

図3 副腎皮質におけるKi67の発現

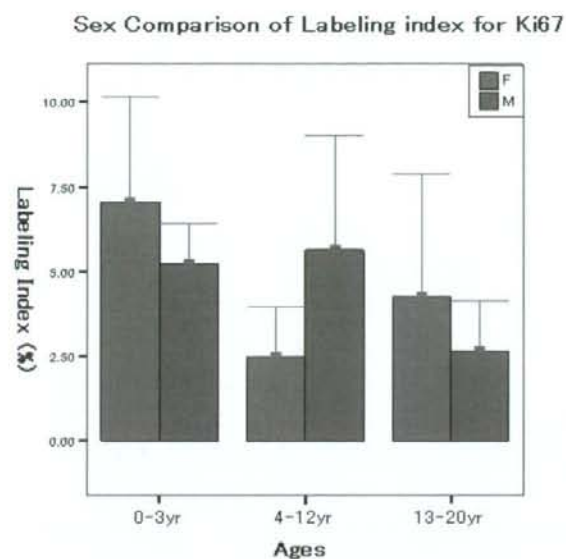
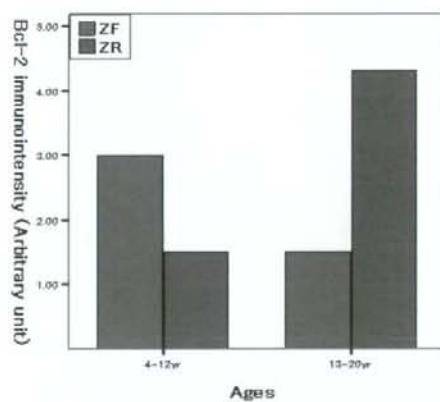
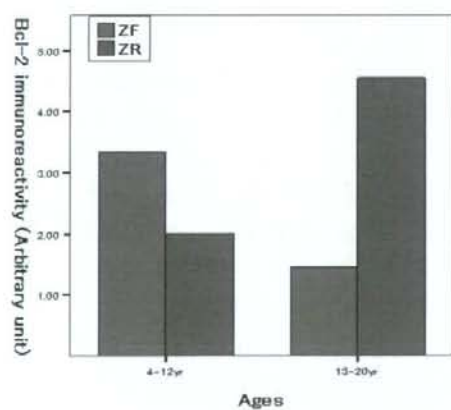


図4 副腎皮質におけるBcl-2の発現



# Yeast two-hybrid system を用いた

## DAX-1 相互作用因子同定の試み

藤枝憲二、向井徳男、鈴木 滋、中村英記

旭川医科大学小児科

### 【研究要旨】

X連鎖性先天性副腎低形成症の原因遺伝子として同定されている DAX-1(NR0B1)は、副腎のみならず生殖腺の分化・形成において重要な働きを有する一方、ステロイド産生においても重要な転写因子である。そのため、DAX-1 と相互作用する因子を新たに同定し、疾患との関連や、ステロイド産生における機能について検討することを目的とした。作製したヒト副腎由来 cDNA ライブラリーに対して、yeast two-hybrid system を用いたスクリーニングを行った。その結果、約 30 種の陽性クローンを同定し、現在さらなる検証を行っている。

### A. 研究目的

先天性副腎低形成症にはさまざまな原因が同定されているが、低ゴナドトロピン性性腺機能低下を合併する X連鎖性先天性副腎低形成症の原因遺伝子として DAX-1(NR0B1)が知られている。この DAX-1 異常症では精巣での精子形成にも障害があらわれ、発症時期の多くは新生児期～乳幼児期であるが、成人になってから発症する例もあり幅広く、DAX-1 異常症の表現型は臨床的に多様であることが明らかになってきた。

DAX-1 は核内ホルモン受容体スーパーファミリーに属する転写因子だが、未だ生体内リガンド不明のオーファン受容体に分類される。典型的な Zn フィンガータイプの DNA 結合領域が存在せず、約 3 回の繰り返し配列を有するのが特徴である。遺伝子異常により転写活性に影響を及ぼす、核内移行に影響するなどの機能異常が報告されているが、作成されたノックアウトマウスの表現型はヒトの症状とは一部乖離していた。また、ステロイドホルモン産生に関連する視床下部-下垂体-副腎/性腺の内分泌軸に沿った発現からも単に副腎の分化形成に関わ

るだけではなく、ステロイド産生においても重要な役割を有する因子である。これまで抑制性の転写因子としての機能を有することが報告されているが、結合する転写共役因子などを含めた転写調節機構や、細胞内核移行メカニズムについては不明な点が残されている。このため、ステロイドホルモン産生の調節機構における新たな知見が得られる可能性があると考え、この DAX-1 との相互作用因子の同定を目指す。

### B. 研究方法

ヒト副腎組織から抽出された RNA (total RNA および mRNA) を購入し、それらを鋳型として cDNA 合成を行って、ヒト副腎由来の cDNA ライブラリーを作製した。この cDNA ライブラリーを yeast two-hybrid system を用いて、ヒト全長 DAX-1 との相互作用因子のスクリーニングを行った。陽性コロニーからライブラリープラスミドを抽出し、塩基配列を同定してデータベースと照合することでその因子を同定し、これまでに蓄積されている発現様式や機能についての情報を収集する。さらに、候補因子同定後には DAX-1 タンパクと候補因子タン

パクとのタンパク間相互作用の有無について、特異的抗体を用いた免疫沈降法の手法や、哺乳動物細胞を用いた two-hybrid アッセイにて検討する。さらに、候補因子については DAX-1 の転写抑制作用に及ぼす影響をルシフェラーゼアッセイによる転写活性について検討していく。

### C. 研究結果

DAX-1 タンパクについては1次スクリーニングの結果約 80 個の陽性コロニーを同定し、さらなる確認実験を実施したところ 27 種の候補に絞られた。今後は各候補因子について一つずつタンパク-タンパク相互作用の確認を他の方法論を用いて検証していく予定で、これまでのところ 17 種について検討した結果、4 因子が陽性となった。また、候補因子の発現様式や DAX-1 の転写調節機能への影響について検討すべく、準備を進めている。

### D. 考察

DAX-1 相互作用候補因子については絞込みを行うと同時に、有望因子についてはその発現様式や転写調節機能に対する効果をルシフェラーゼアッセイなどの手法を用いて検討していきたい。

### E. 結論

ヒト副腎由来の RNA から合成した cDNA ライブラリーについて DAX-1 タンパクとの相互作用因子の同定を目指し、yeast two-hybrid system を用いたスクリーニングを行ったところ、4 種類の因子が候補としてあがった。陽性の可能性がある残り 10 種についてはさらなる相互作用の確認作業を行っており、今後、候補因子についての解析を進めていきたい。

### F. 研究発表

1) Okuhara K, Abe S, Kondo T, Fujita K, Koda N, Mochizuki H, Fujieda K, Tajima T: Four Japanese patients with adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism caused by

