

論文の内容の要旨

論文題目 Droplet digital PCR による乳癌 HER2 遺伝子増幅の定量測定を試み

氏名 尾辻 和尊

【背景】

ヒト上皮細胞成長因子受容体 2 (Human epithelial growth factor receptor 2; HER2, または ERBB2) 遺伝子は上皮成長因子受容体 (Epidermal growth factor receptor; EGFR) 遺伝子と類似の構造を有する癌遺伝子であり、*HER2* 遺伝子がコードする HER2 タンパクは細胞膜に局在する受容体である。乳癌の 15~25%で HER2 の遺伝子増幅またはタンパク過剰発現が認められており、これらを有する乳癌患者は予後不良である。また、HER2 タンパクはトラスツズマブなどの分子標的治療薬による抗 HER2 療法の標的である。HER2 の検査方法のうち最も頻用されているのが HER2 タンパク過剰発現を測定する免疫組織化学的方法 (IHC 法) と、遺伝子増幅を測定する *in situ* hybridization (ISH) 法で、両者は並列の関係に位置付けられる。わが国では簡便かつ安価な IHC 法を第一選択としているが、近年欧米では精度・再現性・治療効果予測性および医療経済的観点から、初めから ISH 法を用いることも提唱されている。

これら現行の方法による HER2 検査にはいくつかの問題が存在する。まず IHC 法については、検査手法や判定基準に関して標準化されているものの、施設間や判定する医師間での判定不一致の問題が挙げられている。また、特に IHC 法で 2+ と判定されてから ISH 法による再判定結果が報告されるまでに時間がかかることも問題となる。そして IHC 法、ISH 法ともに病理医が標本を目視で観察して診断を下していることから、最終的な判定は主観的にならざるを得ず、また病理医の負担にもなっている。さらに、特に ISH 法については検査費用が高額であり、医療経済の圧迫にもつながっている。

近年、『第 3 の PCR』と言われるデジタル PCR が開発された。デジタル PCR は、限界希釈法、エンドポイント PCR、ポアソン解析を組み合わせることで核酸濃度を絶対定量し、リアルタイム PCR よりも精密な測定を行うことが可能な新しいデバイスである。さらに改良されたドロップレットデジタル PCR (ddPCR) は、核酸濃度を再現性をもって自動的に定量化することが可能となり、また作業工程のランニングコストを安価に抑えることができるようになった。この技術を応用すれば、これまで主観的に判定が行われていた乳癌 HER2 ステータスを、客観的に定量測定することができるのではないかと考えた。

一方、細胞膜に発現するタンパクの発現量の定量化についても最新の技術が誕生している。ナノ粒子蛍光体 (Phosphor Integrated Dot nanoparticles; PID) を用いた IHC 法、および PID とデジタル画像処理技術が組み合わさったデジタル病理技術 (High Sensitive Tissue Testing; HSTT) が近年

本邦で開発され、腫瘍細胞でのタンパク発現を精密に観測することが可能になった。特定のタンパク (抗原)に付着した PID (抗体)を測定することにより、タンパクが発現している部位を可視化するだけでなく、細胞あたりの PID を数えることでこれまでの IHC では実現しえなかったタンパク発現の定量化が可能となった。

本研究では乳癌手術標本のホルマリン固定・パラフィン包埋 (Formalin Fixed Paraffin embedded; FFPE)組織を用い、上記の最新技術を応用して乳癌 HER2 ステータスの定量測定を試みた。そして従来の IHC 法・ISH 法による判定結果との比較検討を行うことで、ddPCR や PID の乳癌 HER2 検査としての有用性、そして臨床応用の可能性を検討した。

【方法】

対象症例は 2009~2011 年に東京大学医学部附属病院で手術を行った乳癌症例のうちの 41 例で、FFPE ブロックからの切片を試料として用いた。全ての対象症例で予め American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists (ASCO/CAP)ガイドライン 2013 に基づいて HER2 ステータスの診断がなされ、本研究では 15 例が HER2 陽性と判定された。

各サンプルから 5 μ m 厚の FFPE 切片を作成し、MagCore® Genomic DNA FFPE One-Step Kit を用いて DNA を自動的に抽出した。

デジタル PCR の装置は QX200 droplet digital PCR system (Bio-Rad)を用いた。Bio-Rad QuantaSoft version 1.6.6 software を用いてデータ解析を行い、HER2 と CEP17 のコピー数の比を計算した。

ddPCR で得られた結果を補正する目的で、サンプルに含まれる腫瘍細胞の比率である Tumor content ratio (TCR)の計算を行った。TCR を計算するため、まず各標本を上皮系マーカーである AE1/AE3 (1:200, Leica Biosystems)で免疫染色した。そして NanoZoomer 2.0-HT Digital slide scanner (Hamamatsu Photonics KK)で標本のデジタル画像を作成し、Definiens Tissue Studio (ver 3.6; Munich, Germany)で AE1/AE3 陽性の細胞、陰性の細胞に分類して細胞数をカウントした。TCR は (病変部での AE1/AE3 陽性細胞数) / (サンプル中の全細胞数)で計算した。

HER2 遺伝子増幅の評価のため、縦軸を ddPCR ratio [R] ($0 < R$)、横軸を TCR [x] ($0 \leq x \leq 1$)とした 2 次元チャートを考案し、これを ddPCR-TCR チャートと命名した。HER2 遺伝子が CEP17 のちょうど 2 倍増幅している腫瘍細胞を仮定した場合、ddPCR によって得られるその腫瘍細胞での HER2/CEP17 比 [R]は $x + 1$ で表される。このことから、あるサンプルがチャート上の $R = x + 1$ のカットオフラインよりも上にプロットされればそのサンプルの腫瘍細胞の HER2 遺伝子は増幅あり (HER2/CEP17 比 > 2.0)と判定することができると考えられる。

この理論をより強固なものにする目的で、細胞株を用いた検証を行った。すなわち、HER2 遺伝子が 2 倍増幅した腫瘍細胞に見立てた細胞株と HER2 遺伝子増幅のない非腫瘍細胞に見立てた細胞株を 10%から 90%の TCR になるように混合し、それらを ddPCR で解析して ddPCR-TCR チャート上にプロットした。そして TCR と ddPCR ratio の関係を単回帰分析し、99%信頼区間を算出した。

臨床症例での HER2 遺伝子増幅の判定では、この 99%信頼区間を“equivocal エリア”として設

定し、これよりも上を陽性エリア、下を陰性エリアとすることとした。このように、ddPCR による *HER2*/CEP17 比と TCR をそれぞれ算出し、ddPCR-TCR チャート上にプロットして腫瘍細胞の *HER2* 遺伝子増幅の有無を判定する手法を“ddPCR-TCR method”と命名した。

この ddPCR-TCR method では最終的な判定の部分は定性的なものとなる。今回、ddPCR による絶対定量という特性を活かす目的で、各サンプルで“ $R - (x + 1)$ ” (DT value と命名)を算出し、ddPCR-TCR チャート上にプロットされた症例が理論的なカットオフラインである“ $R = x + 1$ ”からどの程度離れているかということを数値化した。この DT value が正の値であれば、そのサンプルは理論的なカットオフラインである $R = x + 1$ よりも上にプロットされるということになり、逆に負の値であれば $R = x + 1$ よりも下にプロットされることになる。さらに DT value の計算によって、当該サンプルの *HER2* 遺伝子増幅の有無を判定することができるだけでなく、その絶対値によってそのサンプルがカットオフラインからどの程度離れてプロットされるかを定量的に判断することができる。

ddPCR による *HER2* 遺伝子増幅の測定とは別に、PID を用いた免疫染色による *HER2* タンパク発現測定も行った。FFPE サンプルに一次抗体 (抗 *HER2* 抗体)、および二次抗体を反応させ、二次抗体に PID を付着させた。PID による *HER2* タンパク発現の解析は各サンプルの腫瘍の浸潤部分から 5 つのスポットを選択して行った。

