

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16549

研究課題名(和文) 免疫染色によるHER2過剰発現の定量的判定法の開発

研究課題名(英文) Development of quantitative determination method for HER2 overexpression by immunohistochemistry

研究代表者

寺田 かわり (Terata, Kaori)

秋田大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60610748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌細胞におけるHER2タンパク過剰発現は、予後因子、分子標的治療薬の標的となっており、非常に重要である。HER2タンパク過剰発現の診断は免疫組織化学法で癌細胞膜の染色強度により判定されるが、病理医の主観による定性的要素が大きく、染色強度を客観的、定量的に判断する方法はない。診断精度向上のために、染色強度に関する陽性コントロールの確立が望まれる。今回、高分子ゲル生成技術を用いた新規陽性コントロールの改良と、画像解析技術を融合したHER2タンパク過剰発現の定量的免疫組織化学診断の実用化を目指し開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、HER2陽性乳癌に対しては新規薬剤(TDXdをはじめとする分子標的薬、ADC薬)が開発されてきており、その進歩は目覚ましい。これまでは免疫染色によるHER2 score3、または2かつISH法で陽性を示した場合に、抗HER2薬は適応となったが、新規薬剤は、HER2 score1以上にも適応が拡大されつつある。抗HER2療法が適応の場合、治療奏効割合は高く、治療の機会を逸することがないように対応することが望まれている。本研究は現在求められているHER2過剰発現診断の標準化に貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Overexpression of HER2 protein in breast cancer cells is crucial as it is a prognostic factor and a target for molecular targeted therapies. The diagnosis of HER2 protein overexpression is determined by immunohistochemistry based on the staining intensity of the cancer cell membrane, but there is a large qualitative factor based on the subjectivity of the pathologist, and there is no method for objectively and quantitatively determining the staining intensity. In order to improve the diagnostic accuracy, it is desired to establish a positive control regarding the staining intensity. This time, we aimed to improve the new positive control by applying the polymer gel generation technology and to put into practical use the quantitative immunohistochemical diagnosis of HER2 protein overexpression by fusing the image analysis technology.

研究分野：乳癌外科

キーワード：乳癌 HER2 免疫染色 コントロール

### 1. 研究開始当初の背景

乳癌は、本邦における女性の悪性腫瘍の罹患率第1位である。手術、薬物療法、放射線療法などによる集学的治療が行われ、近年の薬物療法による治療効果は極めて高い。特に薬物療法の方針決定の際には、癌組織のホルモンレセプターや、癌細胞膜に存在する HER2 (human epidermal growth factor type2: ヒト上皮成長因子受容体 2 型) タンパクの発現状況を知ることが必要で、病理組織学的検査として免疫組織化学法 (Immunohistochemistry: IHC, 以下 IHC) が用いられており、今や欠かすことのできない検査である。HER2 陽性乳癌は全体の約 20% を占め、予後不良であるが、トラスツズマブに代表される抗体療法の進歩に伴い著しく予後の改善がみられている。そのため乳癌患者の中から HER2 陽性乳癌患者を正確に見出すことは、乳癌の治療戦略を立てるうえで非常に重要で、診断精度の向上が望まれる。HER2 タンパク過剰発現の診断は、IHC で癌細胞の膜の染色強度により 4 段階に判定されるが、これは病理医の主観による定性的要素が大きく、FISH など他の検査との結果の乖離も認められる現状などから [1]、染色強度を客観的に判定する方法の検討が必要である。一方で、当研究室ではこれまで、南谷が、連携研究者である川口とともに研究を進めていたナノテクノロジーの技術を活用し、高分子化合物を用いて、機能性微粒子を用いた癌治療戦略に関する研究 (課題番号: 20390338) を行ってきた経緯がある。その技術から着想を得て、タンパク質と結合する基を持つミクロンオーダーの親水性網目構造体 (= 高分子ゲル) の合成が可能であることを確認した [2]。すなわち、高分子ゲルに HER2 タンパクを結合させ、免疫染色を行ない、酵素抗体法により高分子ゲル自体も HER2 陽性乳癌細胞と同様に染色する。そして添加するタンパク量によって、染色強度の異なる高分子ゲルを生成し、HER2 タンパクの染色強度の陽性コントロールとする。更に、ここに画像解析技術を用いて染色強度を客観化し、HER2 過剰発現のタンパク量を数値化する方法を考えた。現在、HER2 について IHC を行なう際は、その IHC が妥当に行なわれているかを証明するために、HER2 過剰発現が確認されている乳癌組織などが陽性コントロールとして用いられるが、染色性は一定ではなく、また染色強度のキャリブレーターコントロールにはならない。これに対し、高分子ゲルを応用した染色強度に関する陽性コントロールは、染色性が一定であり、添加する HER2 タンパク量によって数種類の濃度差を持つものとなる。画像解析に関しては、現在一部で開発・使用されている装置 (癌組織の染色強度を直接画像解析によって判定する方法) は非常に高価であり、乳癌患者数が今後もさらに増加し続ける現状を考えると、各施設で安価で簡便に行なうことは難しいと思われる。しかし、癌組織と同一スライドガラス上に、染色強度の陽性コントロールをおくことで、画像解析は安価に行なうことができる。以上より、HER2 過剰発現のキャリブレーターコントロールとして、HER2 タンパクを添加した高分子ゲルを応用し、画像解析技術を用いて、安価で簡便、精緻な IHC での HER2 過剰発現の定量的判定を行なう技術を開発できないか、という問いを見出した。

