

平成18年度

若手研究者奨励研究報告書

目 次

政策創薬総合研究

課題番号

KH13302	再生医療を目的としたアデノウイルスベクターによるES細胞への効率的な遺伝子導入・発現系の開発	川 端 健 二 …… 1
KH23303	腎不全の進展・増悪因子の解明と腎機能保護法の開発に関する研究	増 田 智 先 …… 12
KH23304	Toll様受容体 (TLR3) を介したミクログリア活性化機序の解明と脳炎治療薬開発のためのハイスループット試験系への応用	中 道 一 生 …… 26
KH23306	吸血昆虫唾液腺生理活性物質の特性解明と創薬への応用に関する研究	伊 澤 晴 彦 …… 37
KH23307	アポトーシス関連分子EATの機能制御によるES細胞の増殖・分化培養法の開発	大 喜 多 肇 …… 50
KH23331	寄生性原虫の生育に必須な脂質成分の代謝と輸送ならびに創薬探索に関する基礎的研究	中 野 由 美 子 …… 60
KH33308	向精神薬のSNPs解析による有効性・安全性に関する研究	橋 本 亮 太 …… 66
KH33309	ヒトの薬物体内動態の予測向上を目指した薬物代謝酵素および薬物トランスポーターの誘導に関するインシリコ予測	小 林 カ オ ル …… 79
KH33310	薬剤排出トランスポーターの基質輸送メカニズムに関する研究	田 辺 公 一 …… 92
KH33332	制癌分子標的療法の創薬と開発にかかわるブリッジングスタディーの基礎的および応用的研究	川 上 浩 司 …… 101
KH53312	LEE遺伝子群非保有型腸管出血性大腸菌の疫学マーカーおよび新規治療薬の標的となる病原性遺伝子に関する基礎的研究	伊 豫 田 淳 …… 105
KH53313	遺伝子修飾による樹状細胞の機能強化に基づいた新規癌免疫療法の開発	岡 田 直 貴 …… 116
KH53314	PET検査を用いた癌二次予防の診断アルゴリズムの開発、PET検診施設間のネットワーク構築および死亡率低下の検証研究	小 島 伸 介 …… 126
KH53315	網羅的遺伝子破壊による真菌症病原性発現の分子機構の解明と新規抗真菌剤開発への応用に関する研究	梅 山 隆 …… 136
KH53333	治療ターゲットとしてのFcγ受容体を介した Dengue 出血熱の病態形成機序の解析	林 昌 宏 …… 150
KHC3361	C型肝炎ウイルス粒子産生制御による新規治療法の萌芽的研究	村 上 恭 子 …… 156
KHC3362	高齢化社会に適応する歯の延命化を目指した歯髄・象牙質再生による新しい抜髄治療法の開発	庵 原 耕 一 郎 …… 162
KHC3363	HDL形成責任タンパク質ABCA1の代謝制御をターゲットとした新規動脈硬化治療法に関する研究	奥 平 桂 一 郎 …… 167

エイズ医薬品等開発研究

KAI3701	ヘルペスウイルス感染症の新規制御法の確立と潜伏感染機構の 解明	藤室雅弘 ……173
KAC3761	論理的創薬手法によるHIV-1プロテアーゼニ量体化を阻害す る低分子化合物の探索	中村寛則 ……186
KAC3762	HIV治療用合成siRNAの新規デリバリーシステムの開発	児玉耕太 ……191

再生医療を目的としたアデノウイルスベクターによる ES細胞への効率的な遺伝子導入・発現系の開発

所 属 独立行政法人医薬基盤研究所
遺伝子導入制御プロジェクト

研究者 川端 健二

研究期間 平成16年4月～平成19年3月

ES細胞は再生医療のための有力な細胞ソースとして注目されている。ES細胞の分化を自在に制御するには効率の良い遺伝子導入法の開発が必須である。そこで本研究では、アデノウイルスベクターを用いたES細胞への高効率遺伝子導入法の開発およびそれを用いたES細胞の分化法の開発を行った。

