

質問者	質問	講師の回答
加藤大貴先生	<p style="text-align: center;"><b>オルガノイド培養法を用いた犬原発性肺腫瘍に対する抗がん剤治療の検討 佐藤 よもぎ 先生</b></p> <p>東京大学獣医外科の加藤です。興味深いご発表ありがとうございました。・今回、オルガノイドと二次元培養法を比較されていましたが、培養の成功率やその後の細胞増殖速度、また、抗がん剤・分子標的薬に対する生存率アッセイへの適用の容易さなどにおいて、双方の培養法はどのように違い、どちらが優れているのでしょうか。</p>	<p>加藤先生、ご質問ありがとうございます。 スライド発表の内容からはやや不明瞭であったかもしれませんので、改めてお伝えさせていただきますのですが、今回用いた二次元細胞は一度オルガノイド培養を行ったものから、継代時に改めて平面培地に播種し二次元細胞として培養したものであり、腫瘍組織から直接培養したものではありません。 ご質問に対して回答になりますが、今回比較した肺腫瘍細胞は比較的培養当初からの細胞増殖力が高く、オルガノイドと二次元細胞で顕著な増殖力の差は見られませんでした。ただし経時的な細胞数の計測はしていないので正確な増殖速度などはお答えできません。今回示した検体以外も含めると、オルガノイドの継代培養に伴い急速な増殖速度の低下を認めるものもあり、安定的な増殖維持に関しては継代のタイミングや適切な培養サプリメント、細胞播種密度などに二次元細胞より繊細な注意が必要となる印象を持っています。一方で二次元細胞は継代に伴う増殖速度の変化はあまり見られませんでした。培養皿に細胞を播種して数日は個々の細胞が離れているためか増殖速度がやや遅く、細胞同士が接着し始めると同時に急速な増殖が見られる印象がありました。またオルガノイド培養法のメリットとして、二次元培養では増殖しにくい未分化な細胞増殖をサポートできることだと思います。そのため二次元細胞と三次元細胞での構成細胞に差が見られる可能性も示唆され、より生体内の多様な腫瘍環境における薬剤感受性を反映できると考えています。ただし他のがんオルガノイドの研究も踏まえますと、同一個体由来の細胞であればオルガノイドと二次元細胞で薬剤感受性結果は比較的類似した傾向となっておりますので、二次元で増殖しやすい場合には二次元培養の方が各種アッセイに適していると考えられます。 個人的な印象としては、薬剤処置の際の「均一な播種しやすさ」や「同検体の同一薬剤に対する細胞生存率のばらつき」などを考慮すると、増殖力が十分に高い場合はオルガノイドの方が二次元細胞よりも検査に供しやすいと思われました。</p>