DAX-1 gene mutations: mutant DAX-1 failed to repress steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and luteinizing hormone beta-subunit gene promoter activity. *Endocr J.* 2008 Mar;55(1):97-103

- 2) Fujieda K: Multiple endocrine neoplasia syndromes. *Horm Res.* 2007;68 Suppl 5:100
- 3) Tanaka T, Fujieda K, Yokoya S, Seino Y, Tada H, Mishina J: Efficacy and safety of growth hormone treatment in children born small for gestational age in Japan. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2008 May;21(5):423-31
- 4) Tajima T, Ohtake A, Hoshino M, Amemiya S, Sasaki N, Ishizu K, Fujieda K: OTX2 loss of function mutation causes anophthalmia and combined pituitary hormone deficiency with a small anterior and ectopic posterior pituitary. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Jan;94(1):314-9
- 5) Al-Haggag M, Bakr A, Tajima T, Fujieda K, Hammad A, Soliman O, Darwish A, Al-Said A, Yahia S, Abdel-Hady D: Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: unusual clinical associations and novel claudin16 mutation in an Egyptian family. *Clin Exp Nephrol.* 2009 Jan 24. [Epub ahead of print]
- 6) Fukami M, Nishimura G, Homma K, Nagai T, Hanaki K, Uematsu A, Ishii T, Numakura C, Sawada H, Nakacho M, Kowase T, Motomura K, Haruna H, Nakamura M, Ohishi A, Adachi M, Tajima T, Hasegawa Y, Hasegawa T, Horikawa R, Fujieda K, Ogata T: Cytochrome P450 Oxidoreductase Deficiency: Identification and Characterization of Biallelic Mutations and Genotype-Phenotype Correlations in 35 Japanese Patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Mar 3. [Epub



ahead of print]

- 7) 藤枝憲二：副腎ホルモン産生異常における難病の現況とその対策、ホルモンと臨床 56: 61-70, 2008
- 8) 藤枝憲二：原発性副腎機能低下症の診断 先天性副腎低形成、日本内科学会雑誌 97: 736-742, 2008
- 9) 藤枝憲二：【処方計画法】 内分泌・代謝疾患 先天性副腎過形成、総合臨床 57 巻増刊: 1230-1231, 2008
- 10) 藤枝憲二：性分化異常症の診断と治療 特に先天性副腎過形成症を中心に、日本小児泌尿器科学会雑誌 16: 125-129, 2008
- 11) 藤枝憲二：【小児疾患診療のための病態生理】 内分泌疾患 先天性副腎皮質過形成症、小児内科 40 巻増刊: 752-759, 2008
- 12) 藤枝憲二：【新生児内分泌疾患マス・スクリーニングの現状と問題点】 新生児内分泌疾患マス・スクリーニングの現状 先天性甲状腺機能低下症と先天性副腎過形成症、ホルモンと臨床 56: 873-879, 2008

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許許諾  
特になし
2. 実用新案登録  
特になし
3. その他  
特になし

### (3) 副腎再生による新しい副腎不全治療法の開発

## Ad4BP/SF-1 遺伝子のメチル化制御

柳瀬 敏彦、田中 智子、白水 久男、名和田 新、高柳 涼一

九州大学大学院医学研究院病態制御内科学

### 【研究要旨】

マウス *ad4bp/sf1* 遺伝子のメチル化と遺伝子発現との関連を明らかにするため、培養細胞、正常組織、発生期胚を用いてマウス *ad4bp/sf1* 遺伝子の第1イントロン内の CpG アイランドに注目し、この領域のメチル化について解析した。培養細胞では *ad4bp/sf1* 遺伝子のイントロン1の ICI-2-1 領域のメチル化と *sf1/ad4bp* 遺伝子のサイレンシングとの関与が示唆された。一方、ICI-2-1 領域のメチル化と *sf1/ad4bp* 遺伝子の組織特異的発現様式や時期特異的発現様式とは必ずしも関連性を認めなかった。メチル化機構は Ad4BP/SF-1 の発現調節の一部の機序として重要であるが、全てではなく、転写調節因子や他のエピジェネティック制御を介した発現調節も重要と考えられた。我々は、骨髄間葉系幹細胞に Ad4BP/SF-1 遺伝子を導入することにより、ステロイド産生細胞へ変換し得ることを報告してきた。この細胞を脱メチル化処理することにより、Ad4BP/SF-1 遺伝子の約 500 倍の発現誘導を惹起したが、ステロイド産生能を認めるには至らなかった。

### A. 研究目的

核内受容体 Ad4BP/SF-1 はステロイド合成酵素群の普遍的転写因子でステロイドホルモン産生を調節している。Ad4BP/SF-1 は生殖腺や副腎の発生に不可欠な因子である。Ad4BP/SF-1 は組織特異的な発現パターンを示し、副腎、精巣、卵巣に高発現、下垂体ゴナドトロフ、脾臓、胎盤においても発現している。私達はこれまでに Ad4BP/SF-1 を骨髄由来および脂肪組織由来間葉系幹細胞に強制発現させることにより、副腎ステロイドおよび性ステロイド産生細胞へと形質転換し得ることを報告してきた<sup>1-3)</sup>。Ad4BP/SF-1 の発現調節に関する研究報告の多くは、この遺伝子の転写制御機構に関するものであり、Ad4BP/SF-1 遺伝子のメチル化の役割はこれまで解明されていない。

DNA のメチル化は、エピジェネティックな遺伝子制御の重要なメカニズムの一つで、ゲノムインプリンティングや X 染色体の不活化、発生期や成体における組織特異的な発現の制御に

も関与している。CpG のシトシン残基がメチル化されると、methyl CpG-binding protein (MeCP) 結合の標的となる。MeCP の結合はクロマチン構造を変化させ、転写因子を阻害し、遺伝子の転写に影響を与える。近年、遺伝子の組織特異的な発現と CpG アイランドのメチル化状態との間に関連があると考えられている。本研究において、私達はマウス *ad4bp/sf1* 遺伝子のメチル化と遺伝子発現との関連を明らかにするため、マウス Ad4bp/Sf1 遺伝子の第1イントロン内の CpG アイランドに注目し、培養細胞、成獣正常組織、発生期胚を用いてこの領域のメチル化について解析した。

### B. 研究方法

#### (1) CpG island 予測

マウス *ad4bp/sf1* およびヒト Ad4BP/SF-1 遺伝子配列は Ensembl より得た。CpG island の予測は、CpG island 検索プログラムである CPGPLOT にて解析した<sup>4)</sup>。



## (2) DNA と RNA の調整

マウス副腎腫瘍細胞株 Y-1 とマウスライディッヒ腫瘍細胞株 I-10 は ATCC より購入した。Y-1 細胞と I-10 細胞は、Ad4BP/SF-1 発現陽性細胞として用いた。またマウス骨髄由来間葉系細胞 (bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMCs) を Ad4BP/SF-1 非発現細胞として用いた。ゲノム DNA は Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega) にて調整した。培養細胞並びにマウス各組織の total RNA は ISOGEN (Wako) を用いて調整した<sup>4)</sup>。