A. 研究目的

胚性幹細胞 (embryonic stem cells; ES 細胞) は無限増殖能と分化多能性を有する細胞であり、1981年にマウス胚から初めて樹立された。それ以来、ES細胞は遺伝子欠損マウス作成のための発生の工学的材料として重用されてきたが、1998年にはヒト胚からもES細胞が樹立され、再生医療への応用が考えられるようになった。ES細胞を目的の細胞に分化させるには、通常時は未分化のまま維持し、適宜何らかの刺激を与えて分化させることが必要である。マウスES細胞は分化を抑制するサイトカイン LIF (leukemia inhibitory factor) を加えることにより未分化状態を維持できることが知られているが、その作用機構については不明な点が多い。さらに、未分化ES細胞から目的の細胞に分化させる技術についても試行錯誤の状態が続いている。これは、ES細胞への遺伝子導入技術が確立されていないため、ES細胞への外来遺伝子導入による機能解析研究が行えないことに起因する。

本研究では、多くの細胞で効率の良い遺伝子導入が可能であることが知られているアデノウイルスベクターを用いて、ES細胞への効率良い外来遺伝子導入実験系を開発し、それを用いて再生医療へ向けたES細胞の分化誘導系を確立することを目的とする。

B. 研究方法

(1) マウス ES 細胞および EB の培養

通常、E14 マウス ES 細胞 (mES 細胞) は LIF 含有培地にてフィーダー細胞上で培養し、3-5 日ごとに継代した。フィーダー細胞にはマイトマイシン C で不活化したマウス胚繊維芽細胞を用いた。フィーダー非存在下で培養する際には、フィーダー上の mES 細胞をトリプシンで剥離した後、37°C、40 分インキュベートすることにより得た mES 細胞の単細胞浮遊液をゼラチンコートした培養皿上に播種した。胚様体 (EB; embryoid body) は mES 細胞をペトリディッシュの蓋に 3000 cells/30 μ l で付着させ (ハンギングドロップ法)、5 日間培養することにより作製した。

(2) ベクタープラスミドの作製

アデノウイルスベクターの作製は *in vitro* ライゲーション法により行った。シャトルプラスミド pHMCMV5 およびそのプロモーターを CA プロモーター、EF-1 α プロモーターで置換したプラスミド pHMCA5、pHMEF5 を用意した。それぞれのマルチクローニング部位に β -ガラクトシダーゼ (LacZ) 遺伝子を挿入し、LacZ 発現シャトルプラスミド

pHMVMV5-LacZ、pHMCA5-LacZ、pHMEF5-LacZ を作製した。次に、それぞれのシャトルプラスミドを制限酵素 I-Ceu I と PI-Sce I で消化し、同酵素で消化したベクタープラスミド pAdHM4 とライゲーションを行うことにより LacZ 発現ベクタープラスミド pAdHM4-CMVLacZ1、pAdHM4-CALacZ1、pAdHM4-EFLacZ1 を得た。さらに、ファイバー改変型アデノウイルスベクターを作製するため、pHMEF5-LacZ については pAdHM4 だけでなく、他のベクタープラスミド pAdHM15、pAdHM41-K7(C)、pAdHM34 とともにライゲーションを行い、pAdHM15-RGD-EFLacZ1、pAdHM41-K7-EFLacZ1、pAdHM34-EFLacZ1 を作製した。

(3) アデノウイルスベクターの作製

(2) で作製したベクタープラスミドを Pac I で消化し、293 細胞にトランスフェクトすることにより、LacZ 発現アデノウイルスベクター Ad-CMV-LacZ、Ad-CA-LacZ、Ad-EF-LacZ、AdRGD-EF-LacZ、AdK7-EF-LacZ、AdF35-EF-LacZ を得た。

各アデノウイルスベクターは 293 細胞に 3 次感染までさせることにより大量調製した。アデノウイルスベクターを塩化セシウムの密度勾配遠心にて精製し (2 回)、10 mM Tris (pH7.5)、1 mM MgCl₂、10% glycerol から成る溶液で透析した。精製したベクターの物理学的力価は分光学的方法により測定し、生物学的力価はクロンテック社の Adeno-X Rapid Titer Kit を用いて測定した。また、同様に Ad-EF-Oct3/4、Ad-EF-Nanog、Ad-EF-STAT3F、Ad-CA-GFP、Ad-CA-PPAR γ を作成した。

