

**がん組織由来培養細胞
(F-PDO) を用いた
抗がん剤の評価Ver.9**

がん組織由来培養細胞(F-PDO)を用いた 抗がん剤の評価

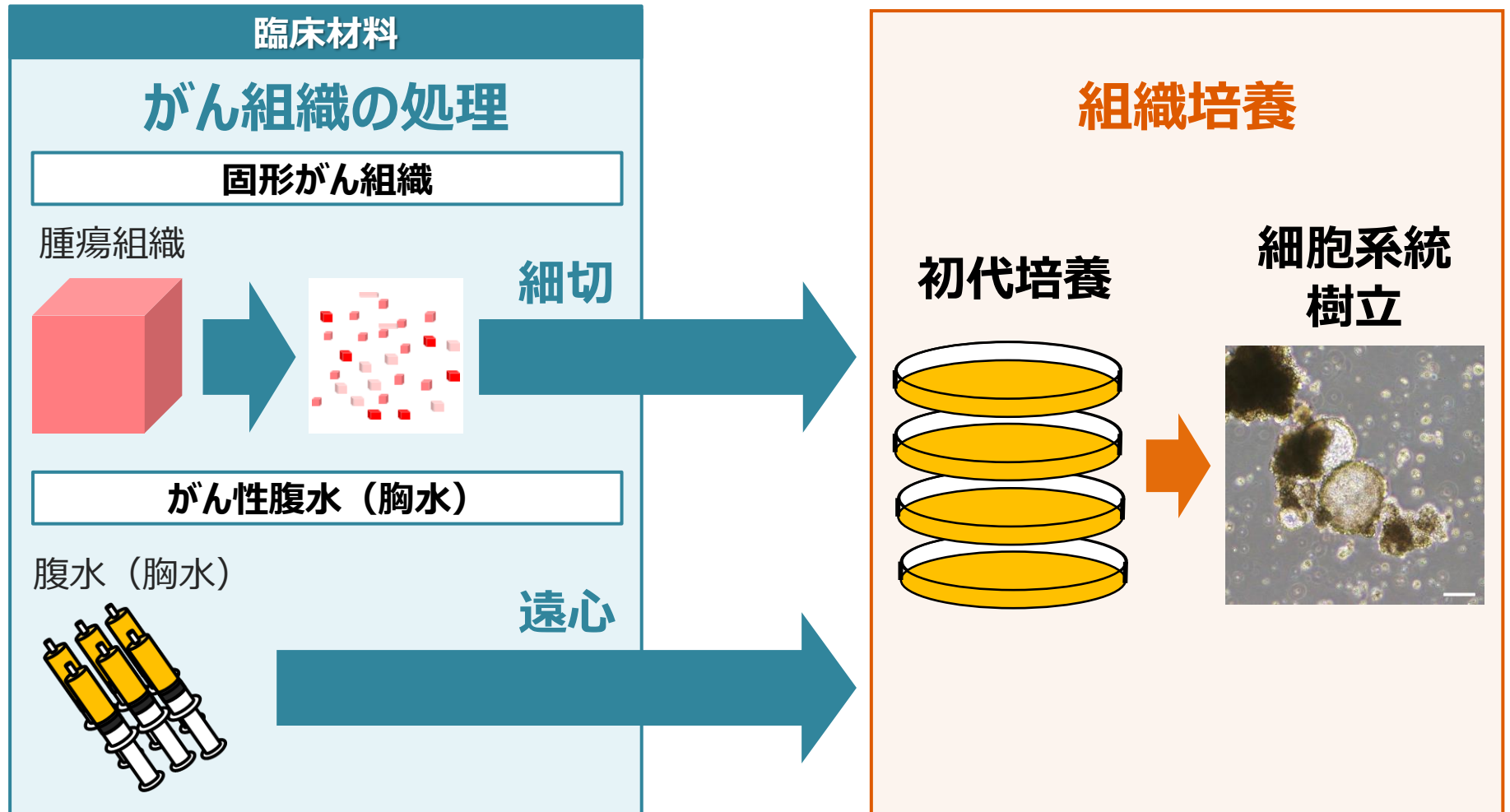
- F-PDOとは
- F-PDOを用いたアッセイ系の構築
- F-PDOの抗がん剤感受性プロファイリング
 - ・ 化学療法剤への感受性
 - ・ 分子標的薬への感受性
 - ・ がん細胞株との感受性の違い
- F-PDOを用いた抗体医薬品の評価
 - ・ 抗体の細胞増殖阻害評価
 - ・ 抗体薬物複合体（ADC）の細胞増殖阻害評価
- F-PDOを用いた免疫反応の評価
 - ・ 免疫細胞を用いたがん細胞への傷害活性の評価
 - ・ 抗体依存性細胞傷害活性(ADCC活性)の評価
 - ・ 免疫チェックポイント阻害剤の評価
 - ・ 二重特異性抗体の評価
- F-PDOを用いたアッセイの展開
 - ・ 遺伝子改変F-PDO
 - ・ F-PDOを用いた動物モデル

F-PDO: Patient-Derived tumor Organoid

とは

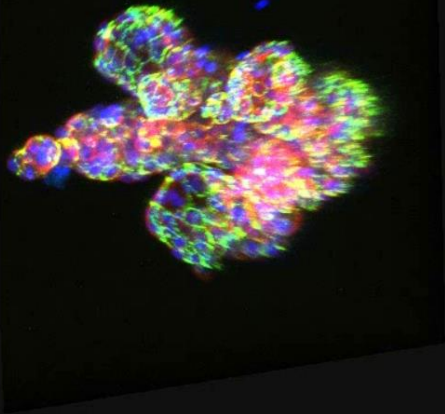
F-PDO作製

初代培養により浮遊細胞を作成

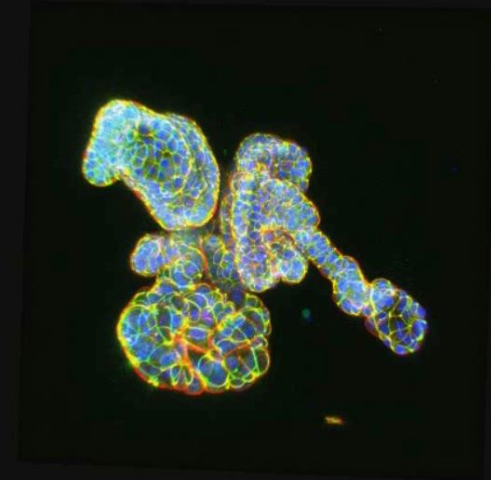


免疫染色を用いた形態的解析

RLUN14: 上皮内腺がん
細気管支肺胞上皮がん



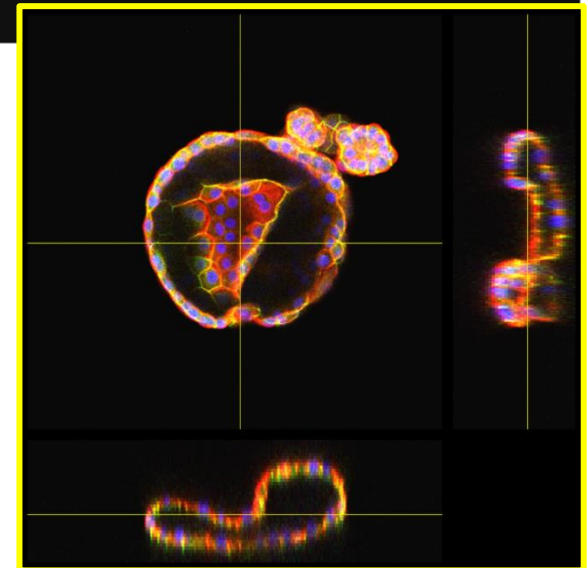
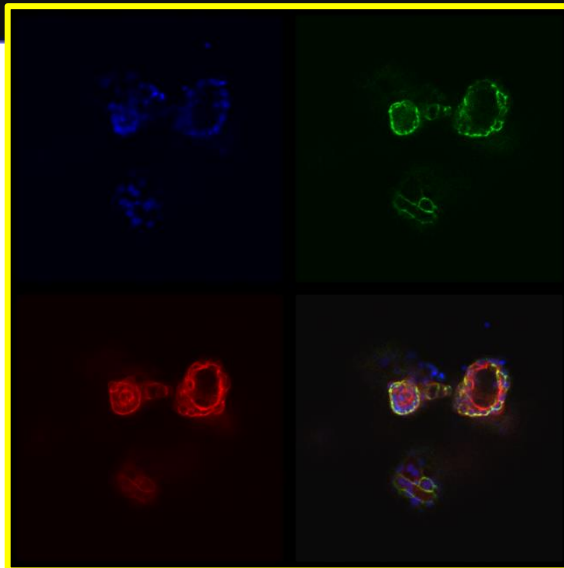
RLUN20



DAPI

actin

zo-1



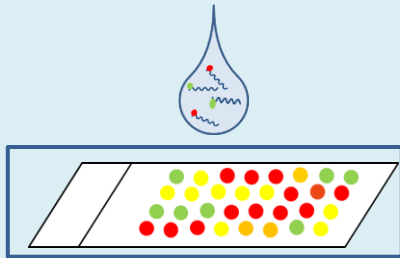
これらのデータはオリンパス株式会社との共同研究により取得しました。

F-PDOの評価

樹立した培養細胞の性質を様々な方法で評価

解析

遺伝子発現

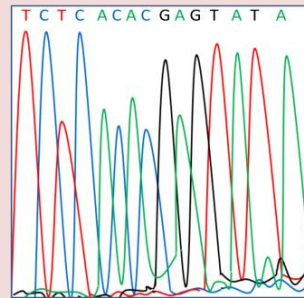


遺伝子発現プロファイル



元のがん組織との比較

ゲノム

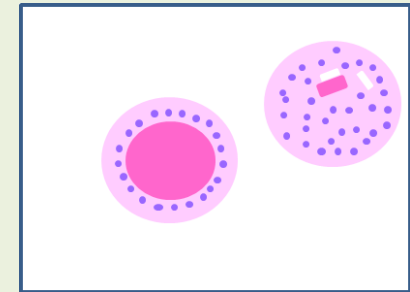


ゲノム解析



がん特異的遺伝子変異の同定

病理



形態観察



元のがん組織との比較

薬剤感受性

検査

微生物

病原体

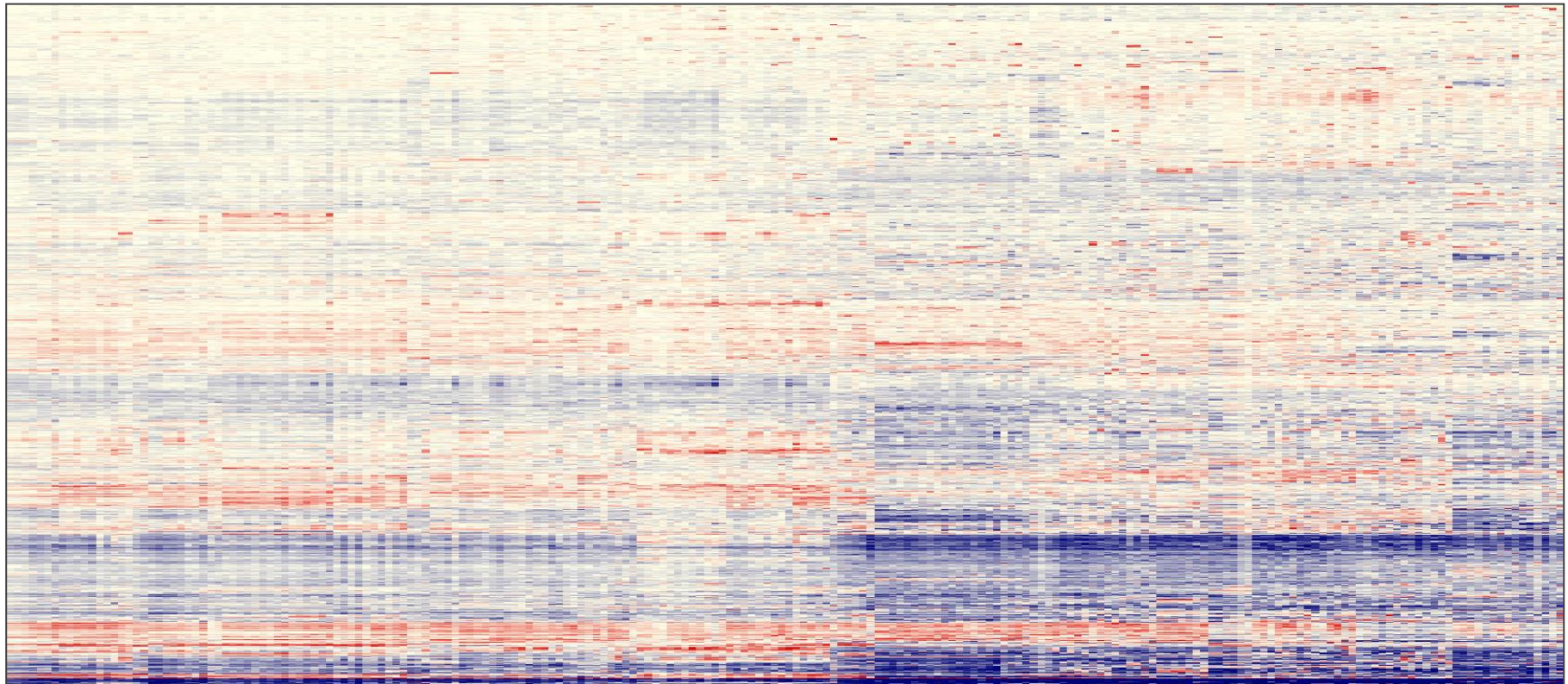
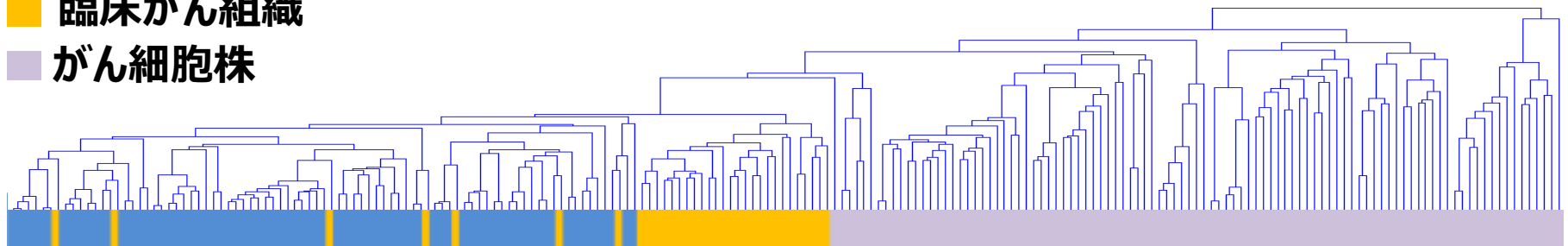
細胞の性質の客観的な「評価」が重要

F-PDOの遺伝子発現プロファイル

■ F-PDO

■ 臨床がん組織

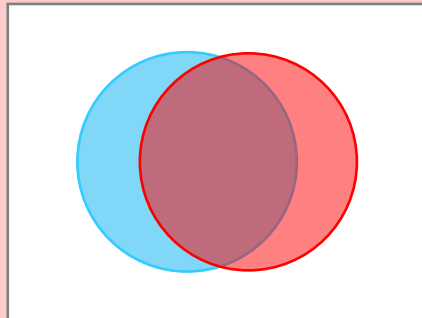
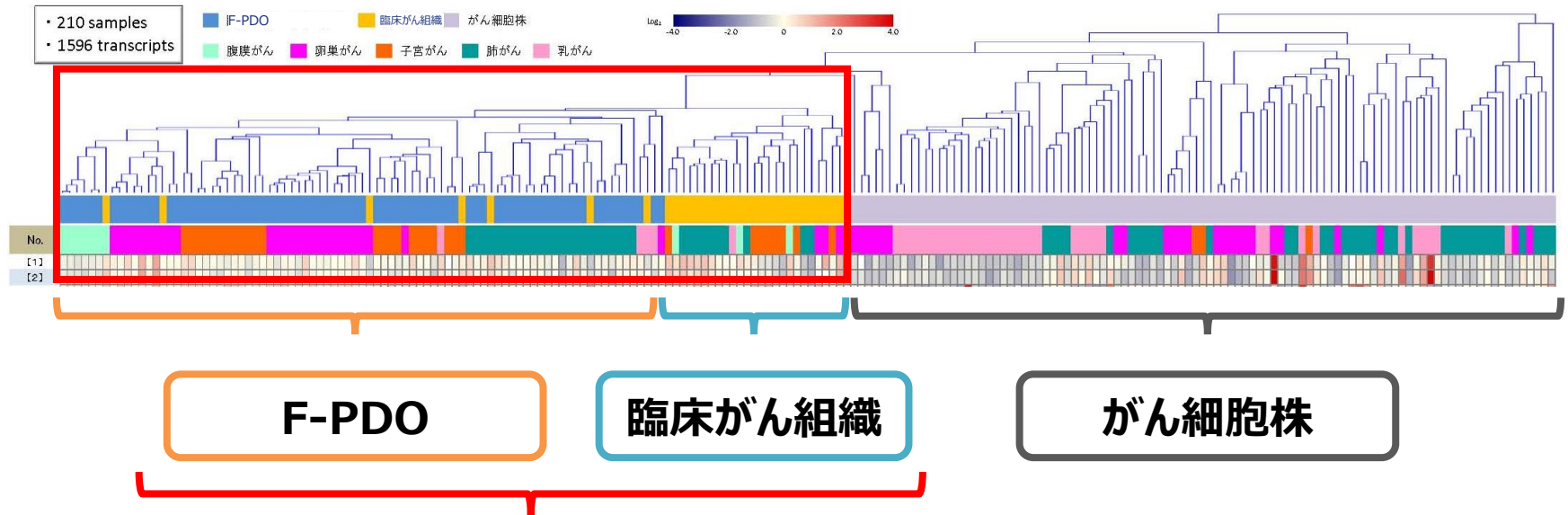
■ がん細胞株



$\log_2$ -4.0 -2.0 0 2.0 4.0

F-PDOの遺伝子発現解析

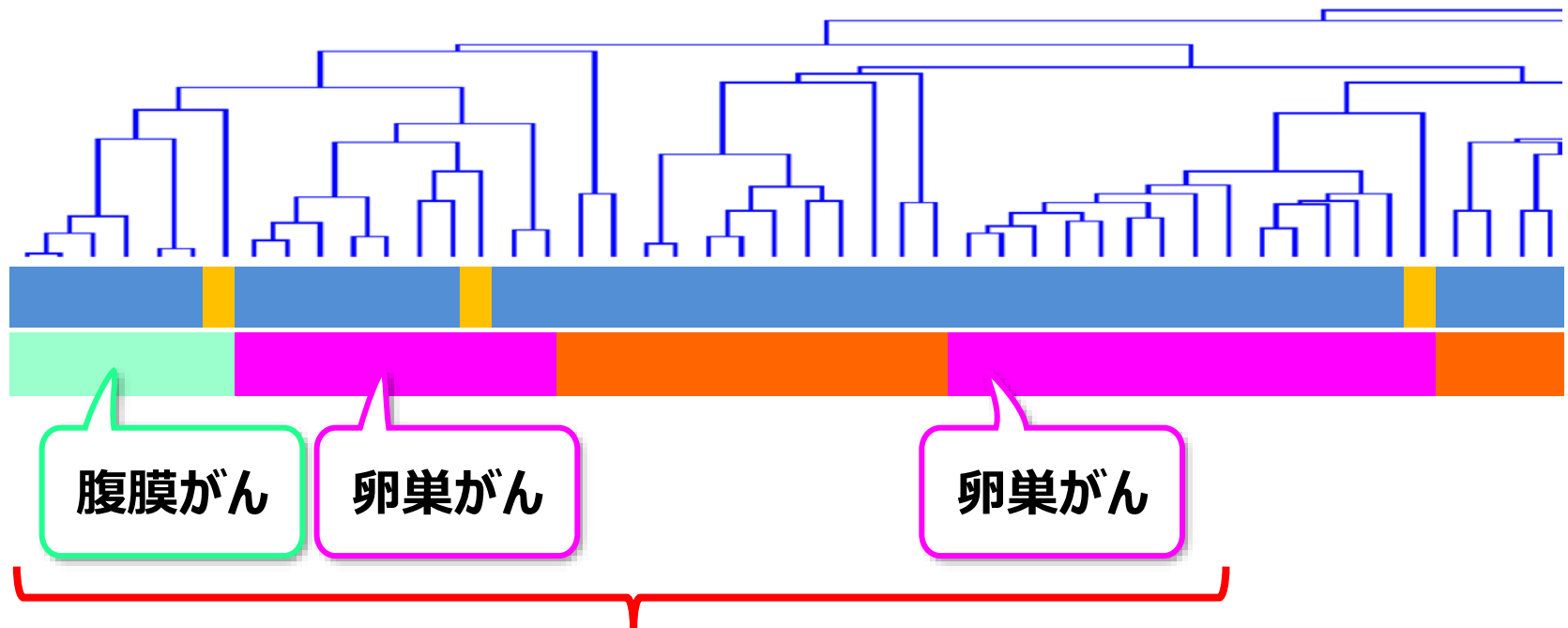
遺伝子発現プロファイルを指標としたF-PDO・臨床がん組織・がん細胞株の比較解析



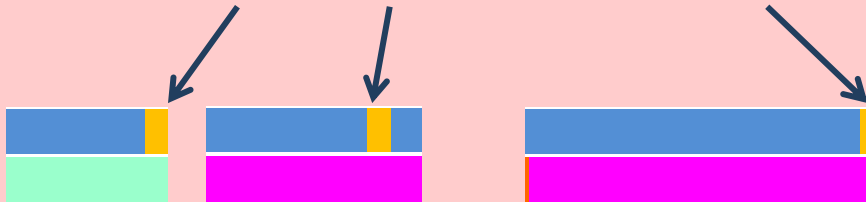
F-PDOは同種組織由来のがん細胞株ではなく、**元の臨床組織と同じグループ**に分類された。

F-PDOは元のヒトがん組織と遺伝子発現プロファイルが近い。

F-PDOの遺伝子発現解析



元となったヒトがん組織



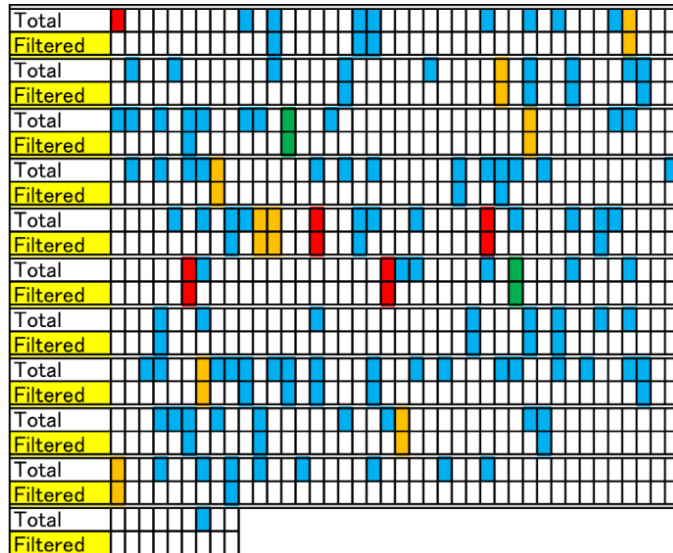
F-PDOは元のヒトがん組織と

プロフィールが近い

F-PDOのゲノム解析

肺がん組織由来培養細胞RLUN16 (FMU#08841)

