

質疑応答集

■ 第1回オンチップ・バイオテクノロジーズ x ヤマハ発動機タイアップウェビナー

2021年3月18日(木) 16:00 - 17:00 開催

■ 講演1: On-chip 製品アプリケーション紹介

- ・ オンチップ・バイオテクノロジーズ: ユーザーサポート部長 石毛 真行 氏

■ 講演2: 細胞ピッキング & イメージングシステム CELL HANDLER の紹介

- ・ ヤマハ発動機: アプリケーションスペシャリスト 熊谷 京彦 氏

■ 講演3: 患者由来がんオルガノイド (F-PDO®) を用いた抗がん剤評価システム

- ・ 福島県立医科大学
医療-産業トランスレーショナルリサーチセンター 教授
福島医大トランスレーショナルリサーチ機構 副理事長
高木 基樹 先生

■ 講演2: ヤマハ発動機へのご質問

Q1: CELL HANDLER で認識できる細胞の大きさは、どのくらいですか。細菌も認識可能ですか。

A1: 認識できる細胞の最小サイズは約 10 μm(シングルセル)です。装置には 4x および 10x レンズを備えており、明視野および蛍光 (最大 3 色) 観察が可能です。細菌の認識実績はありませんが、ご要望のサンプルを使用したテスト評価やデモを行うことも可能です。気兼ねなくご連絡ください(email: yeh@yamaha-motor.co.jp)。

■ 講演3: 福島県立医科大学へのご質問

(樹立関連)

Q1: F-PDO は、がん細胞のみでしょうか。

A1: 長期培養により、間質細胞は排除されて、ほぼがん細胞の塊として培養しています。

Q2: F-PDO の増殖速度について教えてください。

A2: 倍加時間はおおよそ 1 週間程度です。遅いものは 10 日間程度かかります。

Q3: F-PDO は一般的な培地で培養可能なのでしょうか。幹細胞用の培地を使ったり、成長因子または何らかの阻害剤を添加したりする必要はありますか。

A3: 例えば RPMI や DMEM でも場合によっては培養可能な場合もあります。ただし、元のがん組織での遺伝子発現の特徴を維持できる保証はありません。F-PDO を樹立する時は、無血清培地を用い、がん種に合わせて増殖因子や阻害剤などを入れて培養しています。

Q4: オルガノイドはがん種に関わらず同一培養条件で樹立できますか。

A4: 培地への添加因子など、がん種にあった培養条件を検討して行く必要があります。

Q5: スフェロイドには骨格系タンパク質の足場材料は不要なのでしょうか。

A5: がん組織の初期の培養段階では、細胞外マトリックス（足場）を用いてしばらく培養することもあります。その後は基本的に浮遊培養で足場がない状態で増えるような培養方法を行っています。

Q6: 樹立の成功率はどれくらいでしょうか。

A6: 初期の条件検討段階では、成功率が 10%にも満たないこともあります。ただ、安定した培養条件を見つけることが出来れば、樹立効率はかなり上がります。がん種にもよりますが、安定した系での樹立成功率は 30%程度まで上がります。がん種によっては、まだ全く樹立できないものもあります。

Q7: 脳のがんの樹立において特に難しい点がありますでしょうか？

A7: 脳腫瘍については、がんオルガノイドの作製に成功しておりません。F-PDO に脳腫瘍の系統がありましたが、接着培養で増やしております。

Q8: 何をもって樹立というのでしょうか。

A8: 安定的に長期培養をできること、元のがん組織の特徴を維持していることです。

Q9: 培養している細胞が、がん細胞である、という評価はどのように行うのでしょうか。

A9: 一番の基準は、遺伝子発現解析を行い、元のがん組織との遺伝子発現プロファイリングの類似性を評価しています。その他、遺伝子変異の情報、形態的な類似性など常に複数の評価系で、樹立したものに変化が起きていないか、評価しています。

Q10: 変異情報などのみではがん細胞のみである立証にならず、むしろ organ 様として様々な細胞の複合体のほうが感受性試験には適していると思いますがいかがでしょうか？

A10: 網羅的遺伝子発現解析でがん関連遺伝子の発現を確認しています。また、形態的にもがん組織の類似性を確認しています。福島県立医科大学では、間質細胞との共培養や Organ-on-a-Chip 技術への適応を検討しており、よりがん組織に近いアッセイ系の構築を目指しています。