(4) LacZ アッセイ

mES 細胞を 12 穴プレートに 1×10^5 cells/well 播種し、翌日各アデノウイルスベクターを 3000 VP/cell の濃度で 1.5 時間作用させた。48 時間培養後、細胞を 0.5% glutaraldehyde で固定し、X-gal 染色液 (1.3 mM MgCl₂、15 mM NaCl、44 mM hepes、

3 mM potassium ferricyanide、3 mM potassium ferrocyanide、0.05% X-gal) にて染色を行った。

(5) RT-PCR

mES 細胞および EB から total RNA を抽出し、RT-PCR を行った。PCR におけるプライマーの配列は以下の通りである。

G3PDH(F): 5' -ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'

G3PDH(R): 5' -TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

CAR(F): 5' -TGATCATTTTGTATTCTGGA-3'

CAR(R): 5' -TTAACAAGAACGGTCAGCAG-3'

Oct-3/4(F): 5' -GTTTGCCAAGCTGCTGAAGC-3'

Oct-3/4(R): 5' -TCTAGCCCAAGCTGATTGGC-3'

Nanog(F): 5' -ATGGTCTGATTCAGAAGGGC-3'

Nanog(R): 5' -TTCACCTCCAAATCACTGGC-3'

FGF5(F): 5' -GAAGCGGCTCGGAACATAGC-3'

FGF5(R): 5' -GGACGCATAGGTATTATAGC-3'

Brachyury T(F): 5' -CAGGAGGATGTTCCCGGTGC-3'

Brachyury T(R): 5' -TCCGAGGTTCACTACTATGC-3'

GATA6(F): 5' -GCCAAACTGAGCCCCTTCGC-3'

GATA6(R): 5' -GGGGGGCTGTCGGCGGAGGC-3'

PPAR γ 1(F): 5' -CCCTGGCAAAGCATTTGTAT-3'

PPAR γ 1(R): 5' -AATCCTTGGCCCTCTGAGAT-3'

PPAR γ 2(F): 5' -ATGGGTGAAACTCTGGGAGA-3'

PPAR γ 2(R): 5' -CAACCATTGGGTGAGCTCTTG-3'

C/EBP α (F): 5' -CGCTGGTGATCAAACAAGAG-3'

C/EBP α (R): 5' -GTCAGTGGTCACTCCAGCA-3'

aP2(F): 5' -TGGAAGCTTGTCTCCAGTGA-3'

aP2(R): 5' -ACACATTCCACCACCAGCTT-3'

adiponectin(F): 5' -GTTGCAAGCTCTCCTGTTC-3'

adiponectin(R): 5' -GCTTCTCCAGGCTCTCCTTT-3'

leptin(F): 5' -TGACACCAAAACCCTCATCA-3'

leptin(R): 5' -CTCAAAGCCACCACCTCTGT-3'

(6) ウェスタンブロッティング

マウス CAR に対するポリクローナル抗体は CAR

の部分配列 KTQYNQVPSDFERAPQC に対応するペプチドをウサギに免疫することにより作製した（業者に委託）。フィーダー細胞およびフィーダー細胞上で培養した mES 細胞からタンパク質を抽出し、マウス CAR 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。

（7）アルカリホスファターゼ染色

mES 細胞を 12 穴プレートに 1×10^4 cells/well で播種し、翌日、各 Ad ベクターを 3000 VP/cell の濃度で作用させた。播種 3 日目に再度同ベクターを作用させた後、5 日目にアルカリホスファターゼ染色をケミコン社の ES Cell Characterization Kit を用いて行った。

（8）Ad ベクターによる EB への遺伝子導入

2 日間ハンギングドロップを行うことで ES 細胞から EB を形成させ、その後 3 日間浮遊培養した Day5 EB に対して 10,000 VP/cell の濃度で Ad-CA-GFP を 1.5 時間作用させ、下記に示すように GFP の発現を解析した。

Ad ベクターを連続で作用させる場合は、Day0、2、5 の 3 点で 10,000 VP/cell の濃度で各 Ad ベクターを 1.5 時間作用させた。なお、脂肪細胞へ分化誘導するときも同様に 3 点で遺伝子導入を行った。