シングル解析

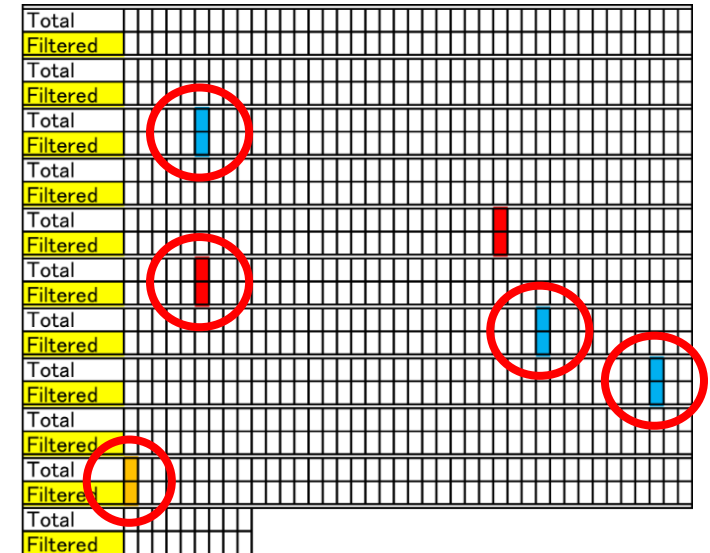


- : Missense
- : Non-Frameshift InDel
- : Frameshift InDel
- : Nonsense

正常検体
(FMU#08843)を
比較対照



ペア解析

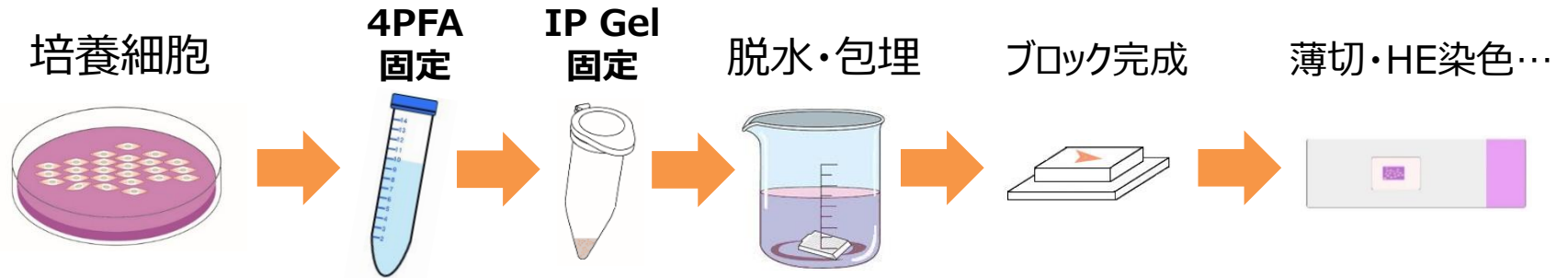


○: 「元のがん組織」検体でも
Somatic Mutationとして
検出

➡ 「元のがん組織」の
遺伝的特徴を有している

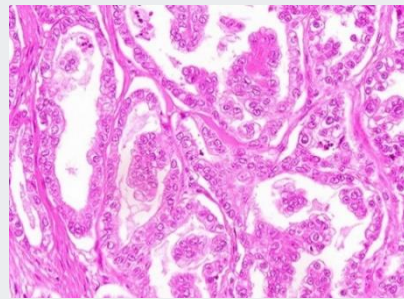
F-PDOの形態学的解析

培養細胞の標本作製

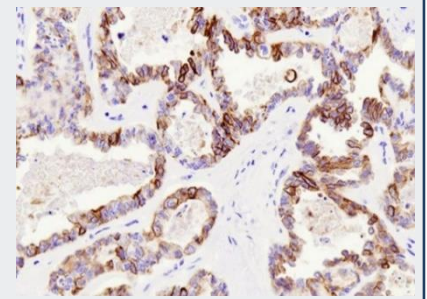


臨床由来組織との比較

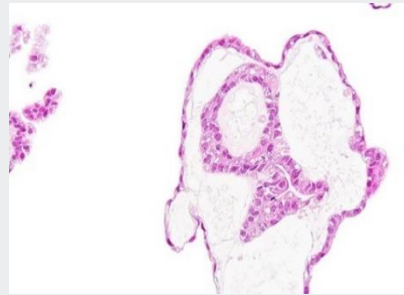
病理組織
HE染色



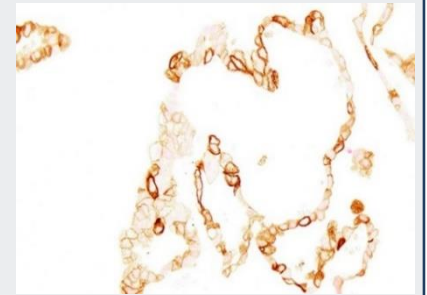
病理組織
免疫染色



培養細胞
HE染色

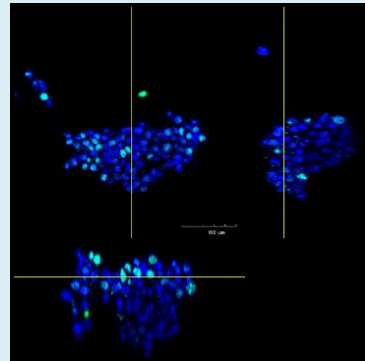


培養細胞
免疫染色

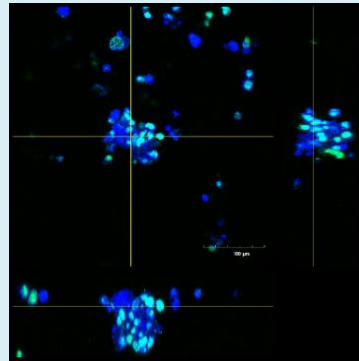


オリンパス NoviSightを用いた形態的解析

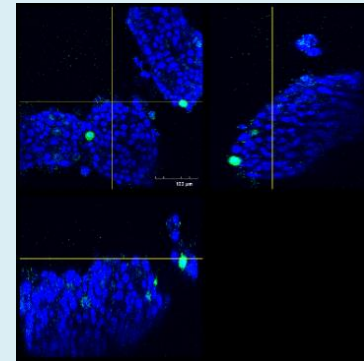
形態情報（細胞数、容積、Ki67細胞数、抗体医薬陽性容積）を算出



RLUN5

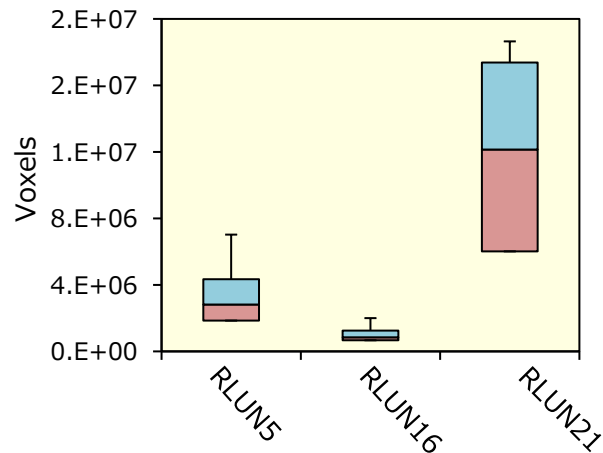


RLUN16

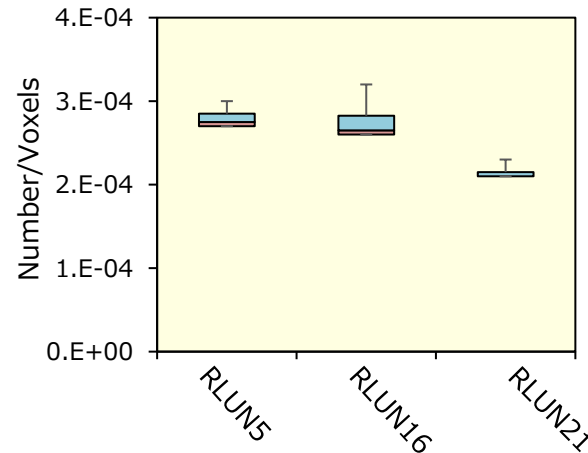


RLUN21

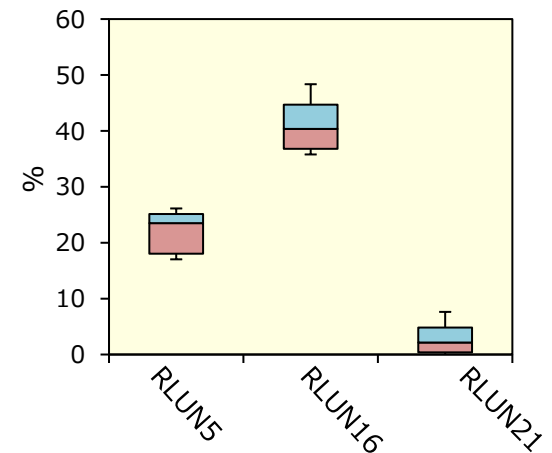
Cell volume



Cell density



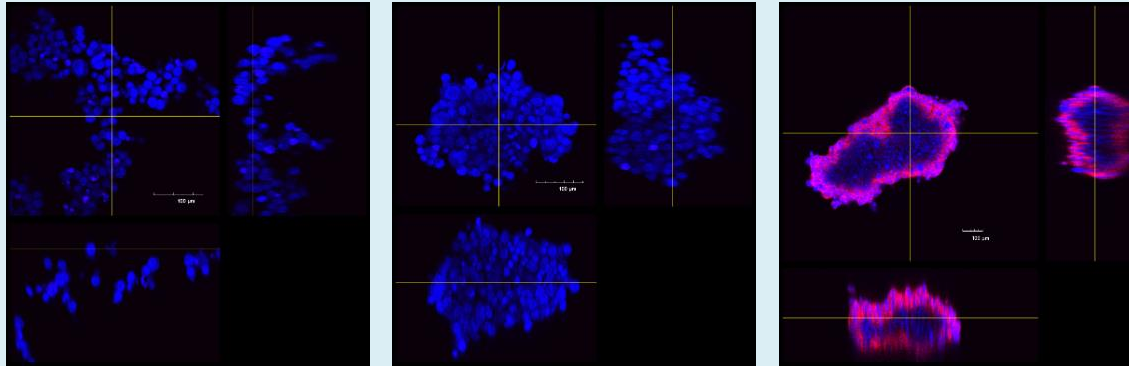
Ki67-Positive ratio



これらのデータはオリンパス株式会社との共同研究により取得しました。

オリンパス NoviSightを用いた形態的解析

形態情報（細胞数、容積、Ki67細胞数、抗体医薬陽性容積）を算出

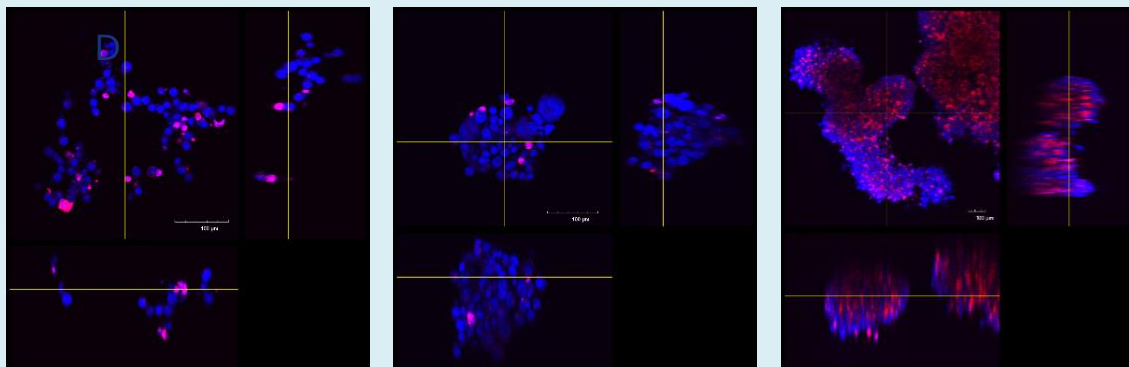


RLUN5

RLUN16

RLUN21

D

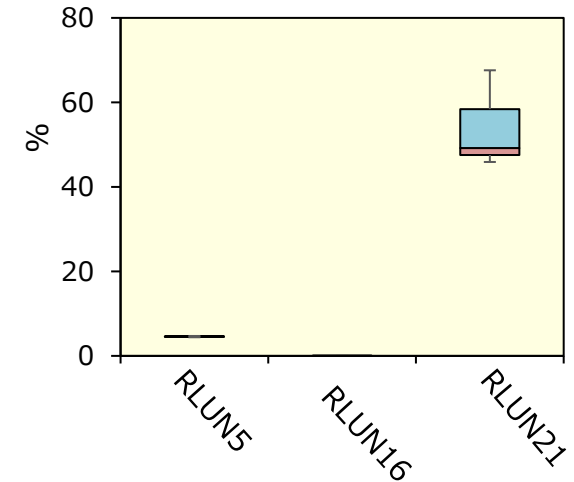


RLUN5

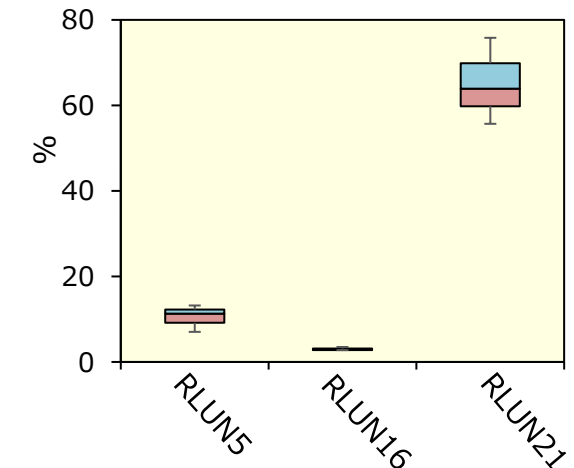
RLUN16

RLUN21

EGFR-Positive ratio



HER2-Positive ratio

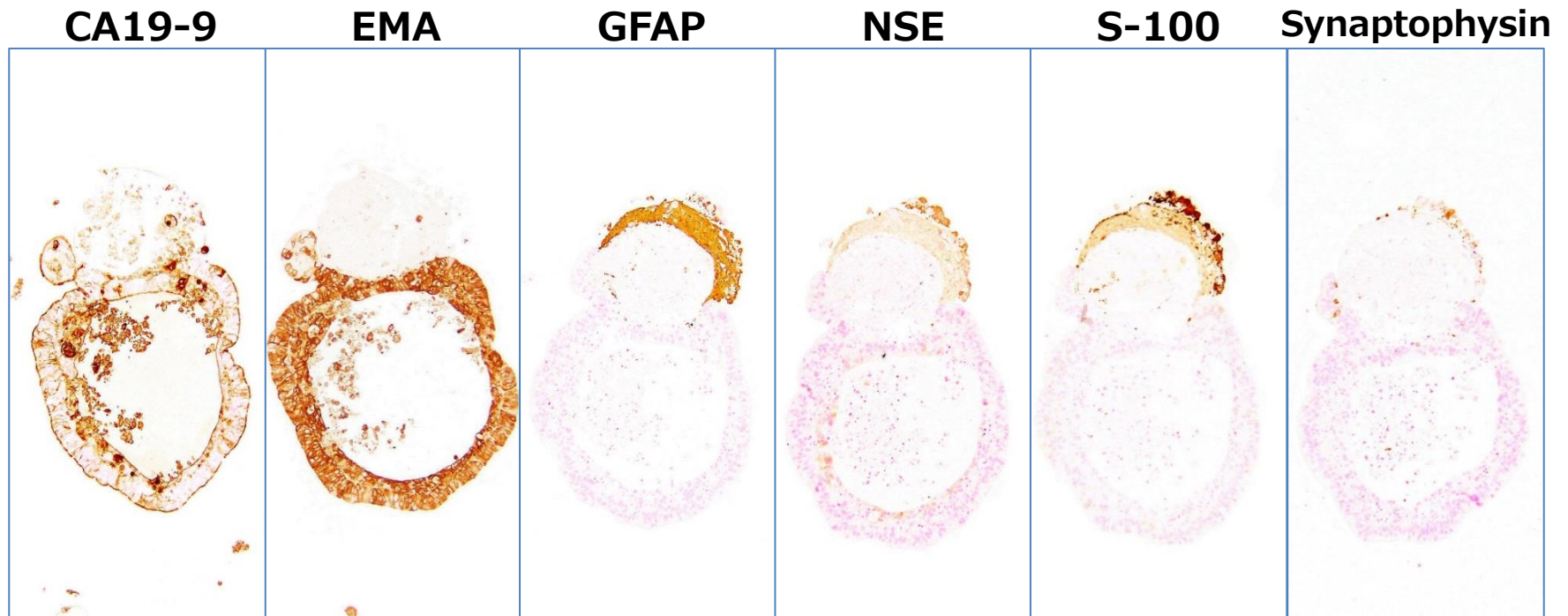


これらのデータはオリンパス株式会社との共同研究により取得しました。

構成細胞の多様性と不均一な局在

大腸がん脳転移巣由来多村細胞の免疫組織化学

転移性脳腫瘍 (m.大腸がん)



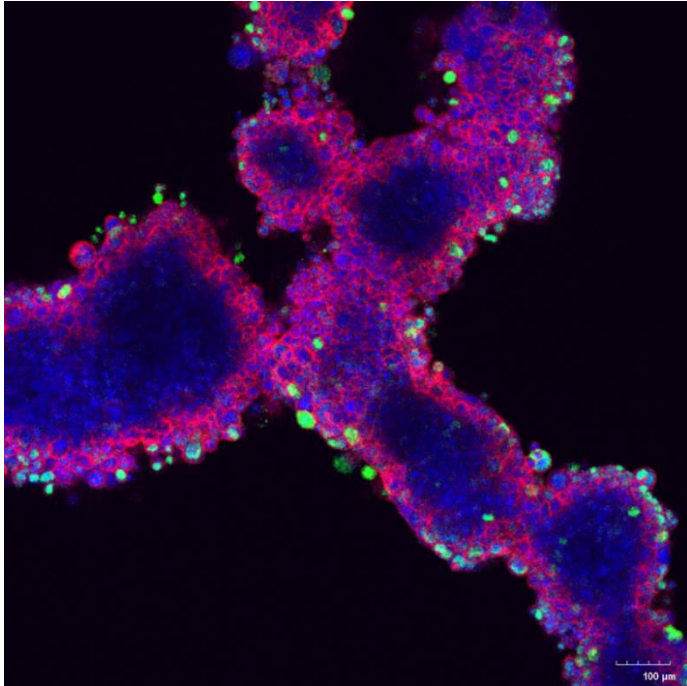
大腸がんマーカー

神経系マーカー

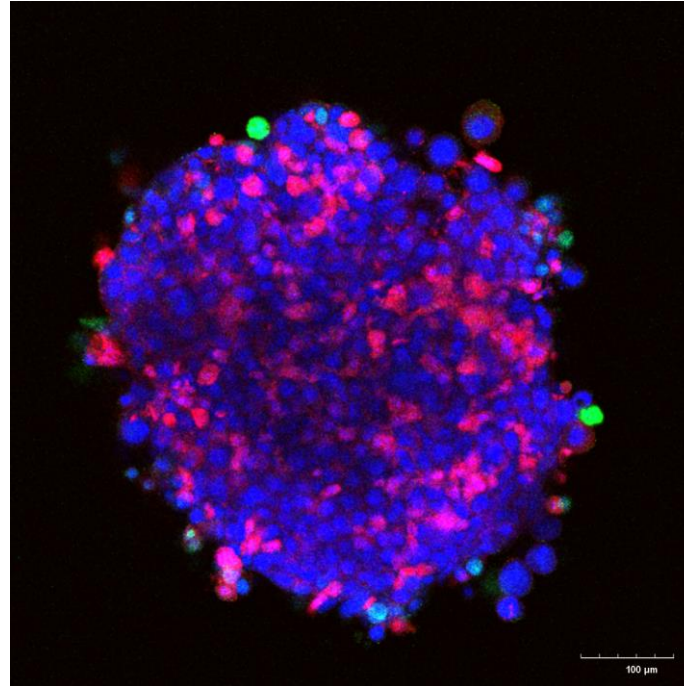
免疫染色を用いた形態的解析

肺がんRLUN21

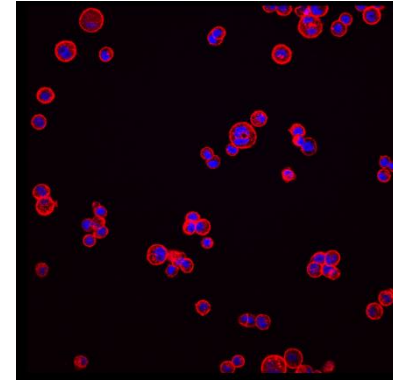
アービタックス



ハーセプチン



単層培養
ZR-75-30細胞



核

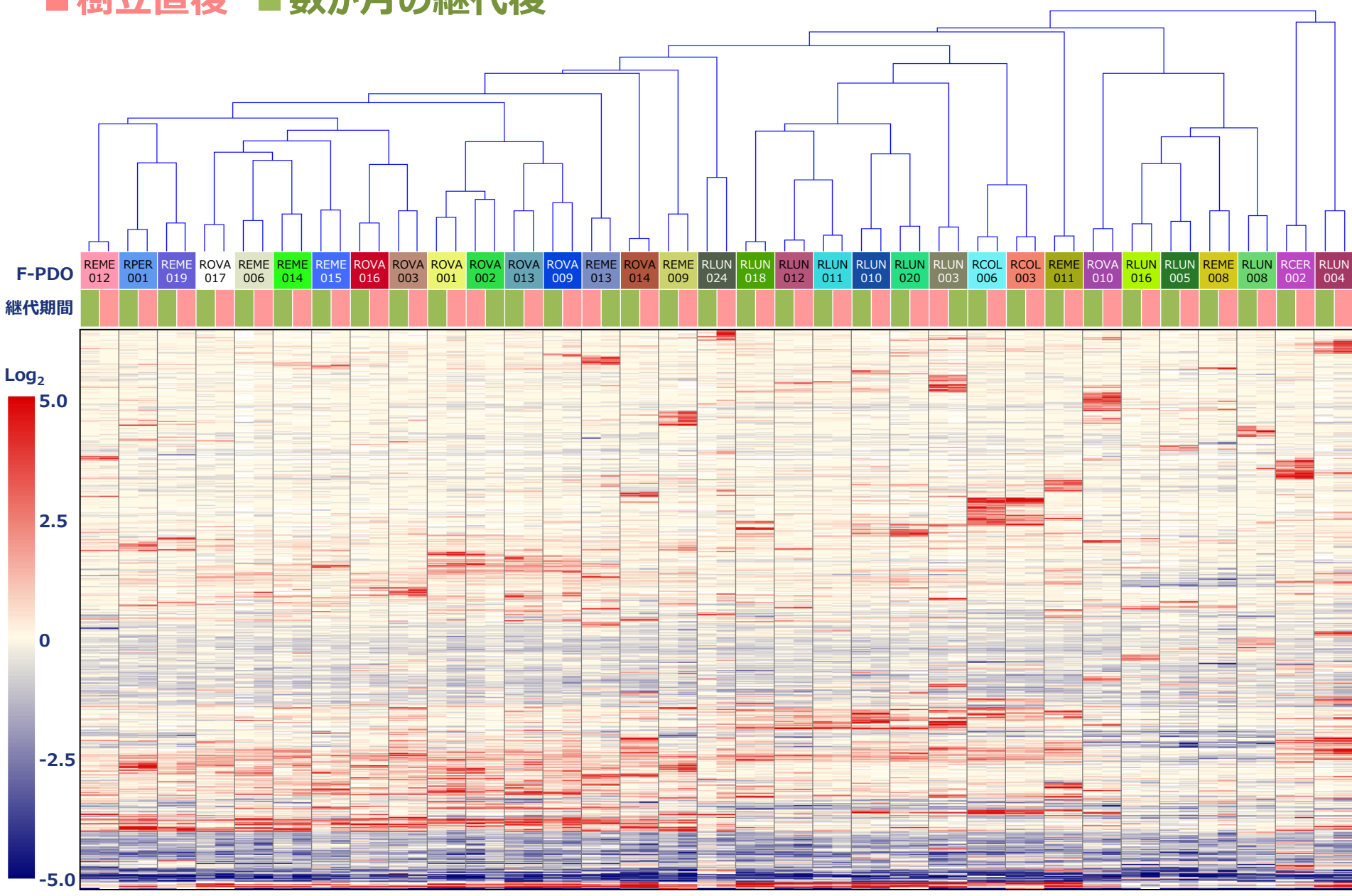
Ki67

抗体医薬

これらのデータはオリンパス株式会社との共同研究により取得しました。

継代によるF-PDOの遺伝子発現プロファイル比較

■ 樹立直後 ■ 数か月の継代後



豊富な臨床情報

Classification		Lung tumor					
Gender	☒ M ☐ F	Age	74	Sampling site	Lung	Metastasis	☒ Yes ☐ No
Organs	Lung, trachea and pleura ^L						
Diagnosis	☒ Lung tumors (Malignant epithelial tumor) ^{L2} ☒ Adenocarcinoma ^{L2.1} ☐ Squamous cell carcinoma ^{L2.2} ☐ Adenosquamous cell carcinoma ^{L2.3} ☐ Large cell carcinoma ^{L2.4} ☐ Small cell carcinoma ^{L2.5} ☐ Neuroendocrine tumor ^{L2.6} (☐ Carcinoid tumor ^{L2.6.1} ☐ Large cell neuroendocrine carcinoma (LCNEC) ^{L2.6}) ☐ Others (Malignant epithelial tumor) ^{L2.7} ☐ Carcinoma with pleomorphic, sarcomatoid or sarcomatous elements ^{L3} ☐ Pleomorphic carcinoma ^{L3.1} ☐ Spindle cell carcinoma ^{L3.2} ☐ Giant cell carcinoma ^{L3.3} ☐ Carcinosarcoma ^{L3.4} ☐ Pulmonary blastoma ^{L3.5} ☐ Tumor of Mesothelium ^{L4} ☐ Adenomatoid tumor ^{L4.1} ☐ Malignant mesothelioma ^{L4.2} ☐ Unclassified (Lung, Pleura) ^{L5}						
Position	Right lower leaf			Size	28×22 mm		
Staging	Primary tumor ☐ pT1a ☒ pT1b ☐ pT2a ☐ pT2b ☐ pT3 ☐ pT4 Regional lymph node ☐ pN0 ☐ pN1 ☒ pN2 ☐ pN3 Distant metastasis ☒ pM0 ☐ pM1 (☐ pM1a ☐ pM1b) Stage ☐ IA ☐ IB ☐ IIA ☐ IIB ☒ IIIA ☐ IIIB Differentiation ☒ G1 ☐ G2 ☐ G3 ☐ G4 ☐ GX						
Pathology & Surgery findings	Lymphatic invasion ☐ Yes ☒ No ☐ Unknown Lymph node metastasis ☒ Yes ☐ No ☐ Unknown Pleural seeding ☐ Yes ☒ No ☐ Unknown Pulmonary artery ☐ Yes ☐ No ☒ Unknown Pleural plaque ☒ Yes ☐ No ☐ Unknown Pleural invasion ☒ pI0 ☐ pI1 ☐ pI2 ☐ pI3 ☐ Unknown Intrapulmonary metastasis ☒ pm0 ☐ pm1 ☐ pm2 ☐ pm3 ☐ Unknown Vascular invasion ☐ Yes ☒ No ☐ Unknown Bronchorrhaphy ☐ Yes ☒ No ☐ Unknown Pleural effusion ☐ Yes ☒ No ☐ Unknown Washing cytology ☐ Yes ☒ No ☐ Unknown Pulmonary vein ☐ Yes ☐ No ☒ Unknown						
Immunohistochemical staining	MIB1 ☐ Yes ☐ No ☒ Not yet Napsin ☐ Yes ☐ No ☒ Not yet PgR ☐ Yes ☐ No ☒ Not yet TTF-1 ☐ Yes ☐ No ☒ Not yet ER ☐ Yes ☐ No ☒ Not yet						
Genetic diagnosis	EGFR ☐ Exon19 del ☐ G719X ☐ S768I ☐ L858R ☐ L861Q ☒ Exon20 int ☒ T790M ☐ Other () ☐ wild type ☐ Not yet ALK ☐ Yes ☐ No ☒ Not yet PD-L1 ☐ Yes ☐ No ☒ Not yet						
Medical history	☒ Diabetes ☒ Coronary artery disease ☐ Hypertonia ☐ Cerebral infarction ☐ Other ()						
Radiation therapy	☐ Yes ☒ No						
Chemotherapy	☐ Amrubicin ☐ Bevacizumab ☐ Carboplatin ☐ Cisplatin ☐ Docetaxel ☐ Erlotinib ☐ Etoposide ☐ Gefitinib ☐ Gemcitabine ☐ Irinotecan ☐ Nedaplatin ☐ Osimertinib ☐ Paclitaxel ☐ Pemetrexed ☐ Tegafur-Gimeracil-Oteracil ☐ Vinorelbine ☐ Other ()						
Smoking	☐ Yes (present) ☒ Yes (past) ☐ No						
Drinking	☒ Yes (practice) ☐ Yes (opportunity) ☐ No						
Notes							

F-PDO

肺がん

RLUN4

RLUN10

卵巣がん

ROVA3

RLUN21

子宮体がん

REME9

ROVA7

子宮頸がん

ROVA13

RCER2

REME11

F-PDOのラインナップ

F-PDOの樹立の状況（2025年3月現在）

臓 器	樹立済み数
肺がん	18
卵巣がん	10
子宮がん	10
消化器がん	11
骨・軟部腫瘍	4
腎がん	2
脳腫瘍	2
乳がん	2
腹膜がん	1
リンパ性白血病	2

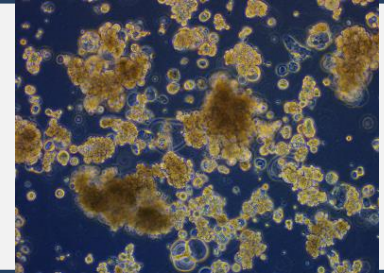
合計：62系統

他のPDOとの違い

F-PDOの特徴

F-PDO

- がん組織の**酵素処理不要**、浮遊培養、ヘテロな細胞塊
- 形態学解析、遺伝子発現解析、ゲノム解析で特徴を確認
- 安定したアッセイ系を確立



樹立方法、培養方法、アッセイ方法が大きく違う

A社

- 免疫不全マウスで増殖させたがん組織（PDX）から樹立
- がん組織を**酵素処理**で小片化
- 細胞塊の大きさが多様でアッセイデータが振れる
- 各種解析データが限定的

B社

- マトリゲルで細胞を培養
- がん組織を**酵素処理**で小片化
- 各種解析データが限定的

C社

- 樹立方法は似ているようだ？
- 有限増殖？
- 系統数が限定的
- 網羅的遺伝子発現解析データがない

F-PDOと他のオルガノイドの違い

F-PDO

- 日本人由来の系統が豊富
- 遺伝子情報等が充実
- 既存抗がん剤感受性データ
- 臨床情報が豊富
- 細胞ごとにアッセイ系をカスタマイズ
- 培養形態は主に浮遊培養
- コンプリート培地の販売あり
- オルガノイドの形態・サイズが不均一
- 起眠後の回復に時間を要する
- 6カ月培養後も元組織の遺伝子発現・形態的特徴を維持していること

