

APPLICATION NOTE

 共焦点レーザー顕微鏡システム A1R/AX R
 画像解析ソフトウェアモジュール General Analysis

Organ-on-a-chipを用いた、 CAR-T細胞動態の共焦点イメージング

CAR-T(Chimeric Antigen receptor T)細胞療法による免疫効果の評価は、主に動物実験モデルにより行われているが、コストや時間がかかる事が課題である。本アプリケーションノートでは、AIM Biotech社製の3D細胞培養チップを用いてシンプルな3D免疫細胞傷害性アッセイモデルを構築し、*in vitro*イメージングによりT細胞の免疫効果を測定した例を紹介する。3Dアッセイモデルは、がん微小環境の条件やT細胞の調製など*in vitro*でのさまざまな条件検討を容易にし、目的に応じて多様にカスタマイズできることが特徴である。このアッセイにより、*in vitro*における細胞のより時空間的な動態 (spatiotemporal dynamics) を再現し、2Dモデルよりも生理学的な条件 (physiological condition) で、免疫細胞を介した殺傷性の観察と計測を行うことが可能である。

実験の概要

癌細胞に対するエフェクターT(CAR-T)細胞の殺傷効率を評価するために、AIM Biotech社製の3Dカルチャーチップ“idenTx9”を用いて腫瘍を模倣した微小環境を3次元的に構築し、共焦点顕微鏡を用いた観察と画像定量解析を行った(図1)。

今回使用したidenTx9チップは、3つの流体チャンネルで構成されている(図2A)。まずGFP標識した癌細胞をラット尾由来コラーゲンI型と混合して、中央のハイドロゲルチャンネルに播種した。ハイドロゲルが重合することにより、3つのチャンネルを区画化することができる(図2B左)。次にハイドロゲルチャンネルに隣接する培地チャンネルに、CAR-Tを加えた(図2B中央)。そして、癌細胞が存在するハイドロゲルチャンネルにCAR-Tが浸潤する様子を、時系列で観察した(図2B右)。

本実験では「癌細胞のみ」「癌細胞+CD133特異的CAR-T」「癌細胞+モック形質導入T細胞」の3グループのサンプルを作製し、それぞれ24時間後と120時間後で固定した。そして3Dの蛍光画像を用いて、CAR-Tの浸潤を評価し、癌細胞のアポトーシス誘導率を定量化した(図3, 4)。

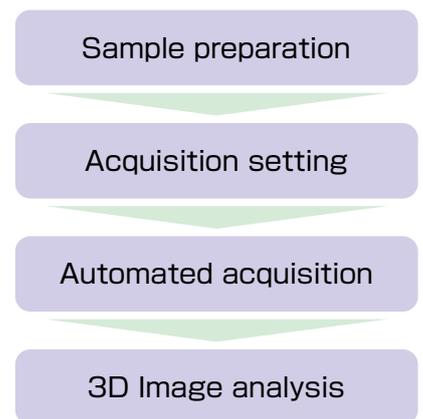


図 1. 実験ワークフロー

図2. idenTx9システムを使った3Dアッセイモデルの作成

(A) idenTx9システムの上上面図と断面図

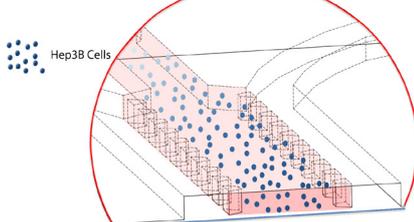
a: サイト, b: メディアチャンネル, c: ゲルチャンネル, d: メディアインレット, e: ゲルインレット, f: ポート, g: トラフ

(B) idenTx9システムを使ったサンプルの調整手順

癌細胞: GFP標識したHep3B細胞 (CD133陽性肝細胞癌)、
 エフェクターT細胞: mCherry標識したCD133特異的CAR-T細胞、
 コントロールエフェクター細胞: モック形質導入mCherry標識したT細胞、
 一次抗体: 抗切断型カスパーゼ3 (Asp175) 抗体; Cell Signaling Technology; Cat #9661、
 二次抗体: Goat anti-rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa 633; ThermoFisher; Cat # A-21071

