

# 総合医科学研究センター

## DNA 医学研究所

所長 山田 尚

### 遺伝子治療研究部

教授：大橋 十也 小児科学，遺伝子治療，先天代謝異常  
准教授：小林 博司 小児科学，遺伝子治療，先天代謝異常

#### 教育・研究概要

##### I. はじめに

本年もライソゾーム蓄積症 (LSDs)，消化器癌を中心に研究を進めた。LSDs の研究では遺伝子治療法の開発，現行の治療法である酵素補充療法，骨髓移植療法の問題点の克服法の開発，iPS 細胞を用いた新規治療法の実現を行った。消化器癌では引き続きプロテアーゼ阻害剤を用いた治療法の実現を遺伝子治療などと併用して行った。

##### II. LSDs の新規骨髓移植療法の実現

ライソゾーム蓄積症では骨髓移植が有広く行われている。しかしながら，前処置で大量の抗癌剤，放射線照射が必要なため，それによる患者さんの全身状態の悪化が臨床経験される。そこでより安全な前処置法の実現を，マウスを用いて行った。前処置ではレシピエントの造血幹細胞を死滅させる必要があるが，通常造血幹細胞は分裂しておらず，これが抗癌剤，放射線照射に抵抗性を示す要因である。そこで造血幹細胞を分裂させ抗癌剤，放射線に対する感受性を高めればより低用量の抗癌剤，放射線照射で済む可能性がある。我々は骨髓のニッチに着目しインターフェロンを誘導する薬物，抗 kkit 抗体を前処置に用いた。対象は LSDs の一つであるムコ多糖症であった。結果としては治療効果を示すに十分なドナー細胞の生着が得られ，またマウスにも副作用の実現はほとんど見られなかった。

##### III. LSDs 酵素補充療法における抗体発生に関する研究

LSDs の一つであるポンペ病では酵素補充療法が効果を挙げているが酵素製剤に対する抗体が出現して治療効果を阻害する。我々は以前，酵素を経口投与することにより酵素製剤に対して免疫寛容が誘導されることを報告した (Ohashi T, et al. Mol Genet Metab 2011)。この研究では酵素をアジュバンドと共に腹腔内投与してマウスを免疫した。今回はより臨床に近い形で酵素を投与した。すなわち酵素製剤は隔週に 1 回 20mg/kg を経静脈的に投与した。酵素製剤の経口投与により免疫寛容が導入され結果として酵素製剤に対する抗体価の減少ならびに酵素製剤投与による致死のアレルギー反応の抑制が認められた。

##### IV. LSDs に対する遺伝子治療

我々は静止期・増殖 (分裂) 期両方の細胞への遺伝子導入効率がよく，しかも長期発現が期待できるレンチウイルスベクターシステムを用いて，進行性脱髄性疾患であるクラッペ病新生児モデルマウスにおける効果を調べ，脳での基質蓄積の低下，末梢神経シュワン細胞病理像の改善，発症時期の遅延，寿命の延長といった効果が見られている。更に基質合成阻害剤と併用すると，上記において相乗効果が得られている。またムコ多糖症 VII 型 Sly 病の関しても同様に新生児遺伝子治療を試み，中枢系への有効な遺伝子発現など成果を挙げている。ムコ多糖症 II 型 Hunter 病のモデルマウスに対しては欠損酵素イブロン酸-2-サルファターゼを発現するレンチウイルスベクターを用いて骨髓幹細胞への導入を目的とする *ex vivo* gene therapy, ポンペ病患者由来の iPS 細胞に対し欠損酵素 GAA を発現するレンチウイルスベクターを感染させ遺伝子導入し，その後分化させて解析する研究も同時進行で行っている。更に現在ウイルスベクター法とは別に，部位特異的な相同組換えによる遺伝子導入を目指し zinc finger nuclease によるシステムを構築し，*in vitro* にて検討中である。