### 2. 研究の目的

本研究は、HER2 過剰発現を IHC で定量的に判定するための陽性コントロールの生成と、画像解析技術との融合による診断法の開発を目的とする。

高分子ゲルを病理組織診断に応用することは、本研究の独自性の本幹となる。現在、病理組織診断時の陽性コントロール、陰性コントロールは、実際の組織・細胞を用いており、染色性を一定に保つことは難しい。しかし、高分子ゲルを用いることで限りなく安定した染色性を再現することが可能となる。これは、現在まで行われることのなかった新規の方法である。HER2 タンパクを添加して、添加するタンパク量により濃度勾配をもつ HER2 染色強度の陽性コントロールを作成することで染色強度のキャリブレーターとなり、そこに画像解析技術を応用して客観的な染色強度の判定を行う。今回、より画像解析に適した形態とするため、高分子ゲルをコア粒子 (正円形の電子顕微鏡標準球) にコーティングした。これにより、生体の細胞と陽性コントロールを区別しての画像認識が可能となる。

これまで、免疫染色診断の陽性コントロールについてはいくつかの方法が検討されてきているが [3] [4]、いずれも実用化されているものはない。本法で用いる高分子ゲルは、独自に生成され、各種タンパクと結合することが可能な、汎用性の高い物質のため、各種免疫染色の陽性コントロールともなりうる。実用化されれば、幅広く応用可能であり、その汎用性は非常に大きく、創造性に富むものである。本研究が達成されれば、今までにない、診断コストや簡便性においても優れた、精緻な HER2 過剰発現の診断が可能となり、更には新たな世界基準となり得る可能性がある。

### 3. 研究の方法

これまで高分子ゲルを用いた陽性コントロールの開発は、若手研究 (B) (課題番号 16K19886) で検討してきた。当初、高分子ゲルそのものを単体の球体として陽性コントロールに用いるべく生成、改良を重ねてきたが、より再現性が高く画像解析技術に適する形態とするため、コア粒子 (正円

形の電子顕微鏡標準球：シリカ)の表面に高分子ゲルをコーティングする方法を見出した。そこで今回は下記の通り研究目標を定めた。

1) コア粒子への HER2 タンパク濃度の勾配を持った高分子ゲル微粒子のコーティング、品質改良(2019 年度)：これまで、染色濃度差のある HER2 タンパク結合型の高分子ゲルは作成可能であったため、これをコア粒子に均一にコーティングするプロトコルを作成する。

2) 陽性コントロールの評価に適した画像解析の開発(2020 年度)：正円形のコア粒子のみを認識し、その表面にコーティングされた免疫染色領域の濃度と、結合している HER2 タンパク量を検量線で表示し、実際の乳癌組織の HER2 染色部分の染色強度を表示できる画像診断システムを開発する。