➤ コスト
➤ 作業性
➤ 付帯情報

]: **F-PDO** > 他のがんオルガノイド

F-PDOを用いたアッセイ系の構築

F-PDO

肺がん

RLUN4

RLUN10

卵巣がん

ROVA3

RLUN21

子宮体がん

REME9

ROVA7

子宮頸がん

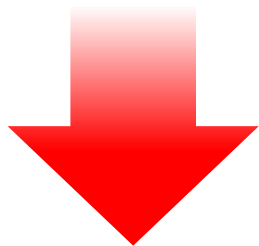
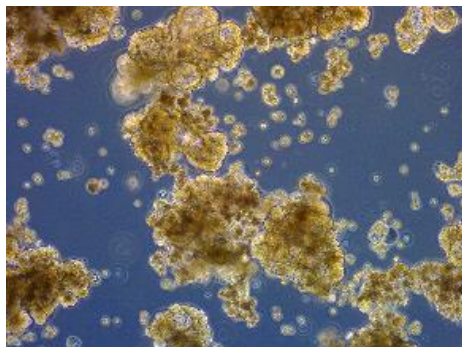
ROVA13

RCER2

REME11

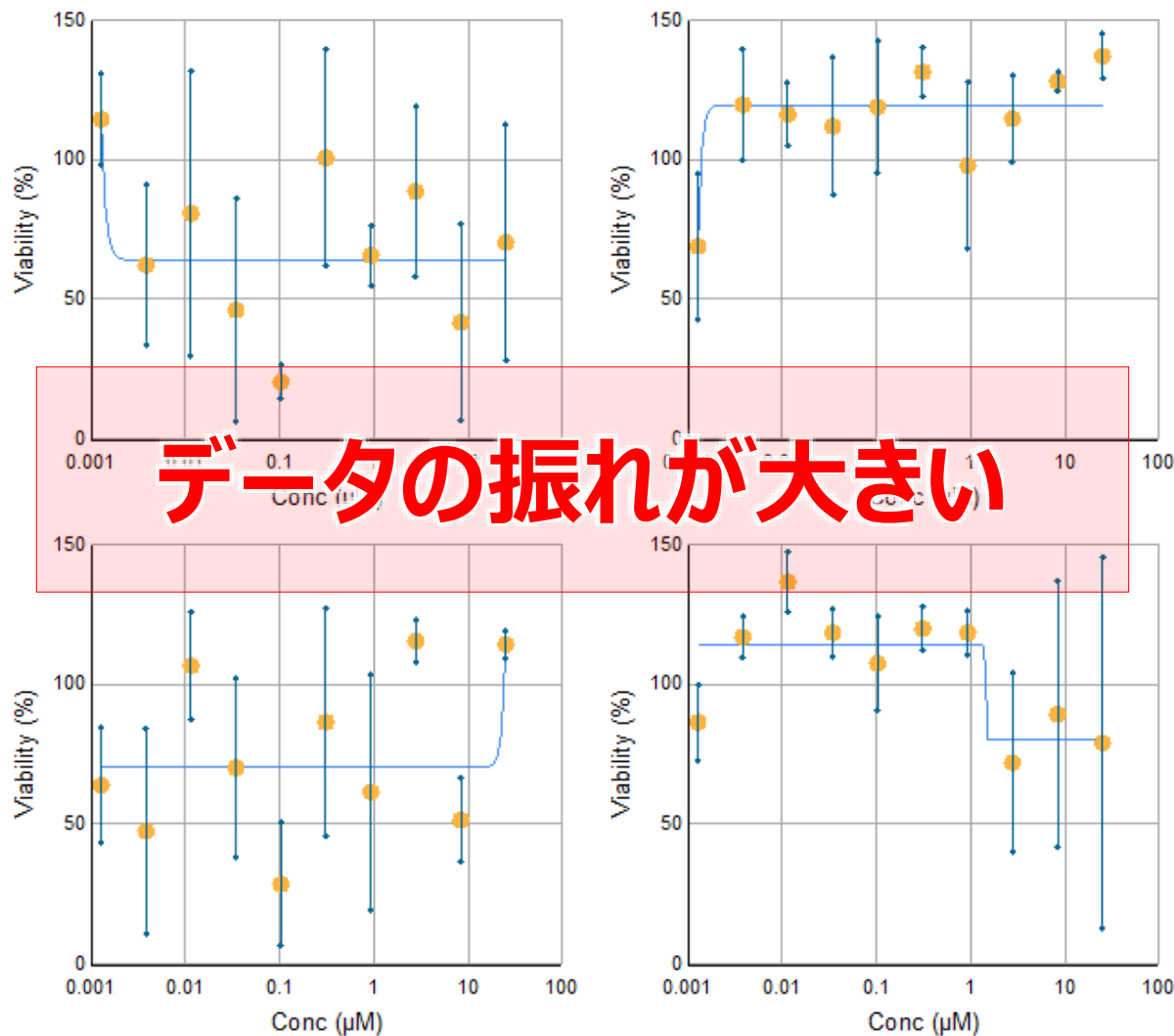
F-PDOのデータの振れ

子宮体がん

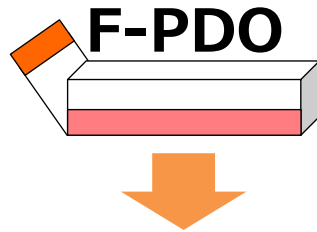


細胞を均一に
播種する
必要がある

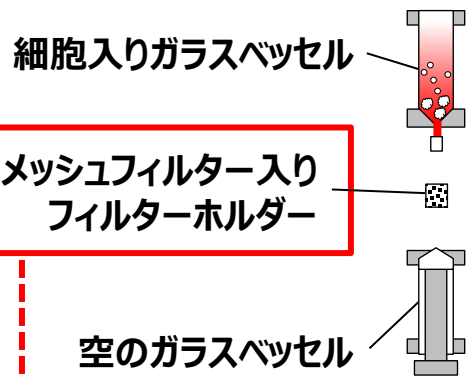
解析例・・・384-well plateに播種



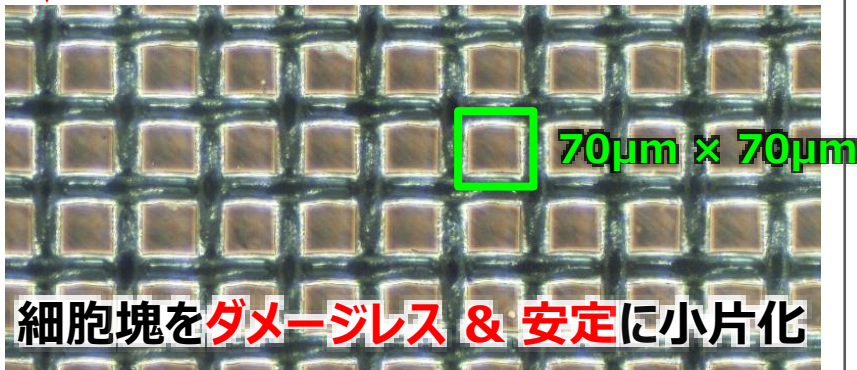
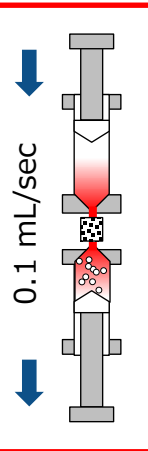
ジェイテックコーポレーション CellPet FT



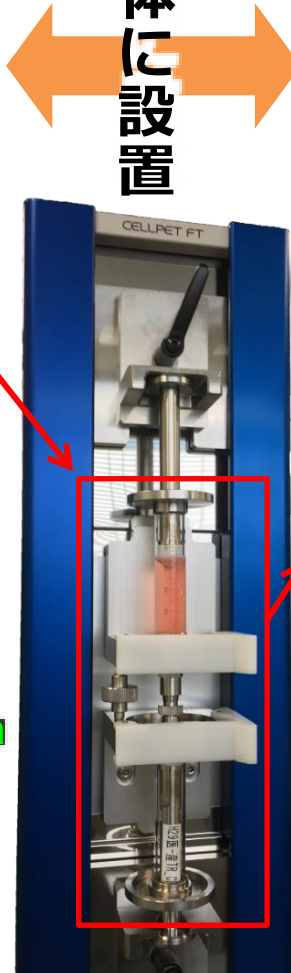
小片化装置



連結



本体に設置

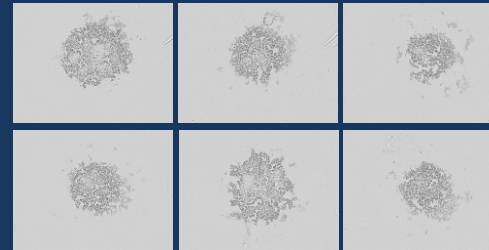
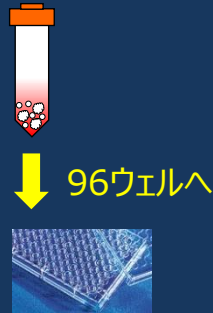
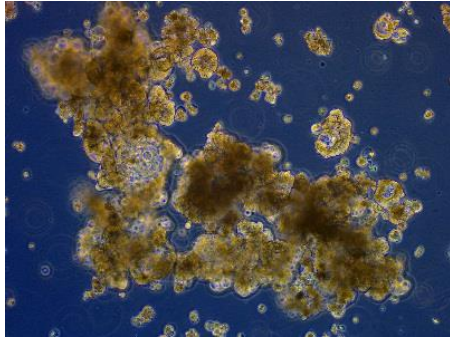


0.1 mL/sec

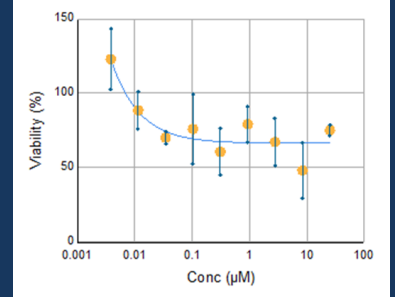
データの振れが大きかったREME11

REME11

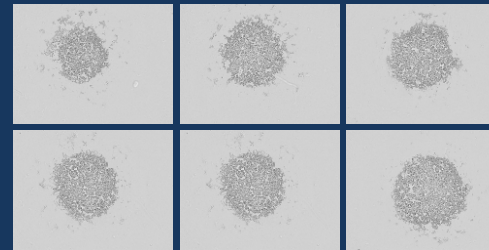
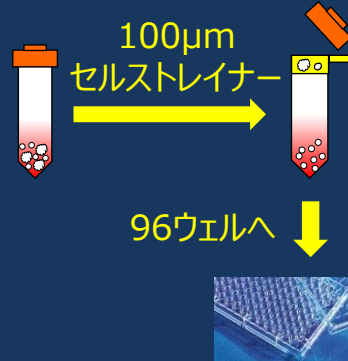
子宮体がん：浮遊



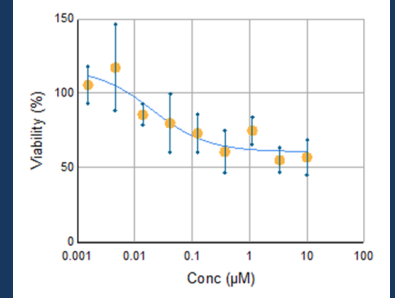
CV値 (0 h) 試験: 34.9%
増殖率: 1.88



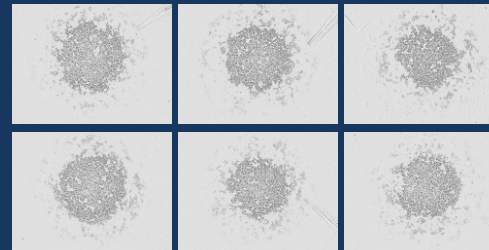
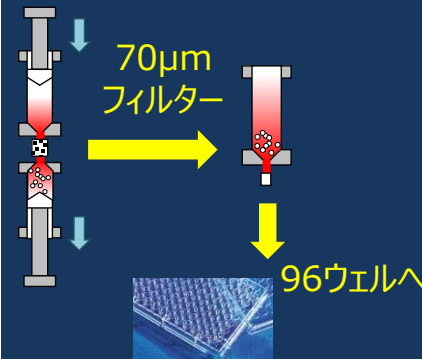
細胞増殖阻害試験
(パクリタキセル)



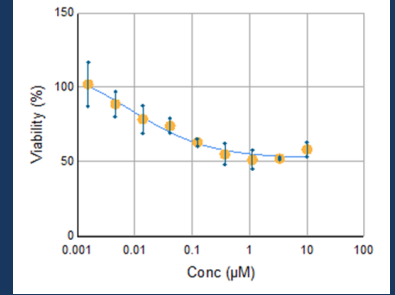
CV値 (0 h) 試験: 27.0%
増殖率: 3.81



細胞増殖阻害試験
(パクリタキセル)

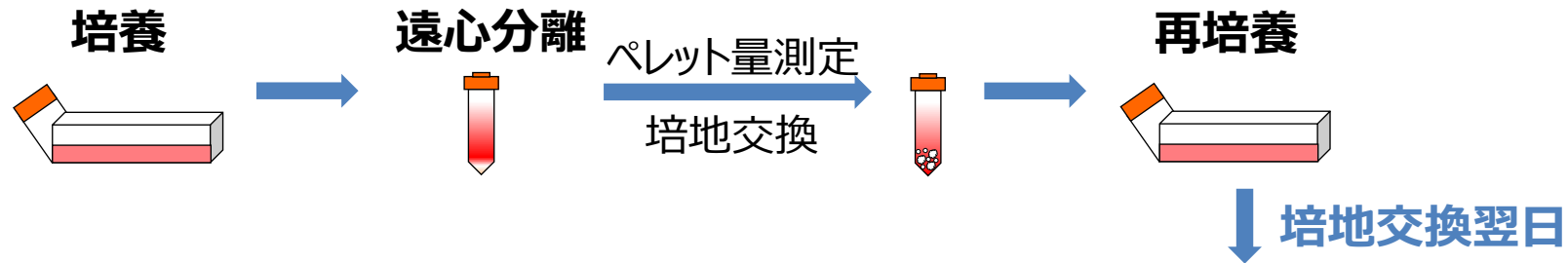


CV値 (0 h) 試験: 14.4%
増殖率: 3.29

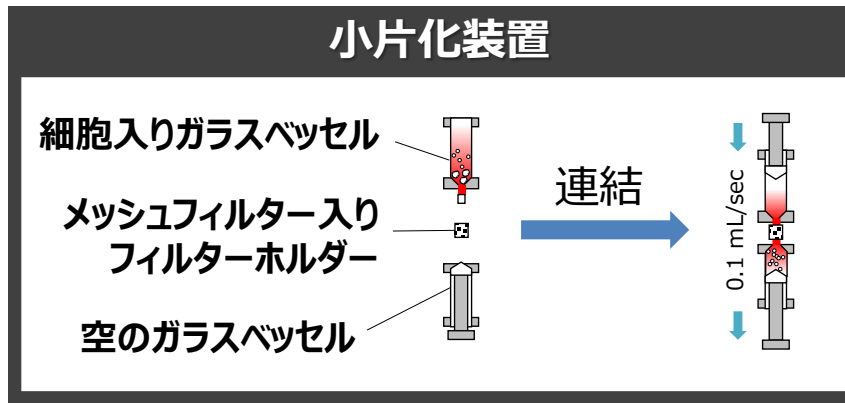


細胞増殖阻害試験
(パクリタキセル)

F-PDOのマルチウェルプレートアッセイ



本体に設置



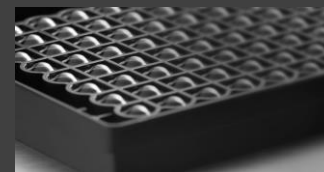
384ウェル
スフェロイドプレート
に播種

播種24 h後
化合物添加
(0.1% DMSO)

6日間
培養

発光値
(ATP量)
測定

MultiDrop Combi



Echo



細胞増殖阻害試験 (96-well plate)

DAY 1 細胞播種

- アッセイプレート: 96ウェルプレート
- メーカー: コーニング スフェロイドマイクロプレート

37℃, 24時間培養 (CO₂インキュベーター)

DAY 2 被験物質添加

- N数: 3
 - 溶媒: DMSO
 - 薬剤濃度: 公比 3, 8濃度
 - 添加量: 0.15 μ L [溶媒濃度 0.1% (vol. %)]
- * 公比, 処理濃度範囲はご希望に応じます.

37℃培養

144時間 被験物質処理

DAY 8 生細胞由来ATP量の測定

- 測定試薬: プロメガ CellTiter-Glo 3D

がん細胞に対する化合物の評価

IC₅₀ (50% 阻害濃度)

AUC (area under the curve; カーブ下面積)

EC₅₀ (50% 効果濃度)

オプション: GI₅₀ (細胞増殖50%阻害濃度)

明視野像, アポトーシス検出など



MultiDrop Combi



Cytomat Incubator

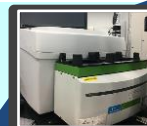
ADS-384-8



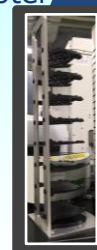
Cytomat Incubator



Enspire



Hotel



Orbitor RS



Hotel



Bioshake



Multidrop Combi

細胞増殖阻害試験 (384-well plate)

DAY 1 細胞播種

- アッセイプレート: 384ウェルプレート
- メーカー: コーニング スフェロイドマイクロプレート

37℃, 24時間培養 (CO₂インキュベーター)

Cytomat
Incubator



MultiDrop Combi

DAY 2 被験物質添加

- N数: 3 ● 溶媒: DMSO
- 薬剤濃度: 公比 3, 9濃度
* 公比, 処理濃度範囲はご希望に応じます.
- 添加量: 40 nL [溶媒濃度 0.1% (vol. %)]

37℃培養

144時間 被験物質処理

Echo555



DAY 8 生細胞由来ATP量の測定

- 測定試薬: プロメガ CellTiter-Glo 3D

がん細胞に対する化合物の評価

IC₅₀ (50% 阻害濃度)

AUC (area under the curve; カーブ下面積)

EC₅₀ (50% 効果濃度)

オプション: GI₅₀ (細胞増殖50%阻害濃度)

明視野像, アポトーシス検出など

Enspire

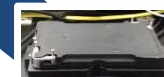


Cytomat 10

Cytomat
Incubator



Orbitor RS



Bioshake



Hotel



Multidrop Combi

細胞増殖阻害試験の基準

	F-PDO
培養後測定時の 溶媒(DMSO)コントロールの CV値	F-PDO: 384ウェルプレート: 20%未満 96ウェルプレート: 15%未満 F-PDO: 384ウェルプレート: 20%未満
アッセイ時の細胞増殖	F-PDO: 同条件でのアッセイ歴あり: 過去の倍加時間と比較して, ± 30% 以内 F-PDX: 細胞増殖 1 以上 (培養後測定時に細胞死を 起こしていない)

F-PDOの抗がん剤感受性プロファイリング

がん細胞株との感受性の違い

Panel assay using F-PDOs

Lung 11 lines

RLUN5, RLUN10, RLUN12, RLUN14, RLUN15, RLUN16,
RLUN17, RLUN18, RLUN21, RLUN22, RLUN23

Uterine 6 lines

REME9, REME11, REME12, REME13, REME16, REME17

Cervical 1 lines

RCER3

Ovary 3 lines

ROVA2, ROVA9, ROVA14

Peritoneal 1 lines

RPER1

Colon 4 lines

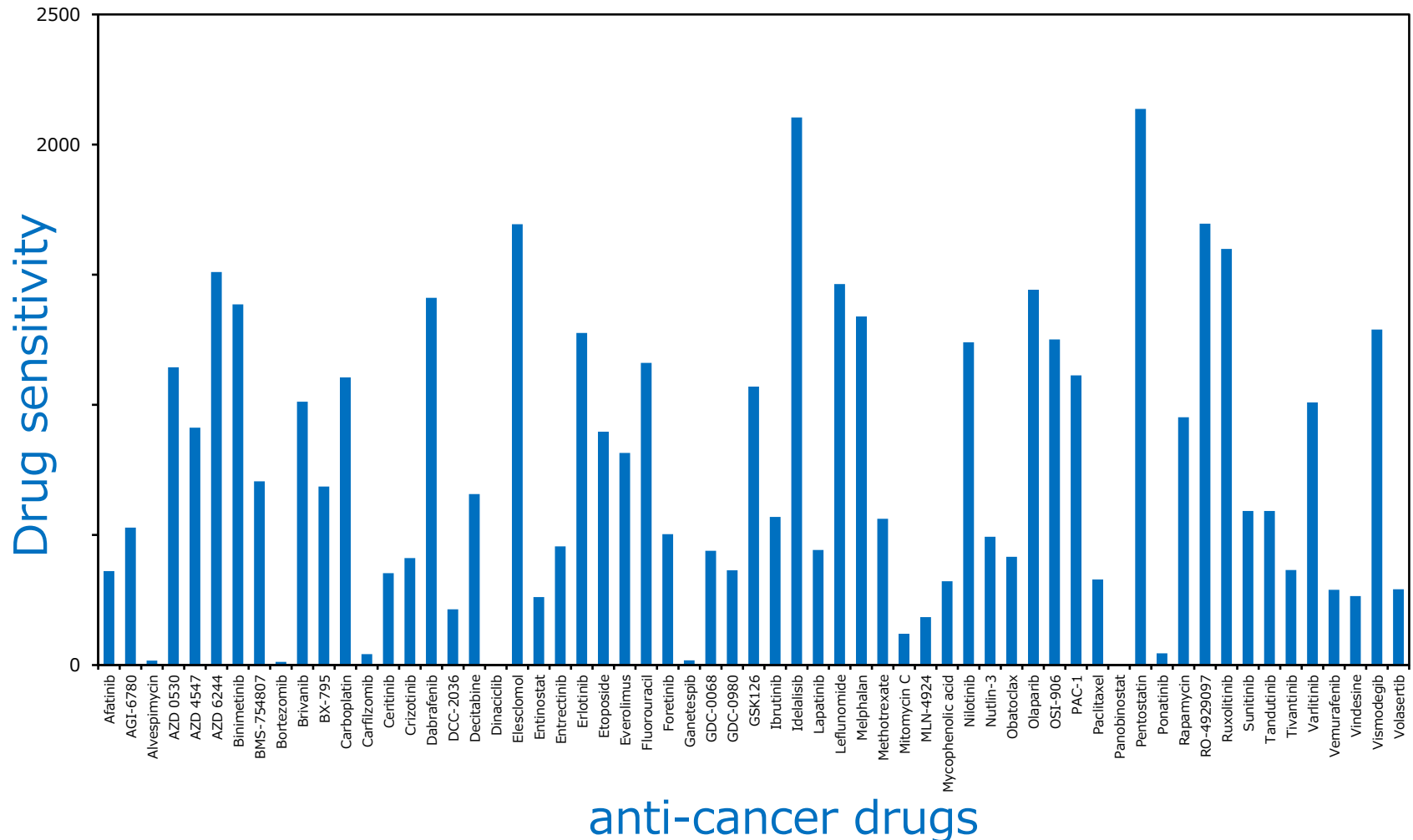
RCOL3, RCOL4, RCOL5, RCOL6

► 74 anti-cancer drugs

化合物名				
Afatinib	Carfilzomib	Foretinib	Nilotinib	RO-4929097
AGI-6780	Ceritinib	Ganetespib	Nutlin-3	Ruxolitinib
Alvespimycin	Crizotinib	GDC-0068	NVP-BKM120	Sunitinib
Aminoglutethimide	Dabrafenib	GDC-0980	Obatoclax	Tacrolimus
AZD 0530	DCC-2036	GSK126	Olaparib	Tamoxifen
AZD 4547	Decitabine	Ibrutinib	OSI-906	Tandutinib
AZD 6244	Dexamethasone	Idelalisib	PAC-1	Temozolomide
Belinostat	Dinaciclib	Lapatinib	Paclitaxel	Tivantinib
Bicalutamide	Elesclomol	Leflunomide	Panobinostat	Tubastatin A
Binimetinib	Entinostat	Lenalidomide	PCI-34051	Varlitinib
BMS-754807	Entrectinib	Melphalan	Pentostatin	Vemurafenib
Bortezomib	Erlotinib	Methotrexate	PHA-793887	Vindesine
Brivanib	Etoposide	Mitomycin C	Ponatinib	Vismodegib
BX-795	Everolimus	MLN-4924	Rapamycin	Volasertib
Carboplatin	Fluorouracil	Mycophenolic acid	Regorafenib	

Panel assay using F-PDOs

Anti-cancer drug profile against ovarian F-PDO (ROVA9)

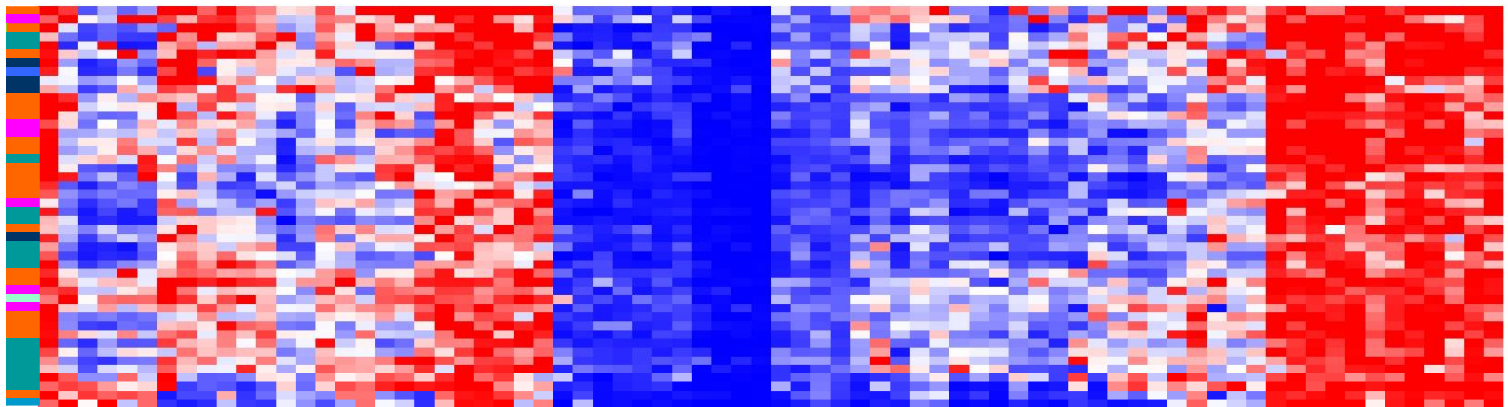


F-PDOとがん細胞株のクラスタ解析

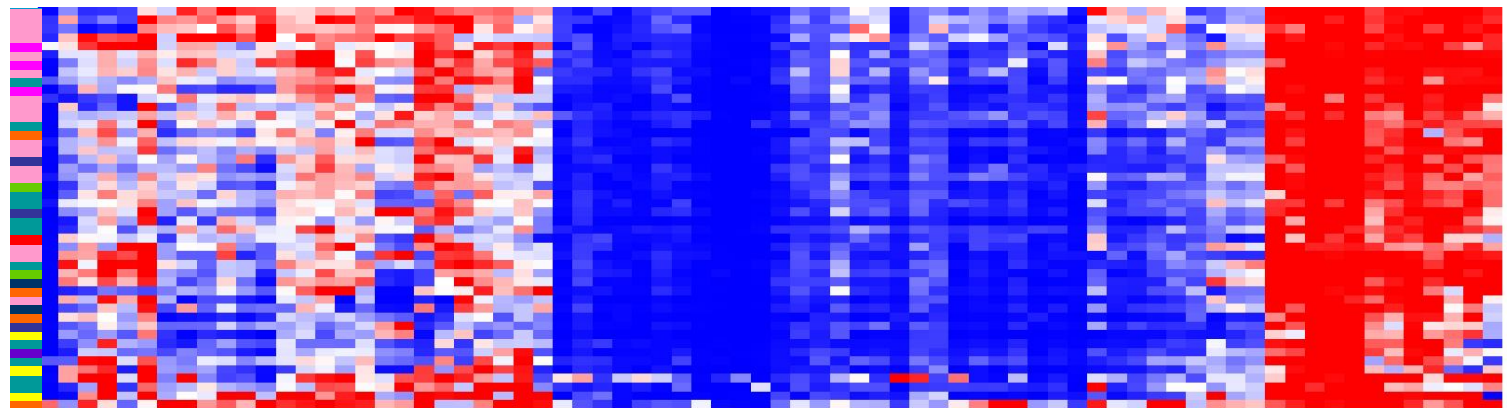


74化合物

46
細胞
F-PDO



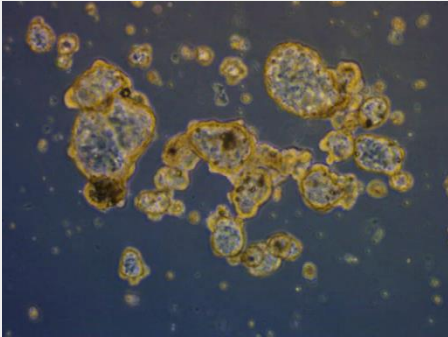
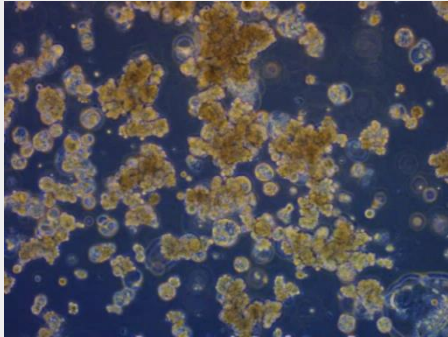
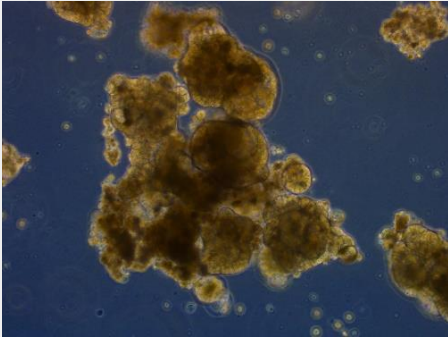
46
細胞
がん細胞株



