

蛍光ナノ粒子PID (Phosphor Integrated Dots) を用いた 超高感度組織染色サービス (Quanticell®) による HER2の高感度・定量的評価

Highly Sensitive Quantitative Evaluation of HER2 by Ultrasensitive Tissue Staining Service (Quanticell®) Using Fluorescent Nanoparticle PID (Phosphor Integrated Dots)

齋藤直也*
Naoya SAITO

松尾司*
Tsukasa MATSUO

藤原浩次**
Koji FUJIWARA

横田博之*
Hiroyuki YOKOTA

要旨

個別化医療を推進するには、適切な治療法を選択するための判断基準として体外診断薬が開発されることが必要で、近年、特定の薬剤に紐づいたコンパニオン診断薬 (CDx) の開発が加速している。ヒト上皮成長因子受容体2 (HER2) は、転移性乳がんの約15~20%で過剰発現しており、抗HER2治療薬トラスツマブの効果予測因子である。免疫組織化学法 (IHC) によるHER2タンパク質検出法は、抗HER2治療薬に対するCDxとして承認されている。しかしながら、承認されているCDxは色素沈着を基本原理とするDAB (3, 3'-diaminobenzidine) 染色のため、判定は目視による半定量である。さらにペルオキシダーゼ酵素反応によりシグナルを増幅させているため低発現領域における判断が困難である。

乳がんの約50%では、HER2増幅のないHER2の低レベルの発現が観察される。近年開発されている抗HER2 ADC療法は、HER2発現が低い患者 (HER2 IHC 1+) でも腫瘍の縮小を示している。しかしながら、HER2低発現患者を高精度で層別化する診断法は存在しない。

本課題を解決するために、コニカミノルタが独自に開発した高輝度蛍光ナノ粒子であるPID (Phosphor Integrated Dots) を用いた超高感度組織染色サービス (Quanticell®) より、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織からHER2タンパク質を検出した例を紹介する。Whole Slide Image (WSI) を用いたQuanticell®により、現在のIHC法ではHER2陰性と分類される臨床組織においてもHER2タンパク質を検出することができ、HER2陰性患者群からHER2低発現患者群を層別化できることを示す。

Abstract

In order to promote personalized medicine, there is a need to develop an *in vitro* diagnostic drug as a criterion for selecting an appropriate treatment method. Thus, in recent years, development of companion diagnostic drugs (CDx) linked to specific drugs has been accelerating.

Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) is over-expressed in about 15-20% of metastatic breast cancers and is a predictor of the efficacy of the anti-HER2 therapeutic agent trastuzumab. The immunohistochemistry (IHC) HER2 protein detection method has been approved as a companion diagnostic (CDx) for anti-HER2 therapeutics. However, since the approved CDx is pigmentation-based DAB (3,3'-diaminobenzidine) stain, the judgment is semi-quantitative by visual inspection. Furthermore, since the signal is amplified by the peroxidase enzyme reaction, it is difficult to judge when the expression level is low.

Low-level HER2 expression cases without HER2 amplification are observed in about 50% of breast cancers. However, recently developed anti-HER2 ADC therapies have shown tumor shrinkage even in patients with low HER2 expression (HER2 IHC 1+). Therefore, there is no diagnostic method for highly accurate stratification of patients with low HER2 expression.

To solve this problem, by using the Quanticell® ultra-sensitive tissue staining service with PID (Phosphor Integrated Dots) which are high-intensity fluorescent nanoparticles originally developed by Konica Minolta, we introduce an example of detecting HER2 protein in formalin-fixed paraffin embedding (FFPE) tissues.

It is shown that Whole Slide Image (WSI) with Quanticell® displays HER2 protein even when the clinical tissues are classified as HER2-negative by the current IHC method. In addition, it is shown that stratification of HER2-low-expressing patients from HER2-negative patients is possible.