## (3) Real-time PCR 法

(2) で調整した RNA を SuperScriptIII (Invitrogen) にて逆転写反応を行った。定量的 real-time PCR は LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics) にて行った。SF-1/Ad4BP のプライマー配列は、5' -TAT CCT GCC TTC TCT AAC CGC AC-3' および 5' -TCT TCC TTG CCC TAC TGG ACC T-3'、 $\beta$ -actin に対するプライマーは 5' -GCA ATG CCT GGG TAC ATG GTG G-3' および 5' -GCT GTA CCA CAG GCA TTG TGA TGG-3' を用いた。 $\beta$ -actin に対する相対的発現量を算出した<sup>4)</sup>。

## (4) 制限酵素を用いたメチル化の解析

ゲノム DNA を制限酵素 SmaI にて消化した。SmaI の認識配列に CpG は含まれない。次に HpaII または MspI にて消化した。イソジマーである HpaII と MspI は CCGG 配列を認識し切断するが、HpaII は内側の CG のシトシンがメチル化されている場合、DNA を切断できない。HpaII または MspI にて消化後、定性的 PCR または定量的 PCR を行った<sup>4)</sup>。

## (5) バイサルファイトシーケンス法

ゲノム DNA を Methyamp DNA modification kit (Epigenetek) にて処理した。ICI 領域を PCR にて増幅し、pCRII-TOPO TA にクローニング後、任意に 10 コロニーを選択し、遺伝子配列をシーケンサーにて決定し、メチル化シトシンを決定した<sup>4)</sup>。

## C. 研究結果

## (1) Introgenic CpG island

マウス ad4bp/sf-1 遺伝子を CPGPLOT プログラムにて解析した結果、第 1 イントロンに CpG アイランドが存在した (図 1)。私達はこの CpG アイランドを 3 つの領域に分け、それぞれ intronic CpG island (ICI)-1, -2, -3 と命名した。さらに ICI-2 は 2 領域に分けた (ICI-2-1, ICI-2-2)。これらの 3 つの領域はヒト Ad4BP/SF-1 遺伝子配列と高い相同性を示したため、この領域のメチル化状態と Ad4BP/SF-1 の発現との関連が予想された<sup>4)</sup>。

## (2) 培養細胞における ICI のメチル化

Ad4BP/SF-1 発現細胞であるマウス副腎皮質腫瘍由来細胞株 Y-1 およびマウス精巣腫瘍ライディッヒ細胞 I-10 または Ad4BP/SF-1 非発現細胞であるマウス骨髄由来間葉系幹細胞 BMCs を用いて、培養細胞における Ad4BP/SF-1 の発現と ICI のメチル化との関連について検討した。制限酵素 HpaII は認識配列内の CpG がメチル化されている場合、DNA を消化せず、PCR の結果、バンドが検出される。制限酵素 HpaII を用いた解析の結果、Ad4BP/SF-1 発現細胞である Y-1 細胞では ICI-2-1 が低メチル化状態で、Ad4BP/SF-1 発現細胞である I-10 細胞では ICI 領域は 3 領域ともに低メチル化状態であった。一方、Ad4BP/SF-1 非発現細胞である BMC では ICI 領域は 3 領域とも高メチル化状態であった (図 2-B)。ICI-2-1 は Y-1 細胞と I-10 細胞に共通して低メチル化状態であり、ad4bp/sf-1 遺伝子発現様式ともっとも良く相関したことから、この領域についてさらに解析を行った。Y-1 細胞と BMC についてバイサルファイトシーケンス法にて ICI-2-1 領域を解析した結果、Y-1 細胞では、メチル化シトシンと非メチル化シトシンが混在していたが、BMC では高メチル化状態であることが確認された (図 3)<sup>4)</sup>。

## (3) マウス組織における ICI-2-1 のメチル化

次に、12 週齢マウス組織における ICI-2-1 について解析した。制限酵素 HpaII を用いた解析の結果、Ad4BP/SF-1 発現組織である副腎、精巣および下垂体では ICI-2-1 は低メチル化状態

であった(図4-B)。しかし、Ad4BP/SF-1非発現組織である肺、腎臓、筋、胸腺においても低メチル化状態であった(図4-B)。バイサルファイトシーケンスの結果においても、Ad4BP/SF-1発現組織の副腎、性腺とともに同非発現組織の肺もICI-2-1は低メチル化状態であった(図4-C)。次に胚発生期におけるメチル化について明らかにするため、交尾後16.5日胚と新生仔の卵巣を解析した。16.5日胚と新生仔では成獣と比較してAd4BP/SF-1は低発現であったが、16.5日胚、新生仔、成獣の卵巣ICI-2-1はいずれも低メチル化状態でAd4BP/SF-1の発現程度とメチル化との間に一定の関連を認めなかった<sup>4)</sup>。

#### (4) 脱メチル化剤処理によるSF-1/Ad4BPの発現誘導

内因性のad4bp/sf1遺伝子の発現誘導を期待して、Ad4BP/SF-1非発現細胞であるBMCをDNAメチル化阻害剤である5-Azacytidineを含む培地にて4日間培養した結果、未処理の細胞と比較してmRNAレベルで500倍程度のAd4BP/SF-1の発現が誘導されたが、Y-1細胞におけるAd4BP/SF-1の発現量にははるかに及ばず(図5)、培養上清中へのステロイドホルモンの分泌は認められなかった<sup>4)</sup>。

## D. 考察

以上の解析結果から、マウス組織におけるad4bp/sf1遺伝子の組織特異的発現および時期特異的発現とICI-2-1のメチル化との間には関連はみられなかったが、培養細胞では、ICI-2-1のメチル化とマウスad4bp/sf1遺伝子のサイレンシングとの関与が示唆された。極く最近、Ad4BP/SF-1遺伝子のメチル化と組織特異的発現との関係が報告されている。これらの報告ではAd4BP/SF-1のプロモーター領域と考えられているエキソン1近傍領域のCpG islandはAd4BP/SF-1発現組織では低メチル化状態で、非発現組織では高メチル化状態であることが報告されている<sup>9, 10)</sup>。また、マウス卵巣においてSF-1/Ad4BPの発現は生後誘導されるが、胚生12.5日卵巣ではプロモーター領域のCpGが既

に低メチル化状態であったことから、メチル化のパターンは胚生期に決定されることが示唆されている<sup>6)</sup>。我々が検討したICI-2-1領域も同様に、胚生期、生後、成獣の卵巣では低メチル化状態であったが、時期特異的Ad4BP/SF-1の発現変動との関連性は認めなかった。一方、Ad4BP/SF-1遺伝子発現調節はDNAのメチル化だけではなく、E box結合配列やその結合タンパクなどの調節因子の関与<sup>7)</sup>が知られているほか、Ad4BP/SF-1の組織特異的発現に関与するエンハンサー領域が同定されてきている(図1参照)<sup>9, 10)</sup>。