（9）GFP の発現解析

EB に対して Ad-CA-GFP を感染させ、2 日後に GFP の発現部位を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。さらに、EB をトリプシンでシングルセルにしてフローサイトメーターにより GFP 陽性細胞の割合を調べた。

（10）脂肪細胞への分化誘導

ハンギングドロップを 2 日間行って EB を形成させ、続いて 3 日間 all-*trans*-retinoic acid (RA)

含有培地で培養した。その後 RA を除いた培地で 2 日浮遊培養して、7 日目にゼラチンコートした 12 穴プレートに 4EB/well で播種して分化誘導培地（100 μ M 3-isobutyl-1-methylxanthine、100 nM insulin、1 μ M dexametasone、2 nM triiodothyronine）で培養した。

（11）GPDH アッセイ

12 穴プレートに播種し、分化誘導培地で 12 日、24 日培養した細胞を回収し、セルガレージ社の GPDH Assay kit を用いて GPDH (glycerol-3-phosphate dehydrogenase) の酵素活性を測定した。

（倫理面への配慮）

今年度は動物実験を行わなかった。また、ヒト由来の生体試料等を用いた実験も行わなかった。

C. 研究結果

LacZ を発現するプロモーターの異なる 4 種の 5 型（従来型）アデノウイルスベクター Ad-RSV-LacZ、Ad-CMV-LacZ、Ad-CA-LacZ、Ad-EF-LacZ を作製し、フィーダー細胞上で培養した mES 細胞にこれらのベクターを 3000 VP/cell の濃度で 1.5 時間作用させた。その結果、Ad-RSV-LacZ および Ad-CMV-LacZ を用いたときはほとんど発現が認められなかったのに対し、Ad-CA-LacZ および Ad-EF-LacZ を用いたときは高レベルの発現が認められた。また、Ad-CA-LacZ を用いたときはフィーダー細胞と mES 細胞両者に遺伝子導入されたのに対し、Ad-EF-LacZ を用いたときはフィーダー細胞にはほとんど発現が見られず、mES 細胞特異的に遺伝子発現が認められた。次に、フィーダー細胞非存在下の mES 細胞への遺伝子導入を調べた結果、Ad-CA-LacZ および Ad-EF-LacZ を用いた場合のみ、高い LacZ の発現が得られた。以上より、CA プロモーターあるいは

EF-1 α プロモーターを用いることにより、mES 細胞に効率よく遺伝子発現させることができ、特に EF-1 α プロモーターは ES 細胞特異的に発現させることができることが明らかとなった。

アデノウイルスは細胞表面上の CAR (coxsackievirus and adenovirus receptor) を介して細胞に感染することが知られている。CA プロモーターあるいは EF-1 α プロモーターを有するアデノウイルスベクターが mES 細胞において高い遺伝子発現を示したので、mES 細胞における CAR の発現を RT-PCR およびウエスタンブロッティングにより調べた。その結果、フィーダー細胞では CAR の発現は認められなかったが、フィーダー細胞上で培養した mES 細胞では CAR が高発現していることが明らかとなった。また、mES 細胞は未分化 ES 細胞のマーカーである Oct-3/4 も高発現していた。

次に、ES 細胞でのさらなる遺伝子発現の上昇を調べるために3種のファイバー改変型アデノウイルスベクターを作製した。すなわち、AdRGD-EF-LacZ はウイルスのファイバーノブの HI ループ部位にインテグリンと高親和性を有する RGD 配列のペプチドを挿入したベクターであり、AdK7-EF-LacZ はファイバーノブの C 末端に7つのリジン残基を挿入したベクターであり、AdF35-EF-LacZ は5型アデノウイルスのファイバーノブとシャフトを35型アデノウイルスのものに置換したベクターであり、それぞれの受容体は α vインテグリン、ヘパラン硫酸、CD46である。従来型を含めたこれら4種のベクターのうち、Ad-EF-LacZ が最も高効率かつ特異的に mES 細胞に LacZ を発現させることができた。AdRGD-EF-LacZ および AdK7-EF-LacZ は mES 細胞よりもむしろフィーダー細胞に遺伝子導入され、AdF35-EF-LacZ を用いたときは両細胞にわずかに発現が認められたのみであった。

