. Mutant Tax proteins from bovine leukemia virus with ability to activate the expression of c-fos. *J. Virol.*, **76**, 2557-2562, 2002
- 24) Tahirov, T.H., Sato, K., Ichikawa-Iwata, E., Sasaki, M., Inoue-Bungo, T., Shiina, M., Kimura, K., Takata, S., Fujikawa, A., Morii, H., Kumasaka, T., Yamamoto, M., Ishii, S. and Ogata, K. Mechanism of c-Myb-C/EBPb cooperation from separated sites on a promoter. *Cell*, **108**, 57-70, 2002
- 25) 緒方一博, 構造解析のための試料調製(総論)ータンパク質-DNA 複合体を中心としてー 遺伝子医学, **6**, 86-95, 2002
- 26) Tsunetsugu-Yokota, Y., Tamura, H., Tachibana, M., Ogata, K., Honda, M. and Takemori, M. Selective expansion of perforin-positive CD8+ T cells by immature dendritic cells infected with *Bacillus Calmette-Guerin* mycobacteria. *J. Leu. Biol.*, in press, 2002
- 27) Kozyrev, I., Miura, T., Takemura, T., Kuwata, T., Ui, M., Ibuki, K., Iida, T. and Hayami, M. Co-expression of interleukin 5 enhances replication of simian/human immunodeficiency chimeric virus in vivo. *J. Gen. Virol.*, in press
- 28) Theophilus B. Kwofie, Miura, T., Ibuki, K., Enose, Y., Suzuki, H., Ui, H., Kuwata, T. and Hayami, M. Characterization of simian and human immunodeficiency chimeric viruses re-isolated from vaccinated macaque monkeys after challenge infection. *Arch. Virol.*, in press.
- 29) Kamata M., and Aida Y. Induction of cell growth retardation by human immunodeficiency virus type 1 Vpr mediated-bystander effect, submitted.
- 30) Isogai M., Aizawa S., Watanabe T. and Aida Y. Interaction between HHR23A with human immunodeficiency virus type 1 Vpr, submitted.
- 31) Kamata M., Azuma A., and Aida Y. *p21<sup>WAF/CIP1</sup>* inhibits human immunodeficiency virus type 1 Vpr-induced apoptosis, submitted.
- 32) Kamata M., Miyamoto M., Yoneda Y., and Aida Y. Importin directly mediates the translocation through a nuclear pore of human immunodeficiency virus type 1 Vpr, submitted.