我々は間葉系幹細胞に外因性のAd4BP/SF-1を強制発現させることによりステロイド産生細胞を創生させることに成功したが、エピジェネティックな制御によりAd4BP/SF-1の遺伝子発現を誘導できれば、発現ベクターによる遺伝子導入の操作なしに同じ目的を達成できる可能性がある。その観点から骨髄間葉系細胞の脱メチル化剤処理を試みた。予想どおり、元来、Ad4BP/SF-1の非発現細胞である骨髄間葉系細胞においてAd4BP/SF-1の約500倍の発現誘導を認めたが、その発現量はY1細胞の基礎Ad4BP/SF-1発現量にははるかに及ばず、ステロイド産生能の獲得には至らなかった。今後、脱メチル化処理以外のエピジェネティックなSF-1発現制御機構を模索する必要性がある。

## E. 結論

培養細胞ではad4bp/sf1遺伝子のイントロン1のICI-2-1領域のメチル化とマウスad4bp/sf1遺伝子のサイレンシングとの関与が示唆された。脱メチル化機構はAd4BP/SF-1の発現調節の一部の機序として重要であるが、全てではなく、転写調節因子や他のエピジェネティック制御を介した発現調節も重要と考えられた。

## F. 参考文献

- 1) Gondo S, Yanase T, Okabe T, Tanaka T, Morinaga H, Nomura M, Goto K, Nawata H. *Genes Cells* 9: 1239-1247, 2004



- 2) Tanaka T, Gondo S, Okabe T, Ohe K, Shirohzu H, Morinaga H, Nomura M, Tani K, Takayanagi R, Nawata H, Yanase T. *J Mol Endocrinol* 39: 343-350, 2007
- 3) Gondo S, Okabe T, Tanaka T, Morinaga H, Nomura M, Takayanagi R, Nawata H, Yanase T. *Endocrinology* 149: 4717-4725, 2008
- 4) Shirohzu H, Okabe T, Gondo S, Tanaka T, Ohe K, Morinaga H, Kawate H, Nomura M, Takayanagi R, Nawata H, Yanase T. *Biochem Biophys Res Commun* 369: 862-867, 2008
- 5) Xue Q, Lin Z, Yin P, Milad M P, Cheng YH, Confino E, Reierstad S, Bulun SE. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 3261-3267, 2007
- 6) Hoivik EA, Aumo L, Aesoy R, Lillefosse H, Lewis AE, Perrett RM, Stallings NR, Hanley NA, Bakke M. *Endocrinology* 149, 5599-5609, 2008
- 7) Hammer GD, Parker KL, Schimmer BP. *Endocrinology* 146:1018-1024, 2005
- 8) Shima Y, Zubair M, Ishihara S, Shinohara Y, Oka S, Kimura S, Okamoto S, Minokoshi Y, Suita S, Morohashi K. *Mol Endocrinology* 19: 2812-2823, 2005
- 9) Zubair M, Ishihara S, Oka S, Okumura K, Morohashi K. *Mol Cell Biol* 26: 4111-4121, 2006
- 10) Shima Y, Zubair M, Komatsu T, Oka S, Yokoyama C, Tachibana T, Hjalt TA, Drouin J, Morohashi, K. *Mol Endocrinol* 22, 1633-1646, 2008
- Ohe K, Morinaga H, Kawate H, Nomura M, Takayanagi R, Nawata H, Yanase T: Methylation of a conserved intronic CpG island of mouse SF-1 is associated with cell-specific expression of SF-1 in a culture system but not with tissue-specific expression. *Biochem Biophys Res Commun* 369: 862-867, 2008
- 3) Namiki M, Akaza H, Shimazui T, Ito N, Iwamoto T, Baba K, Kumano H, Koh E, Tsujimura A, Matsumiya K, Horie S, Maruyama O, Marumo K, Yanase T, Kumamoto Y: Working committee on clinical practice guidelines for late-onset hypogonadism: Japanese Urological Association/Japanese Society for Study of Aging Male. Clinical practice manual for late-onset hypogonadism syndrome. *Int J Urol* 15: 377-388, 2008
- 4) Yanase T, Fan W, Kyoya K, Liu M, Takayanagi R, Kato S, Nawata H: Androgens and metabolic syndrome: lessons from androgen receptor knock out (ARKO) mice. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 109(3-5):254-7, 2008
- 5) Gondo S, Okabe T, Tanaka T, Morinaga H, Nomura M, Takayanagi R, Nawata H. Yanase T: Adipose tissue-derived and bone marrow-derived mesenchymal cells develop into different lineage of steroidogenic cells by forced expression of steroidogenic factor 1. *Endocrinology* 149(9):4717-25. 2008
- 6) Fan W, Yanase T, Nishi Y, Chiba S, Okabe T, Nomura M, Yoshimatsu H, Kato S, Takayanagi R, Nawata H: Functional potentiation of leptin-STAT3 signaling by the androgen receptor. *Endocrinology* 149(12): 6028-6036, 2008
- 7) Maeda Y, Inoguchi T, Tsubouchi H, Sawada F, Sasaki S, Fujii M, Saito R, Yanase T, Shimabukuro M, Nawata H, Takayanagi R: High prevalence of peripheral arterial

#### G. 研究発表

- 1) Matoba Y, Inoguchi T, Nasu S, Suzuki S, Yanase T, Nawata H, Takayanagi R: Optimal cut-points of waist circumference for the clinical diagnosis of metabolic syndrome in the Japanese population. *Diabetes Care* 31: 590-592, 2008
- 2) Shirohzu H, Okabe T, Gondo S, Tanaka T,

disease diagnosed by low ankle-brachial index in Japanese patients with diabetes: The Kyushu Prevention Study for Atherosclerosis. *Diabetes Res Clin Pract.* 82(3): 378-82, 2008

8) 柳瀬敏彦：特集 副腎不全：診断と治療の進歩 2. 副腎ホルモンの補充療法の現状と問題点、*日本内科学会雑誌* 97:772-776, 2008

9) 伊藤 裕、柳瀬敏彦、笠山宗正、小島元子、大関武彦：副腎不全に対する副腎ステロイドホルモン補充療法の現状と展望、*日本内科学会雑誌* 97: 777-796, 2008

## H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし

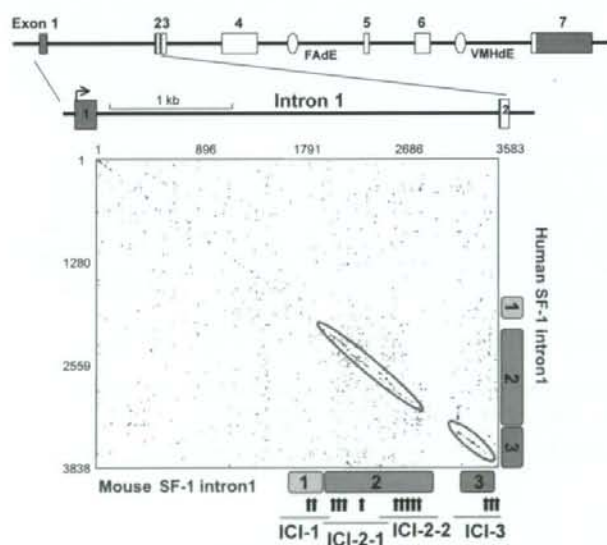
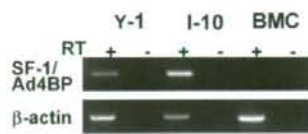