次に、このベクターを用いて機能遺伝子を導入することにより、ES 細胞の分化を自由に制御可能かど

うかについて検討した。mES 細胞では LIF (leukemia inhibitory factor)/STAT3 シグナルや、Oct-3/4、Nanog (共に転写因子)などが多能性維持に必要であることが知られている。そこで、EF-1 α プロモーターを有した STAT3F (STAT3 dominant-negative mutant)、OCT-3/4、Nanog 発現 Ad ベクターを作製し、これらベクター作用後の ES 細胞の分化について検討した。その結果、コントロールと比較し、STAT3F および Oct-3/4 を導入した mES 細胞では LIF 存在下においても大部分の細胞が分化し、三胚葉各マーカー (外胚葉:FGF5, 中胚葉:brachyury (T), 内胚葉:GATA6) の発現を RT-PCR にて調べた結果、三胚葉いずれにも分化していることが明らかとなった。さらに、STAT3F による分化は Nanog を共発現することによりレスキューされ、未分化を維持し、Ad ベクターを用いて機能遺伝子を導入することにより分化を自由に制御できる可能性が示された。

ES 細胞を *in vitro* で目的の細胞に分化させるには、まず、胚様体 (EB) とよばれる発生初期胚に似た構造を有する細胞集合体を形成させ、その後液性因子などを加えることにより目的の細胞に分化させるという手法がとられる。ES 細胞およびハンギングドロップ後 2、5 日目の EB を用いて、遺伝子発現を RT-PCR にて検討した結果、ES 細胞および EB の両者においてアデノウイルス受容体 CAR (coxsackievirus and adenovirus receptor) の発現が認められた。また、ES 細胞の未分化維持に必須の転写因子である Oct-3/4 や Nanog は ES 細胞で高発現しており、EB に分化するにつれ発現は低下していた。さらに、EB では中胚葉マーカーである brachyury (T) の発現がみとめられた。

次に、RSV、CMV、CA、EF-1 α 各4種のプロモーターを有する LacZ 発現 Ad ベクターを、ハンギングドロップ後 5 日目の EB に対し、3,000 VP/cell の濃度で作用させた結果、CA プロモーターを有した

Ad ベクターを作用させた場合に最も高い遺伝子発現を示し、EB には CA プロモーターを有する Ad ベクターが最適であることが示された。

EB は分化した ES 細胞の凝集体であるため、1 回の作用でその内部にまで Ad ベクターを感染させるのは困難であると考えられる。そこで、これまでの 1 回作用に対し、EB 作製後 0、2、5 日目の計 3 回 CA プロモーターを有した GFP 発現 Ad ベクターを作用させ、1 回作用と 3 回作用の遺伝子導入効率について検討した。その結果、1 回作用させた場合、24% の細胞に遺伝子に GFP の発現がみとめられたのに対し、3 回作用させた場合では 38% の細胞に GFP の発現がみとめられ、EB 形成中に Ad ベクターを作用させることにより、発現効率の上昇ならびに EB 内部での発現がみとめられることが明らかとなった。以上より、Ad ベクターを用いた EB への高効率遺伝子導入法が確立できたので、次にこの手法を用いて機能遺伝子を EB に導入し、目的の細胞に分化させることを試みた。

In vitro で成熟脂肪細胞を作製することは脂肪細胞分化に関する基礎研究および再生医療にとって極めて重要である。そこで、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターである PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ) 遺伝子を Ad ベクターを用いて EB に導入し、ES 細胞から脂肪細胞に分化させた。一般に in vitro で脂肪細胞に分化させる場合、4 種の液性因子 (3-isobutyl-1-methylxanthine、insulin、dexametasone、triiodothyronine) を培地に加えることにより行われる。まず、これらの液性因子非存在下で PPAR γ cDNA を導入したところ、脂肪細胞分化の指標である GPDH (glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 活性が有意に上昇した。ただし、その効果は低いものであったことから、次に液性因子存在下で PPAR γ cDNA を導入した。その結果、PPAR γ と液性因子の両者を作用させた場合、液性

因子単独作用時と比較し有意に GPDH 活性が上昇した。したがって、Ad ベクターを用いて PPAR γ 遺伝子を EB に導入することにより、従来の方法と比較し効率良く脂肪細胞へと分化誘導できることが示された。