F-PDOは薬剤感受性のパターンが多様である

化学療法剤への感受性

Drug sensitivity for Gynecological F-PDO

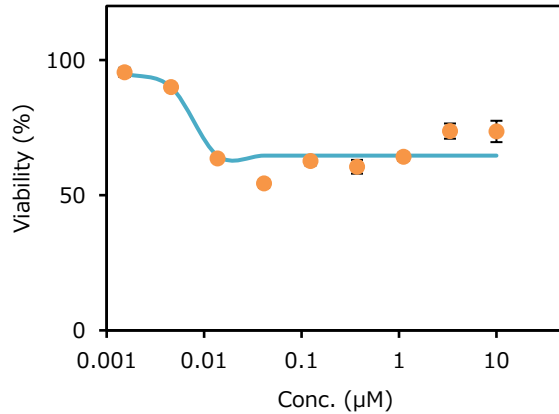
	ROVA14	REME9	REME11
	Ovarian	Uterine	Uterine
Phase contrast image			
Diagnosis	Serous adenocarcinoma	Endometrioid adenocarcinoma with squamous differentiation	Clear cell adenocarcinoma
Clinical drug sensitivity	Tolerant to Paclitaxel & Carboplatin	Tolerant to Paclitaxel & Carboplatin	Tolerant to Paclitaxel & Carboplatin

Drug sensitivity for Uterine F-PDO

REME9

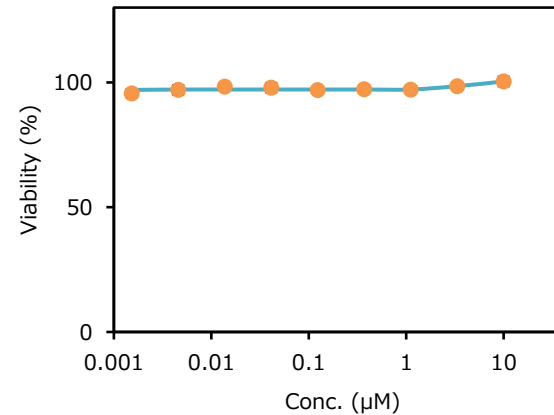
Proliferation rate : 3.0

Paclitaxel



IC₅₀ :
> 10 μM

Carboplatin

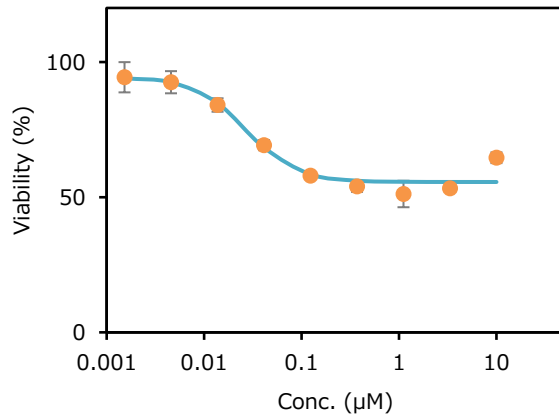


IC₅₀ :
> 10 μM

REME11

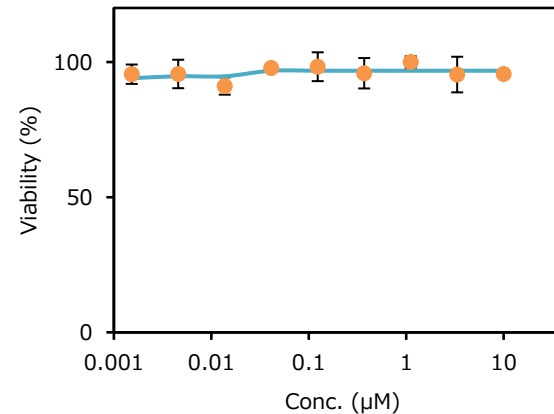
Proliferation rate : 2.3

Paclitaxel



IC₅₀ :
> 10 μM

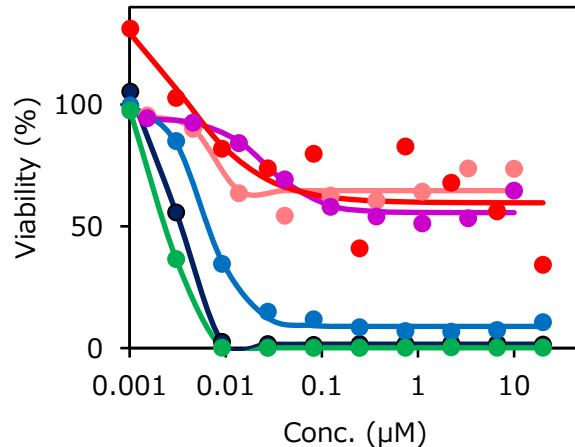
Carboplatin



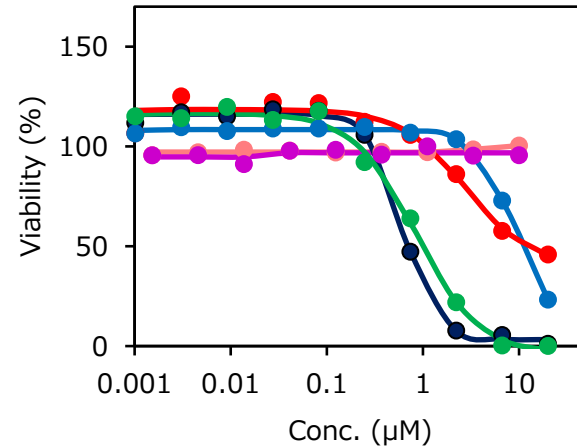
IC₅₀ :
> 10 μM

Drug sensitivity: F-PDOs vs Cell lines

Paclitaxel



Carboplatin



Cells	IC ₅₀ (μM)	
	Paclitaxel	Carboplatin
● Ovarian ROVA14	> 10	> 10
● Uterine REME9	> 10	> 10
● Uterine REME11	> 10	> 10
● Ovarian OVCAR-3	0.003	0.712
● Ovarian SK-OV-3	0.007	10.33
● Uterine SK-UT-1B	0.003	0.988

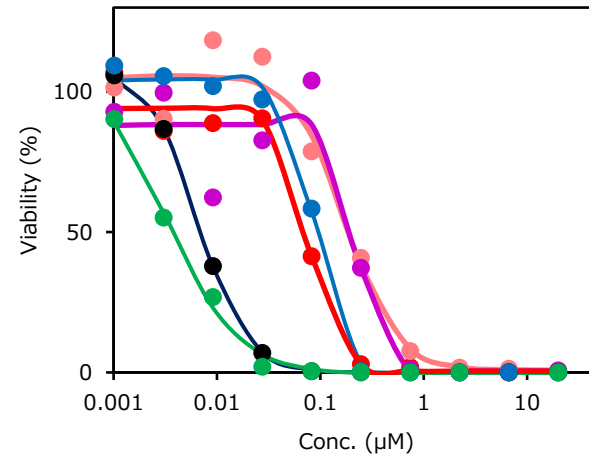
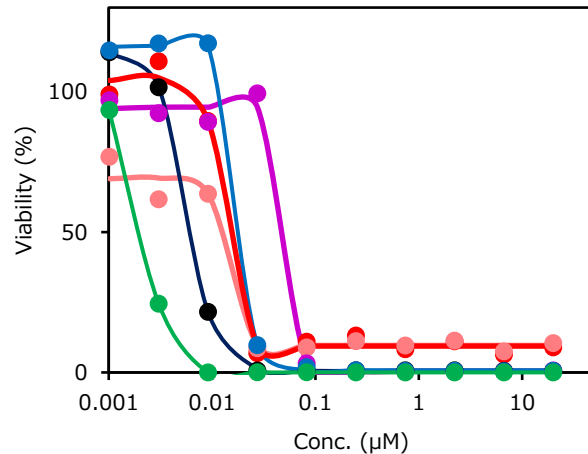
F-PDO showed tolerance to anti-cancer drugs like drug-resistant patient

Drug sensitivity: F-PDOs vs Cell lines

Drugs in clinical stage: showing high efficiency

CDK inhibitor: Dinaciclib

HDAC inhibitor: Panobinostat

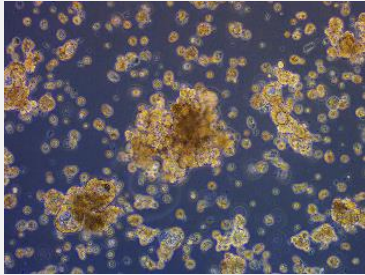
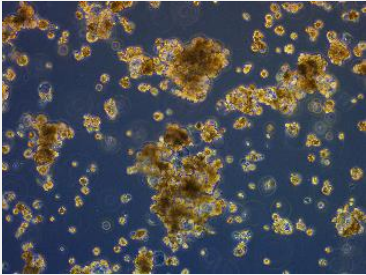
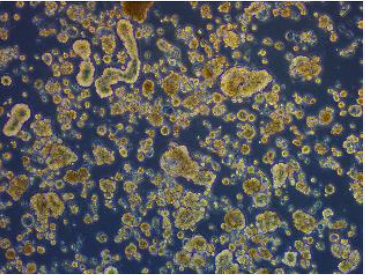
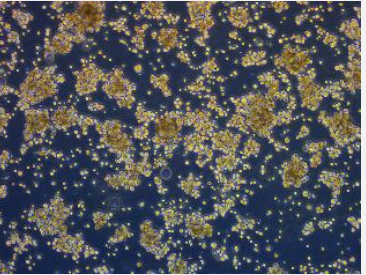


Cells	IC ₅₀ (μM)	
	Dinaciclib	Panobinostat
● Ovarian ROVA14	0.010	0.073
● Uterine REME9	0.010	0.190
● Uterine REME11	0.069	0.238
● Ovarian OVCAR-3	0.006	0.007
● Ovarian SK-OV-3	0.024	0.090
● Uterine SK-UT-1B	0.003	0.004

分子標的薬への感受性

EGFR-inhibitor sensitivity for Lung F-PDO

EGFR inhibitor sensitive mutant

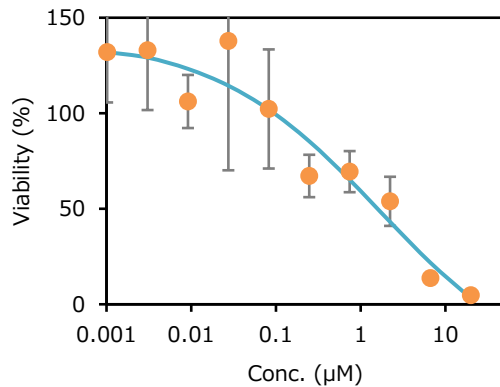
EGFR gene	L858R	E746_A750del	Wild type	
Cell	RLUN14	RLUN23	RLUN15	RLUN16
Phase contrast image				
Diagnosis	Papillary adenocarcinoma	Papillary adenocarcinoma	Pleomorphic carcinoma	Squamous cell carcinoma

EGFR-inhibitor sensitivity for Lung F-PDO

Erlotinib sensitivity

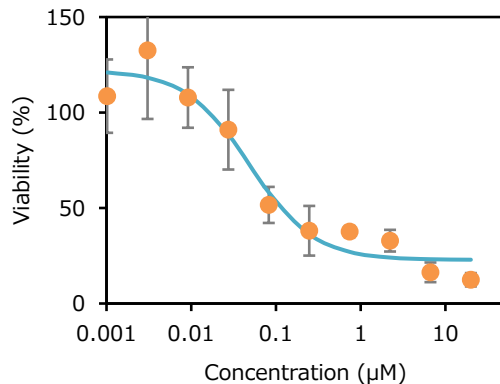
EGFR inhibitor sensitive mutant

RLUN14 (EGFR L858R)



IC₅₀ :
1.58 μM

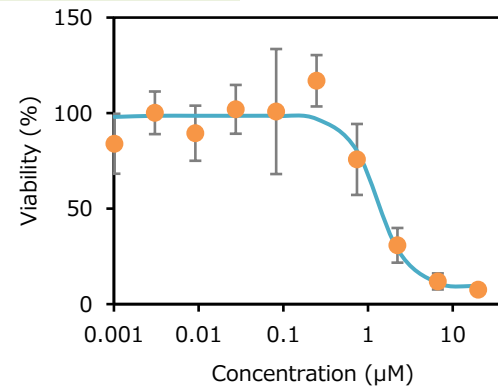
RLUN23 (EGFR E746_A750del)



IC₅₀ :
0.115 μM

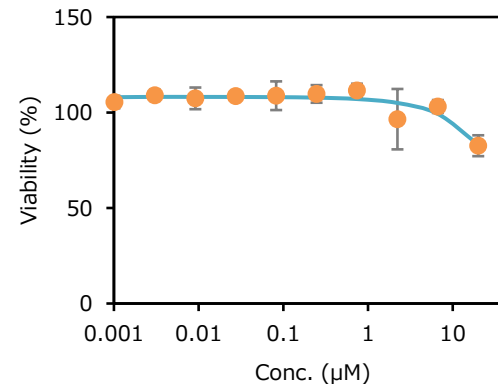
Wild

RLUN15



IC₅₀ :
11.9 μM

RLUN16



IC₅₀ :
> 20 μM

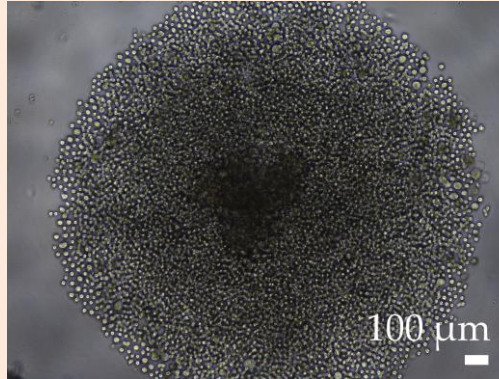
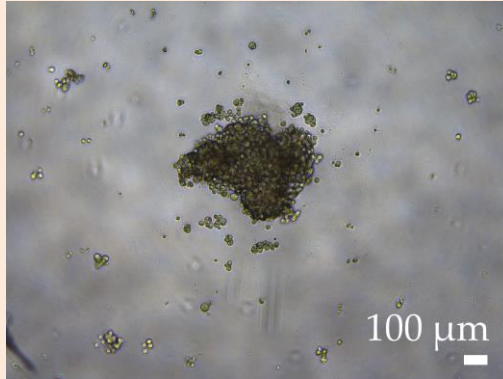
EGFによる増殖依存性

EGF添加の有無で細胞増殖に差があるか

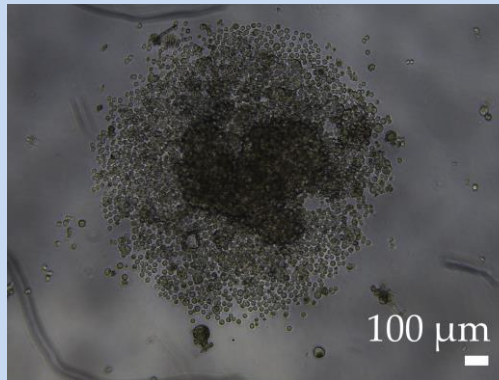
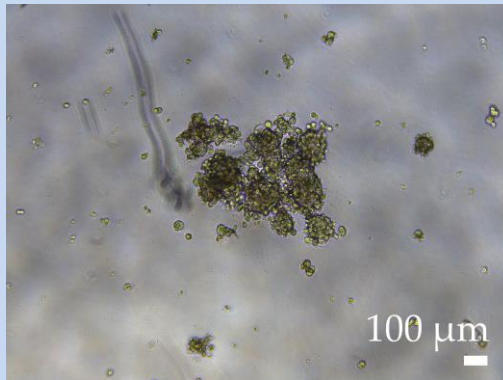
1時間後

144時間後

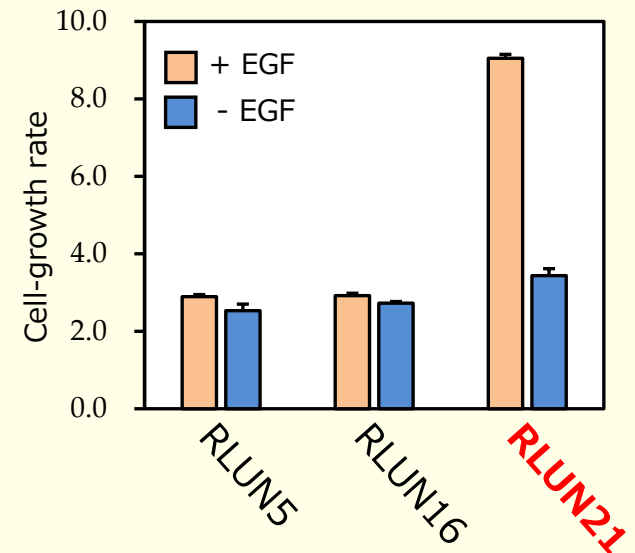
+ EGF



- EGF



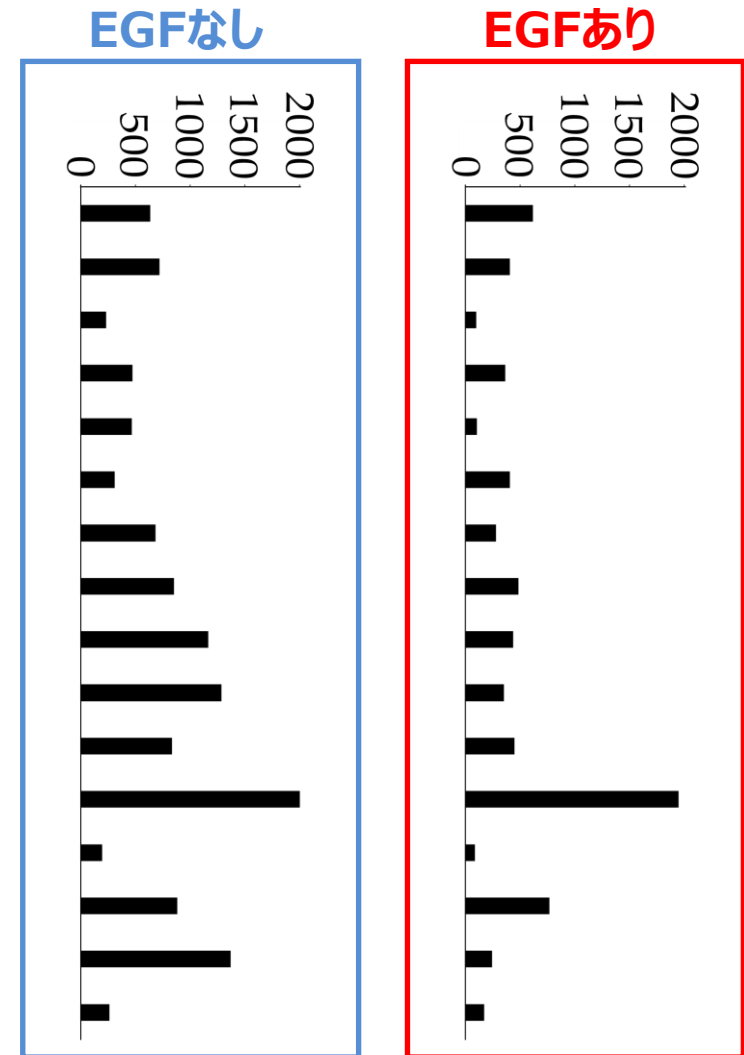
RLUN21



RLUN21はEGF依存性増殖が見られた

肺がんF-PDOのEGFR経路阻害剤感受性

Drug	Target
GDC-0068	AKT
Erlotinib	EGFR
Osimertinib	EGFR
Rociletinib	EGFR
Afatinib	EGFR, HER2
Lapatinib	EGFR, HER2
ARRY-380	HER2
Varlitinib	HER2, EGFR
AZD 6244	MEK
Binimetinib	MEK
NVP-BKM120	PI3K
Idelalisib	PI3K
GDC-0980	PI3K, mTOR
Dabrafenib	Raf
Vemurafenib	Raf
Sorafenib	Raf



**EGF依存的増殖を示すRLUN21は
EGF存在下でEGFRシグナル関連阻害剤の効果が強い**

F-PDOを用いた 抗体医薬品の評価

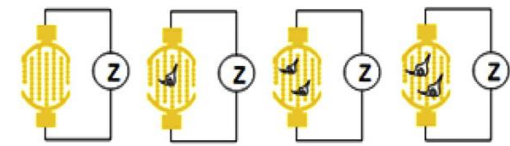
抗体の細胞増殖阻害評価

xCELLigenceによる細胞増殖の測定

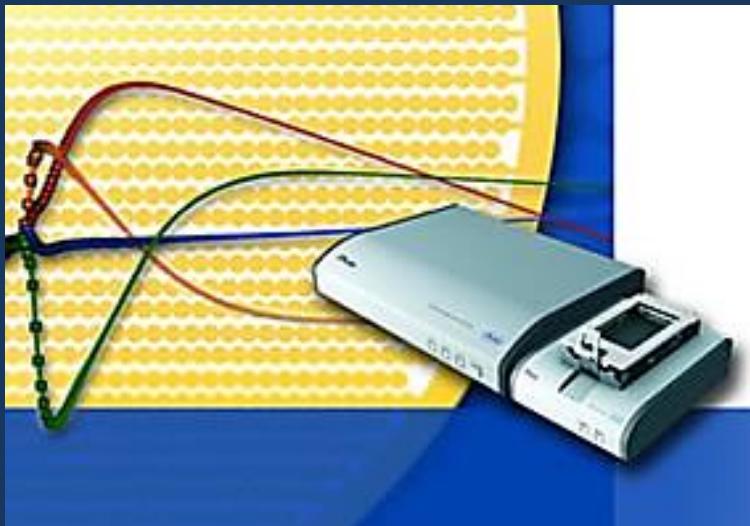
細胞存在下で電気抵抗値（10KHz、25KHz、50KHz）を測定することにより、**細胞の成長（増殖）**、伸展、形態変化、死などの特別な刺激に対する応答を**ラベルフリー**で知ることができる。



金電極が
ウェル底面をカバー



電気抵抗値



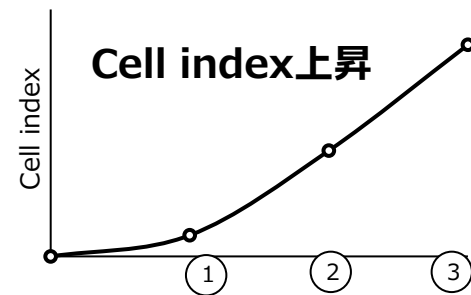
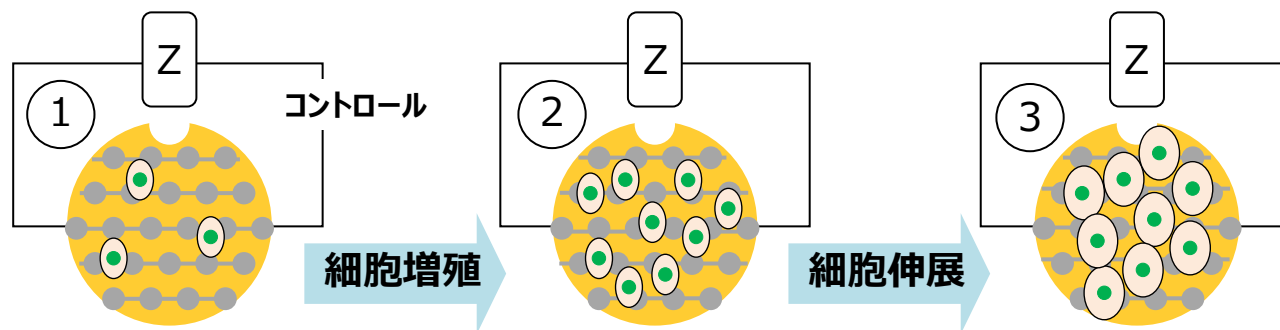
長所

- 多サンプルの同時測定が可能
- 標識やレポーターが必要ない
- 細胞の生存を**リアルタイムモニタリング**
- インキュベーター内で長時間測定が可能

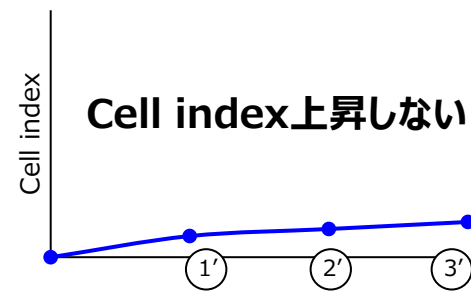
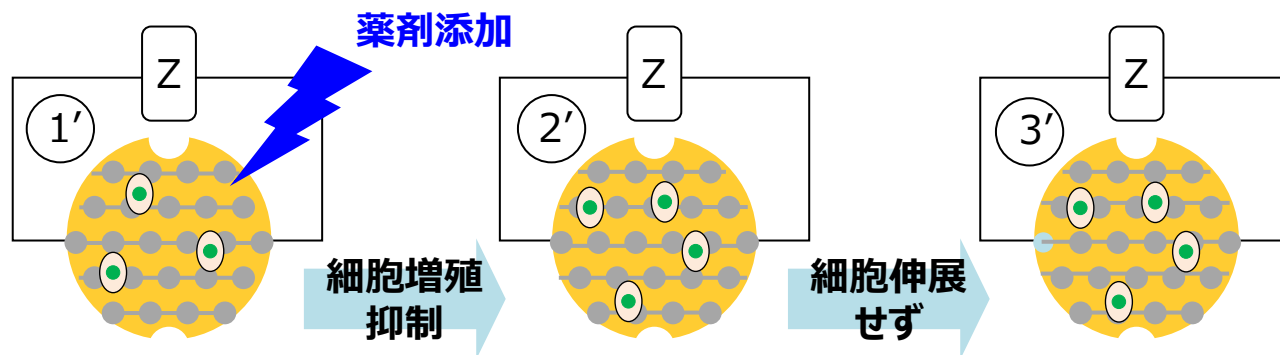
xCELLigenceによる細胞増殖の測定