## 7. 知的所有権の取得状況

特許取得	なし
実用新案登録	なし
その他	なし

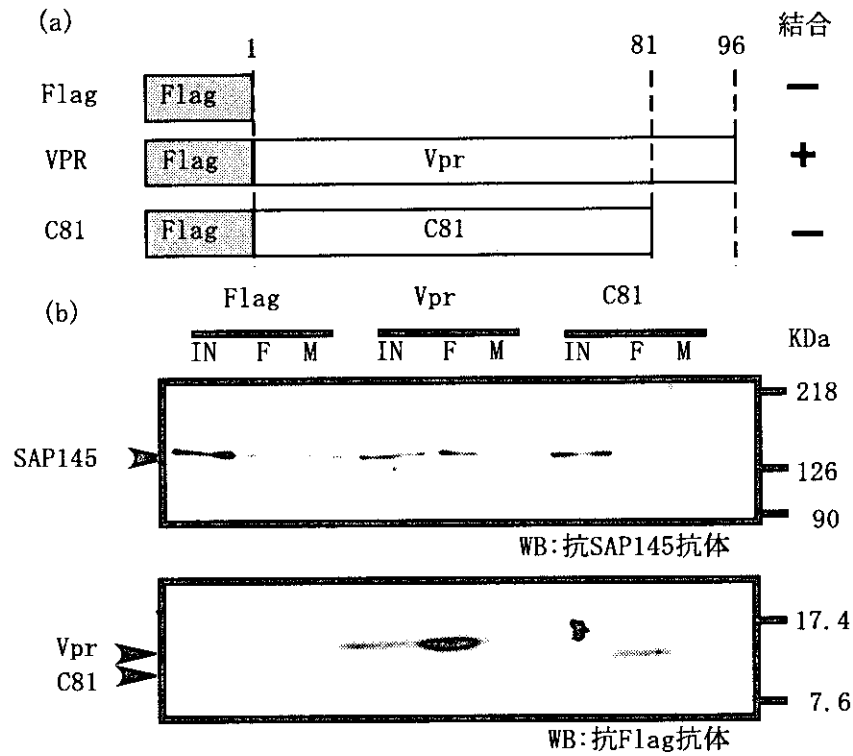


図1 SAP145 とVpr との結合

(a) 導入した遺伝子の模式図。各々、pME18neoベクターに組み込まれている。  
 (b) 免疫沈降法により、SAP145の共沈を調べた。HeLa細胞より抽出したタンパク質溶液をもとに抗Flag抗体により免疫沈降し、抗SAP145抗体によりSAP145を検出した(上)。抗Flag抗体により、Vprおよびその変異体の免疫沈降を確認した(下)。IN, Input (タンパク抽出液)；F, 抗Flag抗体免疫沈降物；M, マウスIgG 抗体免疫沈降物

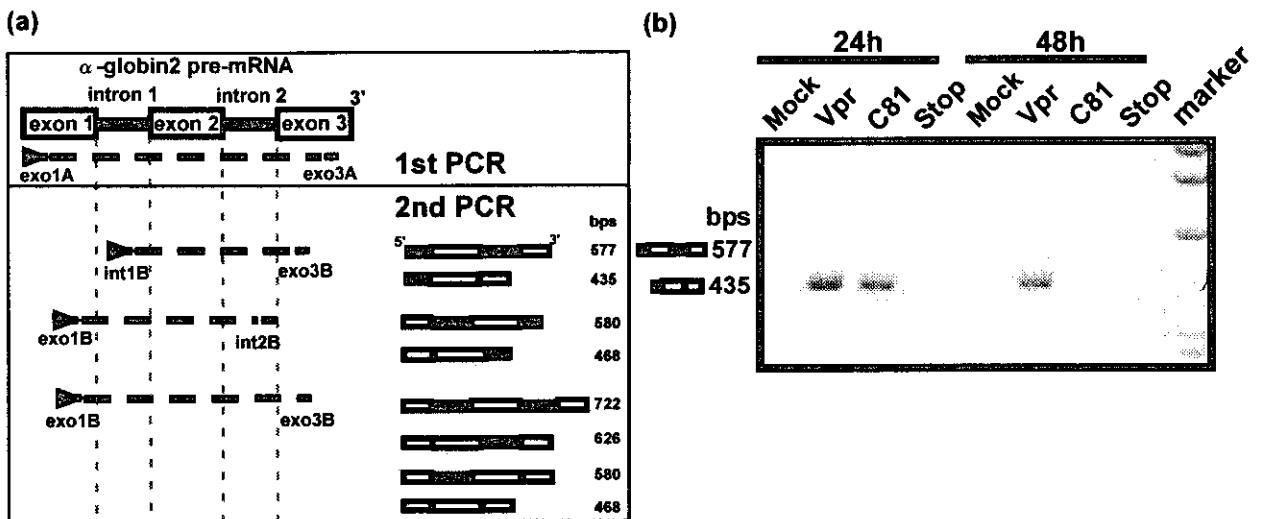


図2 Vprによる $\alpha$ -globin2 pre-mRNAのスプライシング阻害

(a)  $\alpha$ -globin 2 pre-mRNAの検出に用いたプライマーの位置を示す。2nd PCR から予想されるスプライシングパターンと塩基長を右に示した。  
 (b) int1B'-exo3B プライマーのセットでの2nd PCR 35サイクル行った結果。左にスプライシングパターンとその大きさを示した。