図1 マウス *Sf-1/Ad4bp* 遺伝子第1イントロンにおける CpG island 構造

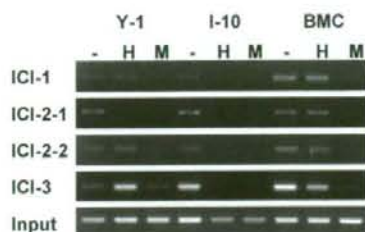
FAdE, 胎児副腎特異的エンハンサー配列  
VMHdE, VMH特異的エンハンサー配列

A. SF-1/Ad4BP の発現



RT, reverse transcriptase

B. 培養細胞におけるICIのメチル化



-: not digested  
H: *Hpa II*  
M: *Msp I*

Y-1, I-10の ICI-2-1領域は低メチル化状態。一方、BMCでは高メチル化を示唆

図2 培養細胞におけるICIのメチル化

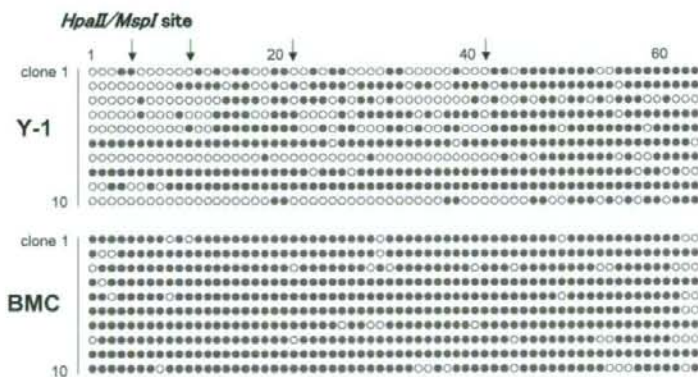


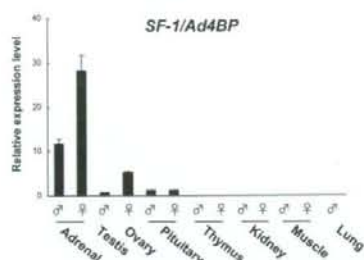
図3 Y-1細胞と BMC における ICI-2-1 のメチル化

10 randomly picked clones (No.1-10) were subjected to sequencing. Methylation status of 64 CG nucleotides are indicated.

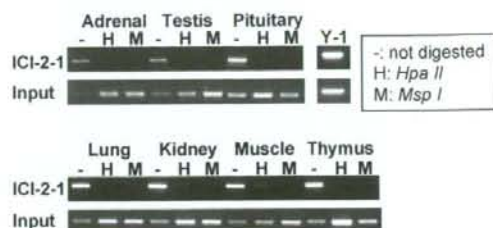
Open circles indicate unmethylated cytosines, closed circles indicate methylated cytosines.



A. SF-1/Ad4BP mRNAの発現



B. ICI-2-1のメチル化



C. ICI-2-1のメチル化 (bisulfite sequence法)

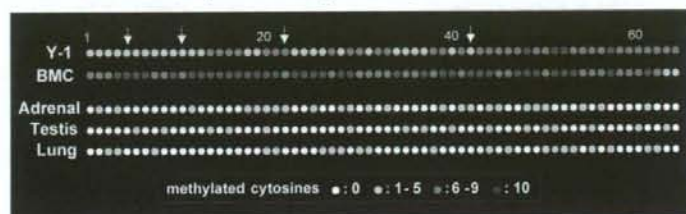


図4 マウス組織における ICI-2-1 のメチル化

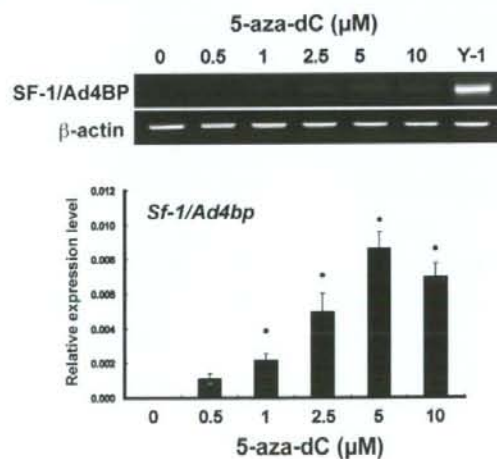


図5 脱メチル化剤処理によるSF-1/Ad4BPの発現誘導

# ステロイド産生細胞の分化再生に関する研究

宮本 薫

福井大学医学部分子生体情報学

## 【研究要旨】

副腎ステロイドホルモン産生異常の治療としては、主にホルモン補充療法が用いられている。一方ホルモン補充療法では、頻繁な補充が必要であることに加えて、様々な副作用があることから、これによって変わる治療法が求められている。私どもは、ホルモン補充療法に変わりうる再生治療法の開発を目指し、間葉系幹細胞を副腎ステロイド産生細胞に転換することを試みている。私どもは、SF-1だけでなく同じファミリーに属する転写因子LRH-1をヒト骨髄間葉系幹細胞に導入しcAMP処理することによりステロイドホルモン産生能を持つ細胞株を得ることを報告した。本年度はさらに詳細に検討したところ、これらの転写調節因子により、標的遺伝子群近傍がクロマチン構造変化を伴うエピジェネティックな修飾を受けていることが明らかとなった。

## A. 研究目的

副腎ホルモン産生異常に関連した疾患の治療に、幹細胞を用いた再生医療の応用が期待されている。副腎皮質ホルモン産生異常の治療には、主にホルモン補充療法が用いられているが、より生理的なホルモン動態を考慮すると外部からの投与によるホルモン補充療法にかわる自律的な分泌調節が可能な再生医療の開発が望まれる。私どもはこういった観点に立って、幹細胞からフィードバック機能を備えた副腎皮質ホルモン産生細胞の作製を試みている。幹細胞としては全能性を持つES細胞の利用も考えられるが、倫理的問題や技術的な困難さが伴うため現実的でない。私どもはES細胞に代わる幹細胞として骨髄由来の間葉系幹細胞に注目した。骨髄間葉系幹細胞は成体から比較的容易に採取できること、さらにES細胞ほどではないにしろ様々な細胞に分化しうることから再生医療への応用に適した幹細胞である。本研究の目的は、骨髄間葉系幹細胞を用いて、フィードバック機能を備えた副腎皮質ホルモン産生細胞を作り出し、副腎ステロイドホルモン産生異常症に対する再生医療への基礎的検討を行うことである。