## V. 酵素安定化に着目したポンペ病の新規治療法開発

現在、ポンペ病に対しては欠損酵素である酸性 $\alpha$ -グルコシダーゼ (GAA) を体外から補充する酵素補充療法が唯一の根治療法として行われている。しかし、患者や臓器により治療感受性が異なる点や抗GAA抗体が産生される点など様々な問題が明らかとなっており、新たな観点からの治療法開発が求められている。そこで我々は、ポンペ病患者の少なくとも一部は、遺伝子変異のためにGAAが小胞体内で正常な立体構造を持つことが出来ないために小胞体関連分解を受けているという点に着目し、それを抑制するプロテアソーム阻害剤が治療薬となり得る可能性を着想した。今年度は、ポンペ病患者細胞に対してプロテアソーム阻害剤を投与し、患者GAAへの効果を解析した。2種類のプロテアソーム阻害剤 (ボルテゾミブとMG132) をそれぞれ患者細胞に投与したところ、どちらの患者細胞でもGAAの安定化が認められ、未処理患者細胞では検出されなかった成熟型GAAの顕著な増加が認められた。この安定化は低濃度処理から観察され、その濃度域における患者細胞の増殖性に影響は認められなかった。また、プロテアソーム阻害剤投与細胞ではライソゾームのマーカー分子であるLAMP2とGAAが共局在していることが確認された。さらに、酵素活性を測定したところ、MG132投与細胞では酵素活性の約2倍の上昇が認められ、ボルテゾミブ投与細胞では約4倍の上昇が検出された。以上の結果より、プロテアソーム阻害剤が患者GAAの安定化および機能改善に有効であることが明らかとなった。本研究で用いたボルテゾミブは現在実地臨床で用いられている唯一のプロテアソーム阻害剤であり、ポンペ病の治療薬として有効である可能性が考えられる。

## VI. 難治性消化器癌に対するNF- $\kappa$ B阻害剤を用いた抗腫瘍効果の検討及び遺伝子治療への応用

我々はこれまで難治性消化器癌に対するNF- $\kappa$ Bの活性化抑制をターゲットとした抗腫瘍効果の検討を様々な消化器癌に対して行っている。以前より、様々な悪性腫瘍の増殖、浸潤、転移、抗腫瘍剤耐性にNF- $\kappa$ Bの活性化が関与している事が報告されている。我々は肺炎やDICの治療で広く汎用されているメシル酸ナファモスタット (フサン<sup>®</sup>) がNF- $\kappa$ Bの活性化を抑制し、単剤または抗腫瘍剤との併用にて抗腫瘍効果をもたらす事を膵癌、胃癌、胆嚢癌にて示してきた。臨床の現場に於いても、切除不能膵臓

癌に対するFUT175併用塩酸ゲムシタピン (GEM) の第2相臨床試験が終了し、良好な成績を得る事が出来た。現在は膵癌に対する放射線併用のメシル酸ナファモスタット投与の抗腫瘍効果の検討を行っており、良好な結果が得られている。更には、新たなNF- $\kappa$ B阻害剤として、サリドマイドの誘導体であるボマリドマイドに着目し、膵癌に対するその抗腫瘍効果についても検討中である。

一方で、我々は消化器癌に対するアデノウイルスベクターを用いた腫瘍内へのTNF- $\alpha$ 遺伝子導入の抗腫瘍効果の検討も行ってきた。TNF- $\alpha$ の遺伝子導入は抗腫瘍効果を認める一方でNF- $\kappa$ Bを活性化し、抗アポトーシスに作用する一面を持つ。そこで我々はメシル酸ナファモスタットとの併用投与により抗腫瘍効果が増強する事を膵癌、肝細胞癌にて示してきた。現在はCD40Lの腫瘍内遺伝子導入による抗腫瘍効果の検討をメシル酸ナファモスタット併用投与で*in vivo*, *in vitro*にて検討中であり、良好な結果が得られている。

Cell viability assayでは、放射線単独群に比してFUT175併用群の方が有意に細胞増殖抑制効果を認めた。

### 「点検・評価」

今年も多くの論文・研究発表が為された。中でも外科学講座からの大学院生が中心となっている「難治性消化器癌に対するNF- $\kappa$ B阻害剤を用いた抗腫瘍効果の検討及び遺伝子治療への応用」研究の結果をもとに臨床の現場に於いても、切除不能膵臓癌に対するFUT175併用塩酸ゲムシタピン (GEM) の第2相臨床試験が終了し、良好な成績を得る事が出来ており高く評価される。更にこれ以外でも臨床応用に直結する研究が多くなされており、今後もこの方針に沿って研究が進められていくものと思われる。

