

審査の結果の要旨

氏名 尾辻 和尊

本研究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、これまで行われてきた免疫組織化学的方法 (IHC 法)や in situ hybridization (ISH)法に代わる方法として、ドロップレットデジタル PCR (ddPCR) やナノ粒子蛍光体 (Phosphor Integrated Dot nanoparticles; PID)といった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ものである。

対象は 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。これらのうち従来法で HER2 陽性と判定されたのは 15 例であった。

各サンプルから 5 μm 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。つづいてデジタル PCR 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 Definiens Tissue Studio (ver 3.6; Munich, Germany)を用いて行った。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。

これらの方法により、以下の結果を得ている。

1. 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。
2. 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 $P < 0.0001$)。
3. DT value と ISH ratio は強い正の相関を認めた (Spearman 順位相関分析: $r = 0.7485, P < 0.0001$)。ROC (receiver operating characteristic) 解析では AUC (area under the curve) 0.982~0.992 と、極めて高い値を示した。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。
4. 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 ($r = 0.4833, P = 0.0014$)。ROC 解析では AUC は

0.744~0.812 と比較的高値ではあったものの、DT value を用いた解析結果には及ばなかった。

以上、本研究では、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、将来的に代替する可能性を十分に持つものであり、今後の実臨床に大いに貢献するものと考えられ、本研究は学位の授与に値するものと考えられる。