細胞増殖阻害を電気抵抗値で評価

電気抵抗値

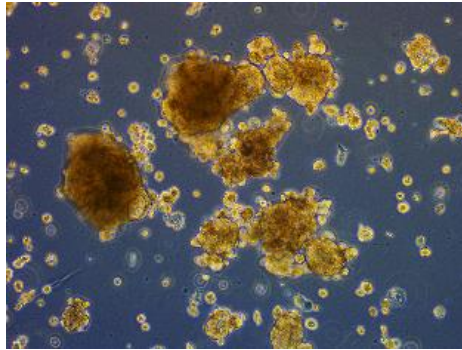


電気抵抗値変動ほとんどない



肺がん由来F-PDOを用いた抗体医薬品の評価

肺がん由来のF-PDO
RLUN21
HER2・EGFR発現



➤アッセイフロー

96ウェルE-Plateをファイブロネクチンコート

16 h

E-Plateへ培地を分注, バックグラウンド測定

F-PDOを播種

xCELLigenceへ設置, Cell index測定開始

24 h

抗体処理 (100, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$)

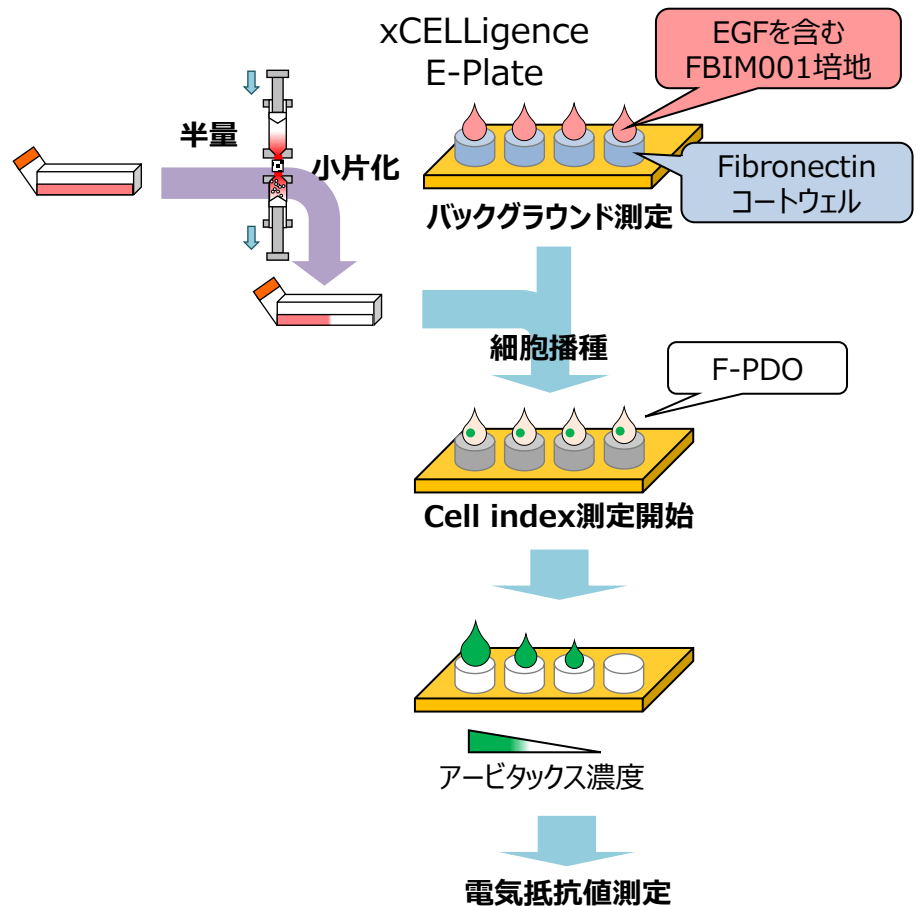
120 h

Cell index測定終了

抗体

■ アービタックス：抗EGFR抗体

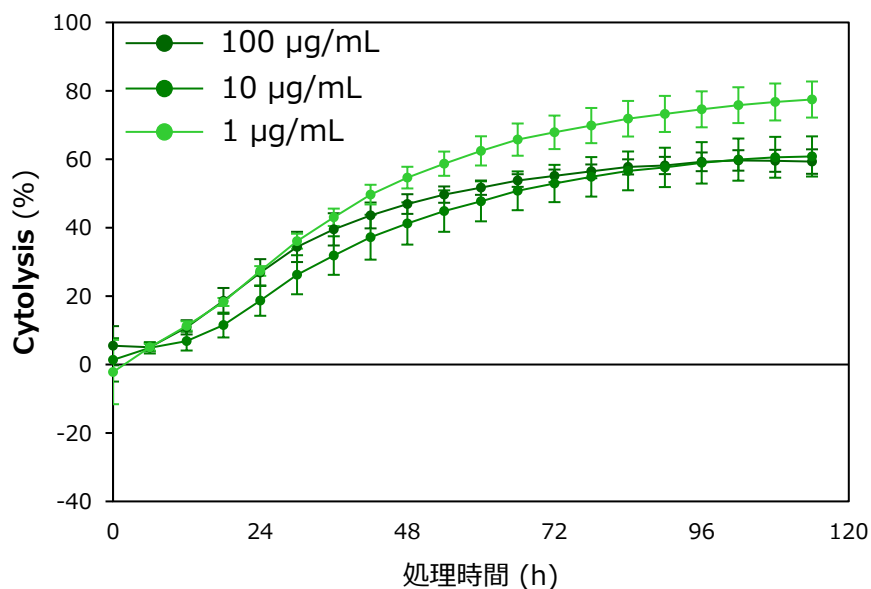
処理濃度 (100, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$)



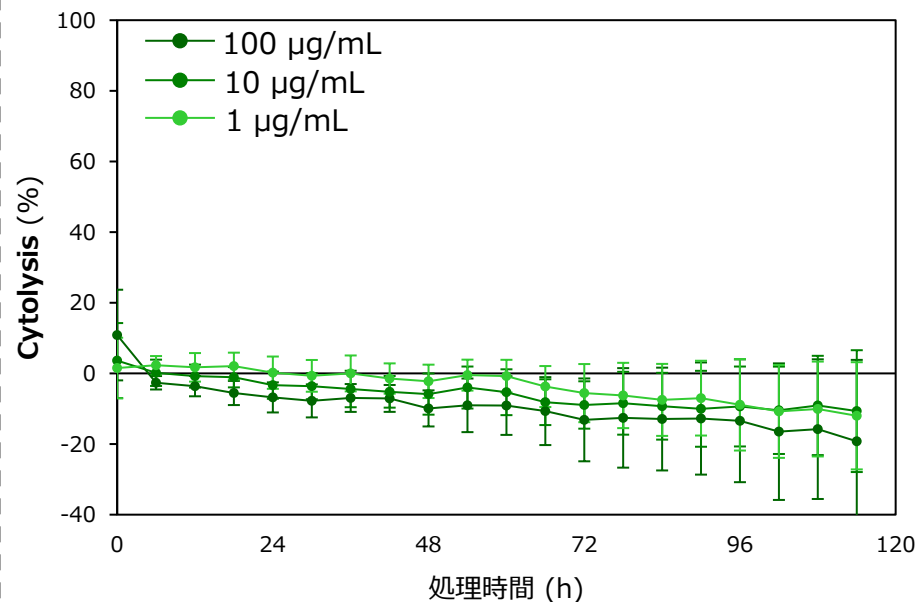
肺がん由来F-PDOを用いた抗体の評価 試験結果

アービタックス

RLUN21: EGFR高発現



RLUN16: EGFR低発現



アービタックスは、肺がん由来F-PDOに増殖阻害を示した

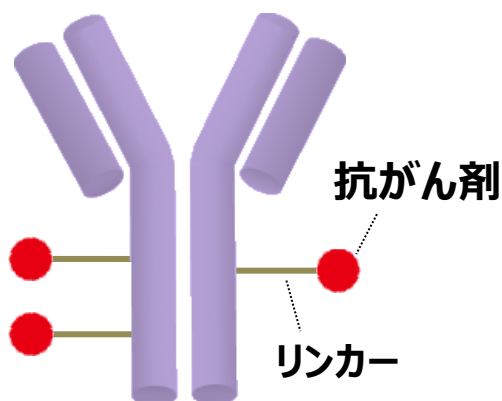
抗体薬物複合体（ADC）の評価

肺がん由来F-PDOを用いたADCの評価

抗HER2抗体

カドサイラ

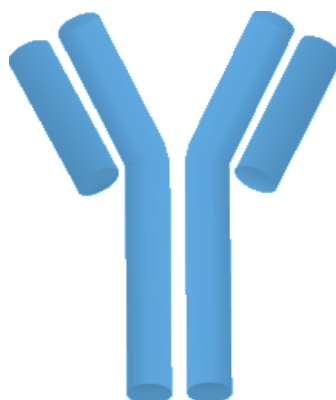
《トラスツズマブ-エムタンシン》



- ◆ 抗体薬物複合体 (ADC)
- ◆ ハーセプチンにチオエーテルリンカーでエンタンシンが結合
- ◆ チューブリン重合阻害
- ◆ 2014年 承認

ハーセプチン

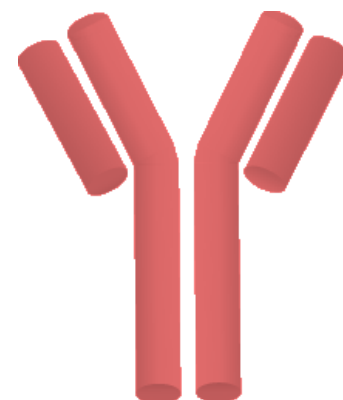
《トラスツズマブ》



- ◆ HER2受容体に対するIgG₁ヒト化モノクローナル抗体
- ◆ パージェタと抗原認識部位が異なる
- ◆ ADCC活性
- ◆ 2001年 承認

パージェタ

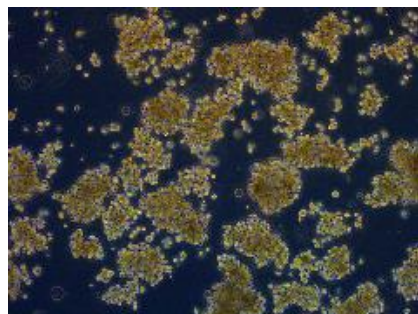
《ペルツズマブ》



- ◆ HER2受容体に対するIgG₁ヒト化モノクローナル抗体
- ◆ ハーセプチンと抗原認識部位が異なる
- ◆ EGFR/HER1、HER3、HER4の重合阻害
- ◆ ADCC活性
- ◆ 2013年 承認

肺がん由来F-PDOを用いたADCの評価

肺がん由来のF-PDO RLUN16 HER2高発現



➤アッセイフロー

96ウェルE-Plateをファイブロネクチンコート

16 h

E-Plateへ培地を分注, バックグラウンド測定

ERBB2高発現RLUN16-2を播種

xCELLigenceへ設置, Cell index測定開始

24 h

抗体処理 (100, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$)

70 h

Cell index測定終了

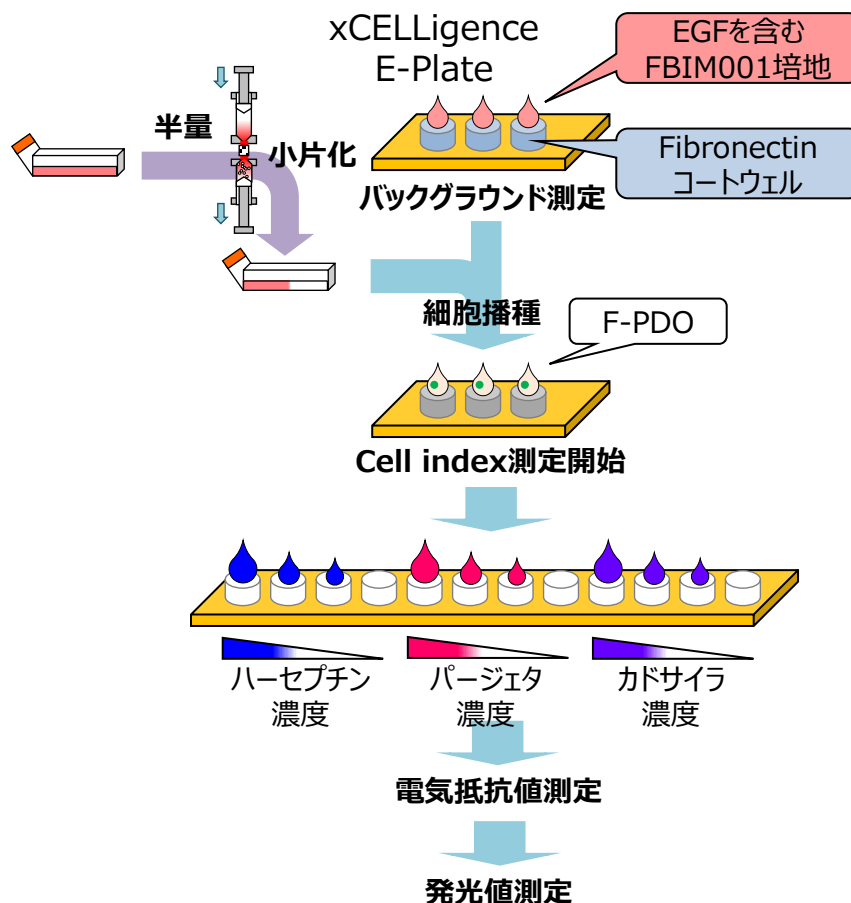


CellTiter-Glo 3D添加, 発光値測定

抗HER2 抗体

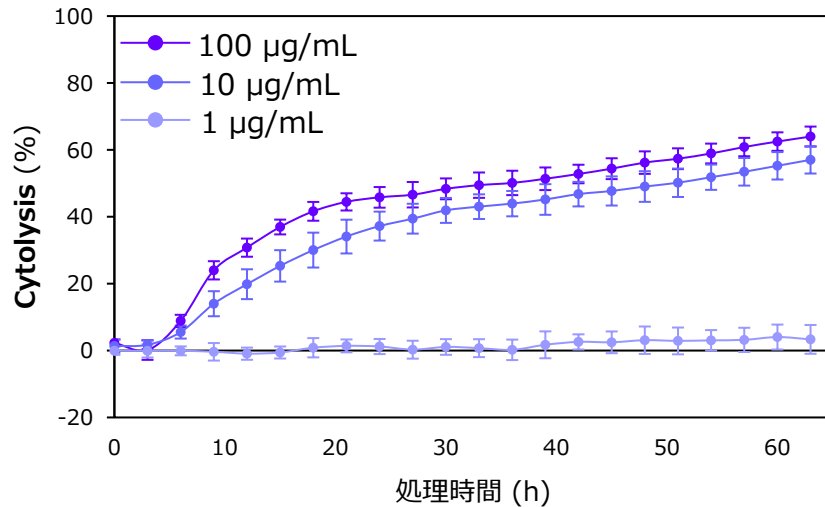
- カドサイラ：トラスツズマブエムタンシン (ADC)
- ハーセプチン：トラスツズマブ
- パージェタ：ペルツズマブ

処理濃度 (100, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$)



肺がん由来F-PDOを用いたADCの評価 試験結果

カドサイラ (ADC)



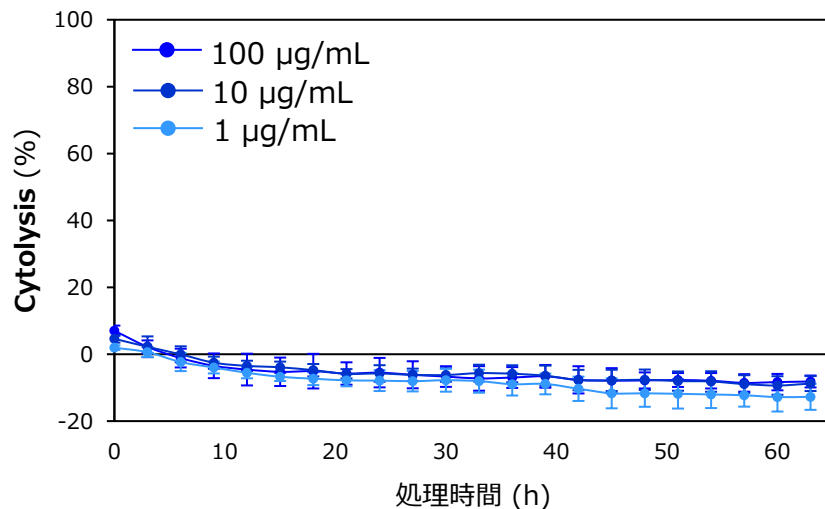
**カドサイラ (ADC) は、
肺がん由来F-PDOの細胞増殖を
顕著に阻害した**

Cytolysis (%) =

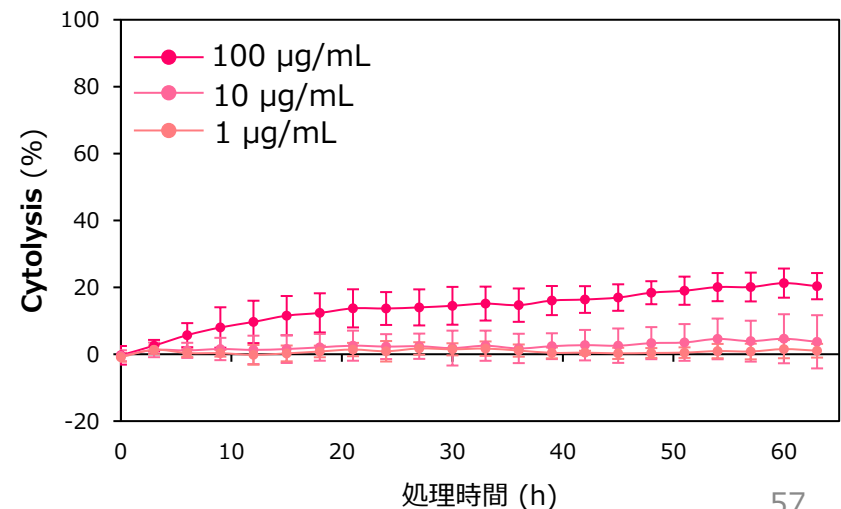
$$\left(1 - \frac{\text{「各時間のCI」} / \text{「処理直前のCI」}}{\text{「各時間の無処理細胞のCI」} / \text{「処理直前の無処理細胞のCI」}} \right) \times 100$$

* CI: Cell index

ハーセプチン

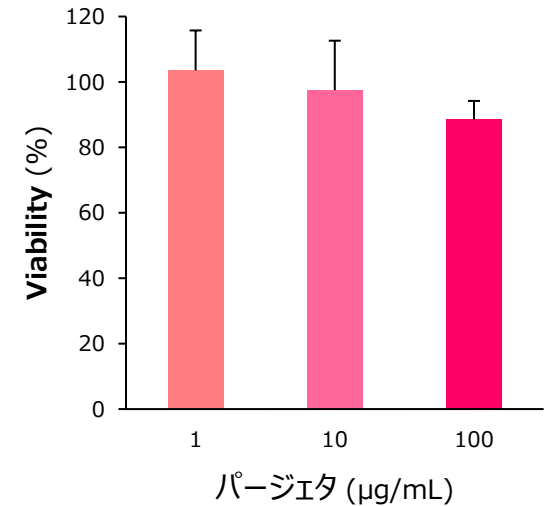
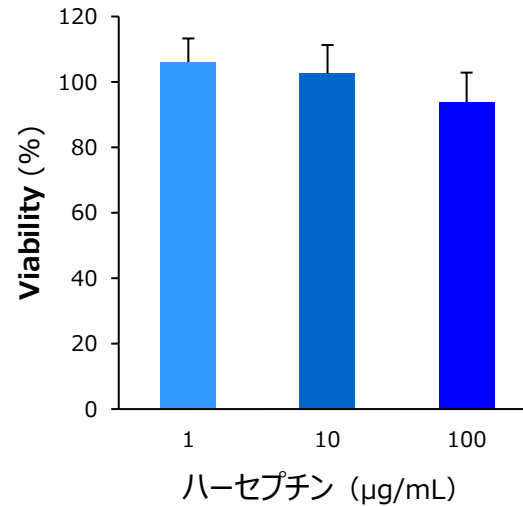
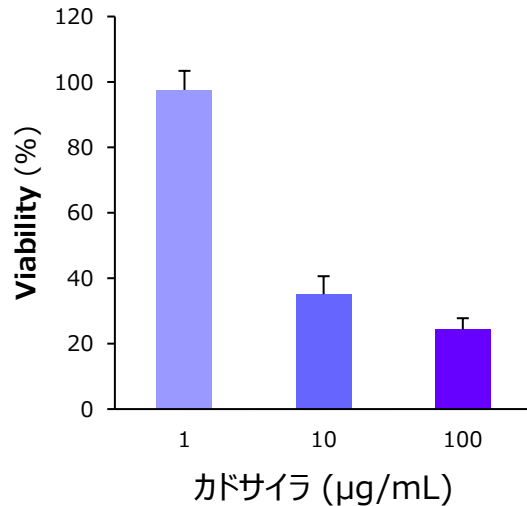


パージエタ



肺がん由来F-PDOを用いたADCの評価 試験結果

HER2高発現 RLUN16-2



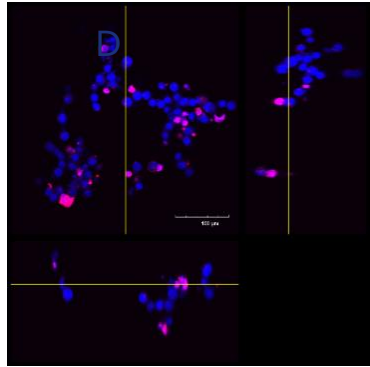
エンドポイントでATP量を測定し生細胞数を測定



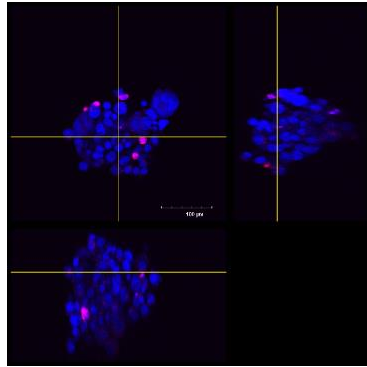
カドサイラのみが細胞死を顕著に誘導している

肺がん由来F-PDOを用いたADCの評価 試験結果

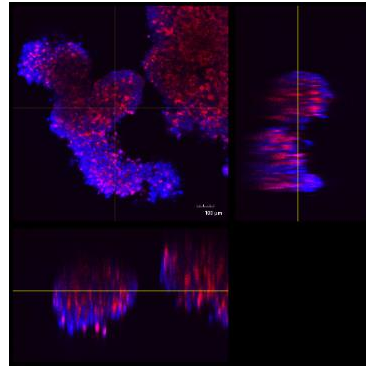
形態情報（容積、抗体医薬陽性容積）を算出



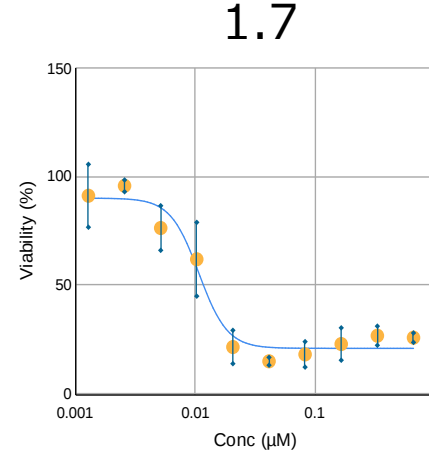
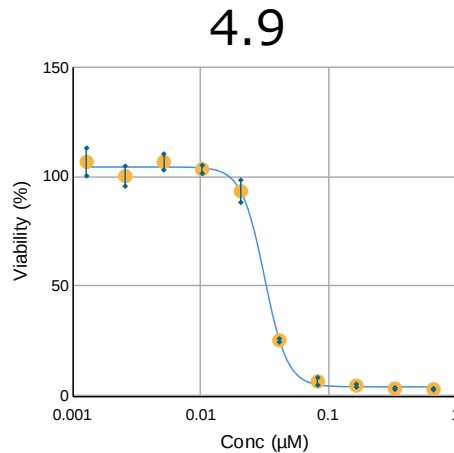
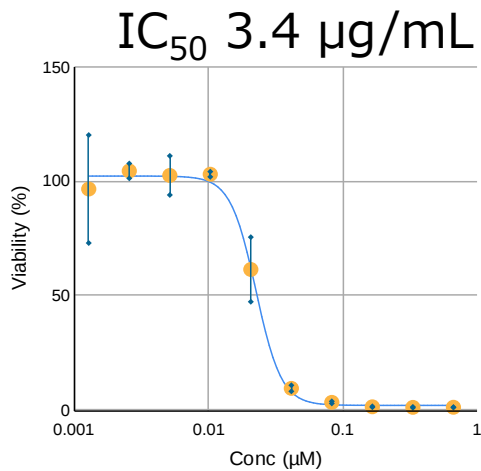
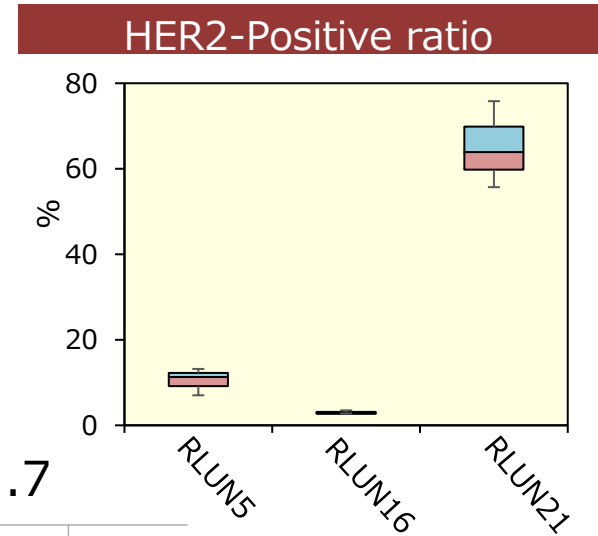
RLUN5



