

PDC の 3 次元培養法の 構築及び薬効評価の検討



mediford
A Member of PHC Group

メディフォード株式会社
熊本研究所 薬理研究部

背景

非臨床試験を経て抗がん剤が申請に至るまでの確率は
5%しかない[1, 2]

- 従来の抗がん剤の*in vitro* 薬効評価方法

- ① 細胞バンクより入手したがん細胞株を使用

→ 遺伝子発現パターンが臨床がんとはがん細胞株で異なる。[3, 4]

- ② 2次元培養下で評価

→ 臨床がんとは2次元培養下のがん細胞の構造が異なる。[5, 6]



臨床がんに近い構造をもつ *in vitro* の薬効評価系の構築が求められている。

目的

胃がんPDCを用いた3次元培養法による
抗がん剤の薬効評価系の立ち上げ

実験1

PDCを用いた3次元培養法（スフェロイド培養）の条件検討

実験2

3次元培養PDCによる抗がん剤の薬効評価

PDC及び3次元培養法の概要と利点

Patient-Derived Cell Line (PDC)^[7, 8]とは？

がん患者の腹水より回収した細胞株



従来の細胞株より臨床がん検体の状態に近いため、
抗がん剤の薬効の臨床予測性を上げることが
期待される。

PDC及び3次元培養法の概要と利点

3次元培養法(スフェロイドの培養)^[1,9]とは？

- 細胞が立体的に配置された培養法
- **スフェロイド**：
細胞外基質なしで細胞同士が結合して形成された
3次元の構造体
- **3次元培養下細胞の構造(スフェロイド)**：
2次元培養下の構造(単層)より臨床がんに近い構造
 - ✓ 栄養，酸素，抗がん剤等の浸透する割合は，スフェロイドの表面と内部で異なる．
 - ✓ 抗がん剤がスフェロイドの内部の細胞まで浸透しにくいため，2次元培養法より3次元培養法で抗がん剤に対する抵抗性が上がるという報告がある．

実験1 目的

実験 1

PDCを用いた3次元培養法（スフェロイド培養）の条件検討

実験 2

3次元培養**PDC**による抗がん剤の薬効評価

試験方法

● 実施内容

細胞低吸着96ウェルプレートに胃がんPDCを播種した。
細胞播種日をDay 0として、Day 4, 7, 11および14に細胞数の指標として細胞内のATPを測定した。