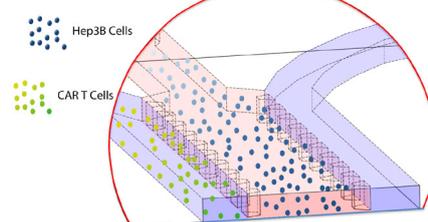
B

a



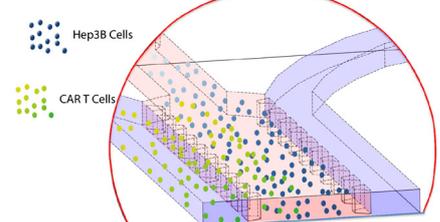
I型コラーゲンゲルにHep3B細胞を混合して播種

b



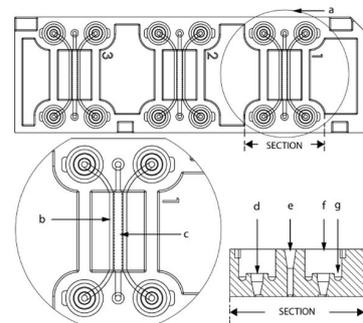
メディアチャンネルにCAR-Tをロード

c



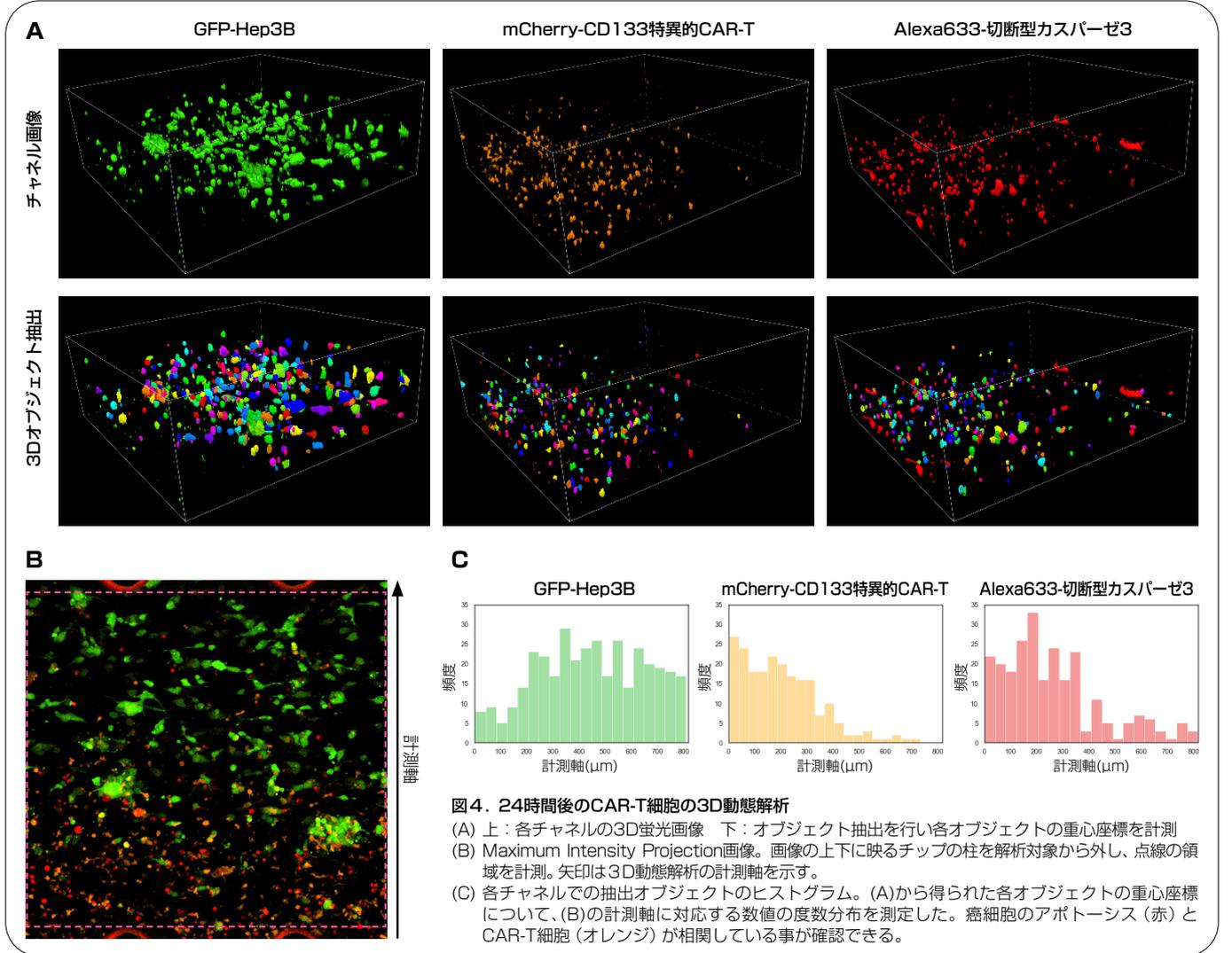
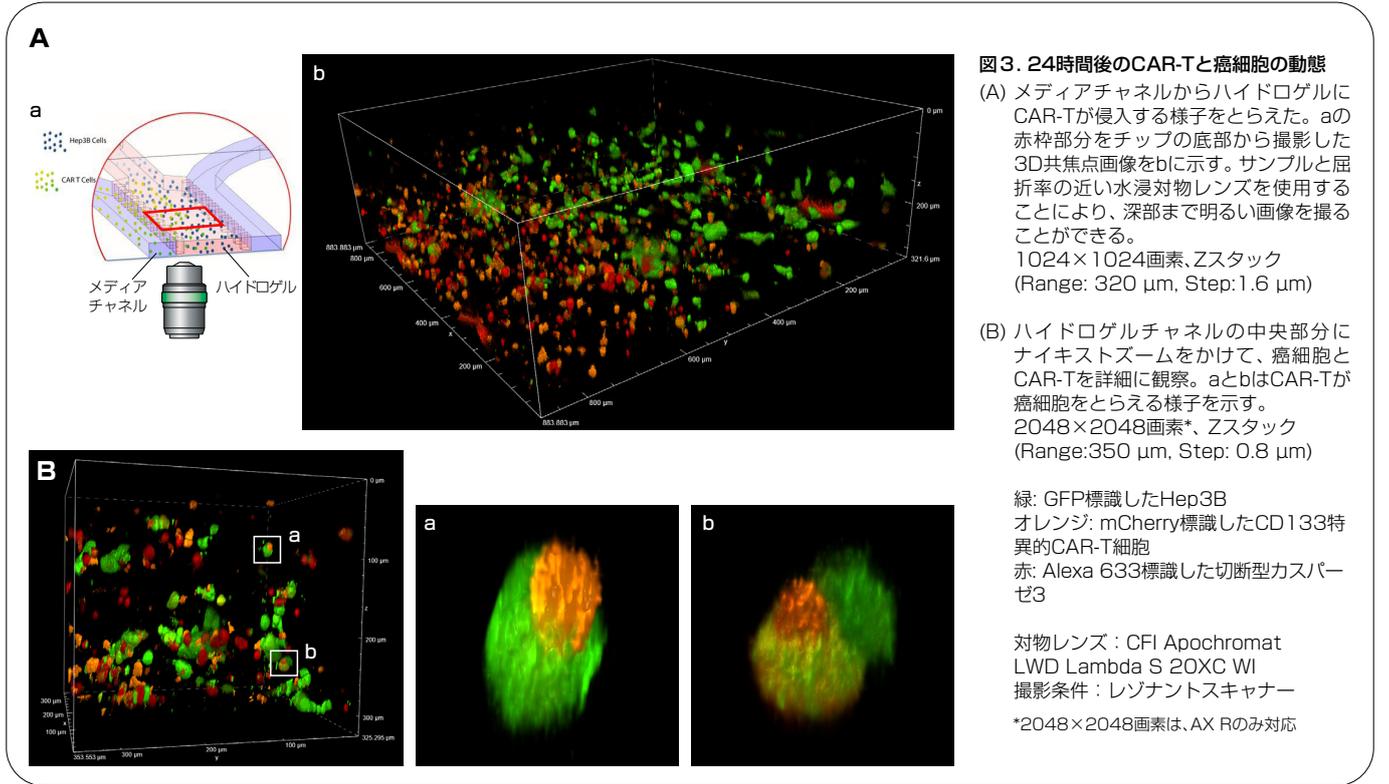
CAR-Tの浸潤と癌細胞に対する殺傷能力を観察