## B. 研究方法

1. Ad4BP/SF-1 および LRH-1 によるステロイド合成関連遺伝子群の転写活性化能を、各遺伝子プロモーター領域を蛍光タンパク質の上流に組み込んだレポーターシステムを用いて検討した。ステロイド合成関連遺伝子群として、主として StAR, CYP11A, CYP17 の各遺伝子プロモーター領域を用いた。レポーターベクターと LRH-1 および Ad4BP/SF-1 発現ベクターとを共発現させて、これら遺伝子プロモーターの活性化に対する影響を解析した。
2. 上記ステロイド合成関連遺伝子に関して、そのプロモーター領域における DNA メチル化状態の変化を、パイサルファイト法を用いて解析した。ヒト骨髄間葉系幹細胞に LHR-1 を安定導入した後 8Br-cAMP により刺激することで CYP11A1 や CYP17 等のステロイド合成酵素の発現誘導を行った。この際これら遺伝子上流に存在する CpG の DNA メチル化状態を解析した。
3. 同様にヒト骨髄間葉系幹細胞にアデノウイルスを用いて LRH-1 および SF-1 を一過性に発現させ、StAR および CYP17 遺伝子上流にお



けるクロマチン構造変化を、メチル化ヒストン抗体をはじめとする ChIP アッセイにより解析した。

### C. 研究結果

1. LRH-1 のステロイド合成関連遺伝子群 StAR, CYP11A, HSD3B2, CYP17 に対する転写活性化能を、各遺伝子プロモーター領域を蛍光タンパク質の上流に組み込んだレポーターシステムを用いて、Ad4BP/SF-1 のそれと比較検討した。その結果、LRH-1 は一過性の発現では、Ad4BP/SF-1 に比べて、HSD3B2 を除いて著しく低い転写活性化能しか示さなかったが、CYP17 プロモーターでは3か所の NR5A ファミリーコンセンサス配列に結合し転写を活性化していることが確認された。一方 StAR 遺伝子上流の解析では、これまでのプロモーター領域に加えて、上流-3000 から-3500bp 付近に極めて強いエンハンサー領域が存在することが明らかとなった。

2. 昨年度報告したように、LRH-1 の安定導入細胞株を cAMP により刺激すると CYP11A1 および CYP17 遺伝子発現は著しく増大し、ステロイドホルモン再生細胞へと分化する。この際の、これら遺伝子上流に存在する CpG のメチル化状態を解析したところ、CYP11A1 ではプロモーター近傍の DNA メチル化は LRH-1 導入や cAMP 刺激に関わらず低メチル化状態であり、変化は見られなかった。一方 CYP17 プロモーター近傍では、骨髄間葉系幹細胞ではすべてメチル化されていたが、LRH-1 導入だけは変化が見られなかったものの、cAMP の刺激により数か所の CpG で経時的に脱メチル化修飾を受けていた。この変化は LRH-1 を導入していない幹細胞親株に cAMP 刺激をくわえることでは生じないことから LRH-1 の発現が脱メチル化の誘導に必須であることが明らかとなった。

3. LRH-1 および SF-1 とヒト骨髄間葉系幹細胞に一過性に導入し、ChIP アッセイにより StAR 遺伝子上流を解析した結果、①プロモーター領域への PolII の結合は、SF-1 導入による

増加が LRH-1 導入による増加よりも著しく高く、レポーターアッセイの結果と一致していた。一方、LRH-1 と SF-1 は共に、StAR 遺伝子上流の新たに同定したエンハンサー領域とプロモーター領域に結合するが、その結合は LRH-1 のほうがより強固であった。さらに興味深いことに、これらの領域ではヒストン H2B の結合が著しく低下していた。

### D. 考察

ヒト骨髄間葉系幹細胞からステロイドホルモン産生細胞への分化誘導能に関して、LRH-1 は Ad4BP/SF-1 と同等の活性を示すが、その転写活性化能は SF-1 と比較してかなり低いことが判明した。一方、StAR 遺伝子上流に存在するコンセンサス配列に対しては、SF-1 よりもより強固に結合することが示唆された。さらに CYP17 遺伝子プロモーター領域では、LRH-1 の結合に伴いクロマチンの構造変化が生じており、cAMP 刺激をきっかけとして、DNA 脱メチル化反応が速やかに生じることが初めて明らかとなった。哺乳動物細胞における DNA 脱メチル化の機構は不明な点が多いが、本研究によりヒト骨髄間葉系幹細胞においても転写の活性化に伴い速やかな脱メチル化が生じることが初めて示された。またその際、LRH-1 の発現が CYP17 遺伝子上流の脱メチル化に必須であることが示唆された。

LRH-1 および SF-1 による StAR 遺伝子の発現誘導において、プロモーターに加え新たなエンハンサー領域が関与していることを初めて明らかにした。この新たなエンハンサー領域が、副腎ステロイドホルモン合成に関与する可能性も考えられる。さらにこれらの領域では転写活性化に伴いヒストンオクタマーが抜け落ちる可能性が示唆された。転写活性化に伴うヌクレオソームの脱落は、一部の immediate-early-gene では報告されているが、新たな転写活性化の機構として注目される。

### E. 結論

本研究により、骨髄由来の間葉系幹細胞はス



テロイドホルモン産生細胞に分化する能力を有していることが示され、転写因子 Ad4BP/SF-1 および LRH-1 の導入によりエピジェネティックな変化を伴って分化誘導されることが示された。この知見は、将来的な副腎ホルモン産生異常に関わる疾患への再生医療の可能性を示すものである。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Inaoka Y, Yazawa T, Mizutani T, Kokame K, Kangawa K, Uesaka M, Umezawa A, Miyamoto K: Regulation of P450 oxidoreductase by gonadotropins in rat ovary and its effect on estrogen production. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 16:6(1),62, 2008.
- 2) Yamada K, Ogata-Kawata H, Matsuura K, Kagawa N, Takagi K, Asano K, Haneishi A, Miyamoto K: ZHX2 and ZHX3 repress cancer markers in normal hepatocytes. *Front. Biosci.* 14 (10), 3724-3732, 2009

### 2. 総説

安部由美子, 宮本 薫: インヒビリン/アクチビン, ホルモン病態異常と検査 8. 生殖関連. *臨床検査*. 52(11), 1276-1280, 2008

### 3. 学会発表

- 1) 稲岡斉彦, 矢澤隆志, 水谷哲也, 上坂美紀, 梅澤明弘, 宮本 薫: ラット卵巣における P450 oxidoreductase (POR) のホルモンによる発現誘導と aromatase 活性に及ぼす影響. 第 81 回日本内分泌学会学術総会 青森, 2008, 5. *日本内分泌学会雑誌* 84(1), 208, 2008
- 2) 矢澤隆志, 稲岡斉彦, 水谷哲也, 上坂美紀, 梅澤明弘, 宮本 薫: ステロイドホルモン産生細胞分化における LRH-1 の役割. 第 81 回日本内分泌学会学術総会 青森, 2008, 5. *日本内分泌学会雑誌* 84(1), 208, 2008
- 3) 稲岡斉彦, 矢澤隆志, 水谷哲也, 上坂美紀, 梅澤明弘, 宮本 薫: ラット卵巣における P450 oxidoreductase ゴナドトロピンによる

発現誘導と aromatase 活性に及ぼす影響. 第 26 回内分泌代謝学サマーセミナー 愛知, 2008, 7. 抄録集, 29.