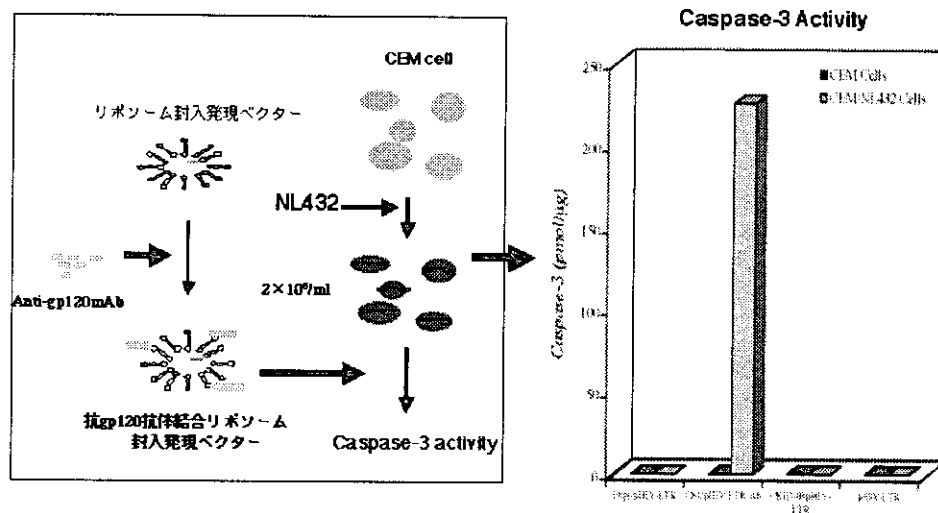
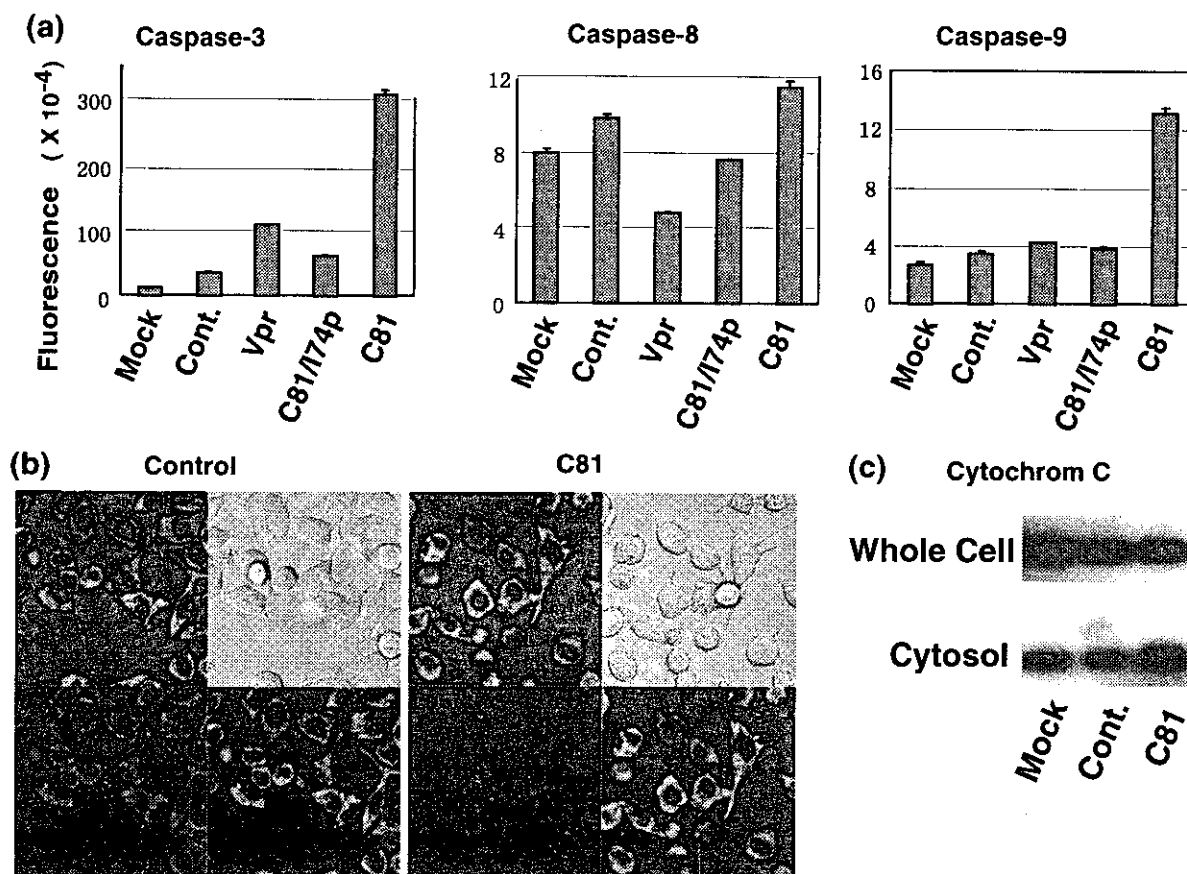