A



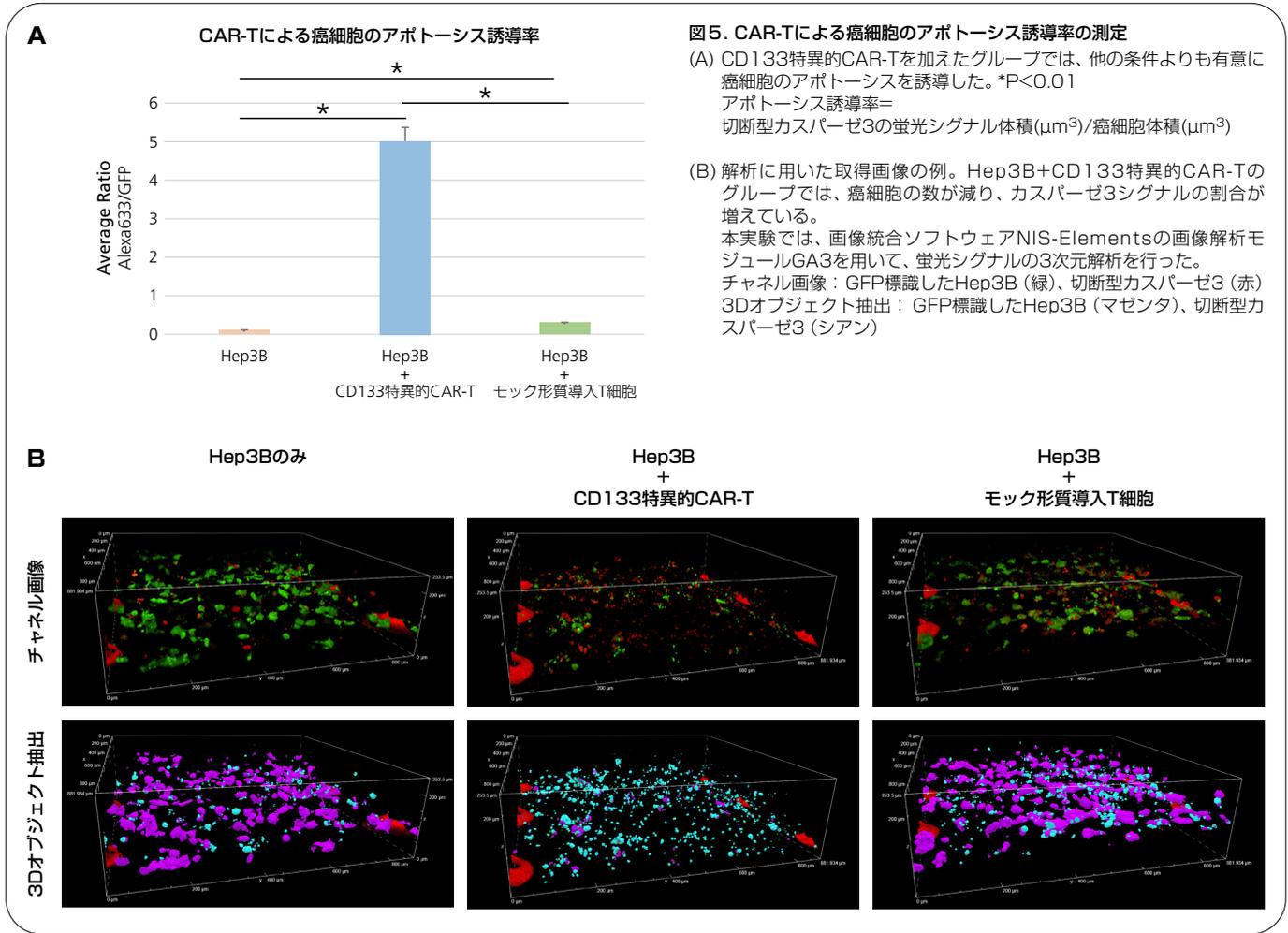
CAR-Tの浸潤による癌細胞のアポトーシス誘導

エフェクター細胞であるCD133特異的CAR-Tは、24時間以内に腫瘍微小環境に正常に侵入し、癌細胞に接触した(図3)。また、癌細胞とCAR-T、切断型カスパーゼ3の蛍光シグナルの動態を解析したところ、これらの重心位置に相関がみられた(図4)。つまり、CAR-Tが癌細胞に向かって移動し、その近くにとどまり、癌細胞のアポトーシスを誘導することが示唆された。



CD133特異的CAR-Tは、癌細胞に対して高い殺傷能力をもつ

次に、120時間後に固定した「癌細胞のみ」「癌細胞+CD133特異的CAR-T」「癌細胞+モック形質導入T細胞」の3グループのサンプルを用いて、CAR-Tによる癌細胞のアポトーシス誘導率を比較した。癌細胞に対する切断型カスパーゼ3の蛍光シグナル比（体積比）は、モック形質導入T細胞を加えたグループよりも、CD133特異的CAR-Tを加えたグループで有意に高いことが明らかになった(図5)。T細胞を含まない癌細胞のみのグループでは、予想された通り、アポトーシスの誘導率が最も低かった。



製品情報

idenTx9プレート (製造元：AIM Biotech社)



「idenTx3」の3チップ分の容量を一枚のSBS規格プレートに統合した、3D細胞培養用チップです。9種類の実験を同時に実行できるため、より高スループットな薬物スクリーニングが可能です。使いやすさ、標準的なプレート規格の操作性、研究の自動化への対応は「idenTx3」と同様のまま、実験を効率的にスケールアップできます。

共焦点レーザー顕微鏡システム AX/AX R

従来機比4倍の8192×8192画素の高解像度画像を実現。対角25mmの広視野でサンプルの広範囲を一度に取得できます。自動シェーディング補正機能は、ムラのない画像取得を可能にします。