- 4) 宮本 薫: 喫煙と女性生殖機能との関連の分子メカニズムの解明. 喫煙科学研究財団 第 23 回平成 19 年度助成研究発表会 東京, 2008, 7.
- 5) 稲岡斉彦, 矢澤隆志, 水谷哲也, 上坂美紀, 梅澤明弘, 宮本 薫: ゴナドトロピンによるラット卵巣での P450 oxidoreductase の発現調節とアロマターゼ活性への影響. 第 13 回日本生殖内分泌学会学術集会 大阪, 2008, 11.
- 6) 矢澤隆志, 稲岡斉彦, 水谷哲也, 上坂美紀, 梅澤明弘, 宮本 薫: ステロイドホルモン産生細胞分化における LRH-1 の役割. 第 13 回日本生殖内分泌学会学術集会 大阪, 2008, 11.
- 7) 稲岡斉彦, 矢澤隆志, 水谷哲也, 上坂美紀, 梅澤明弘, 宮本 薫: ラット卵巣における P450 oxidoreductase ゴナドトロピンによる発現制御とエストロゲン産生に及ぼす影響. *BMB2008* 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 神戸, 2008, 12.
- 8) 矢澤隆志, 稲岡斉彦, 水谷哲也, 上坂美紀, 梅澤明弘, 宮本 薫: ステロイドホルモン産生細胞分化における LRH-1 の役割. *BMB2008* 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 神戸, 2008, 12.
- 9) 矢澤隆志, 宮本 薫: 間葉系幹細胞からのステロイドホルモン産生細胞の作製. 第 16 回日本ステロイドホルモン学会学術集会. シンポジウム 福井, 2008, 11.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

(4) 原発性アルドステロン症 (PA) の  
診断基準の策定と治療法の検討

## 超選択的 ACTH 負荷副腎静脈採血による副腎皮質疾患診断の試み

大村 昌夫\*、牧田 幸三\*\*、西川 哲男

横浜労災病院 内分泌代謝内科、\*健康診断部

\*\*東京北社会保健病院放射線科

### 【研究要旨】

〈目的〉超選択的 ACTH 負荷副腎静脈採血(SS-ACTH-AVS)の有用性を検討した。

方法;新たに考案したマイクロカテーテルを用い ACTH 刺激後に副腎静脈分枝で採血を行ない、ホルモンを測定した。

〈結果と考察〉SS-ACTH-AVS により右副腎外側領域の副腎腫瘍からのアルドステロンとコルチゾールの同時産生と左副腎外側枝領域からのアルドステロン過剰分泌が診断された。右副腎腫瘍の核出術を行い腫瘍からのアルドステロンとコルチゾール産生が病理学的に確認された。

〈結論〉SS-ACTH-AVS は副腎皮質機能異常症でのホルモン過剰産生の部位診断能を副腎内分枝レベルまで精緻化が可能な有用な検査法と考えられた。

### A. 研究目的

副腎皮質疾患、特に原発性アルドステロン症(primary aldosteronism; PA)の原因疾患の診断と治療方針の決定のためのホルモン過剰産生部位診断が重要である。副腎静脈採血(adrenal venous sampling; AVS)は、アルドステロン過剰分泌部位の局在診断のためのゴールドスタンダードな検査法であり<sup>1)</sup>、2008年の日米内分泌学会から個別に公表されたPAの診断と治療のガイドライン<sup>2, 3)</sup>では、AVSは手術によりPAの治療を行なう場合の必須の検査と位置付けられている。

しかし AVS は検査手技が技術的に難しく、またその診断基準も未だ統一されていないという問題以外に、従来の AVS は検査が正確に行なわれた場合においても左右各々の副腎からのホルモン過剰産生の有無の診断は可能であるが、両側副腎からのアルドステロン過剰産生例ではその原因が特発性アルドステロン症によるものか両側副腎腫瘍性病変によるものかの鑑別は不可能であるという、根本的な欠点を抱えていた。この問題を解決する目的で、今回我々は、新し

い副腎静脈採血用カテーテルを開発し、片側副腎内の複数個所で採血を行う超選択的 ACTH 負荷副腎静脈採血法(super-selective ACTH-stimulated adrenal venous sampling; SS-ACTH-AVS)考案したので報告する。

### B. 研究方法

SS-ACTH-AVS は先端両側に直径 0.4mm の 3/4 の大きさの側孔を設けた 2.2Fr マイクロカテーテル(図 1、コーシンメディカル株式会社製、東京)を用いて行なった。まずセルジンガー法で左副腎中心静脈、次いで右副腎中心静脈に通常のカテーテルを挿入し、十分量の造影剤で左右副腎静脈を分枝まで造影する。左副腎中心静脈、下大静脈、右副腎中心静脈の順で採血を行なった後、右副腎静脈にカテーテルを留置したまま肘静脈から ACTH0.25mg を静注する。採血開始までに通常のカテーテルを通してマイクロカテーテルを挿入しその先端を右副腎静脈分枝まで進め、ACTH 刺激後 15 分から再度採血を開始する。右副腎静脈での採血は、可能な限り複数の分枝と中心静脈での採血を試みる。



その後通常の左副腎カテーテルを左副腎中心静脈に挿入しマイクロカテーテルを通じ採血を行なう。左副腎静脈での採血は、上方枝、外側枝からの採血が特に重要となる。可能であれば左副腎中心静脈からの採血も行なう。以上の手技を ACTH 刺激後 45 分までに完了する。

副腎静脈分枝血アルドステロンとコルチゾールの正常値はまだ不明であるため、我々が公表している ACTH 刺激後アルドステロン濃度  $\geq 1400\text{ng/dl}$  をアルドステロン過剰分泌、対側副腎コルチゾール濃度  $\leq 400\mu\text{g/dl}$  をコルチゾール過剰分泌の診断基準とした(4-6)。

SS-ACTH-AVS による診断は平成 20 年 4 月から、当院ですでに約 40 例で行なっている。以下に SS-ACTH-AVS により、両側副腎からのアルドステロンの過剰分泌と右副腎腫瘍からの潜在性コルチゾール分泌が診断された症例を呈示する。

#### (倫理面への配慮)

通常の副腎静脈採血検査と同様に検査にあたり本検査の目的、意義、検査にともなう危険について、また検査結果は個人が特定できない形で公表することを説明し、文書にて承諾を取得した。

### C. 研究結果

症 例：40 才代後半の男性

主 訴：高血圧，糖尿病

現病歴：糖尿病と高血圧で受診，腹痛検査目的で行なった腹部 CT で右副腎腫瘍が確認された。  
既往歴：20 才代から高血圧，40 才代糖尿病。

家族歴：母 糖尿病

身体所見：身長 170cm，体重 88kg，BMI 30.4kg/m<sup>2</sup>，血圧 148/82mmHg(ブトララジン内服)，脈拍 72/分，整。満月様顔などの Cushing 徴候なし。胸部，腹部，四肢末梢，神経所見異常なし。