## 研究業績

### I. 原著論文

- 1) Haruki K, Shiba H, Fujiwara Y, Furukawa K, Iwase R, Uwagawa T, Misawa T, Ohashi T, Yanaga K. Inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B enhances the antitumor effect of paclitaxel against gastric cancer with peritoneal dissemination in mice. *Dig Dis Sci* 2013; 58(1): 123-31.
- 2) Furukawa K, Uwagawa T, Haruki K, Fujiwara Y, Iida T, Shiba H, Misawa T, Ohashi T, Yanaga K. Nuclear factor  $\kappa$ B activity correlates with the progres-

sion and prognosis of pancreatic cancer in a mouse model. *Surg Today* 2013; 43(2) : 171-7.

- 3) Fujiwara Y, Shiba H, Iwase R, Haruki K, Furukawa K, Uwagawa T, Misawa T, Ohashi T, Yanaga K. Inhibition of nuclear factor kappa-B enhances the antitumor effect of combination treatment with tumor necrosis factor-alpha gene therapy and gemcitabine for pancreatic cancer in mice. *J Am Coll Surg* 2013; 216(2) : 320-32.
- 4) Tanaka A, Okuyama T, Suzuki Y, Sakai N, Takakura H, Sawada T, Tanaka T, Otomo T, Ohashi T, Ishige-Wada M, Yabe H, Ohura T, Suzuki N, Kato K, Adachi S, Kobayashi R, Mugishima H, Kato S. Long-term efficacy of hematopoietic stem cell transplantation on brain involvement in patients with mucopolysaccharidosis type II: a nationwide survey in Japan. *Mol Genet Metab* 2012; 107(3) : 513-20.
- 5) Ohashi T, Iizuka S, Shimada Y, Higuchi T, Eto Y, Ida H, Kobayashi H. Administration of anti-CD3 antibodies modulates the immune response to an infusion of  $\alpha$ -glucosidase in mice. *Mol Ther* 2012; 20(10) : 1924-31.
- 6) Higuchi T, Shimizu H, Fukuda T, Kawagoe S, Matsumoto J, Shimada Y, Kobayashi H, Ida H, Ohashi T, Morimoto H, Hirato T, Nishino K, Eto Y. Enzyme replacement therapy (ERT) procedure for mucopolysaccharidosis type II (MPS II) by intraventricular administration (IVA) in murine MPS II. *Mol Genet Metab* 2012; 107(1-2) : 122-8.
- 7) Nishiyama Y, Shimada Y, Yokoi T, Kobayashi H, Higuchi T, Eto Y, Ida H, Ohashi T. Akt inactivation induces endoplasmic reticulum stress-independent autophagy in fibroblast from patients with Pompe disease. *Mol Genet Metab* 2012; 107(3) : 490-5.
- 8) Kobayashi M, Ohashi T, Fukuda T, Yanagisawa T, Inomata T, Nagaoka T, Kitagawa T, Eto Y, Ida H, Kusano E. No accumulation of globotriaosylceramide in the heart of a patient with the E66Q mutation in the alpha-Galactosidase A gene. *Mol Genet Metab* 2012; 107(4) : 711-5.
- 9) Klionsky DJ, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 2012; 8(4) : 445-544.

## II. 総 説

- 1) Ohashi T. Enzyme replacement therapy for lysosomal storage diseases. *Pediatr Endocrinol Rev* 2012; 10(Suppl.1) : 26-34.
- 2) 大橋十也. 【クローズアップ ここまで治せるよう

になった先天代謝異常症】序—先天代謝異常症の治療の新展開. *小児内科* 2012; 44(10) : 1580-2.