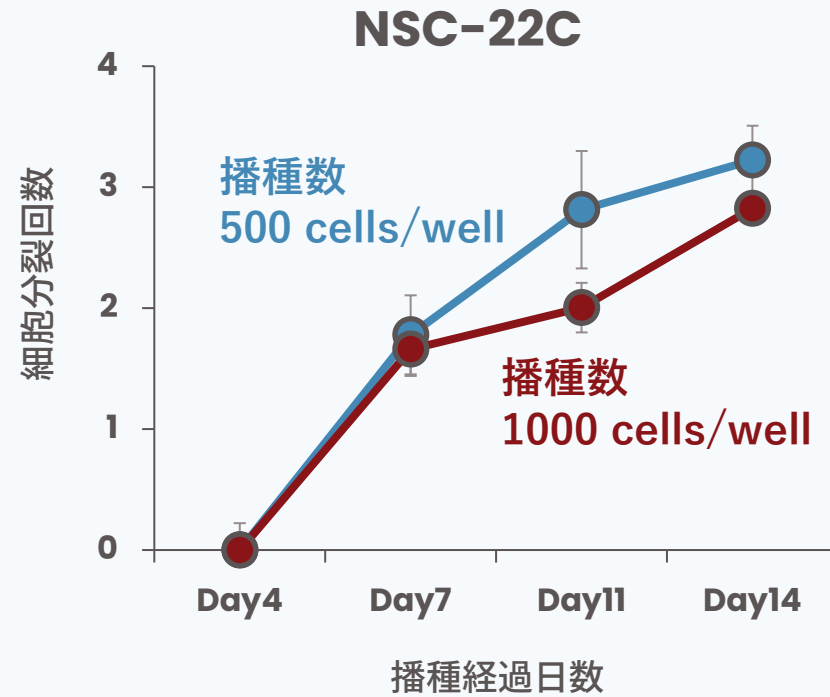
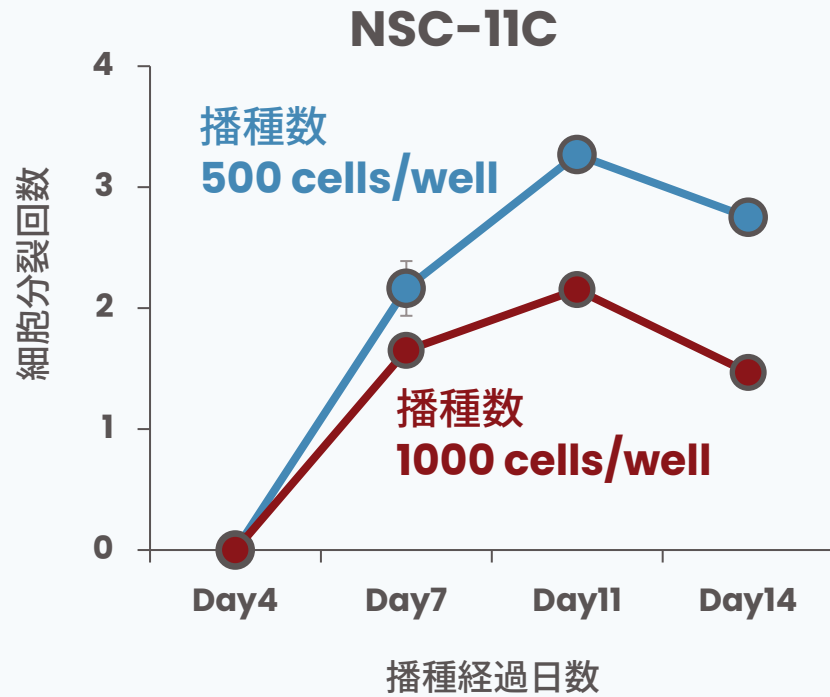
● 試験スケジュール



● 試験条件

- 胃がんPDC： NSC-11C, NSC-22C
(国立がん研究センターより入手)
- 播種細胞数： 500, 1000 cells/well
- 96ウェルプレート： Prime Surface (住友ベークライト株式会社)
- ATP測定： CellTiter-Glo 3D Cell Viability Assay
(Promega Corporation)

試験結果



平均値±標準偏差 (n=3)

$$\text{細胞分裂回数} = \text{Log}_2 \left\{ \frac{(D-B)}{(D_4-B_4)} \right\}$$

- D : 各サンプルの発光強度
- B : ブランク (培地のみ) の発光強度
- D₄ : Day 4の発光強度の平均値
- B₄ : Day 4のブランクの発光強度

実験1 まとめ

細胞増殖阻害の抗がん剤の至適処理期間を決定
▶ 細胞が複数回分裂する日数から選択した。

Day 4 から Day 11の期間で，**NSC-11C** 及び **NSC-22C**
いずれも 2 回以上の細胞分裂が認められた。
(播種細胞数：500 cells/wellの場合)