RLUN16

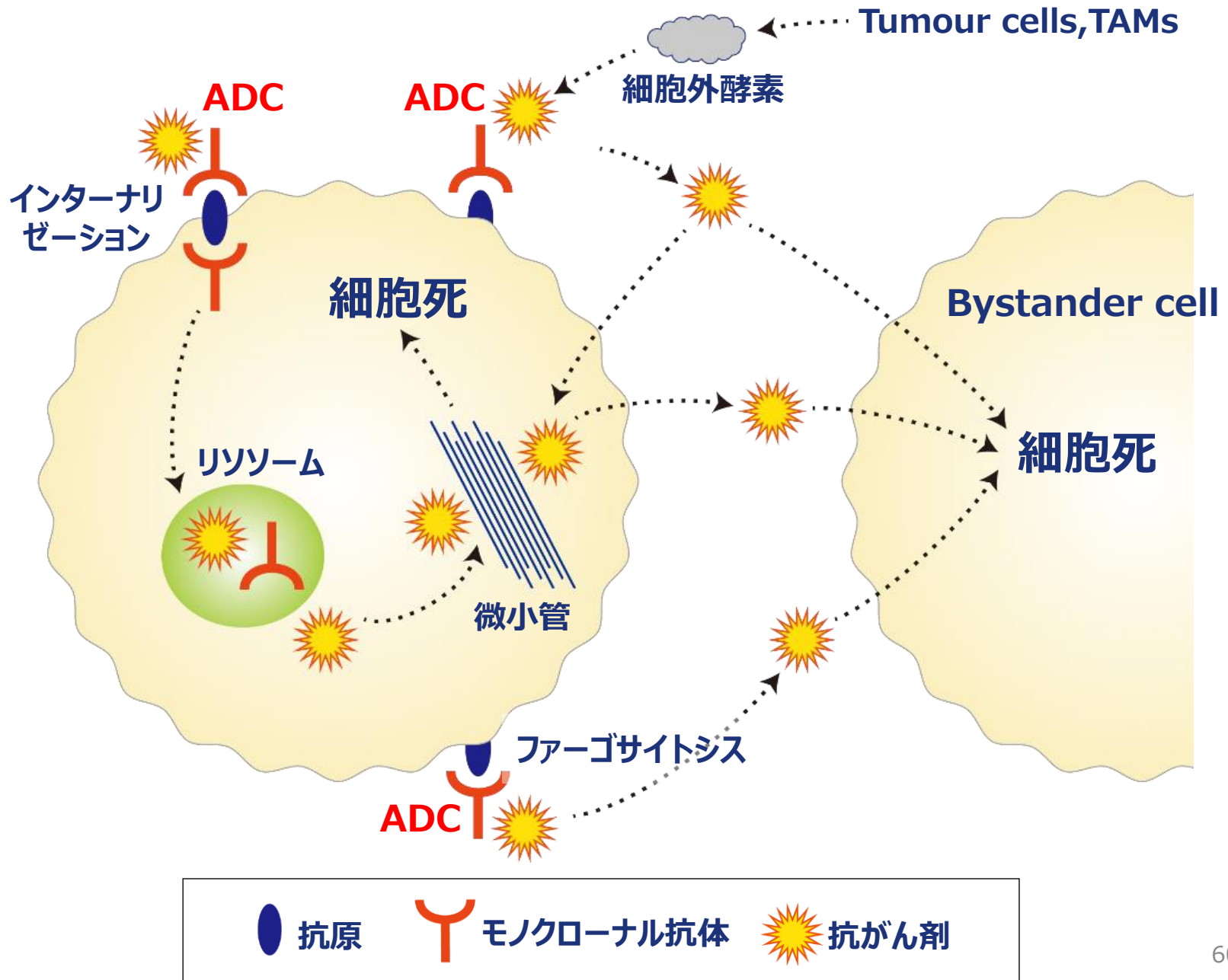


RLUN21



Bystander effectによりHER2低発細胞へもADCは効果を示す

ADCのバイスタンダー効果



免疫細胞を用いた がん細胞への傷害活性の評価

がん免疫療法の歴史

非特異的がん免疫療法

からだ全体の免疫機能を高める

特異的がん免疫療法

がんに対する免疫機能を高める

免疫抑制解除療法

免疫機能の回復

ワクチン
薬・剤
療法
免疫細胞療法

第1世代
(1970年代～)

免疫賦活剤
(BRM)

- ・ クレスチン
- ・ ピシバニール
- ・ BCG

第2世代
(1980年代～)

サイトカイン療法

- ・ インターフェロン
- ・ インターロイキン

第3世代
(1980年代～)

活性化リンパ球療法

LAK療法
CAT療法
NK療法
γδT療法

第4世代
(1990年代～)

➤ ペプチドワクチン療法

➤ 抗体療法

第5世代
(2000年代～)

樹状細胞
ワクチン療法

最新の研究
(2010年代～)

CAR-T療法

- ・ 抗CD19
- ・ 抗CD269

最新の研究
(2014年～)

免疫チェックポイント
阻害剤

- ・ 抗PD-1抗体
- ・ 抗PD-L1抗体
- ・ 抗CTLA-4

免疫細胞を賦活化

(免疫のアクセルを強める)

免疫抑制シグナルの遮断

(免疫のブレーキを解除)

免疫細胞療法：活性化リンパ球

主な療法

LAK療法・・・リンパ球を活性化させて体内に戻す
 CAT療法・・・細胞傷害性T細胞（CTL）を活性化させて体内に戻す
 NK療法・・・NK細胞を活性化させて体内に戻す
 γδT療法・・・γδT細胞を活性化させて体内に戻す

作用機序

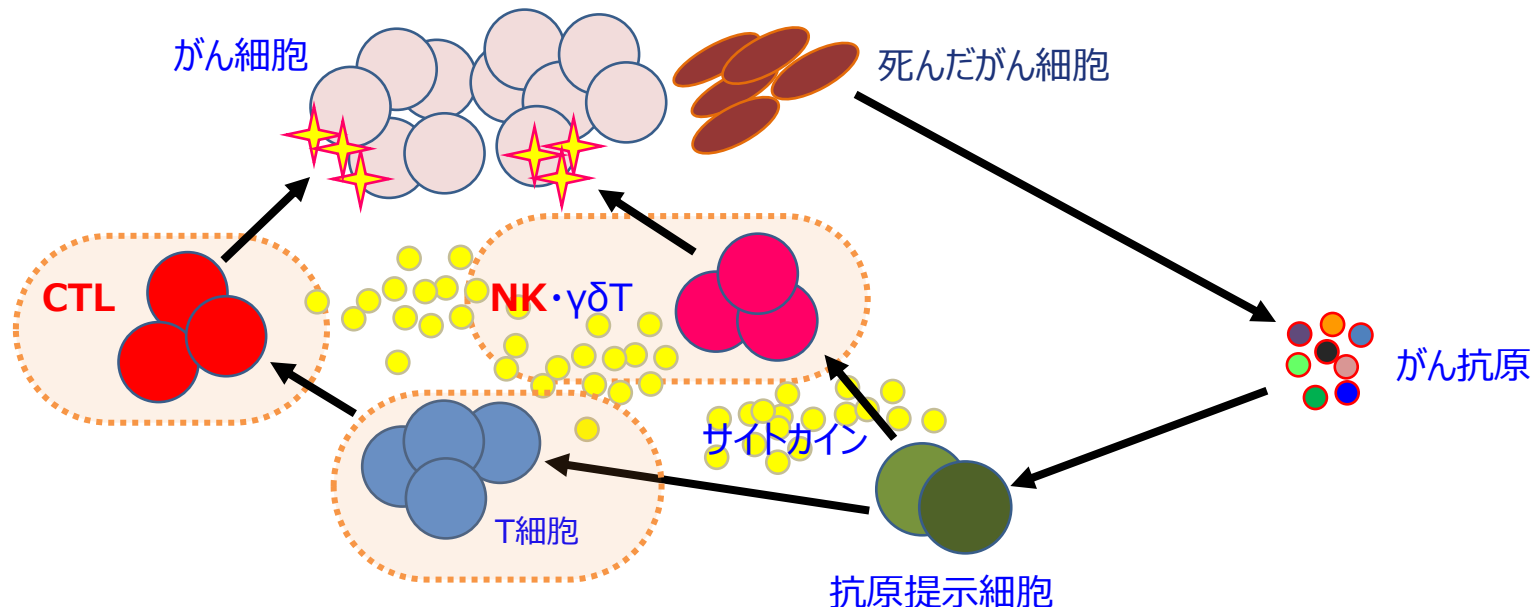
サイトカインなどで増殖・活性化させた免疫細胞を体内に戻すことで免疫反応を高める。

メリット

免疫細胞を体外で活性化させるため、サイトカインの大量投与による副作用を減らせる。

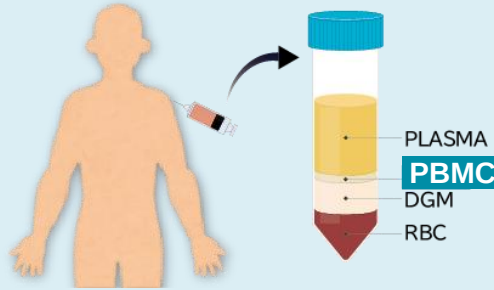
デメリット

オーダーメイド医療となるため、費用が高額。
 誘導されたCTLが、がん細胞を攻撃するとは限らない。

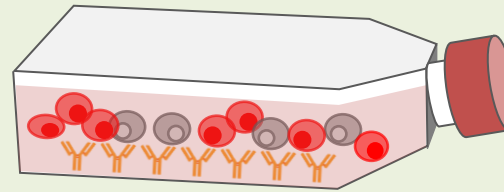


リンホカイン活性化キラー細胞

1. PBMCの準備

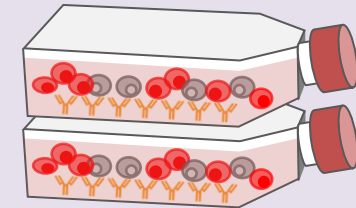


2. 培養開始



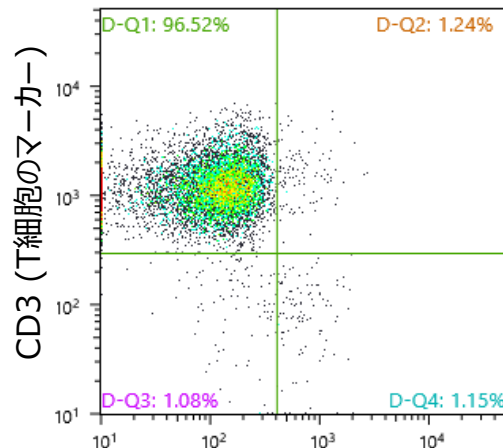
準備したPBMCを
IL-2等を含む培地とともに播種

3. 拡大培養



細胞の増殖に合わせて
培養スケールをアップする

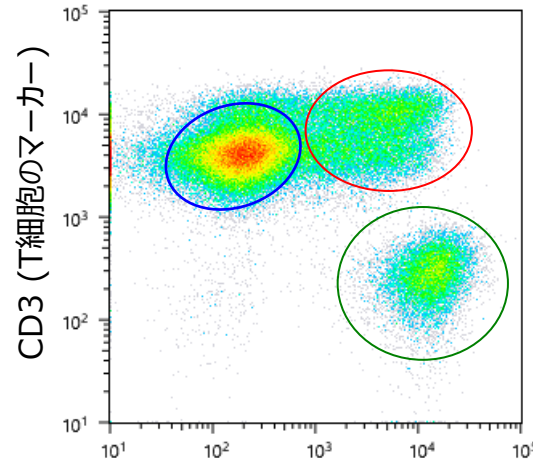
細胞傷害性T細胞 (CTL)



CD56 (NK細胞のマーカー)

T細胞 : 96.5%

NK細胞

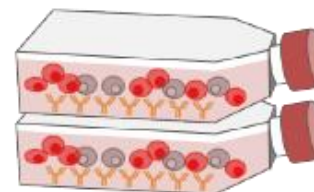
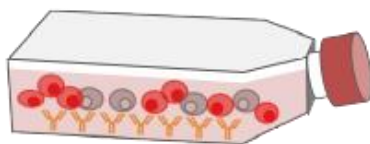
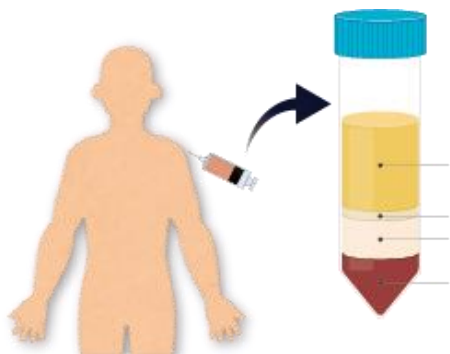


CD56 (NK細胞マーカー)

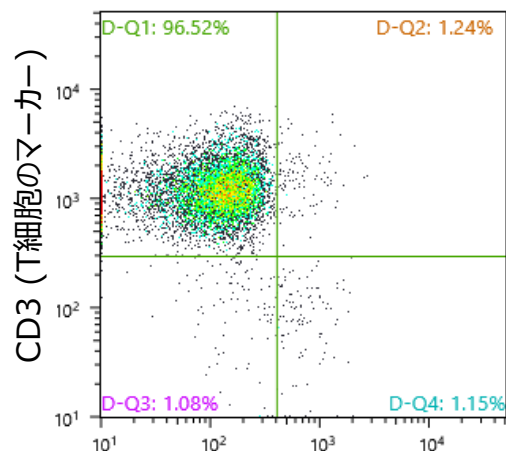
NK細胞を抗CD3抗体
と抗CD56抗体で染色
後ソーティングした

CD3+/CD56- (T細胞) : 52%
CD3+/CD56+ (NKT細胞) : 29%
CD3-/CD56+ (NK細胞) : 18%

リンホカイン活性化キラー細胞

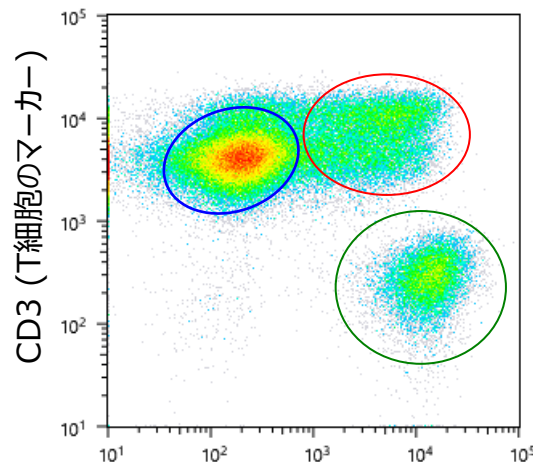


細胞傷害性T細胞 (CTL)



T細胞 : 96.5%

NK細胞

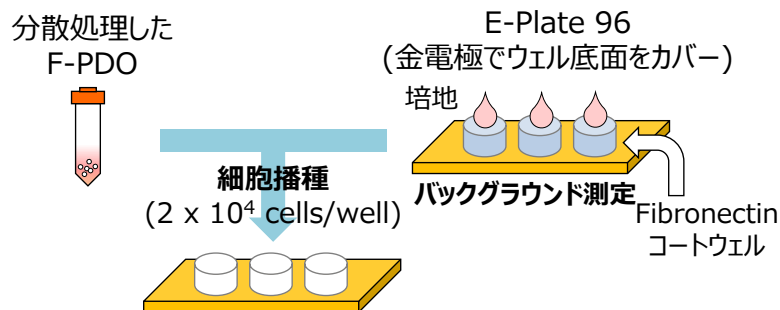


NK細胞を抗CD3抗体
と抗CD56抗体で染色
後ソーティングした

CD3+/CD56- (T細胞) : 52%
CD3+/CD56+ (NKT細胞) : 29%
CD3-/CD56+ (NK細胞) : 18%

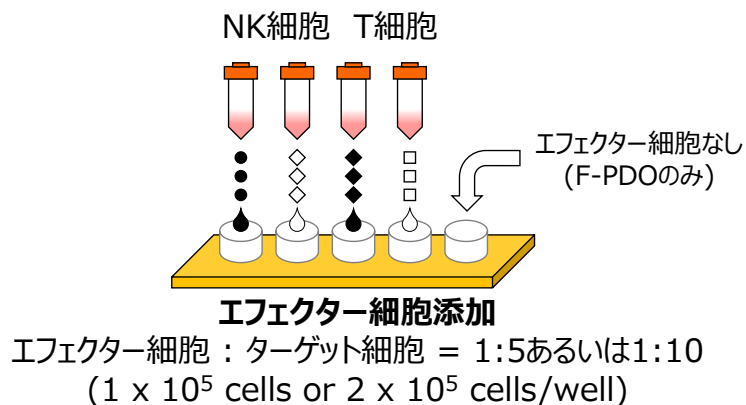
F-PDOを用いた免疫細胞による細胞傷害試験_プロトコール

xCELLigenceによる電気抵抗値測定



xCELLigenceによるCell Index測定開始

24 h

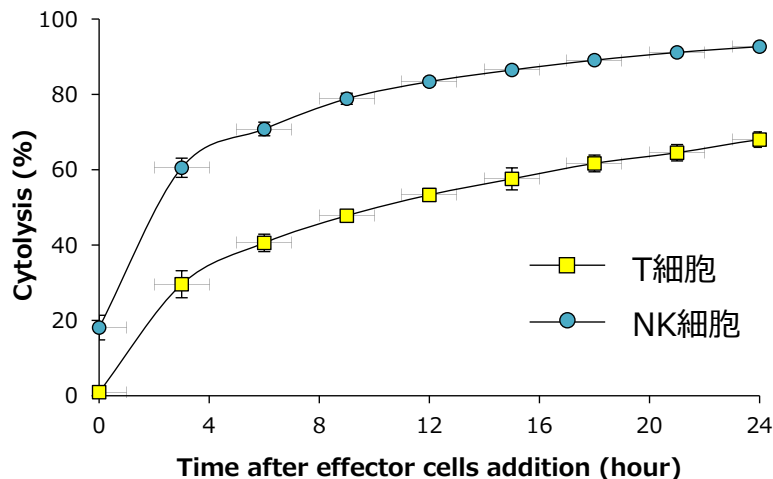
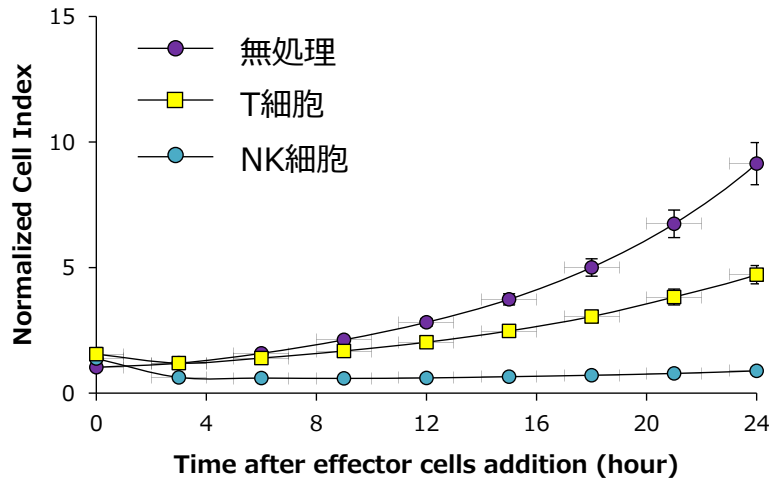


Cell Index測定, Cytolysis算出

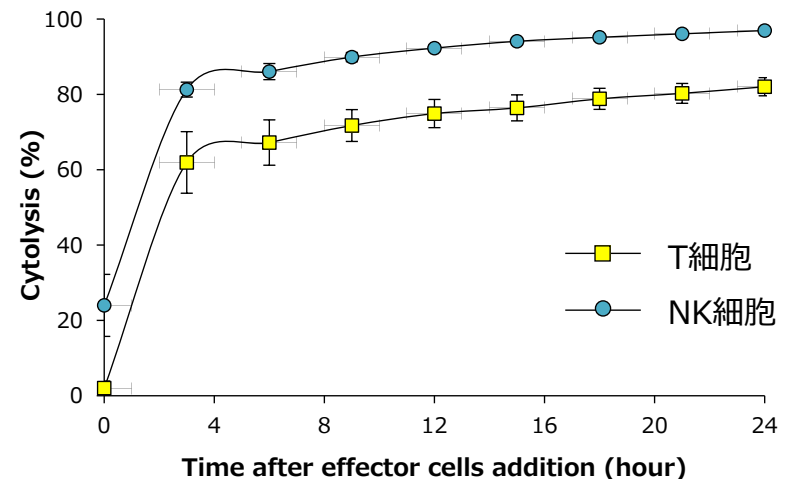
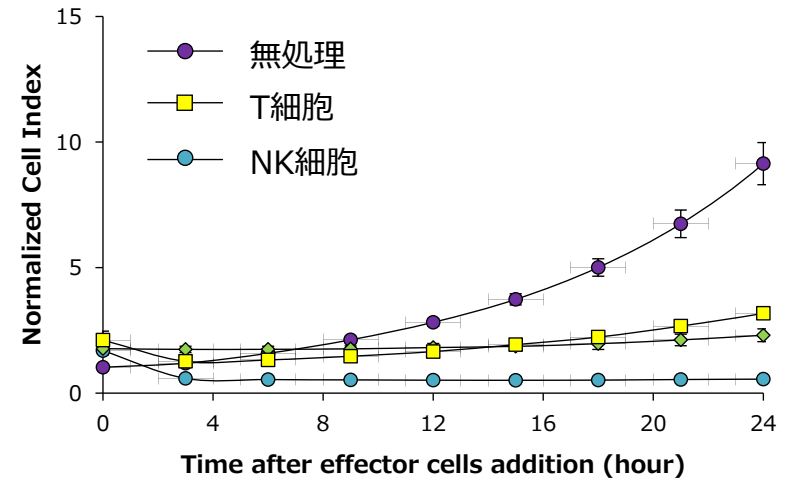
F-PDOを用いた免疫細胞による細胞傷害活性試験

ターゲット細胞：肺がん由来RLUN007, 2×10^4 cells/ウェル

ターゲット細胞：エフェクター細胞 = 1 : 5



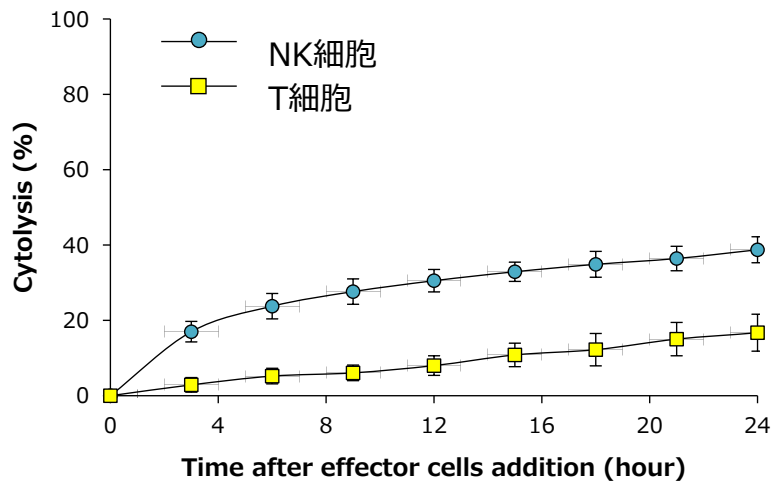
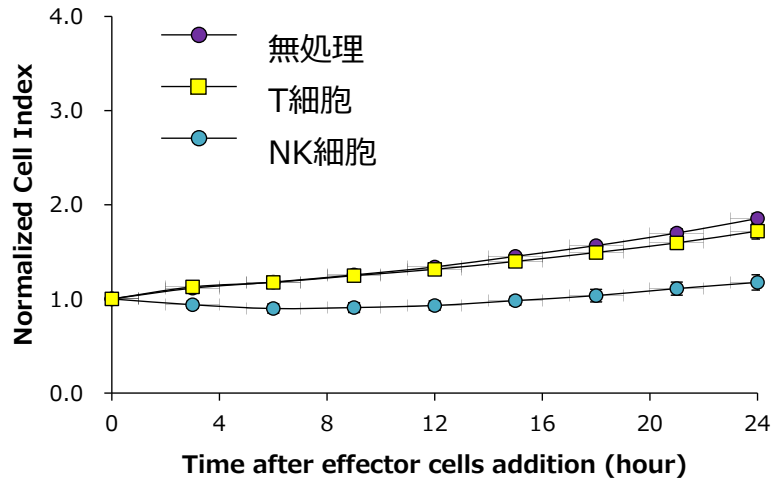
ターゲット細胞：エフェクター細胞 = 1 : 10



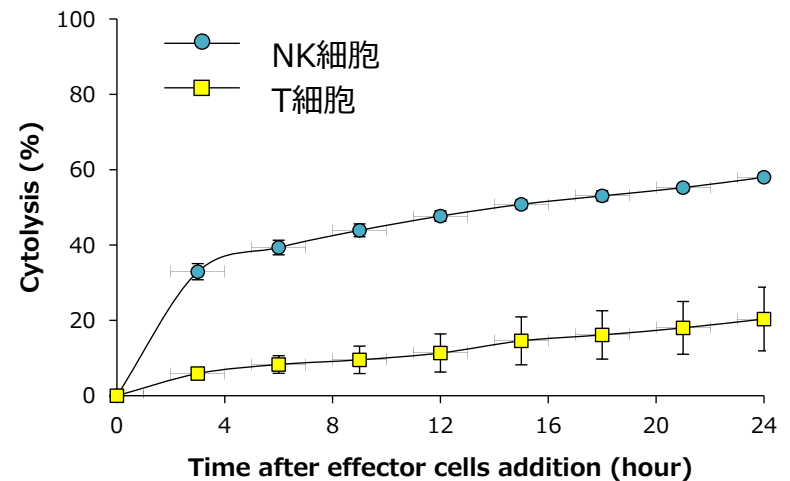
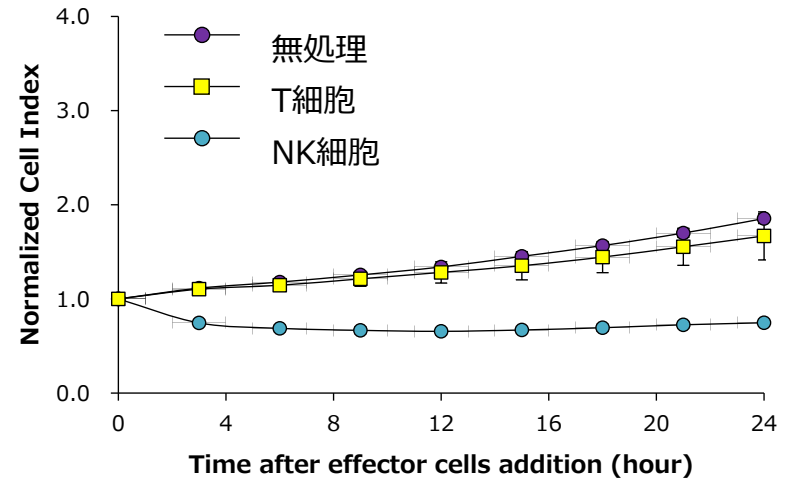
F-PDOを用いた免疫細胞による細胞傷害活性試験