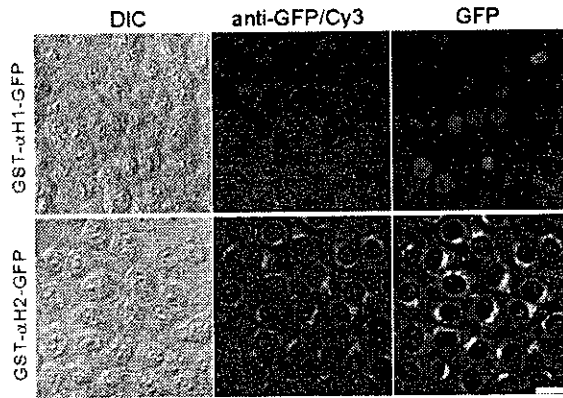
図3 抗 gp120 抗体結合リポソームに封入した発現ベクターの導入  
 前の実験と同様、pNL432をCEM細胞に感染させ、継代培養後、抗体結合リポソームに封入したC81  
 発現ベクターを導入、オーバーナイトでCultivateし、その後Caspase-3の活性を測定した。グラフは左よりVpr、C81、C81I74P、コントロールベクターの順であり、それぞれ非感染細胞、感染細胞のCaspase-3の活性値を示す。



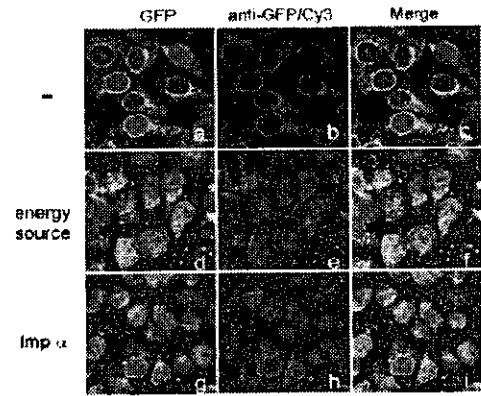
**HeLa Cells (Post Transfection : 36 hrs)**

図4 C81 変異体によるミトコンドリアへの影響

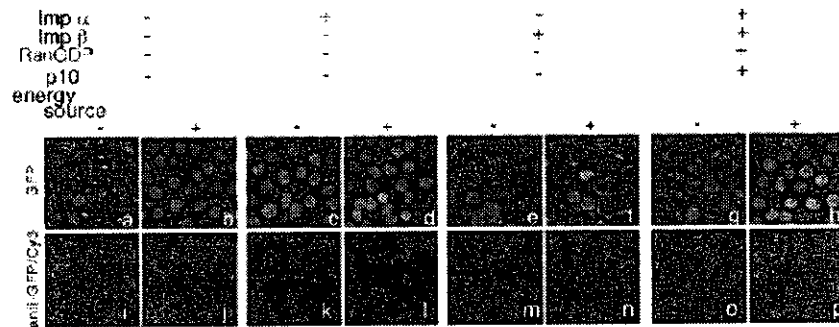
HeLa細胞にC81、vprおよびC81/I74P発現ベクターを導入36時間後に抽出液を調製し、Caspase-3、8  
 および9の活性を比較した(a)。また、細胞をMitocapture試薬で染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観  
 察した(b)。Cytochrome Cの細胞質への流出をWestern Blot法により解析した(c)。



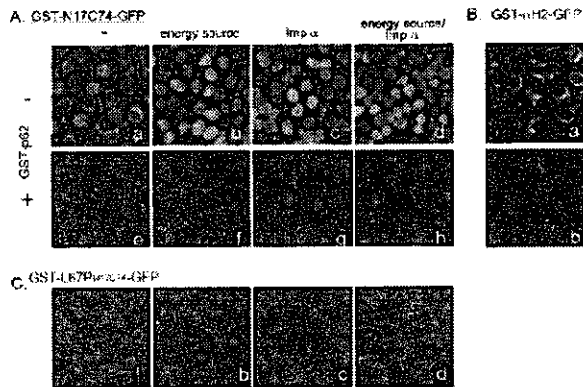
☒5 two  $\alpha$ -helical domains of Vpr have a different function on nuclear import



☒7 Both of energy source and Imp  $\alpha$  can promote the nuclear-pore passage of N17C74