統計解析は全て統計ソフト JMP Pro (ver. 12.2.0, SAS Institute, Japan)を用いて行った。

【結果】

細胞株を用いて仮想 TCR を作成し、各 TCR ごとに ddPCR を行って得られた *HER2*/CEP17 比の結果をチャートにプロットして得られたデータから求めた単回帰直線は $R = 1.0724x + 0.9862$ で表され、理論的なカットオフラインである $R = x + 1$ に極めて近いものであった。

臨床検体を用いた ddPCR での *HER2*/CEP17 比および TCR をプロットした ddPCR-TCR チャートでは、11 症例が *HER2* 陽性エリアにプロットされ、そのうち 7 例は従来法で *HER2* 3+ の症例、4 例は従来法の IHC で 2+ の判定で、ISH で *HER2* 遺伝子増幅ありと診断された症例であった。*HER2* 陰性のエリアにプロットされた症例は 22 例で、うち 5 例は従来法の IHC で 0 または 1+ の判定であったもの、17 例は IHC で 2+ の判定で、いずれも ISH で *HER2* 遺伝子増幅なしと診断された症例であった。そして equivocal area には 8 例がプロットされ、そのうち 1 例は *HER2* 3+ の症例、1 例は IHC で 2+、ISH で遺伝子増幅ありの症例、1 例は IHC で 2+、ISH で遺伝子増幅なしの症例、そして残りの 3 例は IHC スコアが 0 または 1+ の症例であった。ddPCR-TCR チャートを用いた判定としては、感度 100% (15/15: 陽性エリアおよび equivocal area にプロットされた症例)、特異度は 84.6% (22/26)であり、従来法による判定結果と高い一致率を示した (Fisher 正確検定 $P < 0.0001$)。

PID による *HER2* タンパク発現の定量評価と、従来法による *HER2* ステータスの判定 (現在汎用されている ASCO/CAP 2013 に基づいた場合、旧版の ASCO/CAP 2007 に基づいた場合、および IHC の結果は考慮せず ISH による遺伝子増幅の有無のみで判定した場合の 3 パターン)では、

いずれの判定方法を用いても従来法での HER2 陽性例では統計学的に有意に PIDs/cell は高値を示した。ただし Spearman 順位相関分析では、PID を用いた HER2 タンパク発現の定量測定結果と、従来法の ISH による HER2 遺伝子増幅の定量測定結果との間には比較的弱い正の相関を認めるのみであった ($r = 0.4833$, $P = 0.0014$)。

これに対して DT value と従来法の比較検討では、同じく Spearman 順位相関分析を行ったところ、 $r = 0.7485$, $P < 0.0001$ と極めて強い相関関係が示された。

ROC (receiver operating characteristic) 解析では、PID による HER2 タンパク定量の解析では AUC (area under the curve) は 0.744~0.812 であったのに対し、DT value の解析では AUC は 0.982~0.992 と、極めて高い値を示した。

DT value を用いた ROC analysis によって得られたカットオフ値の range ($-0.111 \leq \text{DT value} \leq 0.056$) を新たに“equivocal range”として ddPCR-TCR chart に追記したところ、細胞株を用いた仮想 TCR と ddPCR ratio の得られた“equivocal area”とよく一致した。

【結論】

我々は今回、乳癌手術症例において、ddPCR を用いて HER2 遺伝子増幅の評価を行い、ddPCR-TCR method を開発し、さらにそこから新たな HER2 判定の基準になりうる DT value を提唱した。ddPCR-TCR method によって得られた結果や DT value による HER2 ステータスの判定は従来法の結果と極めて高い一致率を示した。一方で蛍光ナノ粒子を用いた PID による HER2 タンパク発現の定量分析では、従来法との間に良好な相関を認めたものの、DT value と従来法との間の一致率には及ばなかった。ddPCR を用いた乳癌 HER2 検査は現行の検査を補完するだけでなく、将来的に代替しうる可能性を十分に持つものである。今後より症例数を増やした検討や前向き試験を行って、この方法の精度を高めていくことが重要であると考えられる。