ターゲット細胞: 肺がん由来RLUN021, 2.5×10^3 cells/ウェル

ターゲット細胞 : エフェクター細胞 = 1 : 5

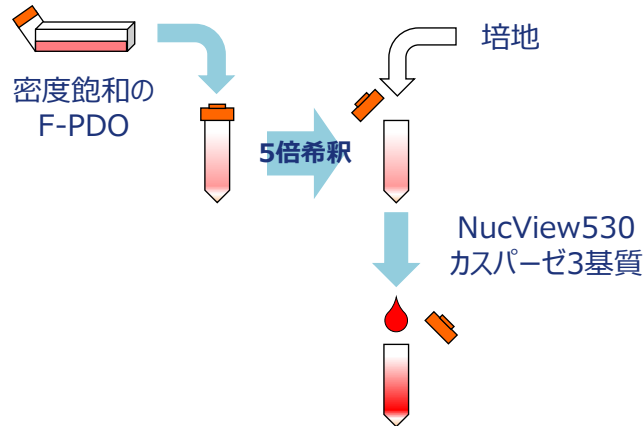


ターゲット細胞 : エフェクター細胞 = 1 : 10

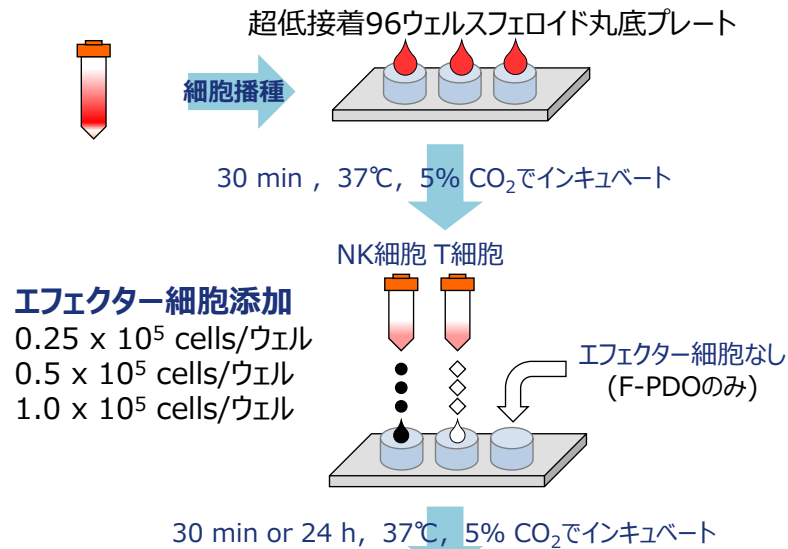


NoviSightによる細胞傷害活性評価方法

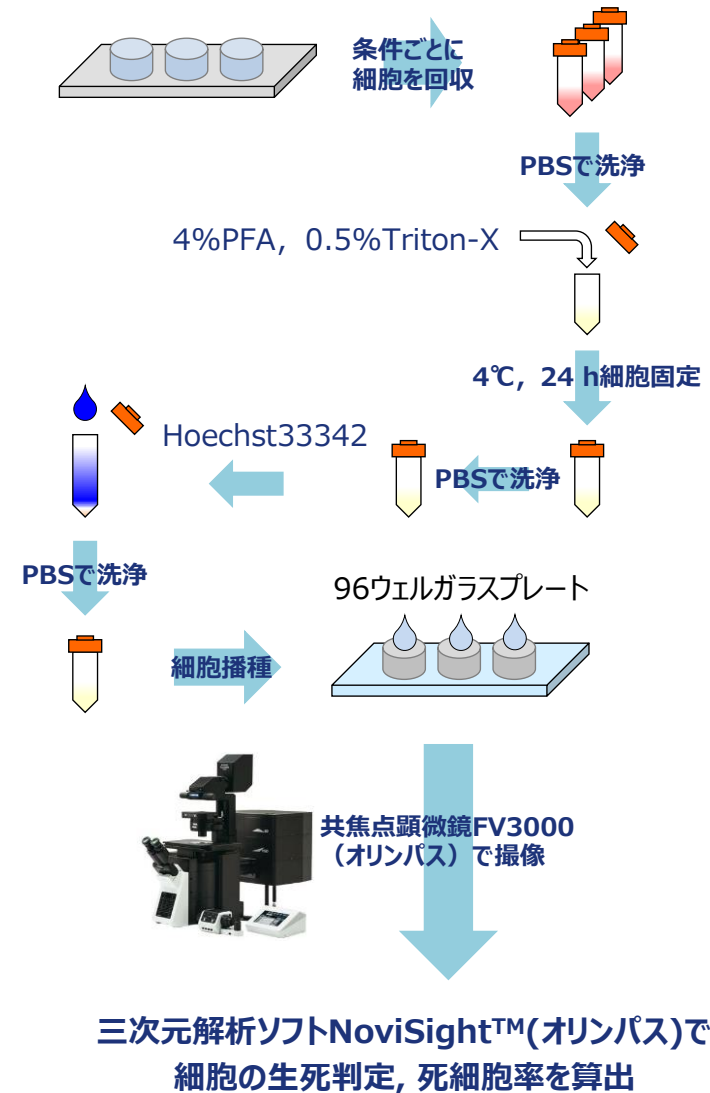
細胞調製：ターゲット細胞



細胞播種

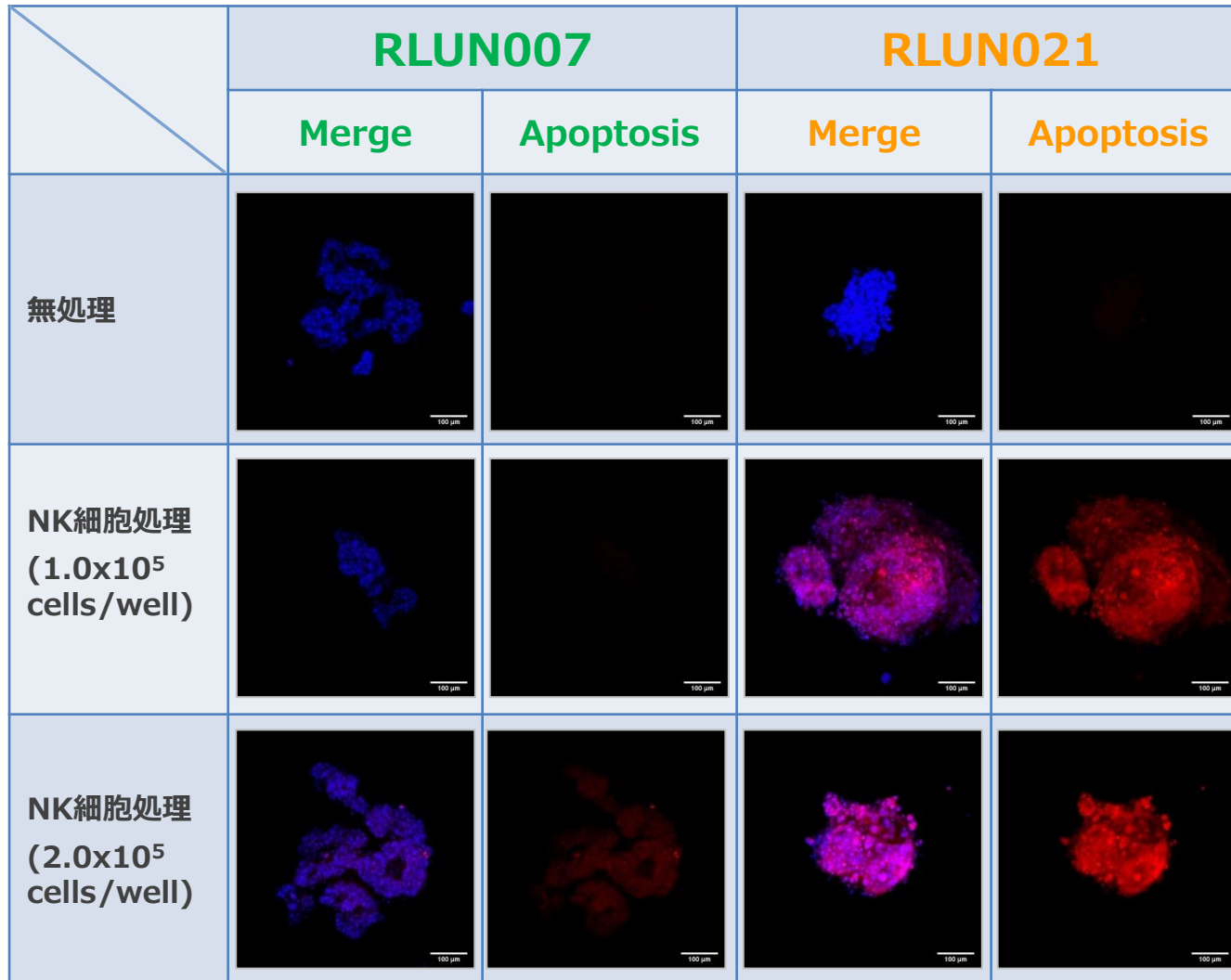


細胞固定，撮像・解析



F-PDOを用いた免疫細胞による細胞傷害活性試験

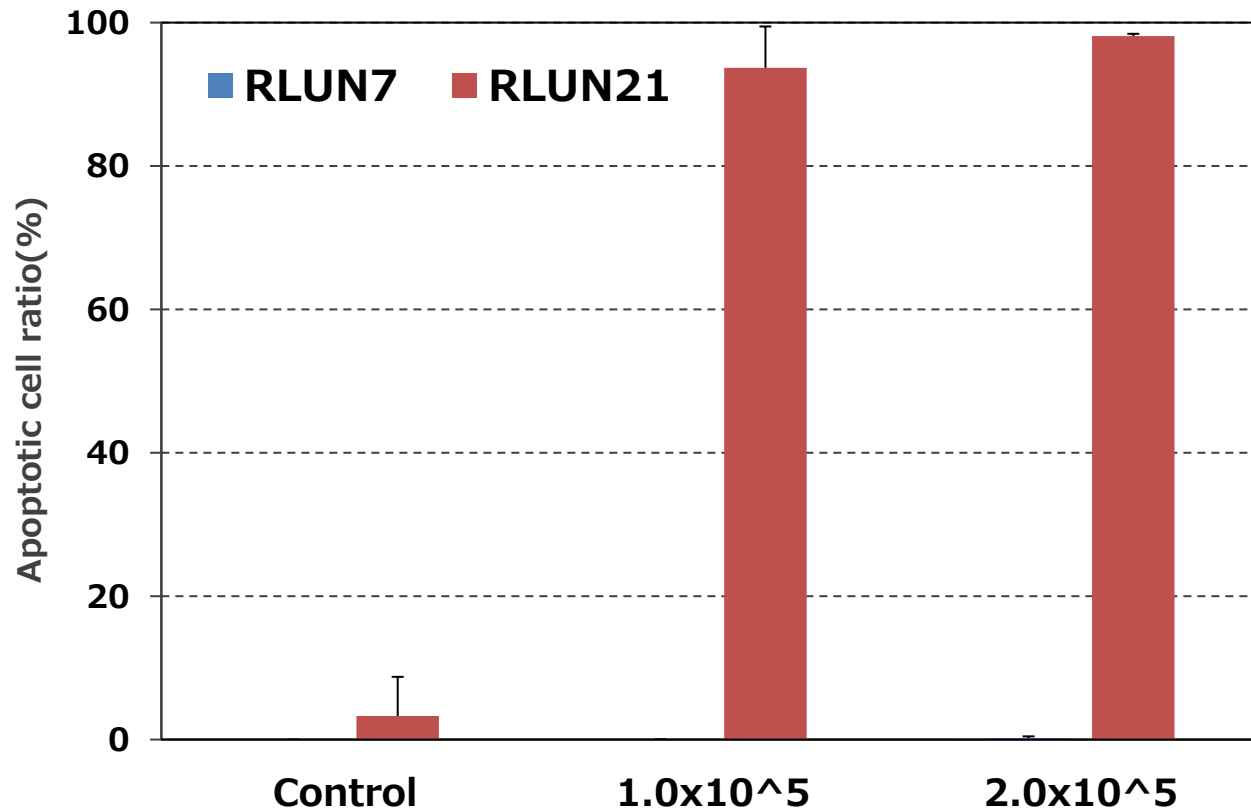
肺がん由来F-PDO



F-PDOを用いた免疫細胞による細胞傷害活性試験

肺がん由来F-PDO

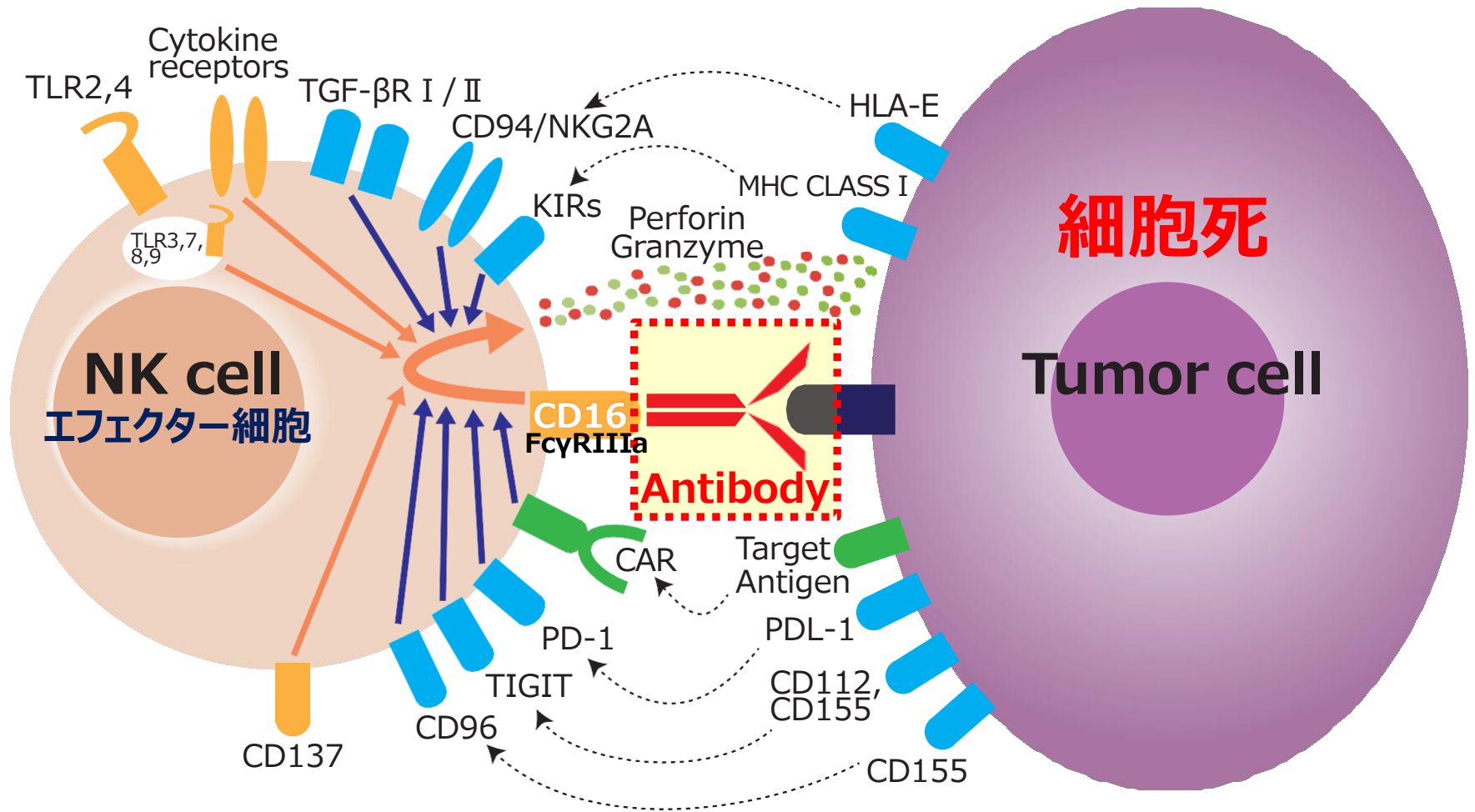
各オルガノイドにおけるアポトーシス細胞率



RLUN021ではNK細胞処理によるアポトーシスが見られたが、その他のオルガノイドではあまり見られていない。
特に、NK細胞への感受性が高いと予想されるRLUN007で、最も生存率が高かった

抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC活性)の評価

ADCC活性



- Activatory mechanism
- Inhibitory mechanism
- Artificial mechanism

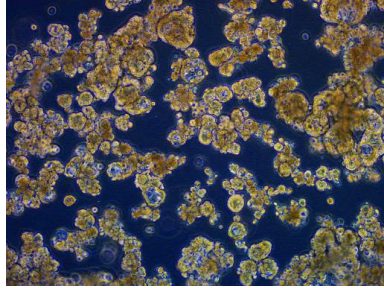
ADCC-inducing Antibody

Surface tumor associated antigen

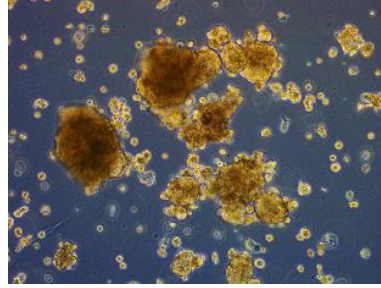
- Activation
- Inhibition
- Perforin
- Granzyme

肺がん由来F-PDOを用いたADCC活性評価

RLUN007
EGFR・HER2発現



RLUN021
EGFR発現



E-Plate 96をファイブロネクチンコート

16 h

E-Plateへ培地を分注, バックグラウンド測定

分散処理したF-PDOを播種

xCELLigenceへ設置, Cell index測定開始

24 h

抗体処理 (100, 10, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

1 h

NK細胞を播種

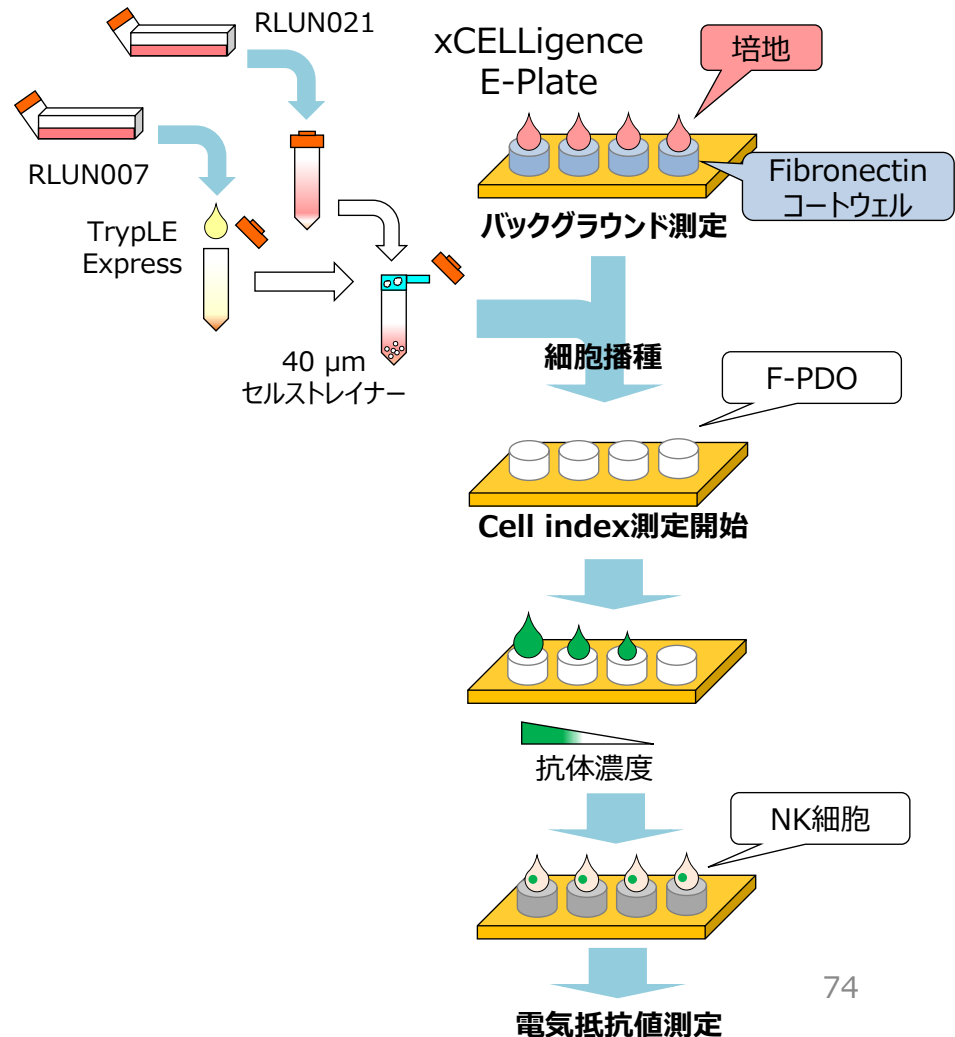
24 h

Cell index測定終了

抗体

- Cetuximab : 抗EGFR抗体
- Trastuzumab : 抗HER2抗体

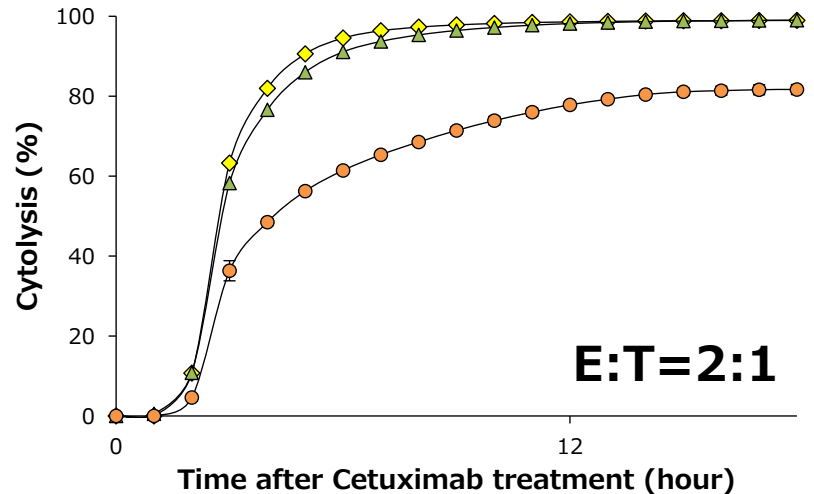
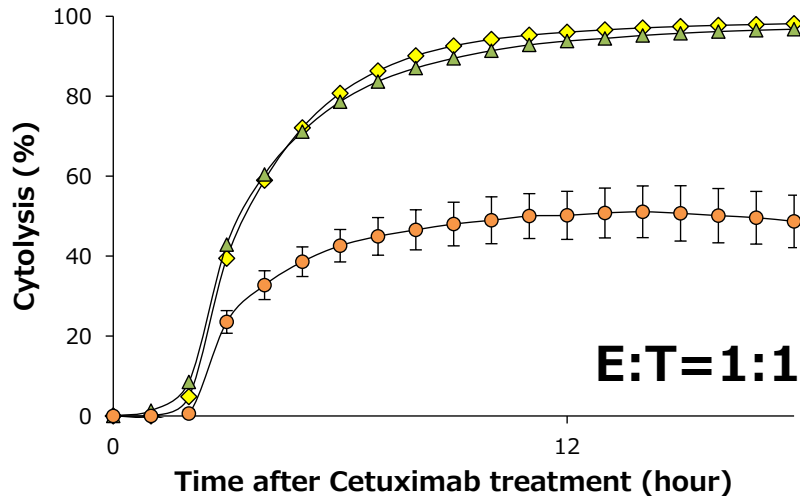
処理濃度 (10, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)



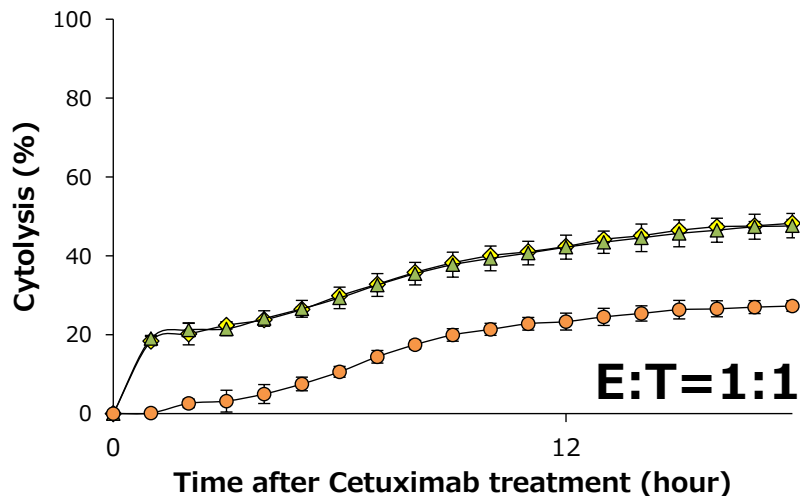
肺がん由来F-PDOを用いたADCC活性評価

Cetuximab: 抗EGFR抗体

RLUN007 EGFR高発現、HER2高発現



RLUN021 EGFR高発現



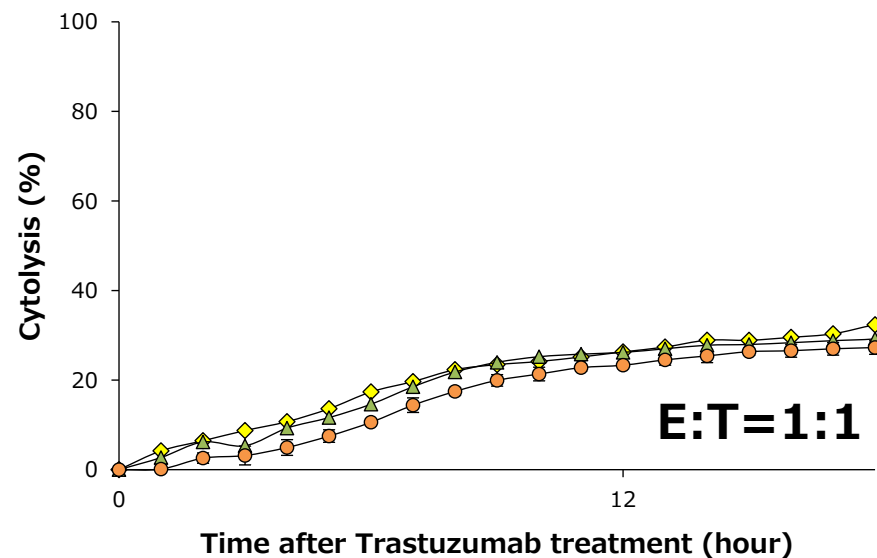
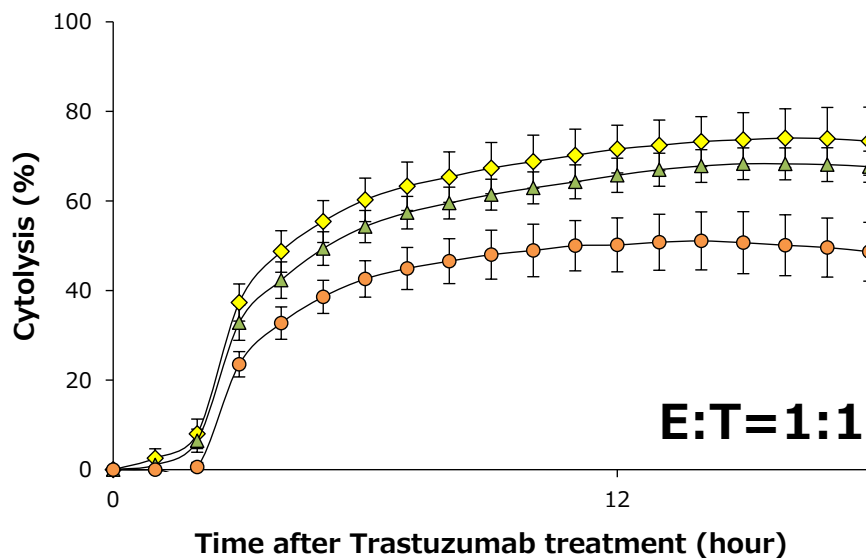
- 10 µg/mL Cetuximab + NK細胞
- 1 µg/mL Cetuximab + NK細胞
- ターゲット細胞 + NK細胞