実験 2 では培養期間のエンドポイントを
Day 11に決定し，胃がん**PDC**の 3 次元培養法
による抗がん剤添加試験を実施した。

実験2 目的

実験 1

PDCを用いた3次元培養法（スフェロイド培養）の条件検討

実験 2

3次元培養PDCによる抗がん剤の薬効評価

試験方法

● 実施内容

細胞低吸着96ウェルプレートに播種した胃癌PDCにDay 4及びDay 7で抗がん剤を添加し，Day 11に細胞内のATPを測定し，細胞生存率を算出した。

● 試験スケジュール



試験方法

● 試験条件

抗がん剤

✓ ドセタキセル

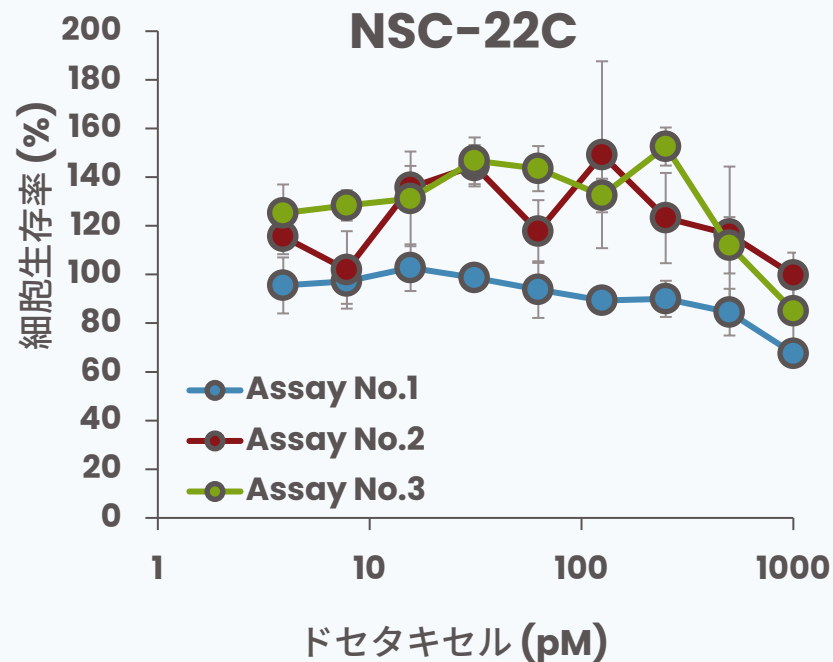
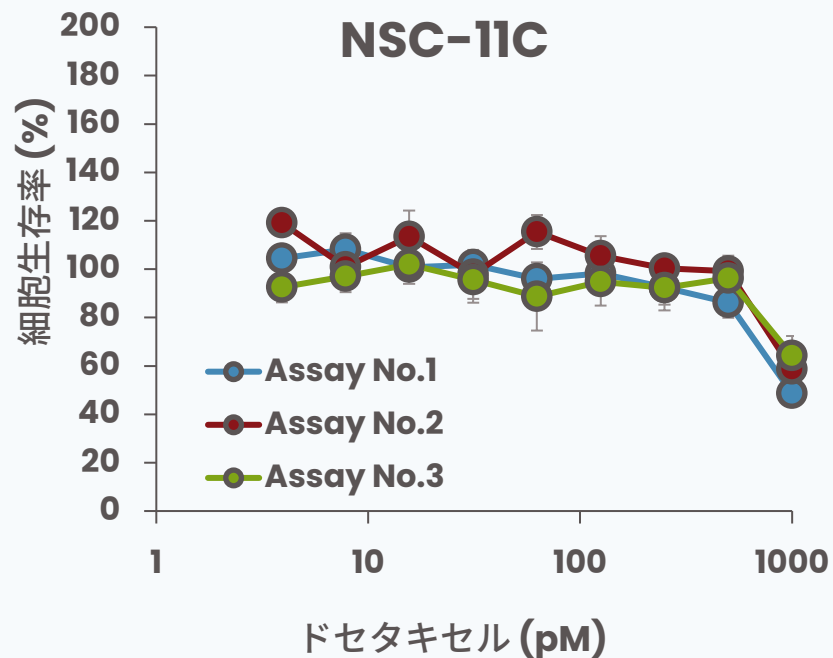
ドセタキセルに対するヒト胃がん細胞株の細胞生存率は3次元培養法で上がるという報告がある。 [10]

✓ シスプラチン

シスプラチンに対するヒト胃がん細胞株の細胞生存率は3次元培養法と2次元培養法で変わる報告と変わらない報告がある。 [11, 12]

- 胃がんPDC： NSC-11C, NSC-22C
(国立がん研究センターより入手)
- 播種細胞数： 500 cells/well
- 96ウェルプレート： Prime Surface
(住友ベークライト株式会社)
- ATP測定： CellTiter-Glo 3D Cell Viability Assay
(Promega Corporation)