3) 臨床応用、従来からある画像解析装置との診断コスト、簡便性の比較、(2021 年度)：実際の乳癌組織において HER2 染色強度の陽性コントロールの有用性を検討する。その際、当研究室で開発し、2014 年 5 月に上市された電解攪拌迅速免疫染色装置(ヒストテック R-IHC)を用いて、費用対効果や迅速な診断の有用性についても併せて検討する。

上記により、HER2 過剰発現に関する免疫染色強度の陽性コントロールを開発する。

#### 4. 研究成果

1) コア粒子への HER2 タンパク濃度勾配を持った高分子ゲル微粒子のコーティング、品質改良  
コア粒子は、シリカ NH<sub>2</sub> とテンタゲル NH<sub>2</sub> を比較し、テンタゲルで良好なマイクロゲルの被覆を示した(図 1)。また、鏡検時に、コア粒子の周囲に不純物が多く見受けられたこと、免疫染色の染色性に精密な再現性が得られにくいことから、透析処理、マイクロゲルのモノマーであるメタクリル酸の減圧蒸留、アルミナを使用したメタクリル酸の安定剤除去、限外濾過の精製処理(Centrifugal Filter Units)を行ったが、それぞれの方法に大きな差はみられず、～ による明らかな改善は見られなかった。以上より、コア粒子のシリカ、テンタゲルそれぞれにおいて、透析の方法を～ まで試し、結果を比較検討したが、やはり明確な差は認められなかった。精密な再現性を担保するには更なる検討を有するが、転嫁するタンパクの濃度によって肉眼的にもしっかりと濃度差の得られる結果となった。(図 2)