D. 考察

本研究ではアデノウイルスベクターによる mES 細胞への高効率遺伝子導入法の開発を試み、それに成功することができた。種々のプロモーターを検討した結果、mES 細胞には EF-1 α プロモーターが最も高効率かつ特異的に遺伝子発現させることができることが明らかとなった。また、従来型アデノウイルスベクターと種々のファイバー改変型アデノウイルスベクターとを比較した結果、従来型ベクターが最も特異的に mES 細胞に遺伝子導入可能であった。これは、mES 細胞は CAR を発現しているが、フィーダー細胞は CAR を発現していないことに起因することも明らかとなった。一方、mES 細胞だけでなく、フィーダー細胞にも遺伝子導入したいときは AdRGD-EF-LacZ や AdK7-EF-LacZ などのベクターが有効であることも示された。

そこで、このベクターを用いて ES 細胞に機能遺伝子を導入し、実際に細胞の分化を制御できるかどうかについて検討した。その結果、分化を誘導すると考えられている遺伝子 (Oct-3/4 および STAT3F) を導入することで、大部分の ES 細胞を三胚葉全てに分化させることに成功した。また、この細胞分化は ES 細胞の未分化維持に必須の遺伝子 (Nanog) を共導入することにより抑制できることも明らかにし、我々の開発した Ad ベクターを用いることで、ES 細胞の分化を自由にコントロールできる可能性を示した。

さらに、in vitro において ES 細胞から目的の細胞に分化誘導する場合の中間体である EB に対し、高効率に外来遺伝子を導入する技術の開発を試み、

CA プロモーターを有した従来型 Ad ベクターが最適であることを明らかにした。また、EB 形成過程で Ad ベクターを感染させることにより、EB 内部にも遺伝子を発現させることが可能であった。さらに、この Ad ベクターを用いて PPAR γ 遺伝子を EB に導入することにより、効率よく脂肪細胞に分化誘導が可能であった。今後、これらの技術を用いて他の機能遺伝子を導入することにより、血液細胞や骨芽細胞など他の系列の細胞種にも分化させることが可能であると考えられ、再生医療への応用に向けたさらなる研究進展が望まれる。

E. 結論

(1) ES 細胞および EB に最適な Ad ベクターを開発した。

(2) 最適化された Ad ベクターを用いて ES 細胞および EB に機能遺伝子を導入することにより、効率よく分化を制御できることを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

K. Kawabata, F. Sakurai, T. Yamaguchi, T. Hayakawa, and H. Mizuguchi. Efficient gene transfer into mouse embryonic stem cells with adenovirus vectors. *Mol. Ther.*, 12, 547-554, 2005

K. Kawabata, F. Sakurai, N. Koizumi, T. Hayakawa, H. Mizuguchi. Adenovirus vector-mediated gene transfer into stem cells. *Mol. Pharm.*, 3, 95-103, 2006.

川端健二, 櫻井文教, 水口裕之. 改良型アデノウイルスベクターを用いた各種幹細胞への遺伝子デリバリー. *DDS*. in press.

2. 学会発表

川端健二, 水口裕之, 櫻井文教, 山口照英, 早川堯

夫. Development of an adenoviral vector system for embryonic stem (ES) cells. 第10回日本遺伝子治療学会総会, 東京, 2004年7月

川端健二, 水口裕之, 櫻井文教, 山口照英, 早川堯夫. ES細胞に対する高効率アデノウイルスベクターの開発. 日本薬学会第125年会, 東京, 2005年3月

田代克久, 川端健二, 櫻井文教, 早川堯夫, 水口裕之. マウス胚性幹細胞及び胚葉体に対する高効率アデノウイルスベクターの開発. 第28回日本分子生物学会年会, 福岡, 2005年12月

田代克久, 川端健二, 櫻井晴奈, 倉知慎之輔, 櫻井文教, 中川晋作, 早川堯夫, 山西弘一, 水口裕之. アデノウイルスベクターを用いたマウス胚様体への遺伝子導入法の確立. 日本薬学会第127年会, 富山, 2007年03月

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成18年度

政策創薬総合研究事業
若手研究者奨励研究報告書

平成19年7月31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