試験結果：ドセタキセル



平均値±標準偏差 (n=3)

$$\text{細胞生存率 (\%)} = 100 \times (T - B) / (C - B)$$

T: 各サンプルの発光強度

B: ブランクの発光強度

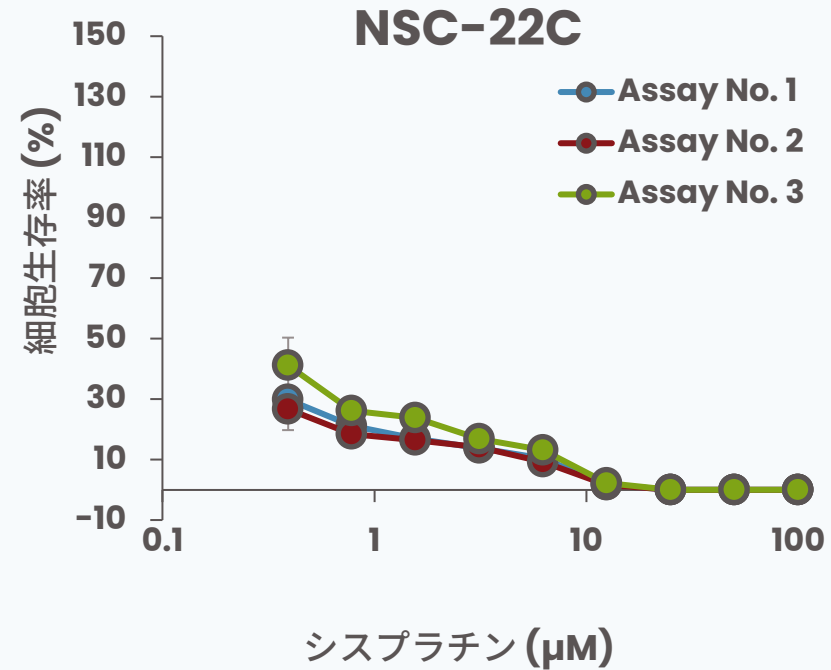
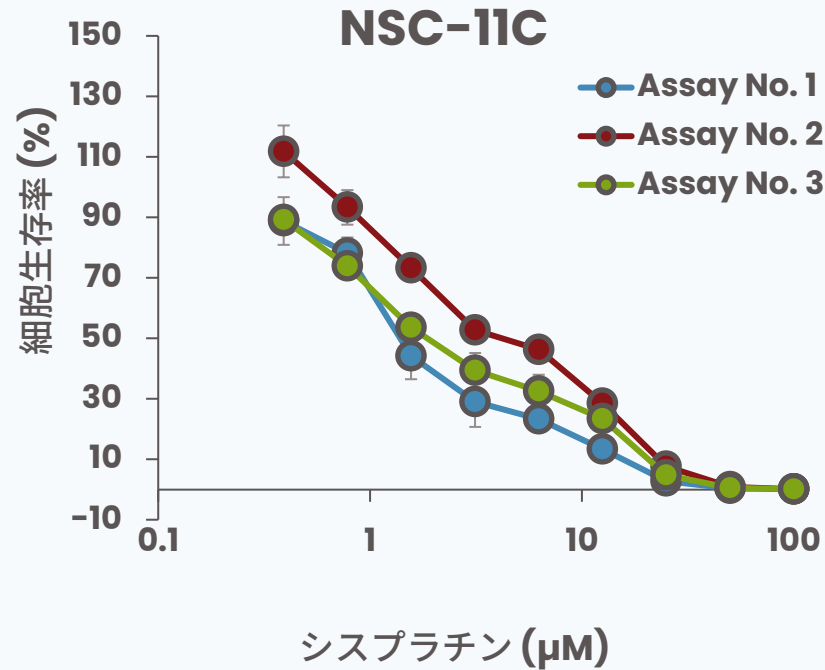
C: コントロールの発光強度