質問者	質問	講師の回答
<b>オルガノイド培養法を用いた犬原発性肺腫瘍に対する抗がん剤治療の検討 佐藤 よもぎ 先生</b>		
橋本直幸先生	<p>貴重なご発表ありがとうございます。一般的に、オルガノイド・二次元細胞培養それぞれに関して、薬剤感受性試験を実施するまでに何継代しているのでしょうか？その結果が得られるまでの期間も教えていただくとありがたいです。また、マウス移植モデルに対して抗がん剤感受性試験を実施した場合、Vitroと同じような結果になるのでしょうか。</p>	<p>橋本先生、ご質問ありがとうございます。</p> <p>今回作製したオルガノイドおよび二次元培養細胞は比較的初期の培養速度が速く良好な細胞増殖を認めため、薬剤感受性試験を実施するまでに1～2継代での実施が可能でした。培養初日から1～2週間程度で薬剤感受性結果を得ることが可能な場合が多いですが、継代後に増殖速度が低下するものなども認められ、薬剤の種類も9種類と多かったためにさらに日数がかかることもあります。また今回実施したマウス移植モデルに関しては、現状ではマウスに対する抗がん剤投与ができていないこともあり、in vitroでの結果との相関は言及できませんが、今後実施したいと考えている部分ではありますので、結果に期待したいと思います。</p> <p>ご参考までに同研究室における他種のがんオルガノイドの研究を踏まえますと、薬剤感受性にかかる継代数として、オルガノイドは1～2継代、オルガノイドから作製した二次元細胞培養も同様に1～2継代となっていました。結果を得るまでの期間としては大体1～4週間程度となっています。</p> <p>さらに移行上皮癌のオルガノイドではマウス移植モデルでビンブラスチン製剤や分子標的薬を投与した結果、in vitroと同様の結果が得られていました。</p>
前田真吾先生	<p>貴研究室で以前発表されていた尿路上皮癌では尿から腫瘍細胞が得られたため採材が容易でしたが、今回の肺腫瘍の場合は外科手術を行わないと採材ができないところが個別化医療への応用として大きなハードルなのではないかと思いました。その点について何かアイデアや解決策がありましたら教えてください。</p>	<p>前田先生、ご質問ありがとうございます。</p> <p>事務局の方々も代行していただきありがとうございます。</p> <p>ご指摘いただいたように今回の肺腫瘍サンプルはいずれも肺葉切除により摘出された腫瘍を用いており、原発性肺腫瘍と確定診断を受けたものを対象といたしました。もし開胸手術による肺葉切除が困難・希望されないという場合は、代替案として確定診断の際に採材した腫瘍細胞の一部を培養に供することで薬剤感受性検査を実施することは可能かもしれません。その場合は経皮的な針生検による腫瘍細胞の採取やがん性胸水が認められる場合はその貯留液からの細胞培養が可能です。ただし気胸などを伴うリスクもあることや培養に適した量の採材が困難である可能性も考えられますので、ご担当医の判断にゆだねる形となります。今後はそのような場合の症例のためにも、血清中マーカーと抗がん剤感受性との関連も視野に含めた治療薬の提案ができればと思っております。</p>

質問者	質問	講師の回答
<b>犬前立腺癌細胞株を用いた新たな分子標的治療の探索 青木 督 先生</b>		
前田真吾先生	各薬剤の有効性を担癌モデルマウスでは検討する予定はありますか？ BRAF阻害剤も抗HER2抗体薬もin vitroではあまり効果がなさそうですが、どちらもin vivoでは効く可能性があるかと僕は考えていますが、そのような考察はありますか？	ご質問ありがとうございます。 本研究においては細胞株に対して抗体薬・薬剤を反応させただけであり、実際の生体における腫瘍微小環境の要因は関与していません。 抗体薬においては今回の実験ではトラスツズマブではHER2受容体のシグナル阻害のみが反映された結果であり、トラスツズマブエムタシンではそれに加えて微小管重合阻害作用が反映された結果になります。生体ではさらに免疫細胞が関与したADCC活性なども関与し、さらなる効果が期待されます。しかし、今回樹立した細胞株を使用する場合、ヌードマウスでは免疫細胞の相互作用が期待できません。現在、その評価のための手法を検討中です。 BRAF阻害剤においては、MAPK経路の活性化とCOX-2、VEGFの過剰発現の関連が認められているため少なくともCOX-2阻害剤と同様の効果が期待されます。COX-2阻害による抗腫瘍効果の作用機序は不明な部分が多いため予想の範疇を超えませんが、BRAF阻害剤も免疫細胞や腫瘍微小環境への働きにより抗腫瘍効果が認められる可能性があります。 青木 督
<b>犬尿路上皮癌に対するプロテアソームを標的とした分子標的治療の検証 小寺 優佳 先生</b>		
前田真吾先生	おもしろかったです。最初の薬剤スクリーニングでは効果がみられたHDAC阻害剤がその後の細胞増殖アッセイではあまり有効でなかった矛盾点についてはどのように考えていますか？ プロテアソーム阻害剤がTCCに効くメカニズムはどのような可能性がありますか？	演者に回答依頼中で、回答をいただけたら追加掲載いたします。
ごろろ先生	感想 貴重な研究発表をありがとうございます。臨床応用できる日を待ち望んでおります！	コメントは演者にお伝えしました。