☒6 Promotion of nuclear-pore passage of N17C74 needs to energy and Imp  $\alpha$



☒8 The interactions between Vpr and nucleoporins are indispensable for the passage of the nuclear pore of N17C74

**Conclusion:**

	Add: of p62		
	Wild (N17C74)	L67P <sub>N17C74</sub>	$\alpha$ LA <sub>N17C74</sub>
<b>Interaction</b>			
Direct	+	+	+
Indirect	+	ND	-
NPC	+	-	+
<b>Nuclear Import</b>			
Independent	+	±	-
Dependent on Imp $\alpha$ or energy	+	-	-

☒9 Conclusion

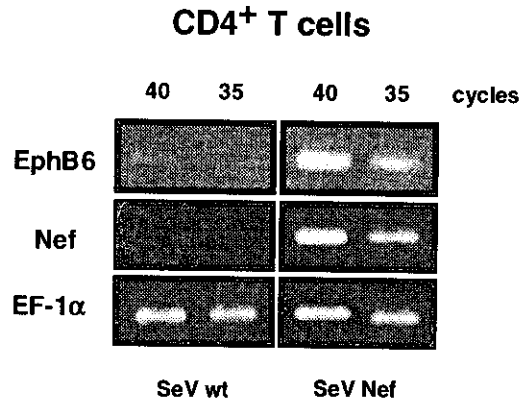


図 10. 活性化 CD4 陽性 T 細胞における Nef 発現の効果。  
 CD4 陽性細胞を抗 CD3/CD2 抗体で活性化させて Nef 発現あるいは野生株センドライウイルスを感染させ、2 日後の RNA を抽出して RT-PCR のサイクルを変えることにより、半定量的に EphB6 の発現量を比較した。

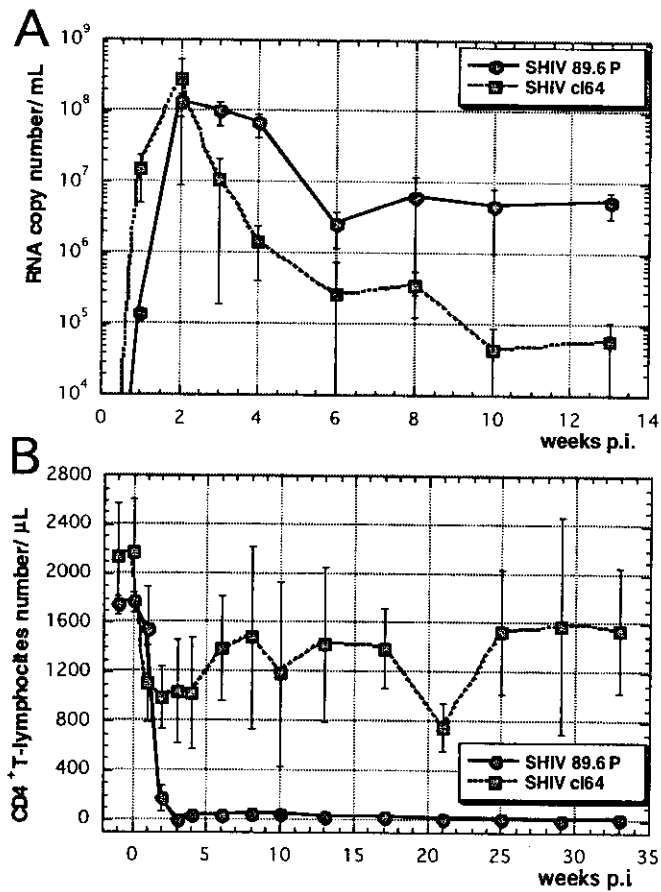


図 11. (A) Plasma viral RNA loads of the macaques infected with SHIV-89.6P(MM130 and 131) and its molecular clone cl 64 (MM189, 200, 210 and 215). Plasma viral RNA loads were measured by RT-PCR. Data are expressed as the mean values of results from each monkey with standard deviation. (B) CD4<sup>+</sup>lymphocyte clone cl 64 (MM189, 200, 210 and 215). Data are expressed as the mean values of the absolute numbers of CD4<sup>+</sup> lymphocytes per mL in each monkey with standard deviation.

---

平成13年度

エイズ医薬品等開発研究  
重点研究報告書

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