IC ₅₀	ドセタキセル	
	2D*1	3D
NSC-11C	29.1 pM	NC *2
NSC-22C	36.9 pM	NC *2

*1: 第79回日本癌学会学術総会にて発表

*2: NC: Not Calculated

試験結果：シスプラチン



平均値±標準偏差 (n=3)

$$\text{細胞生存率 (\%)} = 100 \times (T - B) / (C - B)$$

T: 各サンプルの発光強度

B: ブランクの発光強度

C: コントロールの発光強度

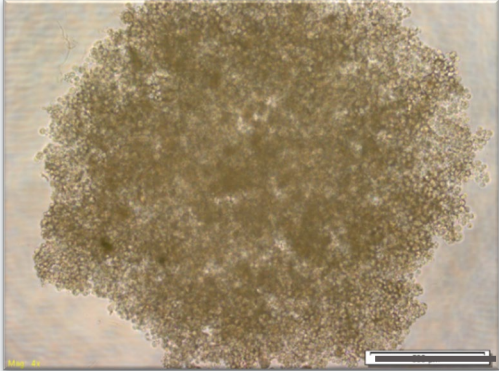
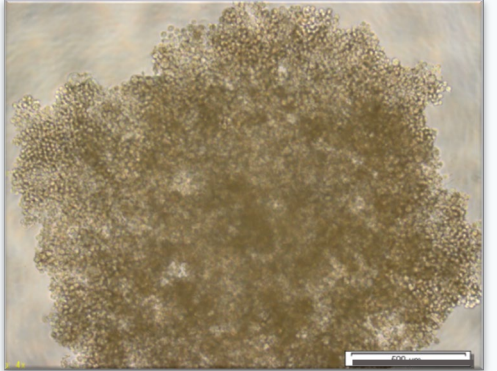
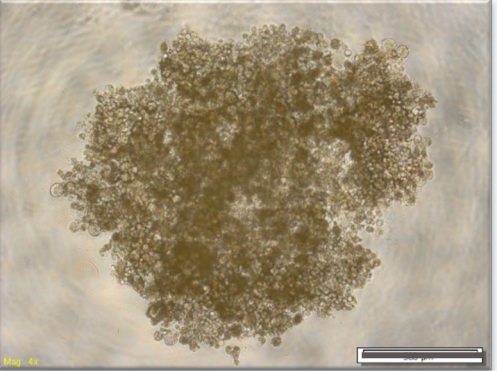
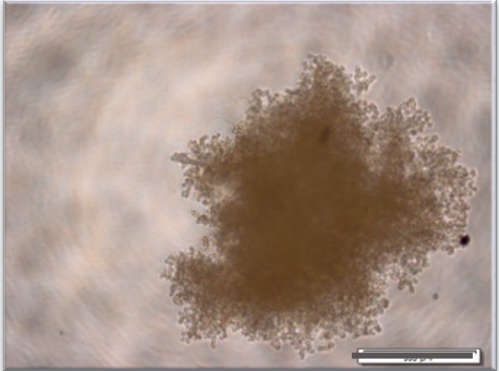
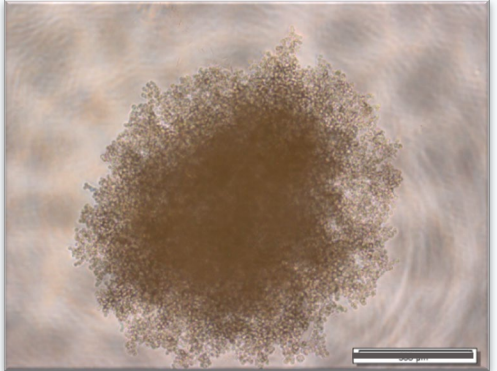
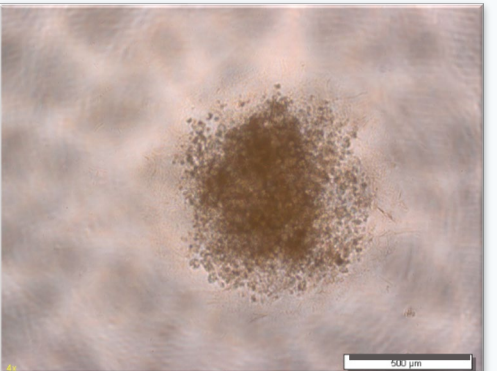
IC ₅₀	シスプラチン	
	2D*1	3D
NSC-11C	0.8 μM	0.7 μM
NSC-22C	0.5 μM	-*2