質問者	質問	講師の回答
<b>術後にオーダーメイド化学療法を実施した前立腺癌の犬の1例 池田 雄太 先生</b>		
加藤大貴先生	<p>東京大学獣医外科の加藤です。素晴らしいご発表ありがとうございます。4種の抗がん剤の増殖アッセイにて、いずれの抗がん剤においても、低濃度帯において、増殖促進効果があるような結果に見えました。これはアッセイ系のアーチファクトなののでしょうか。または、実際に増殖促進効果があるのであれば、これは本症例検体特異的なものなのか、一般的な現象なのか教えていただけますでしょうか。</p>	<p>今回の検査において、低濃度帯にて増殖促進するような結果が見られたかと思いますが、低濃度の抗がん剤曝露時、細胞増殖が上がるのがin vitroの試験で症例によっては特異的に認められるため、今回の前立腺がん症例についても同様のことが考えられます。 (共同発表者：山本晴)</p>
橋本直幸先生	<p>貴重な症例報告をありがとうございます。丁寧な診断と適切な治療により経過がよく、すごいと思いました。抗がん剤感受性検査の結果を見せていただいて、いずれも△という結果だったので、自分だったら何を選んでよいかかわからないと思いました。生体内での実際に期待される濃度と培養液中の濃度はまた違うと思いますし、この判断として、換算できる計算式みたいなものはあるのでしょうか？（この投与量がおおよそ培養液中のこの濃度、みたいな）あるいは、検査会社の先生と相談したりして決めたのでしょうか。新しい検査で大変興味深いと思いました。</p>	<p>ご質問ありがとうございます。生体内での濃度は報告があり、今回ですとビンブラスチンはIn vitroでは 0.01 –10 nM 処置だそうで、生体では11kgの犬で体表面積 0.5m<sup>2</sup>、ビンブラスチン2mg/m<sup>2</sup>=投与量 1 mg →血中C<sub>max</sub> は50 ng/ml くらい →約45 nM ( 10nM =9.09ng/ml だそうです。)今回ビンブラスチンは4.28nMでIC50が得られており、実際の投与量である2~2.5mg/m<sup>2</sup>で十分な血中濃度が得られていたこととなります。その他の薬剤との抑制効果に大きな差は認められませんでした。ビンブラスチンが最も低濃度で抑制できていたので、ビンブラスチンを選択しました。これらの血中濃度などの表は検査会社であるエアデック miniからもらうことができます。 (動物がんクリニック東京 池田雄太)</p>
感想	<p>前立腺癌を外科的に切除することは自分の中ではご提案できない選択肢だったので非常に勉強になりました。 ありがとうございます。 オーダーメイド化学療法もすぐに試してみたいと思います！</p>	コメントの為回答なし