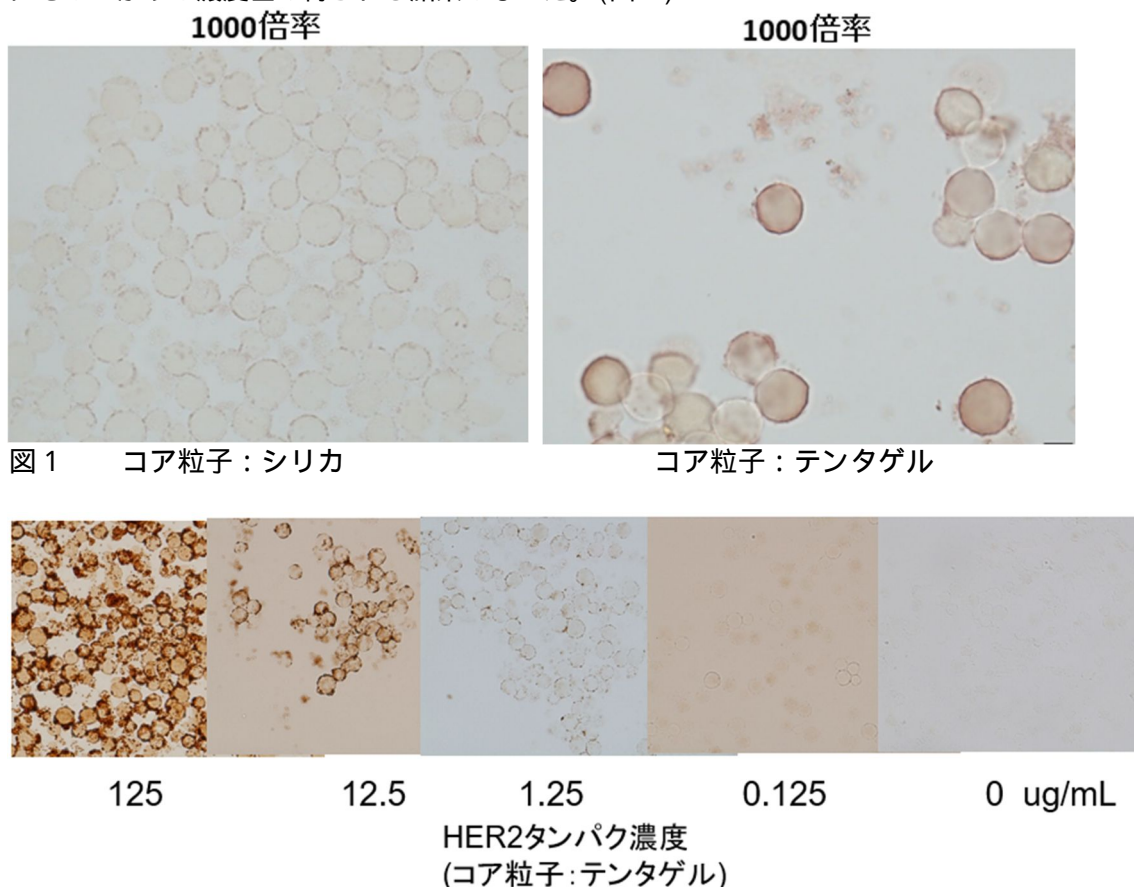


図 2

今回作成したコントロールの表面写真を、走査電子顕微鏡(SEM)によりコア粒子被覆前後で撮影した。病理プレパラートでは球体の断面の評価となるが、SEMにおいても、コア粒子をマイクロゲルで被覆する前後で、きれいな正円球の球体を維持していることが証明された。(図 3)

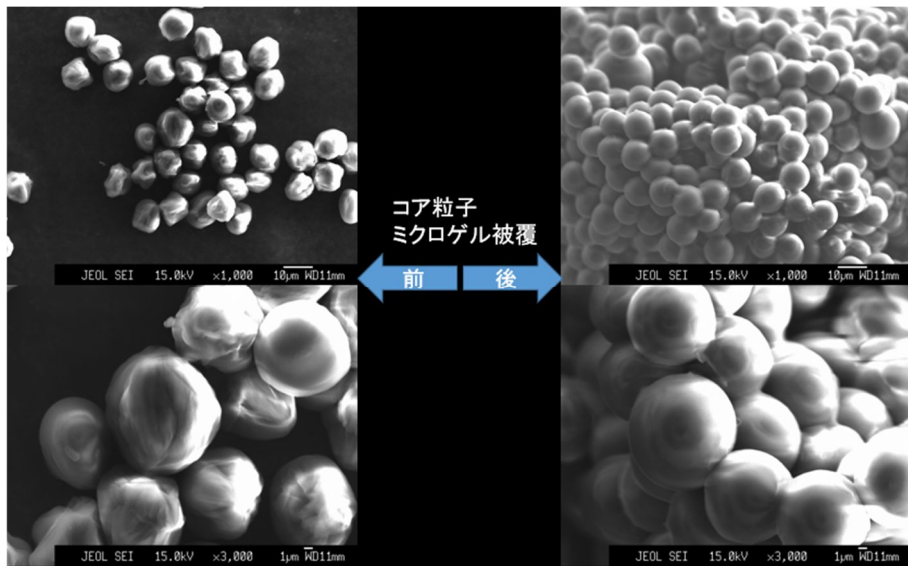


図 3

## 2) 陽性コントロールの評価に適した画像解析の開発

秋田 EPSON の協力により画像解析システムを開発していたが、平行してエクセルデータを基にした三谷商事 WinRoof2018 での解析も並行して進め、良好な進捗が得られた。