*開発統括本部 要素技術開発センター バイオ要素技術開発室

**ヘルスケア事業本部 プレジジョンメディシン事業部 事業統括部

1 はじめに

1998年にFDAによって承認されたHercepTest (Dako/Agilent Corp, Carpinteria, CA) は、抗HER2治療薬のコンパニオン診断法である¹⁾。HER2陽性と診断された患者はがん細胞膜に過剰発現しているHER2に対する抗体医薬品トラスツズマブ（ハーセプチン）を用いた薬物療法の対象となる。

現在承認されているHER2診断法はDAB染色に基づく半定量的な方法である。HER2 ASCO/CAP HER2検査ガイドラインでは、細胞膜上にHER2染色を示すがん細胞の割合及び染色強度に基づいて、病理医が目視にて3+/2+/1+/0を分類し、2+（境界域）に分類された患者はHER2遺伝子増幅を観察するHER2 FISHテストで陽性と判定された場合に抗HER2療法の対象となる。

次世代の抗体医薬品として、がん細胞に結合する抗体に、細胞毒性を有する低分子化合物を結合させた抗体薬物複合体（Antibody-Drug Conjugate, ADC）が開発されており、選択的かつ効果的ながん細胞を死滅させることで、既存の化学療法剤および抗体療法と比較して、治療域の拡大が期待されている。HER2に対する抗HER2 ADC治療薬（DS-8201）は、HER2低発現の再発・転移性乳がん患者を対象とした臨床試験から、がん細胞上にHER2が過剰発現していない乳がんにも一定の効果がある可能性が報告されている^{2), 3)}。治療薬の有効性と安全性を適切に評価するためには、治療対象となるHER2低発現患者をより正確に特定する必要があるが、既存の診断薬が無いのが現状である。

また、デジタル画像技術の進歩により、病理分野においてWSIシステムの導入が加速しており^{4), 5)}、一般的にはデジタル病理学（digital pathology）と呼ばれる。病理医が診断時に参照する患者情報や診断結果などをデジタル情報として扱い、デジタル画像を基に診断する新たなワークフローが確立されてきている。作業の正確性向上、効率化、迅速化だけでなく、恣意的な判断の排除や医療ミスの防止にも役立つと考えられている。

本稿では、コニカミノルタが独自に開発した高輝度蛍光ナノ粒子であるPIDを用いたQuanticell[®]により、乳がん組織を高感度かつ定量的に解析した結果を紹介する。PIDは均一なナノレベルの粒子径を有し、蛍光色素や量子ドットよりも高い輝度、励起光照射下での高い安定性といった特徴により、従来法では達成できない高感度・定量的な解析が可能となる^{6), 7)}。Quanticell[®]は従来のIHC法と同様に、一次抗体→二次抗体→PIDの順に処理するプロトコルであり、特別な試薬や抗体は必要ない。

PID染色した検体はバーチャルスライドスキャナにより高精度のWSIに変換して明視野画像と蛍光画像を取得し、コニカミノルタで開発した独自のソフトウェアを用いて蛍光強度を解析することで目的タンパク質を定量的に評価することが可能である。

2 HER2を検出する従来のコンパニオン診断薬

IHC法を用いたHER2を検出するコンパニオン診断薬として複数の検査キットがFDAにより承認されており、いずれもDAB法をベースとしている⁸⁾（Table 1）。既存の検査キットはHER2発現量の高いHER2 3+/2+を層別化することには適しているが、HER2 1+/0を層別化することには不向きである。

Table 1 The FDA-approved HER2 IHC test kits HercepTest Dako, Oracle Leica, and PATHWAY Ventana are used to properly evaluate anti-HER2 drug treatment cases.

All existing test kits are based on the DAB method and are suitable for stratifying HER2 3+/2+ with high HER2 expression levels. However, they are unsuitable for stratifying HER2 1+/0.

Drug	Antigen	1stAb	Type	Company	Detection	Frequency
Trastuzumab	HER2/Neu	A0485	Polyclonal	DAKO	DAB	21%
Trastuzumab	HER2/Neu	4B5	Monoclonal	Ventana	DAB	63%
Trastuzumab	HER2/Neu	CB11	Monoclonal	Leica	DAB	5%

3 Tissue microarray(TMA)を用いたPID染色

104ケース／208コア（US Biomax, BR20810）の乳房腫瘍組織FFPEマイクロアレイ（TMA）を使用し、DAB染色（Ventana I-VIEW）、及び、DAB染色と同じ一次抗体（クローン4B5）、二次抗体を使用してDABの代わりにコニカミノルタの蛍光ナノ粒子（PID）を用いた染色を行った。TMAのスコアリングはASCO/CAP HER2検査ガイドラインに沿って実施し、DAB染色に基づき各コアを3+/2+/1+/0に分類した。

TMAのDAB染色とPID染色の結果は全体的によく一致していた（Fig. 1）。

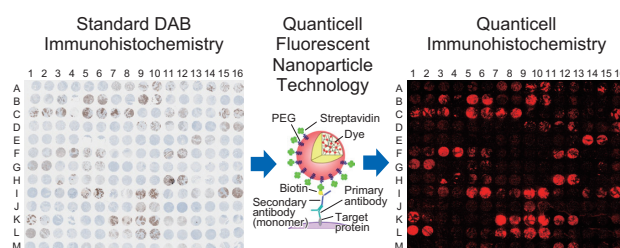


Fig. 1 Schematic diagram of the Quanticell[®]-based assay and comparison of DAB and PID staining with TMA.

The particle size of the fluorescent nanoparticles PID is about 130 nm (excitation wavelength: 580 nm, emission wavelength: 620 nm). Using 104 cases / 208 cores (US Biomax, BR20810) of breast tumor tissue FFPE microarray (TMA), staining was performed using DAB stain (Ventana I-VIEW), as well as the same primary antibody (clone 4B5) as DAB stain. Staining was also performed using Konica Minolta Fluorescent Nanoparticles (PID) in place of DAB with secondary antibodies.

TMA scoring was performed according to the ASCO / CAP HER2 test guidelines, and each core was classified into 3+/2+/1+/0 based on DAB staining. The TMA results for DAB staining and PID staining were in good agreement overall.

4 Quanticell®の特長:広いダイナミックレンジ

PID染色はDAB染色と比較して高い感度を有しているため、極めて発現量の低いHER2タンパク質を明確に検出できるとともに、広いダイナミックレンジを備えているため、HER2発現量の異なる組織が多数含まれるTMAにおいてもHER2過剰発現(3+)と低発現(1+/0)サンプルを同一染色条件下で検出可能である (Fig. 2)。

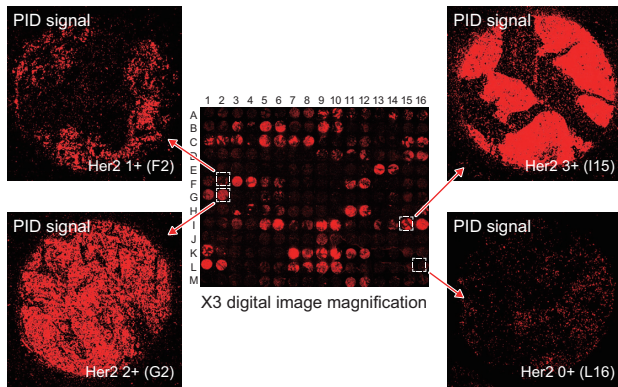


Fig. 2 Assay based on Quanticell®, using Konica Minolta's new fluorescent immunohistochemical technology.

Since PID staining has higher sensitivity than DAB staining, it can clearly detect HER2 proteins with extremely low expression levels. In addition, because it has a wide dynamic range, both HER2 over-expressing (3+) and low expressing (1+/0) samples are identified under the same staining conditions even with TMA containing many tissues with different HER2 expression levels.

5 DAB染色像とPID染色像の比較

DAB染色像とPID染色像の比較結果を示す (Fig. 3)。

HER2 1+/0のDAB染色はシグナルが薄いため、客観的で再現性のある判定を行うことは容易ではないが、PID染色では、DAB法でHER2 1+に分類されるコアにおいても明確な陽性シグナルを検出でき、DAB染色ではHER2発現が認められないHER2 0として分類されるコアにおいても、全周性のHER2膜染色が観察される。

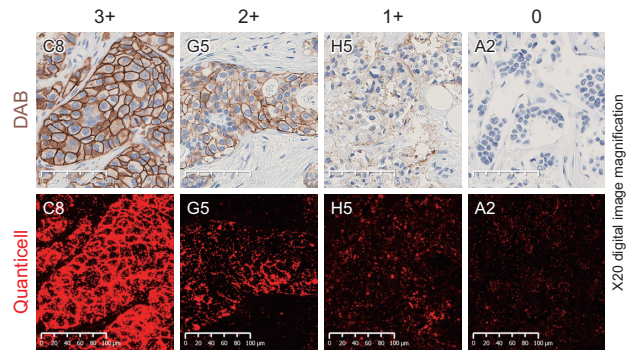


Fig. 3 Comparison between DAB staining and PID staining in tissues with different HER2 IHC scores (3+, 2+, 1+, 0).