肺がん由来F-PDOを用いたADCC活性評価

Trastuzumab: 抗HER2抗体

RLUN007 HER2高発現

RLUN021

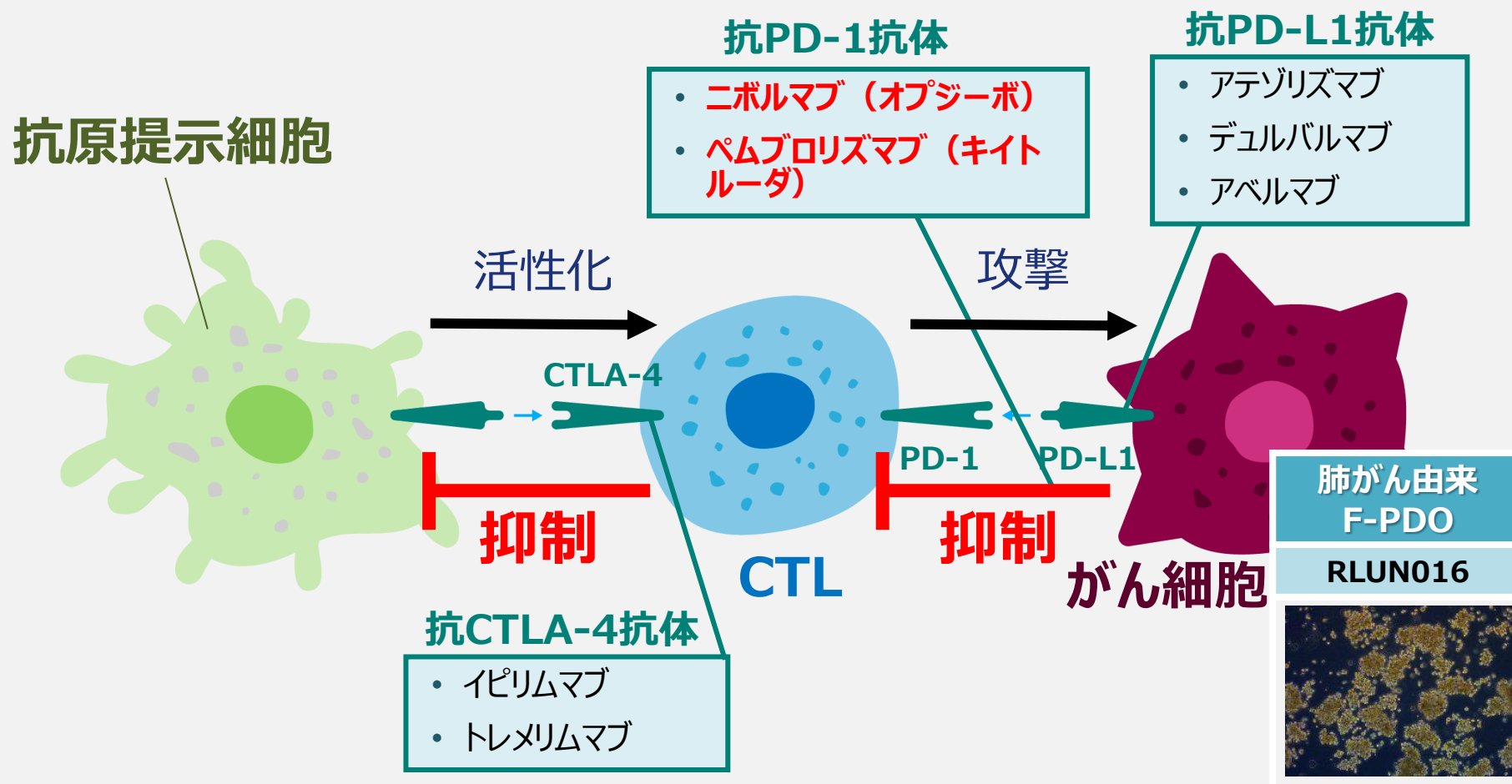


- ◆— 10 µg/mL Trastuzumab + NK細胞
- ▲— 1 µg/mL Trastuzumab + NK細胞
- ターゲット細胞 + NK細胞

免疫チェックポイント阻害剤の評価

免疫チェックポイント阻害剤の作用機序

— 免疫チェックポイント阻害剤 —

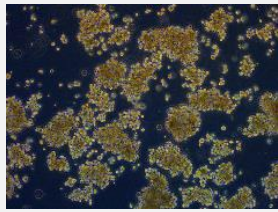


免疫抑制系のシグナルを阻害することで、本来の免疫力が回復
(免疫機能のブレーキを解除)

がん免疫チェックポイントの評価方法

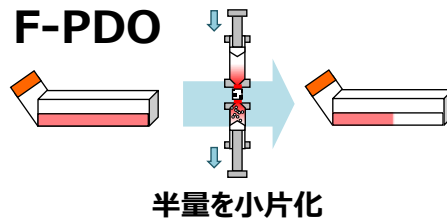
肺がん由来F-PDO

RLUN016



希釈倍率: 30倍

F-PDO



細胞播種

Cell index測定開始

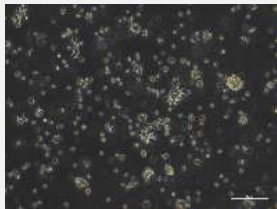
E-Plate

培地

バックグラウンド測定

Fibronectin
コートウェル

末梢血単球細胞 (PBMC)



播種細胞数:

1, 2.5, 5 x 10⁴ cells/well

PBMC



解凍

1-2 h

24 h後
PBMC処理

5 ng/mL
enterotoxin B

24 h

Cell index測定

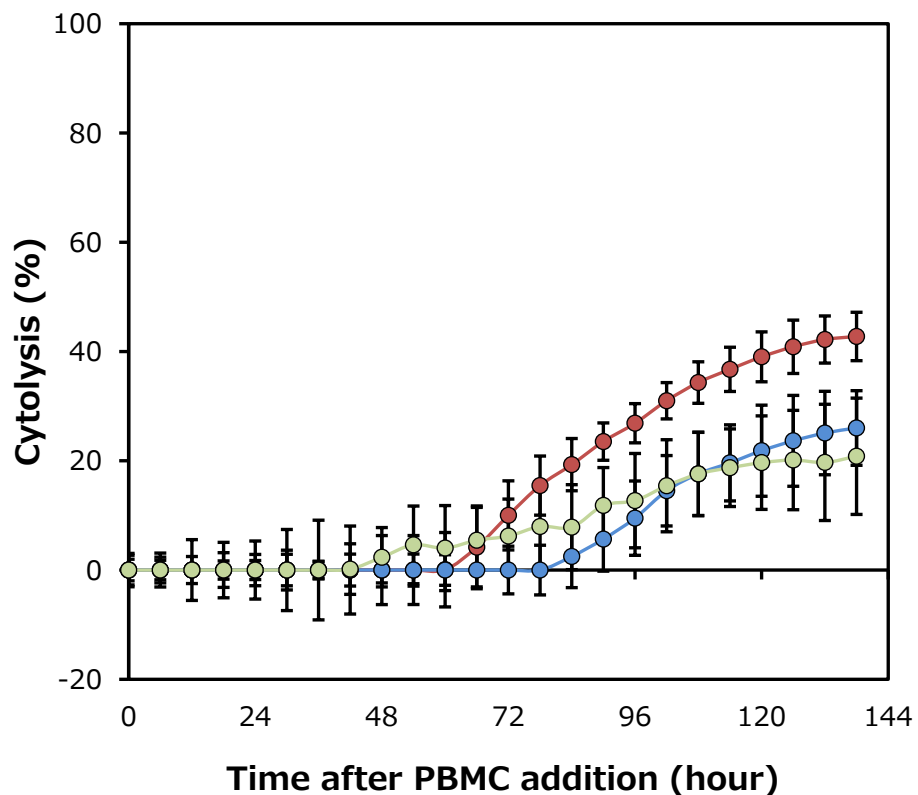
多 少
PBMC細胞数

F-PDO
PBMC

F-PDO
のみ

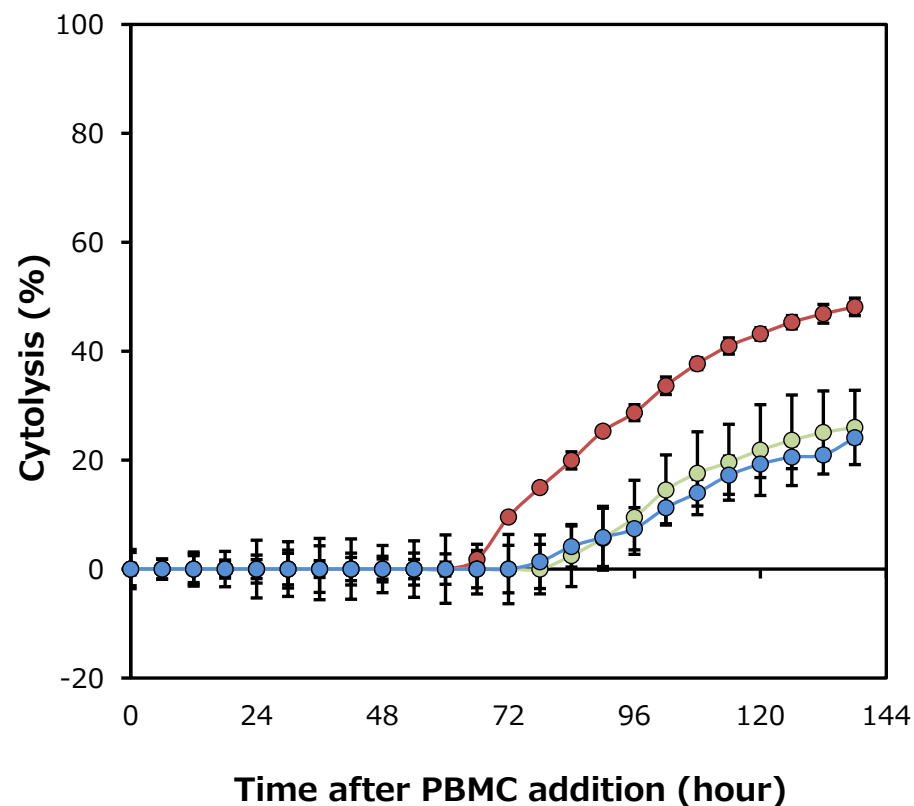
がん免疫チェックポイント阻害剤の評価

opdivo



- RLUN016 + 50 μ g/mL opdivo
- RLUN016 + 50 μ g/mL opdivo + PBMC (+SEB)
- RLUN016 + PBMC (+SEB)

keytruda



- RLUN016 + 1 μ g/mL keytruda
- RLUN016 + 1 μ g/mL keytruda + PBMC (+SEB)
- RLUN016 + PBMC (+SEB)

二重特異性抗体の評価

患者由来ALL細胞を用いた二重特異性抗体の評価

➤ 二重特異性抗体

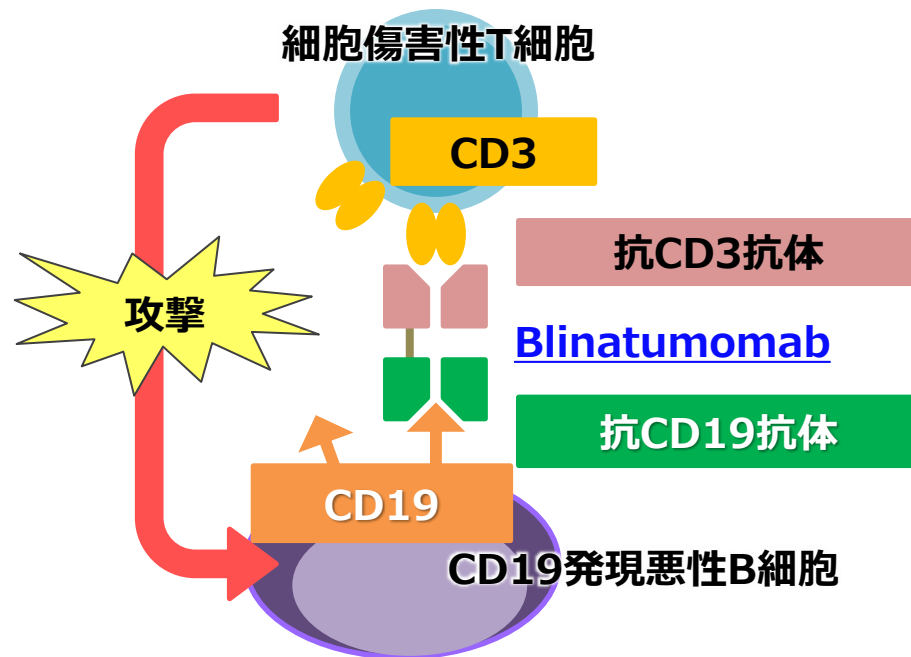
ブリナツモマブ（ビーリンサイト）

- Amgenが販売
- フィラデルフィア陰性の再発もしくは 難治性 B細胞前駆型急性リンパ性白血病薬
- アメリカで2014年に承認、日本では2018年9月に承認

➤ 患者由来ターゲット細胞

細胞	診断名
DLEU002	前駆B細胞急性リンパ性白血病
DLEU003	B細胞急性リンパ性白血病

➤ 細胞傷害性T細胞(CTL)



固相化フラスコ

抗CD3抗体

末梢血単球細胞
(PBMC)

IL-2含有培地

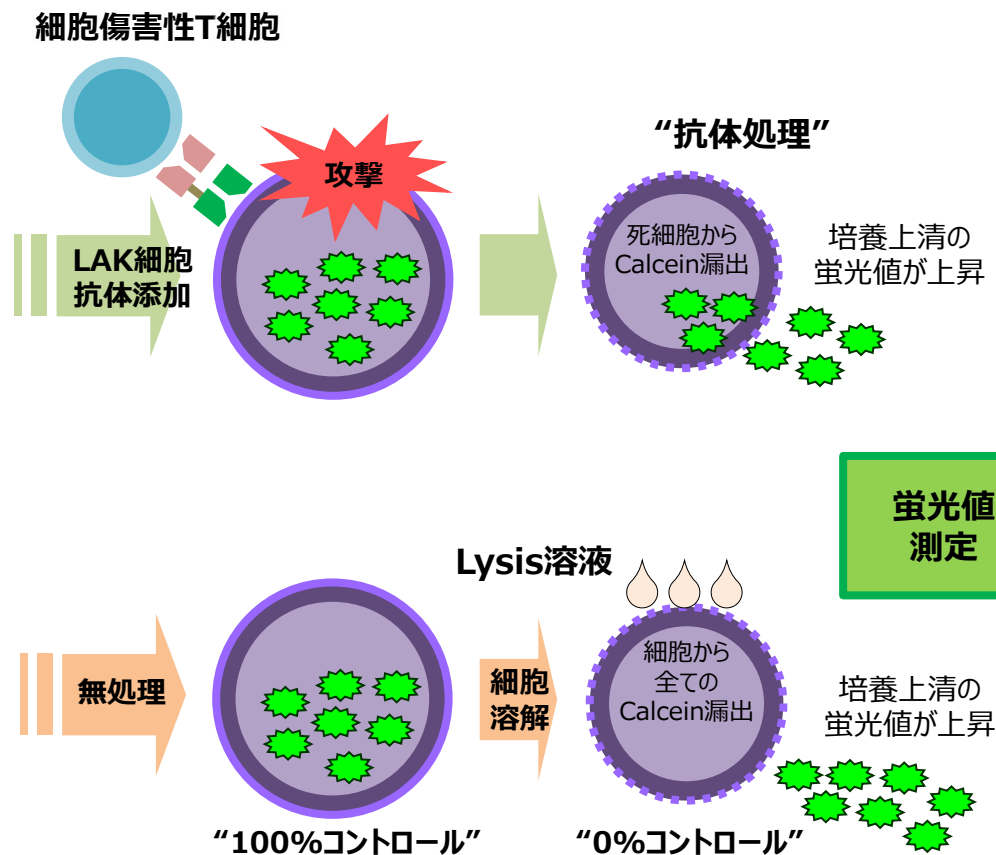
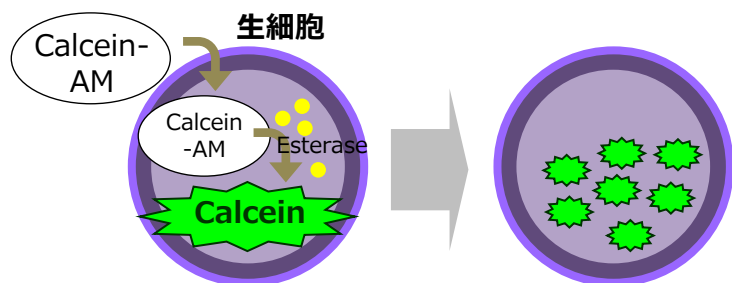
1週間程度
培養

拡大

二重特異性抗体の評価方法

評価方法

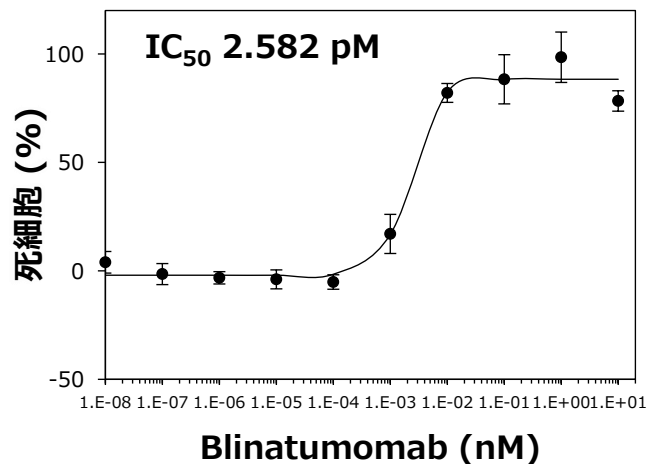
1. Calcein-AMによる生細胞蛍光染色
2. 細胞傷害性T細胞・抗体添加 (2 h)
3. 蛍光強度の測定、死細胞算出



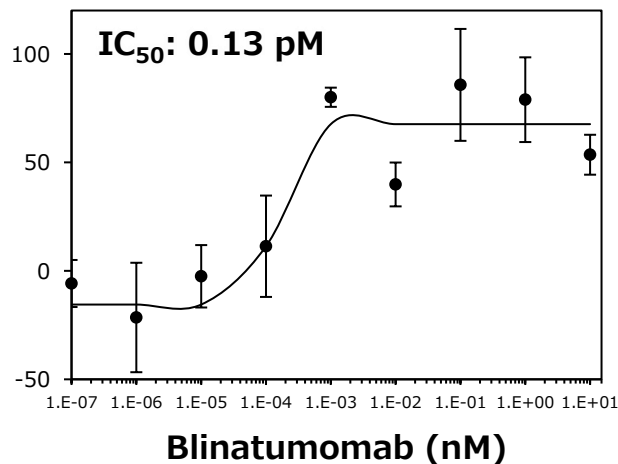
$$\text{死細胞 (\%)} = \frac{\text{「抗体処理」} - \text{「Effectorコントロール」} - \text{「100\%コントロール」}}{\text{「0\%コントロール」} - \text{「100\%コントロール」}}$$

二重特異性抗体Blinatumomabの評価結果

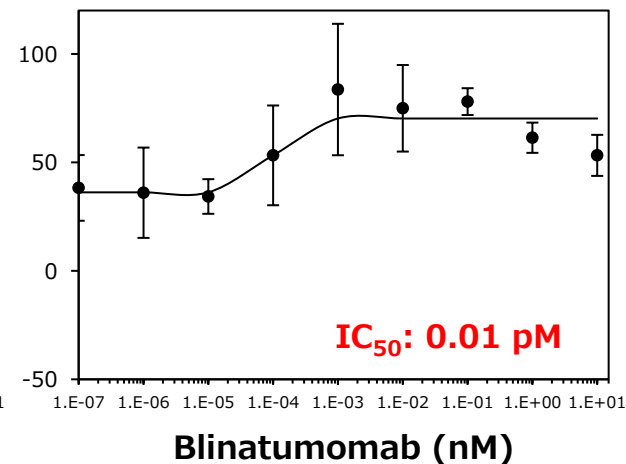
DLEU001



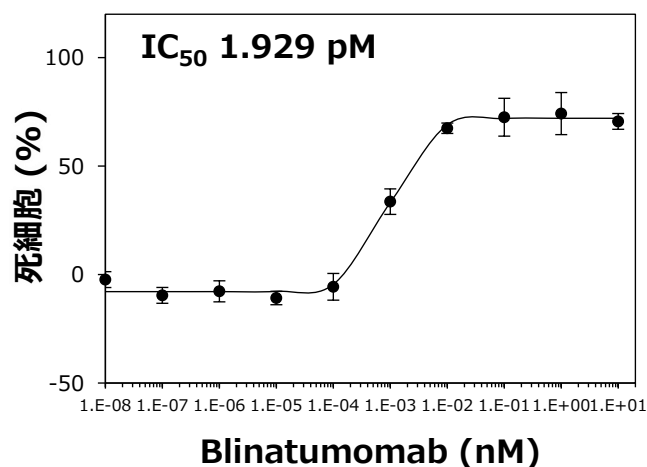
DLEU002



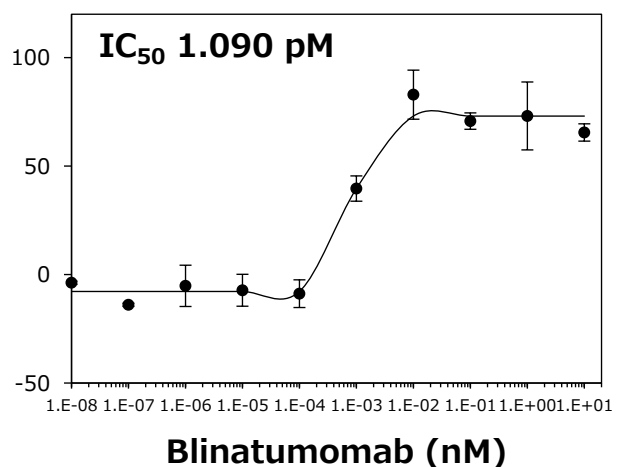
DLEU003



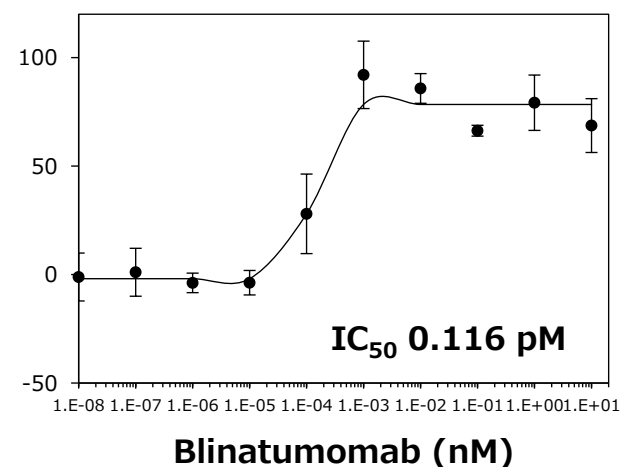
DLEU004



DLEU005



DLEU016



細胞傷害活性を確認

F-PDOを用いたアッセイの展開

個別化医療に対応した抗がん剤評価ツールの開発

<抗がん剤治療を取り巻く状況>

- ゲノム情報に基づく個別化医療の発展
- 遺伝子変異に基づく抗がん剤 (分子標的薬)の開発

希少変異が標的となる

- ・ALK融合遺伝子 (非小細胞肺癌患者の3-5%)
- ・ROS1融合遺伝子 (非小細胞肺癌患者の1-2%)
- ・IDH変異 ・HER2変異 ・EGFR二次変異

標的遺伝子変異を有するがん細胞評価モデル
(e.g. PDO, PDX, がん細胞) は限定されている

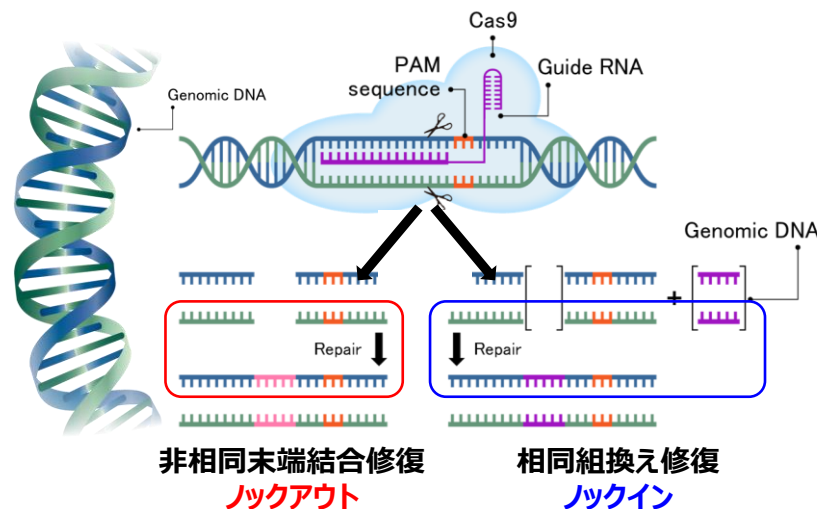
標的遺伝子変異に対する分子標的薬の
細胞レベルでの評価が不可能

ゲノム編集技術によるF-PDOの改変

F-PDO: がん組織の状態を維持している培養細胞

分子標的薬の標的となる変異を人工的に導入し
(あるいは変異を正常に戻し)、ニーズに合ったがん
細胞モデルを創出する

CRISPR/Cas9システムによるゲノム編集の概要



解決手段

優位点

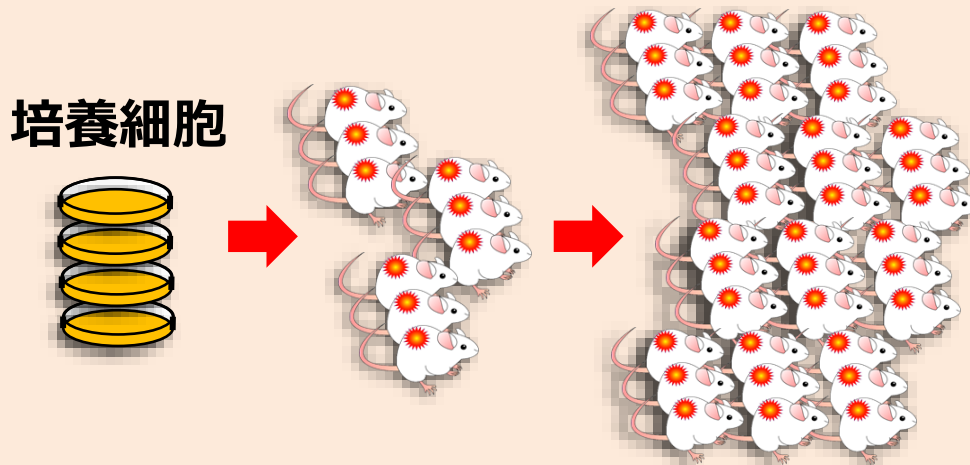
- ◆ ゲノム配列データ／遺伝子発現データが取得済みなので変異導入による影響を評価可能
- ◆ Xenograftモデル評価への展開も可能

F-PDOを用いたPDXモデル

臨床組織を用いたPDXモデルの場合



F-PDOを用いたPDXモデルの場合



【 F-PDO 】

- がん組織の性質に近い
- ◎ すぐに大量供給が可能
- ◎ がん細胞が占める

F-PDOはPDXモデルの作製可能

F-PDOを用いた受託研究の要望

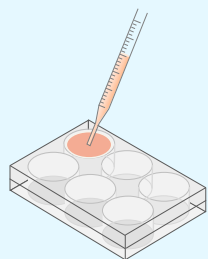
- 抗がん剤が効果なかった患者の細胞が欲しい
- ターゲットの遺伝子の発現が確認できており、かつ、抗がん剤が効かない細胞
- 元の病理組織が欲しい
- 患者背景データ(組織型、ステージ、治療歴)が欲しい
- 細胞を購入したい
- 細胞を移植した担がんマウスで評価をしたい

対応不可能な要望もあるが、できる限り対応

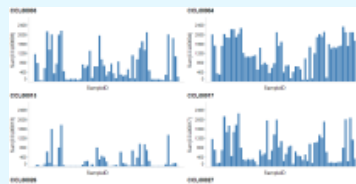
ご興味のある皆様
取得データの提供、受託解析を行います。

医療-産業TRセンターホームページ

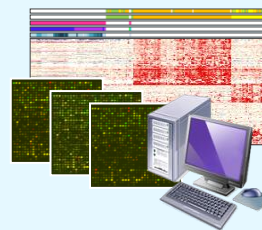
<http://www.fmu.ac.jp/home/trc/>



感受性試験



各種解析



リファレンス
データベース

一般財団法人 福島医大トランスレーショナルリサーチ機構
技術移転部 (tlo@ftrf.jp)