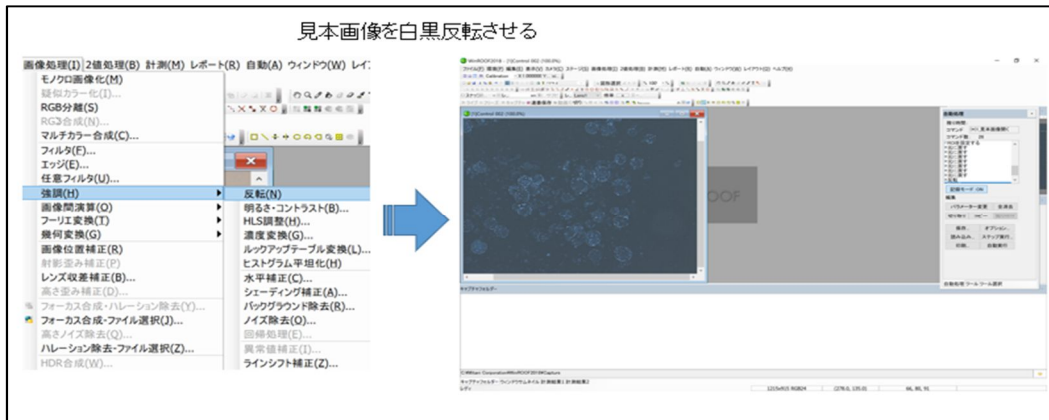
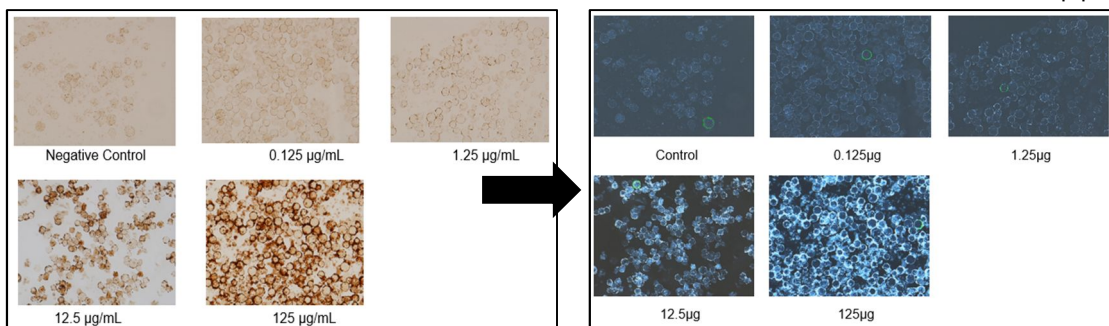
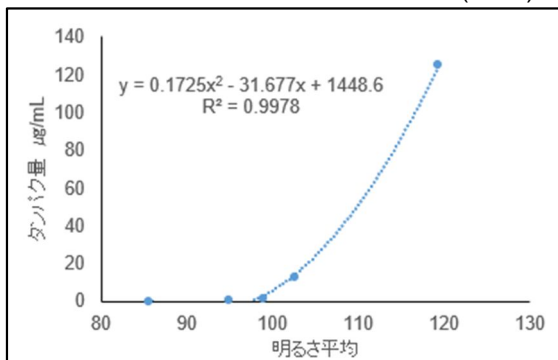


図 4



上記に示す通り、基本となる鏡検像を白黒反転させ、画像解析ソフトで球辺縁の輝度を定量化し、検量線を作成することが可能となった(図 5)。



	X	Y
	明るさ平均	タンパク量(µ/ml)
①	85.493	0
②	94.836	0.125
③	98.892	1.25
④	102.604	12.5
⑤	119.307	125

図 5

## 3) 臨床応用に向けた取り組み

当教室で開発、上市した迅速免疫染色装置(ヒストテック R-IHC)は、全自動器機も上市に向けて

開発が進み、従来器機、全自動器機による免疫染色の評価も行った。HER2 陽性コントロールを想定したパラフィン切片の乳癌原発巣組織染色 (HER2 抗体 : VENTANA) は再現性が確認され、プロトコールが作成可能となった。今回の研究期間において、1) 精密な再現性を有する陽性コントロールの作成に関して、実用化に向けて時間をかけて検討したため、3) に当初含まれた臨床応用の実際に関しては今後も引き続き検討が必要であるが、迅速免疫染色の実用化に関しては、全自動器機での染色再現性も得られ、臨床応用での可能性が示された。具体的な費用対効果の検討は今後の課題である。

[1] Bahreini F1, et al. A meta-analysis on concordance between immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in situ hybridization (FISH) to detect HER2 gene overexpression in breast cancer. *Breast Cancer*. 2014 Apr 10. [Epub ahead of print] .

[2] Kawaguchi H. Micro hydrogels: preparation, properties, and applications. *J Oleo Sci*. 2013;62:865-71.

[3] Shi SR, et al. Protein-embedding technique: a potential approach to standardization of immunohistochemistry for formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *J Histochem Cytochem*. 2005 Sep;53(9):1167-70. Epub 2005 Jun 13.

[4] Welsh AW, et al. Standardization of estrogen receptor measurement in breast cancer suggests false-negative results are a function of threshold intensity rather than percentage of positive cells. *J Clin Oncol*. 2011 Aug 1;29(22):2978-84. doi: 10.1200/JCO.2010.32.9706. Epub 2011 Jun 27.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------