*1: 第79回日本癌学会学術総会にて発表

*2: 全濃度の細胞生存率が50%以下であったため、IC50を算出しなかった。

胃がんPDCの顕微鏡画像

IC₅₀付近の抗がん剤の濃度とコントロールのスフェロイドの大きさの比較

	コントロール	ドセタキセル 62.5 pM*1	シスプラチン 1.56 μM*2
NSC-11C			
NSC-22C			

スケールバー：500 μm

*1：2次元培養法のIC₅₀付近のドセタキセルの濃度
*2：3次元培養法のIC₅₀付近のシスプラチンの濃度

実験2 まとめ

抗がん剤	細胞生存率の低下に必要な 抗がん剤の濃度
ドセタキセル	3次元培養法 > 2次元培養法
シスプラチン	3次元培養法 ≒ 2次元培養法



3次元培養法では胃がんPDCに対する
抗がん剤の効果に違いがみられる。

総 括

- 胃がんPDCの3次元培養法の試験条件を決定
- 3次元培養法の胃がんPDCに対する抗がん剤の薬効評価法を確立

必要に応じて、
各種PDCでの検討は可能です。

参考文献

- [1] Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G. Three-dimensional cell culture: A breakthrough in vivo. *International Journal of Molecular Sciences* 2015; 16(3): 5517-5527
- [2] Genta S, Cobum B, Cescon DW, Spreafico A. Patient-derived cancer models: Valuable platforms for anticancer drug testing. *Frontiers in Oncology* 2022; 12: 976065
- [3] Niu N, Wang L. In vitro human cell line models to predict clinical response to anticancer drugs. *Pharmacogenomics* 2015; 16(3): 273-285
- [4] Zeeberg BR, Kohn WK, Kahn A, Larionov V, Weinstein JN, Reinhold W, Pommier Y. Concordance of gene expression and functional correlation patterns across the NCI-60 cell lines and the Cancer Genome Atlas glioblastoma samples. *Plos One* 2012; 7(7): e40062
- [5] Nath S, Devi GR. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacol & Therapeutics* 2016; 163: 94-108
- [6] Weisward LB, Bellet D, Dangles-Marie V. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia* 2015; 17(1): 1-15
- [7] Tanaka Y, Chiwaki F, Kojima S, Kawazu M, Komatsu M, Ueno T, Inoue S, Sekine S, Matsusaki K, Matsushita H, Boku N, Kanai Y, Yatabe Y, Sasaki H, Mano H. Multi-omic profiling of peritoneal metastases in gastric cancer identifies molecular subtype and therapeutic vulnerabilities. *Nature Cancer* 2021; 2(9): 962-977
- [8] Kitayama J, Ishigami H, Yamaguchi H, Sakuma Y, Horie H, Hosoya Y, Kawarai LA, Sata N. Treatment of patients with peritoneal metastases from gastric cancer. *Annals of Gastroenterological Surgery* 2018; 2(2):116-123
- [9] Perche F, Torchilin VP. Cancer cell spheroids as a model to evaluate chemotherapy protocols. *Cancer Biology & Therapy* 2012; 13(12): 1205-1213
- [10] Hajimoradi M, Mohammad Hassan Z, Ebrahimi M, Soleimani M, Bakhshi M, Firouzi J, Samani FS. STAT3 is overactivated in gastric cancer stem-like cells. *Cell Journal* 2016; 17(4): 617-628
- [11] To HTN, Le QA, Bui HTT, Park JH, Kang D. Modulation of Spheroid Forming Capacity and TRAIL Sensitivity by KLF4 and Nanog in Gastric Cancer Cells. *Current Issues in Molecular Biology* 2022; 45(1):233-248
- [12] Yoon C, Park DJ, Schmidt B, Thomas NJ, Lee HJ, Kim TS, Janjigian YY, Cohen DJ, Yoon SS. CD44 expression denotes a subpopulation of gastric cancer cells in which Hedgehog signaling promotes chemotherapy resistance. *Clinical Cancer Research* 2014; 20 (15):3974-3988

お問い合わせ



私たちだから、できることがある。

Webお問い合わせ / 資料請求



<https://www.mediford.com>