Q11: 臨床で抗がん剤が効くのに、F-PDO だと効きにくくなる場合はございますか。

A11: 臨床で抗がん剤の効果が認められたがん組織を入手することは困難です。その為、薬効が認められたがん組織との比較は実施していません。

Q12: F-PDO は多くの施設で樹立されていますか。

A12: F-PDO は、当センターの独自技術です。ただし、ATCC 等から販売されているがんオルガノイドと特徴などは類似しております。

Q13: 従来のオルガノイドよりもがん組織に近い F-PDO を作製されたとのことですが、F-PDO とが

ん組織の構造でどのような差異がありますか。F-PDO 研究ががん組織研究に比べて不足している部分は何かありますか。

A13: F-PDO が、他のオルガノイドよりも優れているという事ではなく、それぞれの培養方法に特徴があります。他のがんオルガノイドでも、がん組織と同様の特徴を示し、F-PDO と同様の抗がん剤の感受性を示すことは確認しております。

がん組織には、血管、線維芽細胞、免疫細胞等との間質細胞が存在しないため、F-PDO は正確に組織を反映できておりません。福島県立医科大学では、間質細胞との共培養や Organ-on-a-Chip 技術への適応を検討しており、よりがん組織に近いアッセイ系の構築を目指しています。

(アッセイ関連)

Q14: 細胞株との薬剤感受性の比較ですが、培地の添加因子の影響はありますか。同じ条件でも感受性プロファイルは異なるのでしょうか。

A14: EGFR 阻害剤の感受性に EGF の添加が影響することが判っており、この影響は F-PDO も細胞株も一緒です。培地条件が同一でも、がん細胞株と F-PDO の感受性プロファイリングに違いはあります。

Q15: YAMAHA CELL HANDLER の使用により、Z'値が向上するとのお話しがございました。どのように分取すると Z'値が改善するのでしょうか。サイズか、ウェル内数を揃えるのでしょうか。

A15: アッセイの精度を上げるには、サイズとウェル内の細胞塊の数の両方の検討が大切です。

(IO 関連)

Q16: NoviSight(オリンパス株式会社)での NK 細胞の細胞傷害活性についてですが、反応後に死んでしまった NK 細胞を見分けることはできるのでしょうか。また、RTCA で測定する場合には結局は接着細胞と同様になってしまっているのではないのでしょうか。

A16: NK 細胞を染色して、見分けることは可能です。NoviSight の観察は短時間での反応を見ているので、死んだ NK 細胞はほとんどいません。

xCELLigence(Agilent Technologies, Inc.)の測定で、F-PDO は金電極の上に接着されていますが、単層培養のような増殖を示しているわけではありませんので、通常のがん細胞株と増殖が一致していません。この場合においても、F-PDO の増殖は遅いです。

Q17: 使用された NK 細胞は、市販の一般的なものでしょうか。それとも F-PDO と同患者由来の PBMC から採取した NK 細胞を使用しているのでしょうか。

A17: 市販の PBMC から NK 細胞を培養しています。

Q18: ADCC 活性は、細胞株では見られないのでしょうか。

A18: ADCC 活性は、がん細胞株でも検出できます。ただし、F-PDO とがん細胞株で ADCC 活性の感受性に違いがあります。

以下に、F-PDO 関連情報を紹介いたします。是非、ご参考にしてください。

F-PDO 紹介ウェブサイト

<https://www.fmu.ac.jp/home/trc/contract-research/cancer/f-pdo-drug-test/>

論文

■ Evaluation of anticancer agents using patient-derived tumor organoids characteristically similar to source tissues. Tamura et al., *Oncology Reports*, 40: 635-646 (2018)

<https://www.spandidos-publications.com/or/40/2/635>

■ An in vitro system for evaluating molecular targeted drugs using lung patient-derived tumor organoids. Takahashi et al., *Cells*. 8: 481 (2019)

<https://www.mdpi.com/2073-4409/8/5/481>

■ Construction of in vitro patient-derived tumor models to evaluate anticancer agents and cancer immunotherapy. Takahashi et al., *Oncology Letters*. 21: 406 (2021)

<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2021.12667>

文献

実験医学別冊 「患者由来がんモデルを用いたがん研究実践ガイド CDX・スフェロイド・オルガノイド・PDX/PDOX を網羅 臨床検体の取り扱い指針から樹立プロトコールと入手法まで」佐々木博己／編、羊土社 ISBN 978-4-7581-2242-9 (2019)

福島 PDO®を用いた抗がん剤の評価、比嘉亜里砂、高木基樹、P.124-131

<https://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/book/9784758122429/index.html>

以上