- 3) 大橋十也. 【先天代謝異常症候群 (第2版) (下)—病因・病態研究, 診断・治療の進歩—】膜輸送系の異常 ライソゾーム膜の異常 シスチン蓄積症. *日臨* 2012; 別冊先天代謝異常症候群 (下) : 812-7.
- 4) 大橋十也. 【先天代謝異常症候群 (第2版) (下)—病因・病態研究, 診断・治療の進歩—】ライソゾーム病 ポンベ病. *日臨* 2012; 別冊先天代謝異常症候群 (下) : 593-8.
- 5) 佐藤洋平, 大橋十也. 【先天代謝異常症候群 (第2版) (下)—病因・病態研究, 診断・治療の進歩—】ライソゾーム病 ムコ多糖症 ムコ多糖症 IX 型. *日臨* 2012; 別冊先天代謝異常症候群 (下) : 558-60.
- 6) 嶋田洋太. 【種々の代謝異常】ライソゾーム病と蛋白分解異常. *内分泌糖尿代謝内科* 2012; 34(3) : 192-7.
- 7) 小林博司. 【小児疾患の診断治療基準 (第4版)】(第2部) 疾患 先天代謝異常症 筋型糖原病. *小児内科* 2012; 44(増刊) : 156-7.

## III. 学会発表

- 1) Ohashi T. Introduction to Fabry disease · Epidemiology, pathophysiology, genetics · Clinical spectrum of disease · Case samples. 5th Annual Pompe-Fabry Physician Training. Taipei, June.
- 2) Ohashi T. Current therapies for lysosomal storage diseases and their problems—for the development of cell and gene therapies. Japan Society of Gene Therapy 18th Annual Meeting 2012. Kumamoto, June.
- 3) Ohashi T. Immunological aspect of enzyme replacement therapy for lysosomal storage diseases. 4th International Forum for Lysosomal Storage Disorders & 17th Japan Society of Lysosomal Storage Disorders Joint Meeting. Tokyo, Oct.
- 4) Kobayashi H, Shimada Y, Iizuka S, Higuchi T, Ariga M, Iwamoto T, Fukuda T, Ida H, Eto Y, Ohashi T. Lentiviral vector mediated neonatal gene therapy of Krabbe disease model mice. 2nd Asian Congress for Inherited Metabolic Disease. Seoul, Apr.
- 5) Nishiyama Y, Shimada Y, Yokoi T, Kobayashi H, Eto Y, Ida H, Ohashi T. Mechanism of endoplasmic reticulum stress-independent autophagic activation in Pompe disease fibroblasts. 2nd Asian Congress for Inherited Metabolic Disease. Seoul, Apr.
- 6) Shimada Y, Nishida H, Nishiyama Y, Kobayashi H, Higuchi T, Eto Y, Ida H, Ohashi T. Proteasome inhibitor improves the function of mutant lysosomal alpha-glucosidase in fibroblasts from Pompe disease pa-

- tient. 2nd Asian Congress for Inherited Metabolic Disease. Seoul, Apr.
- 7) Wakabayashi T, Tajima A, Ohashi T, Ida H. Research clinical and genetic study of Japanese patients with Gaucher disease type 2. 8th Congress of Asian Society for Pediatric Research. Seoul, May.
- 8) Higuchi T, Shimizu H, Fukuda T, Kawagoe S, Matsu-moto J, Hirayama R, Shimada Y, Kobayashi H, Ida H, Ohashi T, Eto Y. Intraventricular enzyme replacement therapy (ERT) for MPS II murine model. 2nd Asian Congress for Inherited Metabolic Disease. Seoul, Apr.
- 9) Kobayashi H, Shimada Y, Ariga M, Iizuka S, Sato Y, Iwamoto T, Fukuda T, Eto Y, Ohashi T. Recombinant lentivirus mediated gene therapy for neonatal mouse model of Krabbe disease. Japan Society of Gene Therapy 18th Annual Meeting 2012. Kumamoto, June.
- 10) Haruki K, Yanaga K, Iwase R, Fujiwara Y, Furukawa K, Shimada Y, Iida T, Shiba H, Uwagawa T, Kobayashi H, Misawa T, Ohashi T. Combination treatment using adenovirus-mediated tumor necrosis factor- $\alpha$  gene transfer and NF- $\kappa$ B inhibitor for hepatocellular carcinoma in mice. Japan Society of Gene Therapy 18th Annual Meeting 2012. Kumamoto, June.
- 11) 小林博司, 有賀賢典, 飯塚佐代子, 岩本武夫, 嶋田洋太, 福田隆浩, 衛藤義勝, 大橋十也. レンチウイルスベクターを用いたクラブ病モデルマウスに対する新生児遺伝子治療. 日本人類遺伝学会第57回大会. 東京, 10月.
- 12) 佐藤洋平, 小林博司, 大橋十也, 井田博幸. Mucopolidosis II 型剖検例におけるオートファジー機能不全との関連性. 第54回日本先天代謝異常学会総会. 岐阜, 11月.
- 13) 秋山和政, 飯塚佐代子, 嶋田洋太, 樋口 孝, 福田隆浩, 小林博司, 井田博幸, 衛藤義勝, 大橋十也. ムコ多糖症 II 型 (MPS II) マウスにおける酵素補充療法と骨髄移植療法の比較検討. 第54回日本先天代謝異常学会総会. 岐阜, 11月.
- 14) 嶋田洋太, 西山由梨佳, 小林博司, 樋口 孝, 衛藤義勝, 井田博幸, 大橋十也. ポンペ病におけるプロテアソーム阻害剤応答性酸性  $\alpha$  グルコシダーゼ変異の探索. 第54回日本先天代謝異常学会総会. 岐阜, 11月.
- 15) Haruki K, Shiba H, Iwase R, Fujiwara Y, Furukawa K, Iida T, Uwagawa T, Misawa T, Ohashi T, Yanaga K. Combination treatment using adenovirus-mediated tumor necrosis factor- $\alpha$  gene transfer and NF- $\kappa$ B inhibitor for hepatocellular carcinoma in mice. 8th Annual Academic Surgical Congress. New Orleans, Feb.
- 16) Sato Y, Saito R, Kobayashi H, Fujiwara M, Ohashi T, Ida H, Eto Y. Massive accumulation of glycosaminoglycans in the aortic valve of a patient with Hunter syndrome during enzyme replacement therapy. 4th International Forum for Lysosomal Storage Disorders & 17th Japan Society of Lysosomal Storage Disorders Joint Meeting. Tokyo, Oct.
- 17) Fujiwara Y, Shiba H, Iwase R, Haruki K, Furukawa K, Uwagawa T, Misawa T, Ohashi T, Yanaga K. Inhibition of NF- $\kappa$ B enhances the anti-tumor effect of combination treatment with tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) gene therapy and gemcitabine for pancreatic cancer in mice. American college of Surgeons 98th Annual Clinical Congress. Chicago, Sept.
- 18) 岩瀬亮太, 柴 浩明, 春木孝一郎, 藤原佑樹, 古川賢英, 飯田智憲, 宇和川匡, 三澤健之, 大橋十也, 矢永勝彦. マウス胆嚢癌皮下腫瘍モデルに対するメシル酸ナファモスタット併用塩酸ジェムシタピンの抗腫瘍効果の検討. 第67回日本消化器外科学会総会. 富山, 7月.
- 19) Ariga M, Kobayashi H, Shimada Y, Fukuda T, Iizuka S, Kaneshiro E, Ida H, Eto Y, Ohashi T. Neonatal gene therapy of MPS VII mice by lentiviral vector. 4th International Forum for Lysosomal Storage Disorders & 17th Japan Society of Lysosomal Storage Disorders Joint Meeting. Tokyo, Oct.
- 20) Iwase R, Shiba H, Haruki K, Fujiwara Y, Furukawa K, Iida T, Uwagawa T, Misawa T, Ohashi T, Yanaga K. Combination chemotherapy of gemcitabine with nafamostat mesilate against gallbladder cancer targeting nuclear factor- $\kappa$ B activation. 8th Annual Academic Surgical Congress. New Orleans, Feb.

#### IV. 著 書

- 1) 大橋十也. E. 治療 2. 酵素補充概要 i. 抗体産生とその治療. 衛藤義勝責任編集, 井田博幸, 遠藤文夫 (熊本大学), 大橋十也, 奥山虎之 (国立成育医療センター), 櫻庭 均 (明治薬科大学), 辻 省次 (東京大学), 鄭 忠和 (鹿児島大学), 成田一衛 (新潟大学), 湯澤由紀夫 (藤田保健衛生大学) 編. ファブリー病 UpDate. 東京: 診断と治療社, 2013. p.212-9.
- 2) 大橋十也. F. 経過, 予後 1. 経過, 予後. 衛藤義勝責任編集, 井田博幸, 遠藤文夫 (熊本大学), 大橋十也, 奥山虎之 (国立成育医療センター), 櫻庭均 (明治薬科大学), 辻 省次 (東京大学), 鄭 忠和 (鹿児島大学), 成田一衛 (新潟大学), 湯澤由紀夫 (藤田保健衛生大学) 編. ファブリー病 UpDate. 東京:

診断と治療社, 2013. p.234-41.

- 3) 西山由梨佳. K. ライソゾーム病の医療費等助成認定基準 1. 医療費等助成認定基準-ファブリー病を中心に. 衛藤義勝責任編集, 井田博幸, 遠藤文夫(熊本大学), 大橋十也, 奥山虎之(国立成育医療センター), 櫻庭 均(明治薬科大学), 辻 省次(東京大学), 鄭 忠和(鹿児島大学), 成田一衛(新潟大学), 湯澤由紀夫(藤田保健衛生大学) 編. ファブリー病 UpDate. 東京: 診断と治療社, 2013. p. 304-5.
- 4) 小林博司. C. 臨床症状 5. 消化器症状. 衛藤義勝責任編集, 井田博幸, 遠藤文夫(熊本大学), 大橋十也, 奥山虎之(国立成育医療センター), 櫻庭 均(明治薬科大学), 辻 省次(東京大学), 鄭 忠和(鹿児島大学), 成田一衛(新潟大学), 湯澤由紀夫(藤田保健衛生大学) 編. ファブリー病 UpDate. 東京: 診断と治療社, 2013. p.75-8.
- 5) 小林博司. E. 治療 2. 酵素補充概要 h. 酵素補充療法の副作用とその治療. 衛藤義勝責任編集, 井田博幸, 遠藤文夫(熊本大学), 大橋十也, 奥山虎之(国立成育医療センター), 櫻庭 均(明治薬科大学), 辻 省次(東京大学), 鄭 忠和(鹿児島大学), 成田一衛(新潟大学), 湯澤由紀夫(藤田保健衛生大学) 編. ファブリー病 UpDate. 東京: 診断と治療社, 2013. p.206-11.

## 悪性腫瘍治療研究部

教授: 本間 定	腫瘍免疫学
教授: 銭谷 幹男	肝臓病学
(兼任)	
准教授: 小井戸薫雄	消化器病学, 腫瘍免疫学
(兼任)	
講師: 赤崎 安晴	脳神経外科学, 腫瘍免疫学
(兼任)	

### 教育・研究概要

本研究部の業務目的は、がんを中心とする悪性腫瘍の新規治療法を開発し、悪性腫瘍治療の進歩に貢献することにある。研究者の自由な発想により構築された新規悪性腫瘍治療法のアイデアは基礎研究においてその理論的基盤を確立させ、臨床各科との共同研究による臨床試験でその有効性、安全性を検証し、実際の臨床への導入を目指していく。本研究部は生体の有する抗腫瘍免疫を利用して悪性腫瘍の治療を行う研究を継続してきており、本年度もこの分野を中心に研究を行った。

### I. 進行肺癌を対象とした WT1 class I & II ペプチドパルス樹状細胞 (DC) 療法の第 1 相臨床試験

本臨床試験は腫瘍抗原 Wilms' Tumor 1 (WT1) を認識する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の活性化のみならず、抗腫瘍免疫の誘導と活性化に必須であるヘルパー T 細胞の活性化をその機序に取り入れた本邦初の臨床試験である。手術不能進行肺癌症例で規定のクライテリアを満たす者を試験参加者として登録し、アフエレーシスにより末梢血単核球を採取、GMA 対応細胞産生施設においてこれを培養し、大量の DC を得て治療まで凍結保存する。定法の Gemシタピン投与に併用して、2 週に 1 回の頻度で WT1 peptide (CTL を刺激する class I peptide とヘルパー T 細胞を刺激する class II peptide) をパルスした DC を患者に投与する。試験開始にあたり、WT1 class I peptide を単独でパルスした DC 療法を 3 例に施行し有害事象を認めなかったことから、WT1 class I peptide と class II peptide の両方をパルスした DC により治療を開始した。WT1 class I/II peptide pulse DC を投与された第 1 例目の 64 歳、男性は 2012 年 5 月より治療を開始し、重篤な有害事象を認めず、2013 年 3 月時点で病状は安定した状態で外来通院治療を継続している。さらに数名の進行肺癌患者の登録があり、引き続き同臨床試験に参加の予定である。