Since DAB staining of HER2 1+/0 shows a weak signal, it is not easy to make an objective and reproducible judgment. However, with PID staining, a clear positive signal can be detected even in cores classified as HER2 1+ by the DAB method. Circumferential HER2 membrane staining is observed with cores which are classified as HER2 0 expression with DAB staining.

6 HER2低発現領域(1+)のPID染色像

本TMAにおいてDAB染色によりHER2 1+に分類されたコアのPID染色像を示す (Fig. 4)。

DAB染色では判定が難しいHER2 1+に分類されるいずれのコアにおいても、明確な陽性シグナルを検出した。

DAB法では目視による半定量にてスコアリングを行うため、特にHER2低発現サンプルにおいて、病理医の経験値により判定に差異が生じやすいが、PID染色は、蛍光強度に基づく定量的で客観的な評価であり、DAB法では判定が難しい低発現量領域において数値にて評価できるため特に長所を発揮する。

近年開発された抗HER2 ADC治療薬は、HER2陰性として分類される患者群の一部にも効果があることが示されているが、適切な診断方法が存在しないため、抗HER2 ADC療法を適用できる患者群を特定することができない。HER2低発現患者群を選別できる能力を有するQuanticell®により、これらの患者群に投薬機会の可能性が開かれることが期待できる。

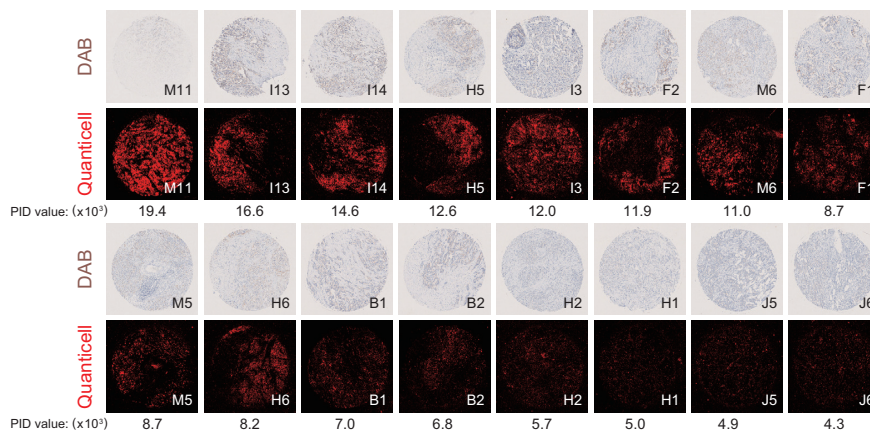


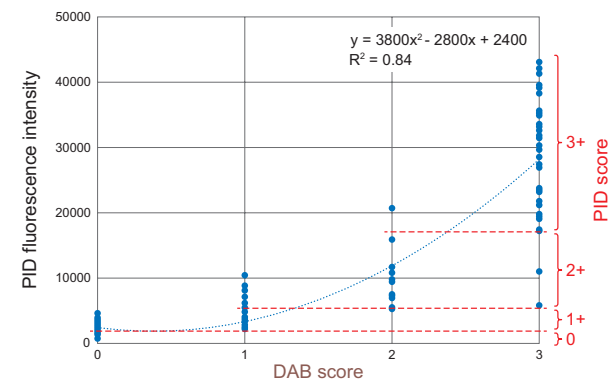
Fig. 4 A PID-stained image of tissues judged as low HER2 expression by DAB staining.

The PID value is an integral of the fluorescence intensity of PID in the invasive cancer area. Clear positive signals were detected in all cores, classified as HER2 1+, which is difficult to determine by DAB staining.

7 DABスコアとPIDスコアの比較

PID染色した画像は、バーチャルスライドスキャナにより高精度のWhole Slide Image (WSI) に変換し、浸潤がん領域から蛍光強度積算値を抽出した。ASCO/CAP HER2検査ガイドラインに準じ、上位10%までの蛍光強度平均値をPIDスコアとして算出し、DAB染色によるHER2スコアと比較した結果をFig. 5に示す。

Quanticell®は蛍光強度を基にスコアを算出しているため、線形で直線的なスコアが得られ、3+/2+/1+/0のような非連続的なスコアではなく、連続的な数値としてスコアを得ることができる。



Her2 Score	0+	1+	2+	3+
PID score (mean)	2360	5510	9608	29066
# samples s	103	14	14	37
Mann-Whitney U test	N/A	0+ / 1+ difference p=2.03*10-e8	1+ / 2+ difference p=2.07*10-e3	2+ / 3+ difference p=1.47*10-e7

Fig. 5 Comparison between DAB and PID scores. The PID-stained image was converted into a high-precision Whole Slide Image (WSI) by a virtual slide scanner, and the integrated fluorescence intensity was extracted from the invasive cancer area.

In accordance with ASCO / CAP HER2 test guidelines, the average fluorescence intensity of the top 10% was calculated as the PID score. Since Quanticell® calculates the score based on the fluorescence intensity, a linear score can be obtained, which is continuous rather than a discontinuous score such as 3+ / 2+ / 1+ / 0.

8 DAB法とQuanticell®による分類比較

PIDスコアをDABスコアと比較するために、PIDスコアに閾値を設定して3+/2+/1+/0の4段階に分類し (Fig. 5), PIDスコアとDABスコアのConcordance Tableを作成した (Table 2)。

HER2 3+/2+カテゴリにおいて、Quanticell®とDAB法は非常によく一致していた。一方で、Quanticell®の高感度検出により、HER2 1+コアにおいては、HER2 2+に相当する陽性シグナルを示すコアが40%程度、HER2 0コアにおいてもHER2 1+に相当する陽性シグナルを示すコアが50%程度存在することを見出した。

1+, 0の領域は専門病理医の間でも判定が異なり、しばしば議論とはなるが、いずれも抗HER2療法の対象とはならなかったため、真剣な議論は保留されていた。しかしながら、DS-8201等のADC治療薬の開発により、低

発現領域での患者層別ツールが必要となる。Quanticell®はまさにこの目視判定の困難な低発現領域の患者サンプルにおいて、蛍光シグナルを数値化し客観的な患者層別を可能にする新規診断法として有用性を発揮する可能性を示唆している。

		PID score				
		3+	2+	1+	0	Total
DAB score	3+	36	2	0	0	38
	2+	1	12	0	0	13
	1+	0	7	9	0	16
	0	0	0	49	54	103
	Total	37	21	58	54	170

■ = 0+ by DAB IHC but considered 1+ by Quanticell
 ■ = 0+ by DAB IHC and Quanticell

Table 2 Comparison between DAB classification and estimated Quanticell® classification.

A concordance table of PID scores and DAB scores was created. In the HER2 3+/2+ category, the Quanticell® and DAB methods were in very good agreement. On the other hand, due to the high-sensitivity detection of Quanticell®, about 40% of the HER2 1+ cores show a positive signal corresponding to HER2 2+. Also, for the HER2 0 core, a positive signal corresponding to HER2 1+ was observed at a rate of around 50%.

9 まとめ

高輝度蛍光ナノ粒子PID (Phosphor Integrated Dots) を用いた超高感度組織染色サービス (Quanticell®) により、HER2発現量が低くDAB法ではHER2陰性と判定される患者群に対して、高感度HER2検出に基づく再分類が可能となる。HER2陰性患者群に対して効果を有する新規抗HER2 ADC薬に対して治療効果の高い患者群の層別化への実用化が期待される。

今後、ADC・二重特異性抗体・CAR-Tなど、発現量の少ない抗原タンパク質を標的とした薬剤開発の進展が予測され、Quanticell®の高感度識別能力による患者層別化・コンパニオン診断薬へ適用する機会が増大すると考えられる。

謝辞

乳がん組織の病理形態や病理判定についてご助言、ご協力を賜りました防衛医科大学校病態病理学講座の津田均教授に深く感謝いたします。

●参考文献

- 1) Twomey JD, et al. Drug Resist Updat. 2017; 30: 48
- 2) Modi S, et al. J Clin Oncol. 2020; 38: 1887
- 3) Modi S, et al. N Engl J Med. 2020; 382: 610
- 4) Chung GG, et al. Lab Invest. 2007; 87: 662
- 5) Perkel JM, et al. Science. 2016; 351: 1098
- 6) Gonda K, et al. Sci Rep. 2017; 7: 7509
- 7) Hicks DG, et al. BMC Cancer. 2018; 18: 1266
- 8) Wolff AC, et al. J Clin Oncol. 2018; 36: 2105