一般検査所見では血清カリウム 4.2mEq/L，空腹時血糖値 132mg/dl，HbA1c 6.0%以外特記事項はなく、内分泌検査では ACTH 12.0pg/ml，コルチゾール 10.3  $\mu\text{g/dl}$ ，DHEA-S 87ng/dl，ア

ルドステロン 10.7ng/dl，血漿レニン活性 0.6ng/ml/h と DHEA-S の低下と低レニン性高アルドステロン血症を認めた。副腎 CT では右副腎に径 13mm の腫瘍像を認めたが、左副腎に異常所見はなかった(図 2)。

内分泌負荷試験では、ACTH 負荷試験での負荷後最大アルドステロン反応値・コルチゾール比は 1.32、フロセミド-立位試験 120 分後のレニン活性は 1.4ng/ml/h，生理食塩水負荷 240 分後のアルドステロンは 13.6ng/dl と PA に合致する結果であったが、カプトプリル負荷 90 分後のアルドステロン・レニン活性比は 10.7 と正常の値であった。

CRH 負荷試験では ACTH 最大反応値は 24pg/ml と抑制を認め、デキサメサゾン 1mg 抑制試験でコルチゾールは 4.1  $\mu\text{g/dl}$  と抑制不十分であり、サブクリニカルクッシング症候群に合致する所見であった。

図 3 に SS-ACTH-AVS の結果を示す。本例では右副腎静脈外側枝と下側枝が右副腎静脈が下大静脈開口部近傍ですぐに分岐し、また左副腎上側枝と外側枝は左下横隔膜静脈が合流する近傍で分岐していたため、左右副腎中心静脈に相当する部位での採血は行えず、副腎静脈分枝 4 カ所での採血となった。

アルドステロンは右副腎腫瘍の存在する右副腎静脈外側枝と、明らかな腫瘍病変の見られない左副腎静脈外側枝で 1400ng/dl 以上の高値を示したが、他の静脈分枝では 1400ng/dl 以下の正常値を示した。一方コルチゾールは右副腎静脈外側枝以外の 3 カ所の静脈分枝で 400  $\mu\text{g/dl}$  以下に抑制されていたため、右副腎腫瘍からのコルチゾール過剰産生が示唆された。

SS-ACTH-AVS の結果、右副腎外側の腫瘍からのアルドステロンとコルチゾール過剰産生が確認され、一方画像検査で腫瘍は確認されていないが左副腎外側領域に微小なアルドステロン過剰産生病変の存在が示唆された。

左副腎のアルドステロン過剰産生病変は画像検査で腫瘍が確認されていないためその治療に左副腎腫瘍全摘が行なわれる可能性があるが、今回、右副腎腫瘍による PA とサブクリニカルク

ッシング症候群治療の目的で右副腎を全摘した場合、将来の左副腎全摘術は副腎不全を招くため実施不可能となる。しかし、今回のSS-ACTH-AVSで右副腎のアルドステロンとコルチゾール過剰分泌は右副腎腫瘍が原因と特定できたため、将来の左副腎全摘を考慮し、右副腎非腫瘍部の正常附属副腎の温存を目的に腹腔鏡下右副腎腫瘍核出術を行なった。

摘出副腎腫瘍の病理所見を図4に示す。副腎腫瘍は径13mmの剖面黄色の腫瘍で、Weissの基準で悪性所見はなかった。ステロイド合成酵素の免疫組織化学的検討は東北大学病理診断学分野 笹野公伸教授にお願いし、腫瘍細胞で $3\beta$ -HSDと $17\alpha$ -水酸化酵素の発現を、また過形成を示す非腫瘍部附随副腎の球状層での $3\beta$ -HSD発現の低下と束状層でDHEA-ST発現の低下が確認され、腫瘍からのアルドステロンとコルチゾール過剰産生を示唆する所見であった。術後コルチゾール過剰分泌は正常化した。しかしアルドステロン値は低下したがごく軽度ではあるがアルドステロン過剰分泌の残存が確認された。

SS-ACTH-AVSによる検査の合併症は、通常の副腎静脈採血で知られている穿刺時の痛み、術後の穿刺部の出血以外なかった。

#### D. 考察

SS-ACTH-AVSはホルモン過剰分泌部位を左右副腎で診断するレベルから、左右副腎内の副腎静脈分枝領域での診断を可能とした。これにより、従来アルドステロン産生腺腫では、副腎腫瘍が確認されていても、この腫瘍以外の微細なアルドステロン産生病変の存在の可能性が否定できないため片側副腎の全摘を行なっていたが、本症例ではSS-ACTH-AVSで腫瘍からのホルモン過剰分泌が確認されたため腫瘍核出術での治療が可能となった。今後SS-ACTH-AVSを行うことにより、両側副腎アルドステロン産生腺腫と特発性アルドステロン症の鑑別や、同一症例に複数の副腎腫瘍が合併した際の正確なホルモン過剰分泌部位の診断が可能となることが示唆された。

#### E. 結論

SS-ACTH-AVSは副腎皮質機能異常症のホルモン過剰分泌部位診断能を副腎内分枝レベルまで精緻化する新たな有用な検査法と考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Angela M. Leung, Hironobu Sasano, Tetsuo Nishikawa, David B. McAneny, and Alan O. Malabanan: Multiple unilateral adrenal adenomas in a patient with primary hyperaldosteronism. *Endocr Pract.* 14 (1): 76-79, 2008

##### 2. 学会発表

- 1) 大村昌夫、齋藤寿一、齋藤淳、松澤陽子、伊藤浩子、西川哲男. 片側多発副腎皮質微小結節による原発性アルドステロン症の特徴. 第18回臨床内分泌代謝Update 2008年3月15~16日
- 2) Omura Masao, Jun Saito, Yoko Matsuzawa, Hiroko Ito, Tetsuo Nishikawa: Unexpectedly high prevalence of primary aldosteronism among Featured Research Session 01, hypertensives in Japan. *New Clinical Aspect for Hypertension. The 72nd annual scientific meeting of the Japanese Circulation Society. Fukuoka, International Congress Center. March 28-30, 2008.*
- 3) 大村昌夫、左右各々2本の副腎静脈の片側からのホルモン過剰分泌が診断された原発性アルドステロン症とスプリニカルクッシング症候群の一例. 第81回日本内分泌学会学術総会. 青森市. 2008年5月16日~18日.
- 4) 大村昌夫、牧田幸三、松澤陽子、齋藤淳、西川哲男. 原発性アルドステロン症は副腎静脈採血を行わずに手術可能か? 福井市. 第16回日本ステロイドホルモン学会学術集会
- 5) 大村昌夫、牧田幸三、松澤陽子、齋藤淳、西川哲男. 原発性アルドステロン症診断における各種副腎静脈採血法診断基準の比較検討.

第12回日本心血管内分泌代謝学会学術総会  
熊本市国際交流会館 . 2008年11月28日～  
29日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

Split-tip micro catheterの特許出願を準備中.

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし