

## 5. 添付データ

表 1. 組換えレトロウイルスベクターの RNA コピー数測定時の PCR 反応条件

・ DNase 処理反応

試薬	使用量/反応	反応条件
レトロウイルスベクター溶液	12.5 $\mu$ l	37°C : 30 min
10×DNase I Buffer	2.5 $\mu$ l	70°C : 10 min
DNase I (5U / $\mu$ L)	2.0 $\mu$ l	4°C
RNase Inhibitor (40U / $\mu$ L)	0.5 $\mu$ l	
RNase Free dH <sub>2</sub> O	7.5 $\mu$ l	
Total	25 $\mu$ l	

・ One Step Real Time RT-PCR 反応

試薬	使用量/反応	反応条件
2×One Step SYBR RT-PCR Buffer III	12.5 $\mu$ l	42°C : 5 min 95°C : 10sec Cycle : 1
TaKaRa Ex Taq HS (5U / $\mu$ L)	0.5 $\mu$ l	↓
PrimeScript RT enzyme Mix II	0.5 $\mu$ l	95°C : 5sec ↗
PCR Forward Primer (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	60°C : 30sec ↘
PCR Reverse Primer (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	↓
被検サンプル*	2 $\mu$ l	Dissociation Curve
RNase Free dH <sub>2</sub> O	8.5 $\mu$ l	
Total	25 $\mu$ l	

\* DNase I 処理後、EASY Dilution で希釈した被検レトロウイルスベクター溶液

表 2. リアルタイム RT-PCR 測定データ (RNA Control Template)

Sample name	Total RNA Init-qty. (copies/ $\mu$ L)	Sample Total RNA log <sub>10</sub> (conc.)	濃度計算		
			Ct Avg. (SDM)	calculated log <sub>10</sub>	calculated Init-qty. (copies/ $\mu$ L)
STD 1	1.00E+08	8.00	14.64	8.01	1.01E+08
STD 2	1.00E+07	7.00	17.96	7.04	1.09E+07
STD 3	1.00E+06	6.00	21.57	5.99	9.69E+05
STD 4	1.00E+05	5.00	25.03	4.98	9.50E+04
STD 5	1.00E+04	4.00	28.71	3.91	8.05E+03
STD 6	1.00E+03	3.00	31.52	3.09	1.22E+03
SLOPE (傾き)					-3.4317
INTERCEPT (切片)					42.11
E (増幅効率)					95.6
RSQ (決定係数: R <sup>2</sup> 乗)					0.9989

### 資料 3

図 1. リアルタイム RT-PCR の検量線(Standard Curve: 2<sup>nd</sup> Derivative Max.)

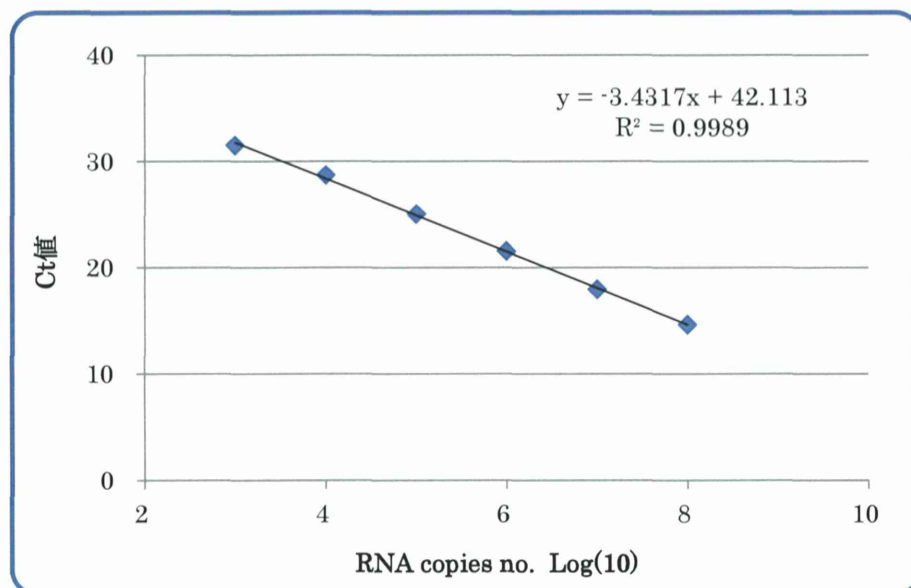


表 3. リアルタイム RT-PCR 測定データ (被検サンプル) (Eco env. RNA タイター)

Sample name	濃度計算				
	Ct (SDM)*1	calculated log10	calculated Init·qty. (copies/μL)	qPCR 時 希釈倍率	DnaseI 処理前 濃度*2 (copies/mL)
SYN5064-3-51	24.51	5.13	1.35E+05	500	1.35E+11
SYN5064-4-41	24.05	5.26	1.83E+05	500	1.83E+11
SYN5064-5-40	24.26	5.20	1.59E+05	500	1.59E+11
P.C.(ZsG)(Eco)	23.72	5.36	2.29E+05	500	2.29E+11
N.T.	35.93	1.80	6.33E+01	500	測定範囲外
P.C.	24.58	5.11	1.29E+05	500	1.29E+11
DDW	35.78	1.85	7.00E+01	1	測定範囲外
E.D.	--	#VALUE!	#VALUE!	1	測定範囲外

#### Sample ID について

SYN5064-x-x : プラスミド DNA 調製時の弊社サンプル識別番号

P.C. (ZsG) (Eco) : トランスフェクション操作の確認用に調製したレトロウイルスベクター溶液

NT : 未処置細胞 (G3T<sup>hi</sup>) の培養上清

P.C. : qPCR 反応の Positive Control ウイルス溶液

(今回調製のレトロウイルスベクター溶液と同様の処置を実施)

DDW, E.D. : qPCR 反応の Negative Control (DDW:注射水, E.D.:希釈 Buffer)

\*1 リアルタイム RT-PCR 反応は N=2 で実施し、Ct (SDM) はその平均値を記載しています。

\*2 被検サンプル中のレトロウイルスベクター量 (copies / mL)

= Calculated Init·qty. (copies/μL) × 2 (DNase I 処理時の希釈倍率) × qPCR 反応時の希釈倍率 × 1,000

表 4. マイコプラズマ汚染検査

	測定値 A	測定値 B	B / A
基本培地	479	256	0.53
PG13 培養上清	534	257	0.48
P.C. (MycoAlert Assay Control)	3398	19574	5.76

判定基準

B / A  $\geq$  1 : 陽性

B / A &lt; 1 : 陰性

表 5. リアルタイム RT-PCR 測定データ (被検サンプル) (GaLV env. RNA タイター)

Sample name	濃度計算				
	Ct (SDM)*1	calculated log10	calculated Init·qty. (copies/ $\mu$ L)	qPCR 時 希釈倍率	DNaseI 処理前 濃度*2 (copies/mL)
SYN5064-3-51	26.91	4.43	2.69E+04	500	2.69E+10
SYN5064-4-41	28.27	4.03	1.08E+04	500	1.08E+10
SYN5064-5-40	27.97	4.12	1.32E+04	500	1.32E+10
P.C.	24.58	5.11	1.29E+05	500	1.29E+11
DDW	36.84	2.18	1.50E+02	1	測定範囲外
E.D.	35.59	2.51	3.20E+02	1	測定範囲外

Sample ID について

SYN5064-x-x : プラスミド DNA 調製時の弊社サンプル識別番号

P.C. : qPCR 反応の Positive Control ウイルス溶液  
(今回調製のレトロウイルスベクター溶液と同様の処置を実施)

DDW, E.D. : qPCR 反応の Negative Control (DDW:注射水, E.D.:希釈 Buffer)

\*1 リアルタイム RT-PCR 反応は N=2 で実施し、Ct (SDM) はその平均値を記載しています。

\*2 被検サンプル中のレトロウイルスベクター量 (copies / mL)

= Calculated Init·qty. (copies/ $\mu$ L)  $\times$  2 (DNase I 処理時の希釈倍率)  $\times$  qPCR 反応時の希釈倍率  $\times$  1,000

### 資料 3

表 6. リアルタイム RT-PCR 測定データ (RNA Control Template) (Clone の RNA タイター測定時)

Sample name	Total RNA Init·qty. (copies/μL)	Sample Total RNA log10(conc.)	濃度計算		
			Ct Avg.(SDM)	calculated log10	calculated Init·qty. (copies/μL)
STD 1	1.00E+08	8.00	14.57	8.05	1.11E+08
STD 2	1.00E+07	7.00	18.11	6.99	9.88E+06
STD 3	1.00E+06	6.00	21.56	5.97	9.38E+05
STD 4	1.00E+05	5.00	24.95	4.97	9.25E+04
STD 5	1.00E+04	4.00	28.41	3.94	8.70E+03
STD 6	1.00E+03	3.00	31.30	3.08	1.20E+03
SLOPE (傾き)					-3.3700
INTERCEPT (切片)					41.68
E (増幅効率)					98.0
RSQ (決定係数: R2 乗)					0.9992

図 2. リアルタイム RT-PCR の検量線(Standard Curve: 2<sup>nd</sup> Derivative Max.)

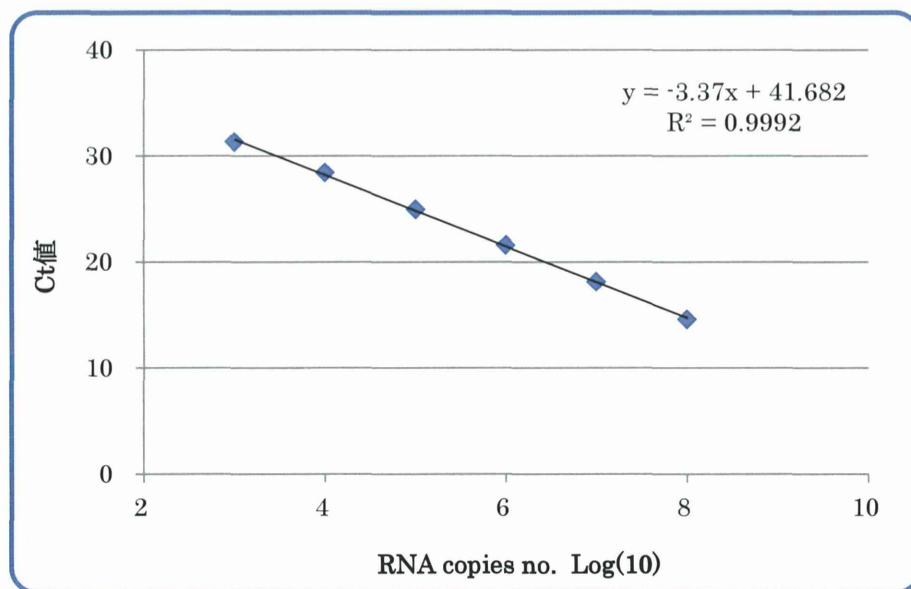


表 7. リアルタイム RT-PCR 測定データ (被検サンプル) (Clone[GalV env.] RNA タイター)

Sample name	濃度計算				
	Ct (SDM)*1	calculated log10	calculated Init·qty. (copies/μL)	qPCR 時 希釈倍率	DnaseI 処理前 濃度*2 (copies/mL)
#1	32.14	2.83	6.81E+02	500	測定範囲外
#2	32.22	2.81	6.42E+02	500	測定範囲外
#3	32.06	2.86	7.16E+02	500	測定範囲外
#4	34.05	2.27	1.85E+02	500	測定範囲外
#5	31.97	2.88	7.64E+02	500	測定範囲外

Sample name	濃度計算				
	Ct (SDM)*1	calculated log10	calculated Init-qty. (copies/ $\mu$ L)	qPCR 時 希釈倍率	DnaseI 処理前 濃度*2 (copies/mL)
#6	31.74	2.95	8.91E+02	500	測定範囲外
#7	35.04	1.97	9.35E+01	500	測定範囲外
#8	36.47	1.55	3.53E+01	500	測定範囲外
#9	31.97	2.88	7.62E+02	500	測定範囲外
#10	28.54	3.90	7.96E+03	500	7.96E+09
#11	31.80	2.93	8.56E+02	500	測定範囲外
#12	36.35	1.58	3.83E+01	500	測定範囲外
#13	34.52	2.13	1.33E+02	500	測定範囲外
#14	31.70	2.96	9.19E+02	500	測定範囲外
#15	31.45	3.04	1.09E+03	500	測定範囲外
#16	32.15	2.83	6.74E+02	500	測定範囲外
#17	31.70	2.96	9.19E+02	500	測定範囲外
#18	34.09	2.25	1.79E+02	500	測定範囲外
#19	28.14	4.02	1.04E+04	500	1.04E+10
#20	31.26	3.09	1.24E+03	500	測定範囲外
#21	32.53	2.72	5.21E+02	500	測定範囲外
#22	34.91	2.01	1.03E+02	500	測定範囲外
#23	32.02	2.87	7.39E+02	500	測定範囲外
#24	28.32	3.96	9.22E+03	500	9.22E+09
#25	31.16	3.12	1.32E+03	500	測定範囲外
#26	31.61	2.99	9.74E+02	500	測定範囲外
#27	31.34	3.07	1.18E+03	500	測定範囲外
#28	32.64	2.68	4.82E+02	500	測定範囲外
#29	31.19	3.11	1.30E+03	500	測定範囲外
#30	33.86	2.32	2.10E+02	500	測定範囲外
#31	31.23	3.10	1.26E+03	500	測定範囲外
#32	34.88	2.02	1.05E+02	500	測定範囲外
#33	31.50	3.02	1.05E+03	500	測定範囲外
#34	31.28	3.09	1.22E+03	500	測定範囲外
#35	35.51	1.83	6.78E+01	500	測定範囲外
P.C.	25.01	4.95	8.85E+04	500	8.85E+10
DDW	36.30	1.60	3.97E+01	1	測定範囲外
E.D.	37.16	1.34	2.20E+01	1	測定範囲外

Sample ID について

#xx : Clone No.

### 資料3

P.C. : qPCR 反応の Positive Control ウイルス溶液  
(今回調製のレトロウイルスベクター溶液と同様の処置を実施)  
DDW, E.D. : qPCR 反応の Negative Control (DDW:注射水, E.D.:希釈 Buffer)

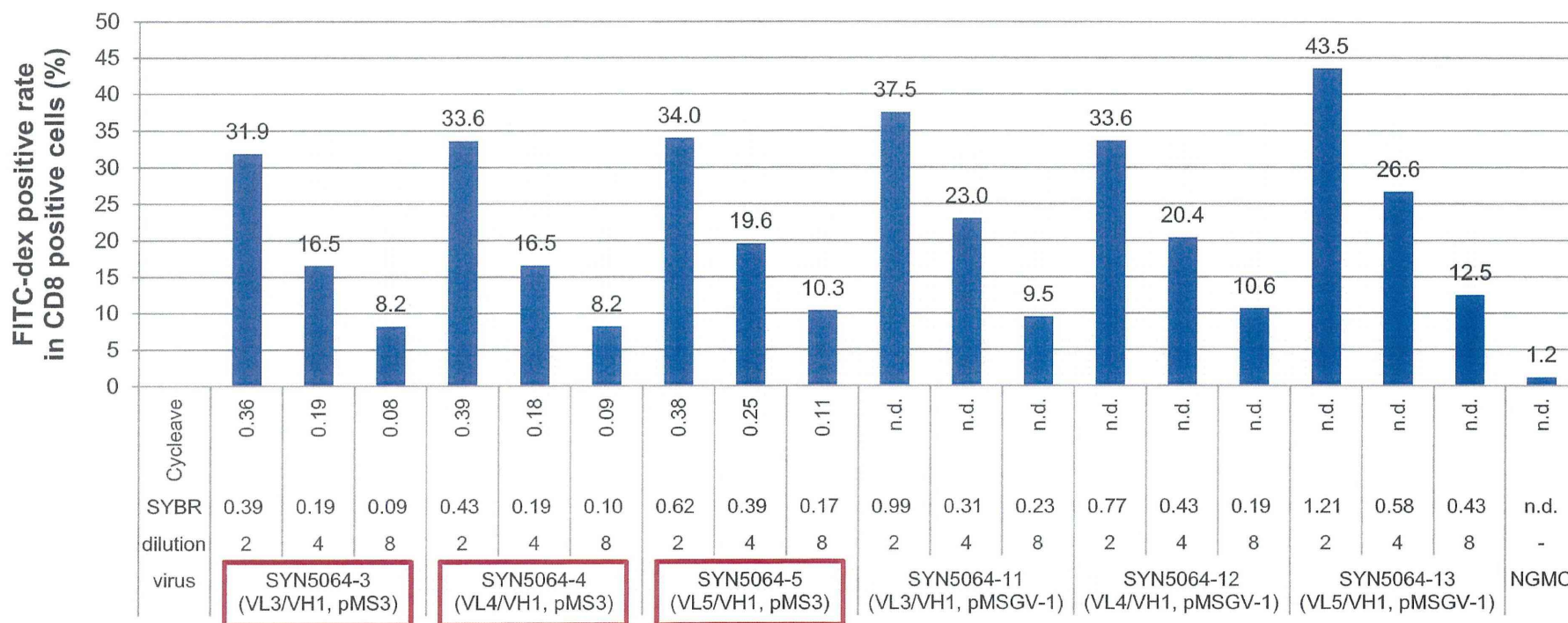
\*1 リアルタイム RT-PCR 反応は N=2 で実施し、Ct (SDM) はその平均値を記載しています。

\*2 被検サンプル中のレトロウイルスベクター量 (copies / mL)

= Calculated Init-qty. (copies/ $\mu$ L)  $\times$  2 (DNase I 処理時の希釈倍率)  $\times$  qPCR 反応時の希釈倍率  $\times$  1,000

# 抗FITC-CAR染色結果 (Day 7)

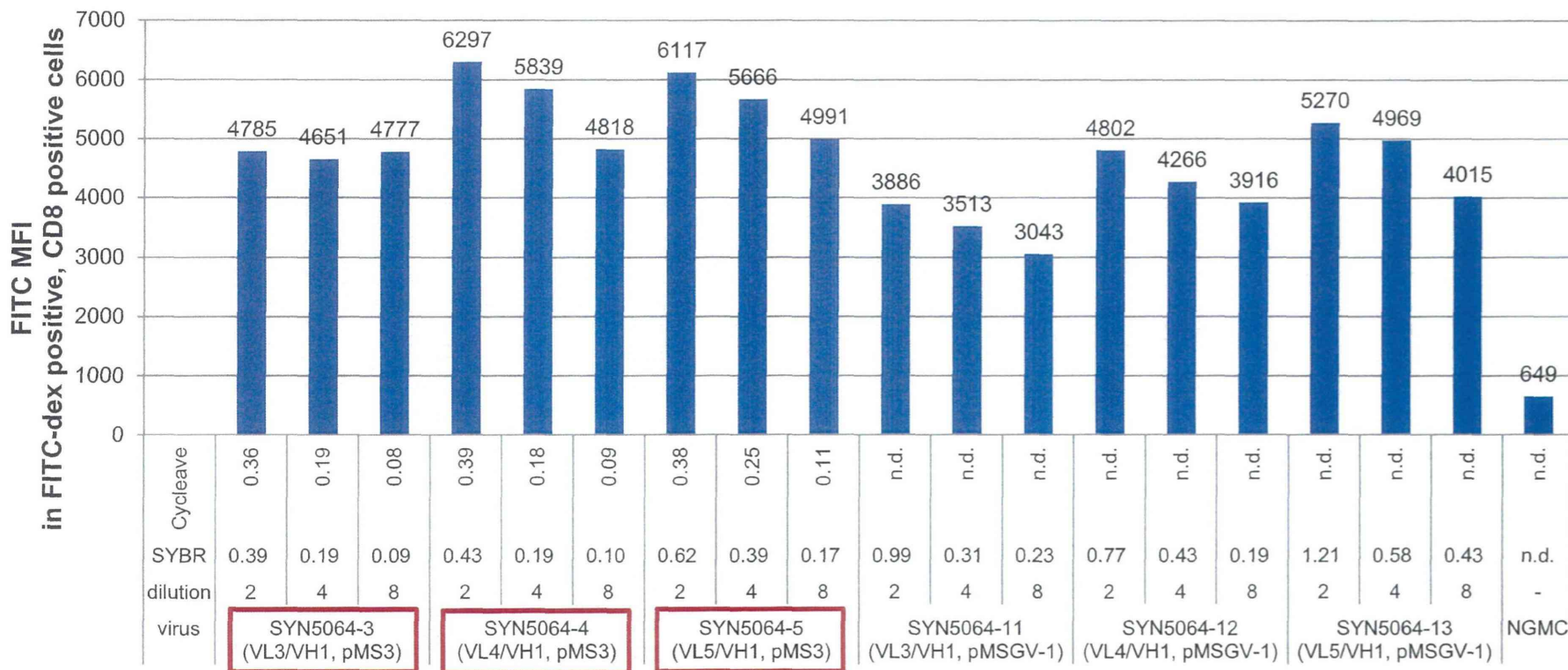
## CD8陽性細胞中FITC-CAR 陽性率



全てのレトロウイルスにおいて、T細胞への感染 および FITC特異的CARの発現が認められた。

# 抗FITC-CAR染色結果 (Day 7)

CD8陽性FITC-CAR陽性細胞中 FITC-CAR MFI

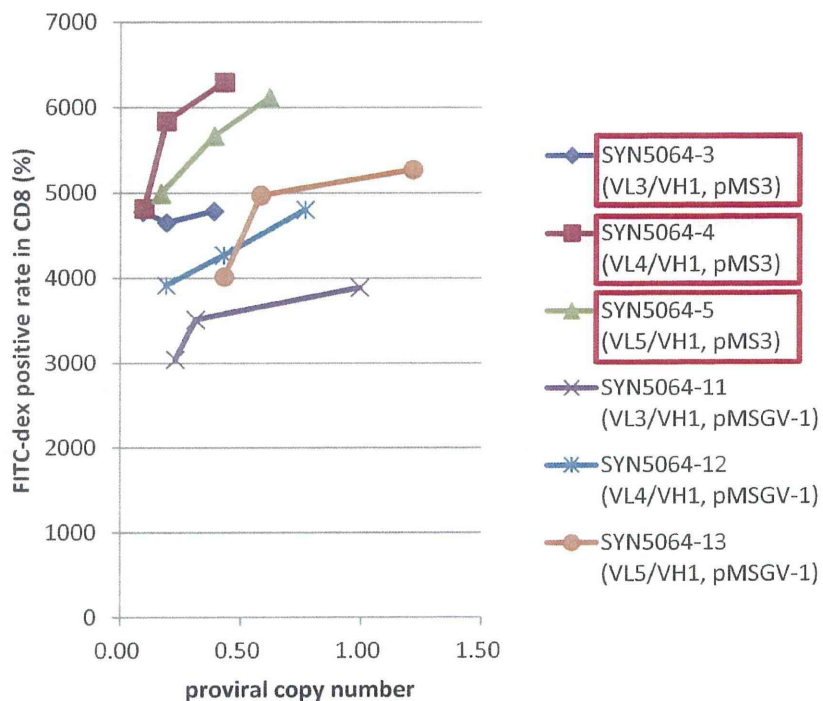


全てのレトロウイルスにおいて、T細胞への感染 および FITC特異的CARの発現が認められた。

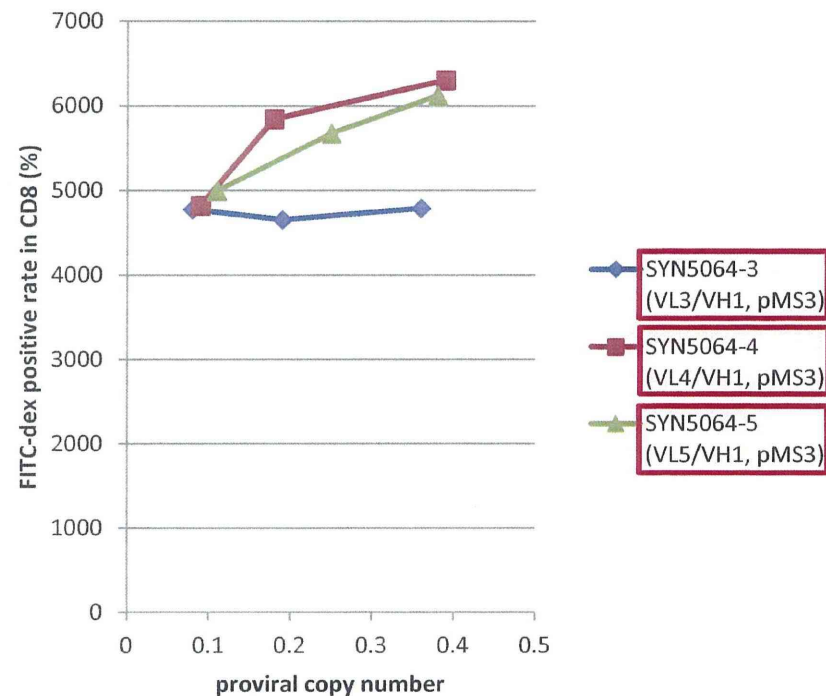


# 抗FITC-CAR染色結果 (Day 7)

プロウイルスコピー数 (SYBR) に対する  
CD8陽性FITC-CAR 陽性細胞中 FITC-CAR MFI



プロウイルスコピー数 (Cycleave) に対する  
CD8陽性FITC-CAR 陽性細胞中 FITC-CAR MFI



・VL4VH1はプロウイルスコピー数あたりの発現が高く、VL3/VH1は発現が低かった。

# CD25 染色 (Day7, 10, 14)

プロウイルスコピー数の近いサンプルでの比較 (約 0.5 copies / cell)

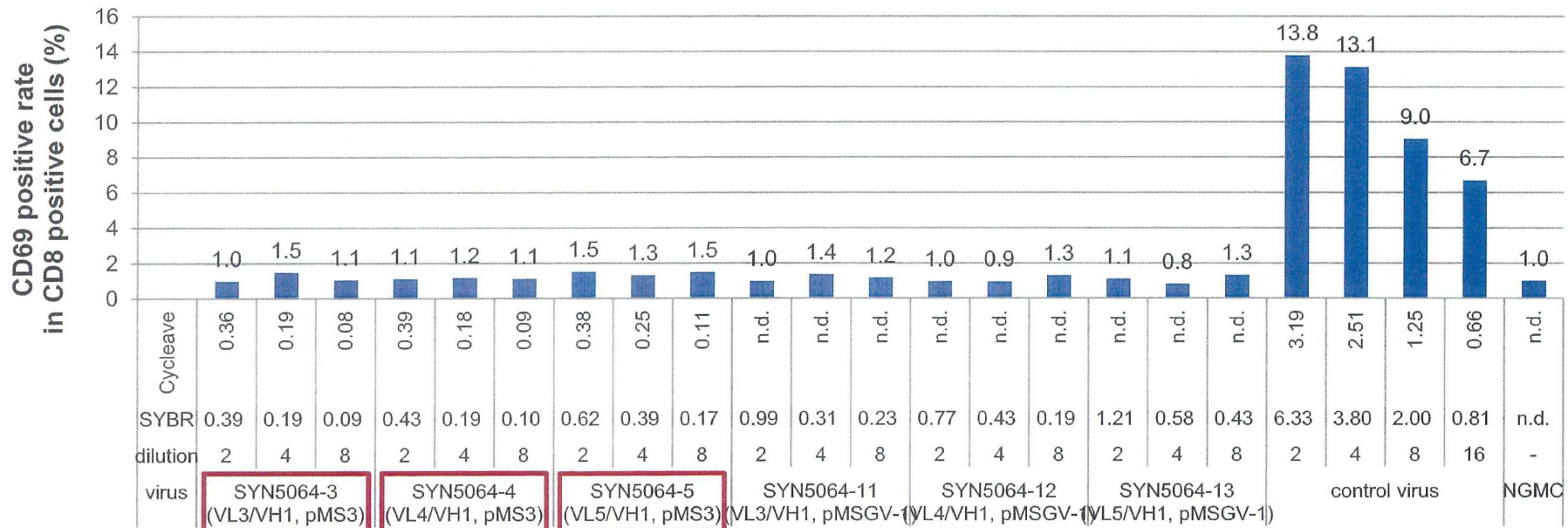
virus	SYN5064-3 VL3VH1	SYN5064-4 VL4VH1	SYN5064-5 VL5VH1	SYN5064-11	SYN5064-12	SYN5064-13	control virus	非遺伝子導入細胞
virus 希釈率	2倍	2倍	2倍	4倍	4倍	4倍	16倍	—
copy数 (Cycleave)	0.36	0.39	0.38	no data	no data	no data	0.81	0.0
copy数 (SYBR)	0.39	0.43	0.62	0.31	0.43	0.58	0.66	not detected
CD8陽性細胞中 CD25 陽性率 (Day7)	64.3%	62.5%	64.3%	63.5%	66.8%	66.4%	89.9%	63.4%
CD8陽性細胞中 CD25 陽性率 (Day10)	36.6%	40.3%	40.9%	36.3%	33.5%	40.1%	83.1%	30.1%
CD8陽性細胞中 CD25 陽性率 (Day14)	46.4%	45.7%	52.7%	46.5%	42.8%	41.5%	82.7%	39.5%

遺伝子導入群において、非遺伝子導入細胞と比べて過剰なCD25発現は見られなかった。

# CD69 染色 (Day14)

CD69: activation inducer molecule (AIM) としても知られており、リンパ球、単球および血小板の活性化の初期過程に関与している。T細胞またはB細胞の活性化後、非常に早い段階(IL-2Rなど他の活性化抗原より前)で発現する細胞表面糖タンパクで、休止期のリンパ球には存在しない。

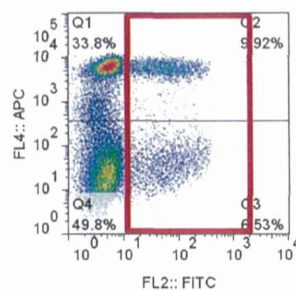
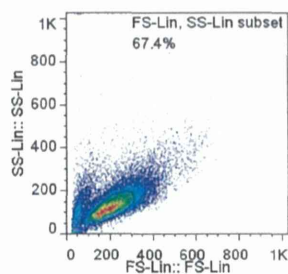
### CD8陽性細胞中CD69陽性率



CD25と同様に、非遺伝子導入細胞と比べて過剰なCD69発現は見られなかった。

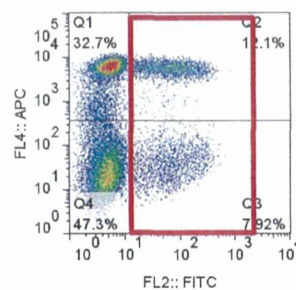
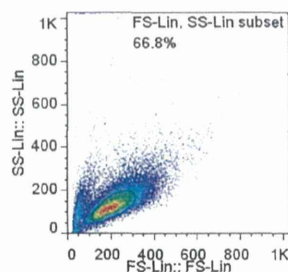
## Expression of humanized anti-FITC CAR on T cells

VL3VH1



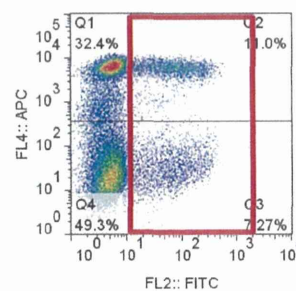
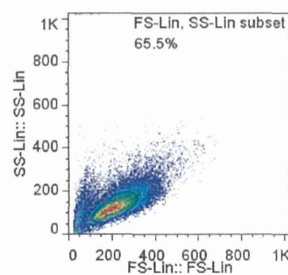
16.45%

VL4VH1



20.02%

VL5VH1



18.27%

ヒト末梢血由来T細胞に対して、15-20%の発現効率で、抗FITC-CARを発現させるstandard operating procedureを確立した。

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）  
委託業務成果報告  
（肝細胞がんに対する標的抗体の開発）

業務担当責任者 中面哲也  
国立がん研究センター  
早期・探索臨床研究センター 免疫療法開発分野長

## 研究要旨

「がん認識抗体としての抗 glypican-3 (GPC3) 抗体と遺伝子導入 T 細胞を組み合わせた次世代がん免疫療法」の first in human 医師主導第 I 相臨床試験開始に向けた前臨床研究を実施するために、抗 GPC3 抗体の樹立とそのヒト化、FITC 標識した抗体の GMP 産生、を行うことを目的として、1) ヒト膜型 GPC3 蛋白質を免疫したマウスから細胞融合法によりハイブリドーマを樹立する方法、2) 抗体遺伝子ライブラリーを用いたファージディスプレイ法、さらには、3) ナイーブ抗体ライブラリーを含む RNA ディスプレイ法の 3 種類の方法により、膜型 GPC3 に特異的に結合する抗体作製を試みた。1) BALB/c マウスに recombinant GPC3 を免疫して選択培養からクローニングを経て樹立して得た 12 種の抗 GPC3 抗体について、フローサイトメーターを用いて FACS 解析した結果、いずれの抗体も SK-Hep-1 に GPC3 を強制発現させて得た安定発現株、SK-Hep-1-GPC3 を染色しなかったことから、これらの 12 種類の抗体候補は細胞表面の GPC3 と結合しないため FITC-CAR には適していない抗体と判定した。GPC3 はヒトとマウスでは高い相同性 (94%) であるため、BALB/c マウスでは免疫原として弱いことも課題であり、免疫原として GPC3 強制発現細胞を用いることとし、関節リウマチを自然発症する SKG マウス (BALB/c 由来) に免疫してのモノクローナル抗体作製に着手した。2) 外部受託により、SKG マウスと BALB/c マウスに全長の GPC3、C 末側の部分長 GPC3 と SK-Hep-1-GPC3 細胞を免疫して抗体ライブラリーを構築してファージディスプレイ法に用いて scFv 抗体の作製を試みている。3) In vitro virus (IVV) 法を用いて、一本鎖抗体 (scFv) ライブラリーからライブラリーサイズが 10 の 11 乗サイズの scFv のナイーブ抗体ライブラリーを構築した。GPC3 の C 末に BioTag 配列と精製用タグ配列をタンデムに融合させたバイト蛋白質を作製することとし、発現細胞として SK-Hep-1 を選択し、BioTag 付加型 GPC3 の発現検討を進めている。

FITC-CAR に適した抗体の基準はがん細胞膜表面の抗原蛋白質と結合する抗体であるため、IgG 型あるいは scFv でも抗体スクローニングには細胞に発現する GPC3 との結合性によって選択する必要がある。そのため、細胞融合法・ファージディスプレイ法・IVV 法で取得した抗体ともスクリーニング初期の段階で細胞表面の GPC3 との結合性で選抜することが重要であると考えられた。引き続き、これら 3 種類の方法で、膜型 GPC3 に特異的に結合する最適な抗体の作製を実施する。

## A. 研究目的

本研究では、日本人に多く発症し、進行した症例では有効な治療法が存在しない難治性がんである肝細胞がんを対象とし、肝細胞がんがんで特異的に高発現している glypican-3 (GPC3) を治療標的分子とする。肝細胞がんに対する効果的治療法の開発を最終的な到達目標とし、「がん認識抗体としての抗 GPC3 抗体と遺伝子導入 T 細胞を組み合わせた次世代がん免疫療法」の first in human 医師主導第 I 相臨床試験開始に向けた前臨床研究を実施するために、抗 GPC3 抗体の樹立とそのヒト化、FITC 標識した抗体の GMP 産生、を行うことを目的とする。

## B. 研究方法（倫理面への配慮）

ヒト GPC3 膜型蛋白質を免疫したマウスから

細胞融合法によりハイブリドーマを樹立する方法、抗体遺伝子ライブラリーを用いたファージディスプレイ法、さらには、ナイーブ抗体ライブラリーを含む RNA ディスプレイ法の 3 種類の方法により、膜型 GPC3 に特異的に結合する抗体作製を実施した。抗体の性能は蛍光免疫染色法、ELISA、およびフローサイトメーターにて検証し、結合親和性の高いモノクローナル抗体選択を行った。

（倫理面への配慮）

動物を用いる実験において「動物愛護管理法」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛軽減に関する基準」、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」、「厚生労働省の所轄する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」を踏まえ、国立がん研究

センターにおける動物取扱の取り決めを遵守して、事前に国立がん研究センターにおける動物実験委員会承認を得た後に実施した。

## C. 研究結果

### 1) 細胞融合法による抗体作製と特異性評価

BALB/c マウスに recombinant GPC3 を免疫して選択培養からクローニングを経て樹立して得た 12 種の抗 GPC3 抗体について蛍光細胞免疫染色およびフローサイトメーターを用いた FACS 解析によって抗体性能を評価した。細胞は SK-Hep-1 に GPC3 を強制発現させて得た安定発現株とそのベクターのみをトランスフェクションした SK-Hep-1-mock を陰性コントロールとして、さらに GPC3 を発現することが分かっている培養株、HepG2 と JHH7 の 2 株を検討した。蛍光細胞免疫染色の結果、樹立した 12 種類の内 4 つのモノクローナル抗体 (3E3、4F5、7G6、U3E) において蛍光免疫染色像が観察された。HepG2 および JHH7 も同様に染色されたことから、上記 4 つのモノクローナル抗体を第一候補抗体として選択した。次にフローサイトメーターを用いて FACS 解析した結果、いずれの抗体も SK-Hep-1-GPC3 を染色しなかった。以上のことから、初回の抗体候補は細胞表面の GPC3 と結合しないため FITC-CAR には適していない抗体と判定した。膜型 GPC3 の構造を認識する新たな抗体を作るべく、免疫抗原から再検討し、免疫原として GPC3 強制発現細胞を用いることとした。また GPC3 はヒトとマウスでは高い相同性 (94%) であるため、BALB/c マウスでは免疫原として弱いことも課題である。そこで関節リウマチを自然発症する SKG マウス (BALB/c 由来) に免疫してモノクローナル抗体作製に着手した。現在のところ頻回免疫を進めており、血清抗体価の上昇が認められるまで免疫操作を継続する予定である。

### 2) 免疫ライブラリーによるファージディスプレイ法による scFv 作製 (外部受託)

SKG マウスと BALB/c マウスに全長の GPC3、C 末側の部分長 GPC3 と SK-Hep-1-GPC3 細胞を免疫して抗体ライブラリーを構築してファージディスプレイ法に用いて scFv 抗体の作製を実施した。部分長 GPC3 は先行特許を侵害しない C 末端ドメインを選びデザインした。部分長 GPC3 の組換え蛋白質発現は 293T 細胞と CHO 細胞にトランスフェクションして蛋白質産生を行った。部分長 GPC3 精製品の電気泳動の結果から、糖鎖修飾による不均一性とフリーのシステインの影響によると考えられる不安定化、それに伴う会合体形成が認められ、天然状態と等しい立体構造を有したモノマー蛋白質として精製するのは困難であることが分かった。しか

し GPC3 C 末ドメインのリニアエピトープを認識する抗体は取得可能と判断し、作製した部分長 GPC3 を免疫原として用いることとした。全長 GPC3 を含め免疫原が全て揃ったため、現在は BALB/c と SKG マウスに抗原の免疫操作を進めている。血清抗体価の上昇が認められたところで、脾臓 B 細胞から抗体ライブラリーを構築してファージディスプレイによるバイオパニングにより scFv の選択を実施する予定である。

### 3) RNA ディスプレイ法による scFv 作製 (外部受託)

In vitro virus (IVV) 法を用いて、一本鎖抗体 (scFv) ライブラリーから GPC3 に対する結合特異性 scFv の抗体ライブラリー構築を実施した。抗体 cDNA ライブラリーは免疫無しマウス・ナイーブ抗体ライブラリーをテンプレートに、H 鎖と L 鎖をリンカーで繋げた scFv ライブラリーを構築した。ここでのライブラリーサイズは 10 の 10 乗サイズであり、十分な抗体多様性を有していた。さらに PCR によりランダム配列を導入することにより、10 の 11 乗の規模である scFv ライブラリーを再構築した。

並行して scFv の選択 (淘汰) 実験用にバイト蛋白質抗原の新規デザインを行った。GPC3 の C 末に BioTag 配列と精製用タグ配列をタンデムに融合させたバイト蛋白質を作製することとした。発現ベクターは pcDNA3.3 TOPO ベクターとして GPC3 融合配列を挿入して、哺乳細胞にトランスフェクションを行うこととした。IVV 法におけるバイト蛋白質は重要なデバイスであるため、質の良い蛋白質を精製することは本実験を遂行するためにも重要である。一方で GPC3 は立体構造のフォールディング、翻訳後修飾や SS の架橋結合など、その蛋白質構造は極めて複雑であることが知られている。最適な発現細胞を決定するため SK-Hep-1、293T、SP2/0、HepG2 の 4 種類の細胞にトランスフェクションして発現量の比較を行った。その結果、SK-Hep-1 が最も優れた収量であった。以上の結果を踏まえて BioTag 付加型 GPC3 の発現検討を進めている。

## D. 考察

ヒトとマウスの GPC3 の相同性は 94% であり、通常の抗体取得方法では困難であると考えられた。そこで自己免疫疾患 (関節リウマチ) を自然発症する SKG マウスを免疫動物にして抗体取得を開発することで、これまでの課題の克服が出来ると考えている。また複雑なフォールディングと翻訳後修飾を受けるため、抗原蛋白質である GPC3 を得るにも工夫が必要である。具体的には最適な

発現細胞の選択や、フォールディングを複雑にする要因である糖鎖修飾サイトの置換なども今後の検討課題である。

FITC-CARに適した抗体の基準はがん細胞膜表面の抗原蛋白質と結合する抗体であるため、IgG型あるいはscFvでも抗体スクローニングには細胞に発現するGPC3との結合性によって選択する必要がある。そのため、細胞融合法・ファージディスプレイ法・IVV法で取得した抗体ともスクリーニング初期の段階で細胞表面のGPC3との結合性で選抜することが重要であると考えられた。

## E. 結論

初回作製の抗 GPC3 抗体は細胞表面の GPC3 と結合性を示さなかったため、自己免疫疾患マウス (SKG マウス) に免疫して、細胞融合法と免疫ライブラリーによるファージディスプレイ法による抗体取得を目指すこととした。さらにナイーブライブラリーをテンプレートに *in vitro* でランダムイズして多様性を拡大した新規ライブラリーからも通常の抗体の親和性成熟を基盤とする抗体とは全く異なる抗体の取得を目指す。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kinoshita Y, Tanaka S, Souzaki R, Miyoshi K, Kohashi K, Oda Y, Nakatsura T, Taguchi T. Glypican 3 Expression in Pediatric Malignant Solid Tumors. *Eur J Pediatr Surg.* 25(1):138-144, 2015

### 2. 学会発表

1. がんに対する免疫療法の基本、中面哲也、教育セミナー「がん専門 CRC のためのアドバンスセミナー」、第 12 回日本臨床腫瘍学会学術集会 (福岡) 2014 年 7 月 17 日～19 日
2. Glypican-3(GPC3) ペプチドワクチン投与後の投与局所及び腫瘍局所でのペプチド特異的 CTL の解析、吉川聡明、下村真菜美、澤田雄、高橋真理、吉原宏樹、上野浩生、真部淳、細野亜古、植村靖史、中面哲也、第 18 回日本がん免疫学会総会 (松山) 2014 年 7 月 30 日～8 月 1 日
3. Glypican-3 由来エピトープペプチド結合リポソームの CTL 誘導能の評価、岩間達章、内田哲也、下村真菜美、吉川聡明、中面哲也、

第 18 回日本がん免疫学会総会 (松山) 2014 年 7 月 30 日～8 月 1 日

4. Analysis of glypican-3 specific CTLs in the tumor tissue and vaccination site after administration of GPC3 peptide.

(Glypican-3(GPC3) ペプチドワクチン投与後の投与局所及び腫瘍局所でのペプチド特異的 CTL の解析)、吉川聡明、下村真菜美、澤田雄、植村靖史、中面哲也、第 73 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2014 年 9 月 25 日～27 日

5. Establishment of three-dimensional primary tumor cell culture method and novel drug sensitivity test.

(肺がん初代培養細胞を用いた抗がん剤感受性試験の構築と検討)、下村真菜美、五字弘、伊藤学、植村靖史、中面哲也、第 73 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2014 年 9 月 25 日～27 日

6. Evaluation of peptide-specific CTL-inducibility of glypican-3-derived peptide-coupled liposome vaccine.

(Glypican-3 由来ペプチドを結合したリポソームワクチンのペプチド特異的 CTL 誘導能評価)、岩間達章、内田哲也、下村真菜美、吉川聡明、中面哲也、第 73 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2014 年 9 月 25 日～27 日

7. The enhancement of the CTL induction by peptide vaccine therapy in combination with anti-CD4 antibody.

(抗 CD4 抗体の併用投与は抗腫瘍ペプチドワクチン療法の CTL プライミング効率を高める)、藤浪紀洋、吉川聡明、澤田雄、下村真菜美、岩間達章、植村靖史、中面哲也、第 73 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2014 年 9 月 25 日～27 日

8. Glypican-3 (GPC3) ペプチドワクチン投与後の投与局所及び腫瘍局所でのペプチド特異的 CTL の解析、吉川聡明、下村真菜美、澤田雄、高橋真理、植村靖史、中面哲也、第 12 回日本免疫治療学研究会学術集会 (東京) 2015 年 2 月 28 日

9. BCR-ABL-specific T helper cells facilitate propagation of antigen-specific CTLs via DC maturation.、上田格弘、植村靖史、張エイ、劉天懿、巽美奈子、安井裕、葛島清隆、清井仁、金子 新、第 76 回日本血液学会学術集会 (大阪) 2014 年 10 月 31 日～11 月 2 日

10. Generation of BCR-ABL reactive CD4 T lymphocytes by reprogramming and redifferentiation.、上田格弘、植村靖史、張エイ、劉天懿、巽美奈子、安井裕、葛島清隆、清井仁、金子 新、第 43 回日本免疫学会学術集会 (京都) 2014 年 12 月 10 日～12 日

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



様式第 19

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「がん認識抗体と遺伝子導入T細胞によるがん治療を目指した前臨床開発研究」

機関名 国立大学法人 山口大学

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
Checkpoint blockade-based combination therapies against cancer. (口頭発表)	玉田耕治	横浜 (第52回日本癌治療学会 高松宮妃癌研究基金共催国際シンポジウム)	2014年8月30日	国内
Immune checkpoint mechanisms mediated by PD-L1/CD80 interaction in mouse model. (口頭発表)	玉田耕治	横浜 (第73回日本癌学会学術総会)	2014年9月25日	国内
遺伝子改変T細胞療法の次世代技術開発：CAR-T細胞療法の改良を目指して (口頭発表)	玉田耕治	大阪 (第27回日本バイオセラピー学会シンポジウム)	2014年12月4日	国内
Novel strategies of chimeric antigen receptor (CAR)-T cells for cancer immunotherapy. (口頭発表)	玉田耕治	東京 (第19回がん研究会—国際癌化学療法シンポジウム)	2014年12月11日	国内
CAR-T細胞による免疫療法の将来展望 (口頭発表)	玉田耕治	東京 (日本がん分子標的治療学会 第10回TRワークショップ)	2015年1月20日	国内
がんに対する次世代型CAR-T細胞療法の開発 (口頭発表)	玉田耕治	東京 (第12回日本免疫治療学研究会シンポジウム)	2015年2月28日	国内
ヒト大腸癌細胞株からの癌幹細胞が豊富な細胞集団の誘導 (ポスター発表)	吉村清、渡邊裕策、松隈聡、恒富亮一、前田祥成、山本滋、吉野茂文、裕彰一、岡正朗	横浜 (第52回日本癌治療学会学術集会)	2014年8月28日	国内

Induction of cancer stem cells enriched population derived from human colon cancer cell line (SW480) by culture (ポスター発表)	<u>Kiyoshi Yoshimura</u> , Yusaku Watanabe, Satoshi Matsukuma, Ryouichi Tsunedomi, Yoshitaro Shindo, Yoshinari Maeda, Noriko Maeda, Shigeru Yamamoto, Shigefumi Yoshino, Shoichi Hazama, Masaaki Oka	横浜 (第73回日本癌学会学術総会)	2014年9月25日	国内
Development of Cancer Immunotherapy by Blocking PD-1/PD-L1 interaction (口頭発表)	吉村清	韓国ソウル (7th Annual Autumn Meeting for Clinical Oncology Association, International session (MOGA/KACO/JSMO))	2014年10月24日	国外
免疫調整因子阻害剤の臨床開発、米国での経緯と現状 (口頭発表)	吉村清	東京 (第4回 がん新薬開発合同シンポジウム 日本からのグローバルエビデンス発信を目指して：今取り組むべき課題)	2014年11月28日	国内
Emerging immunotherapy -免疫チェックポイント阻害剤について- (口頭発表)	吉村清	金沢 (金沢大学附属病院 第13回 消化器外科カンファレンス)	2015年2月2日	国内
インテグリンと癌肝転移 (口頭発表)	吉村清	東京 (国立がん研究センター 第55回 Monthly Progress Report)	2015年2月24日	国内
がん免疫 (口頭発表)	吉村清	東京 (国立がん研究センター 2014年度NCC若手会企画 第5回がん研究入門セミナー)	2015年2月25日	国内
Immunomonitoring in clinical trials of immunomodulatory antibodies. (口頭発表)	北野滋久	松山 (第18回日本がん免疫学会総会 日本バイオセラピー学会と日本がん免疫学会合同シンポジウム)	2014年7月30日 ～8月1日	国内
進行メラノーマ患者における抗CTLA-4抗体療法後のがん抗原特異的細胞障害性CD4陽性T細胞反応の増強 (口頭発表)	北野滋久	横浜 (第73回日本癌学会学術総会 International session: Antibody therapy 国際シンポジウム)	2014年9月25日 ～27日	国内

Fine T cell analysis of patients treated with Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase Suicide Gene System in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. (ポスター発表)	Hashimoto H, <u>Kitano S</u> , Ueda R, Itoh A, Tada K, Tomura D, Nukaya I, Mineno J, Heike Y.	New York, USA. (21st Annual Cancer Research Institute International Cancer Immunotherapy Symposium. CANCER IMMUNOTHERAPY 2014)	2014年10月6日 ~8日	国外
がん免疫細胞療法の新しい展開 (口頭発表)	中面哲也、北野滋久	東京 (第4回 がん新薬開発合同シンポジウム 日本からのグローバルエビデンス発信を目指して：今取り組むべき課題)	2014年11月28日	国内
教育セミナー「がん専門CRCのためのアドバンスセミナー」 がんに対する免疫療法の基本 (口頭発表)	中面哲也	福岡 (第12回日本臨床腫瘍学会学術集会)	2014年7月17日 ~19日	国内
Glypican-3 (GPC3) ペプチドワクチン投与後の投与局所及び腫瘍局所でのペプチド特異的CTLの解析 (ポスター発表)	吉川聡明、下村真菜美、澤田雄、高橋真理、吉原宏樹、上野浩生、真部淳、細野亜古、植村靖史、中面哲也	松山 (第18回日本がん免疫学会総会)	2014年7月30日 ~8月1日	国内
Glypican-3由来エピトープペプチド結合リポソームのCTL誘導能の評価 (ポスター発表)	岩間達章、内田哲也、下村真菜美、吉川聡明、中面哲也	松山 (第18回日本がん免疫学会総会)	2014年7月30日 ~8月1日	国内
Analysis of glypican-3 specific CTLs in the tumor tissue and vaccination site after administration of GPC3 peptide (ポスター発表)	吉川聡明、下村真菜美、澤田雄、植村靖史、中面哲也	横浜 (第73回日本癌学会学術総会)	2014年9月25日 ~27日	国内
Establishment of three-dimensional primary tumor cell culture method and novel drug sensitivity test (ポスター発表)	下村真菜美、五字弘、伊藤学、植村靖史、中面哲也	横浜 (第73回日本癌学会学術総会)	2014年9月25日 ~27日	国内
Evaluation of peptide-specific CTL-inducible ability of glypican-3-derived peptide-coupled liposome vaccine. (ポスター発表)	岩間達章、内田哲也、下村真菜美、吉川聡明、中面哲也	横浜 (第73回日本癌学会学術総会)	2014年9月25日 ~27日	国内

The enhancement of the CTL induction by peptide vaccine therapy in combination with anti-CD4 antibody (ポスター発表)	藤浪紀洋、吉川聡明、澤田雄、下村真菜美、岩間達章、植村靖史、中面哲也	横浜 (第73回日本癌学会学術総会)	2014年9月25日 ~27日	国内
Glypican-3 (GPC3) ペプチドワクチン投与後の投与局所及び腫瘍局所でのペプチド特異的CTLの解析 (ポスター発表)	吉川聡明、下村真菜美、澤田雄、高橋真理、植村靖史、中面哲也	東京 (第12回日本免疫治療学研究会学術集会)	2015年2月28日	国内
BCR-ABL – specific T helper cells facilitate propagation of antigen-specific CTLs via DC maturation. (ポスター発表)	上田格弘、植村靖史、張エイ、劉天懿、巽美奈子、安井裕、葛島清隆、清井仁、金子新	大阪 (第76回日本血液学会学術集会)	2014年10月31日 ~11月2日	国内
Generation of BCR-ABL reactive CD4 T lymphocytes by reprogramming and redifferentiation (ポスター発表)	上田格弘、植村靖史、張エイ、劉天懿、巽美奈子、安井裕、葛島清隆、清井仁、金子新	京都 (第43回日本免疫学会学術集会)	2014年12月10日 ~12日	国内

## 2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文(発表題目)	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外の別
キメラ抗原レセプター (CAR) 遺伝子導入T細胞によるがん治療	玉田耕治	臨床免疫・アレルギー科, 62(3):344-348, 2014	2014年9月	国内
Glypican 3 Expression in Pediatric Malignant Solid Tumors	Kinoshita Y, Tanaka S, Souzaki R, Miyoshi K, Kohashi K, Oda Y, Nakatsura T, Taguchi T	Eur J Pediatr Surg 25(1):138-144	2015年	国外

(注1) 発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。

(注2) 本様式はexcel形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。