質問者	質問	講師の回答
加藤大貴先生	<p>東京大学獣医外科の加藤です。興味深いご発表ありがとうございました。</p> <p>1) 今回、猫の乳腺腫瘍におけるオルガノイド培養法を樹立されたとのことですが、犬や人の乳腺腫瘍におけるオルガノイド培養法との相違点や共通点があれば教えてください。</p> <p>2) オルガノイド培養には、特殊な培養液を用いているとのことですが、その培養液の影響により、殺細胞性抗がん剤や分子標的薬添加時の細胞生存率を過大または過小に評価してしまう可能性はあるのでしょうか。</p>	<p>加藤先生、ご質問ありがとうございました。</p> <p>1) 犬や人の固形癌においてもオルガノイド培養を行うことは可能です。今回の猫の乳腺腫瘍オルガノイドと同様に、マトリゲルと組織を混合し培養を行うことで上皮組織由来のオルガノイドを作製し、構造を再現することができます。これまでのオルガノイド培養では、悪性度が高い腫瘍においてよく増殖・成長する傾向を観察しております。そのため、人間と比較すると動物では悪性度の高い腫瘍が多いことから、動物の腫瘍症例の方が増殖スピードが速いという点が相違点にあげられるかと思えます。</p> <p>2) 細胞生存率の増殖アッセイ系では、コントロールとして細胞に対して培養液のみ処置し抗がん剤の添加を行わない対照を設けており、細胞生存率はそれを差し引く形で測定を行っております。そのため、培養液によって生じる細胞の増殖等の影響は除外しうると考えております。</p> <p>【回答を受けて、加藤大貴先生よりご返信がありました。】 ご回答いただきありがとうございます。今後の成果を楽しみにしております。</p>
澤琴美先生	<p>山本先生貴重なご発表ありがとうございます。</p> <p>ドキシソルビシンとカルボプラチンの実際に症例に使用した薬用量はどれくらいだったのでしょうか？ オルガノイド培養法を使用した結果から、比較的低用量で感受性が高いという結果の場合、一般的（教科書的）な薬用量を症例に投与することが推奨されるのでしょうか？教えてください。</p>	<p>澤先生 お世話になっております。ご質問ありがとうございました。</p> <p>今回ご紹介させていただいた2症例について、実際に投与を行った薬剤はカルボプラチン・ゲムシタビンとなります。ゲムシタビンについては、100~200mg/m<sup>2</sup>、カルボプラチンについては投与を行ったという予後調査のみいただいており現時点では濃度の確認ができておりません。恐れ入ります。</p> <p>本抗がん剤感受性検査にて、低用量にて感受性が比較的高いという結果が得られた場合、一般的な投与量をおすすめしております。この感受性検査については、主に腫瘍に対する抗がん剤の効果を評価するというのがメインとなっております。なお、検査で扱っている試験濃度は各薬剤のC<sub>max</sub>等を参考に設定しております。</p>

質問者	質問	講師の回答
前田真吾先生	<p style="text-align: center;"><b>微小管重合阻害薬とBRD4阻害薬の併用による新規がん化学療法の開発 栃内 亮太 先生</b></p> <p>今回の担癌マウスモデルでは心筋障害については検討しているのでしょうか？心臓の病理組織などのデータがありましたら教えてください。</p>	<p>大変貴重なご指摘をいただきありがとうございます。薬効用量で心筋障害を検討することは重要であると存じます。しかしながら、今回、担癌マウスでの心筋障害については検討を行っておりません。なぜかと申しますと、経験的に、臨床でみられる微小管重合阻害薬誘発性の心筋障害をマウスではなかなか再現できないからです。実験に用いる動物種が大きなものになると心筋障害が顕著になっていくので、ある程度の心臓の大きさがないと毒性が顕在化しないようです。血管痙攣に対する耐性に種差があるのだろうと想像はしていますが、その詳細は不明です。小型実験動物での心臓微小血流の観察は依然としてハードルが高く、解析手法が無いので、今後のイメージング技術などの進歩に期待して、今後の研究課題になればと考えています。抗がん剤の開発上で気を付ける必要があるのは、上記のことから、マウスで心毒性がなかったからといっても油断はならないことです。そのため、私たちは、今回ご報告しましたマウスの実験の次のステップとして、微小管重合阻害薬の心毒性を再現可能であることが確認されているラット（病理組織学的には、心臓微小血管内皮細胞のアポトーシス像や、水腫様変化、微小血管拡張、左心室壁の内層側の心筋細胞の変性・壊死が認められます）を用いた心毒性のリスク評価を行っています。その結果については近々に別の形でご報告できるかと存じます。</p>

\*学会のご質問はご氏名を記入いただきたいのですが、一部VETSCOPEシステムのニックネーム可を利用して質問投稿がされておりました。今後は、日本獣医がん学会では本名を記載の上、ご質問をいただくように統一させていただきますことをご了承ください。