Poster # 3188

Contact: Joseph Krueger, PhD
E-mail: jkrueger@Invicro.com

“Her2陰性”に分類される患者群において抗Her2 ADC(Antibody-drug conjugate)応答が期待される ”Her2弱陽性”患者群を予測するための新規の高感度免疫組織化学染色法を用いた試験

Joseph Krueger[1], Kenneth Bloom[1], George Abe[1], Hisatake Okada[2], Hiroyuki Yokota[2]
[1] Invicro, a Konica Minolta Company, Boston, MA [2] Konica Minolta Precision Medicine, Japan

概要

Trastuzumab/deruxtecan (DS-8201)はHer2陽性乳癌を対象としたフェーズII臨床試験（DESTINY-Breast01 trial、2019年５月発表）において良好な結果を示し、抗Her2治療のあり方に大きな変化をもたらしました。特筆すべき点としては、このAntibody-drug conjugate(ADC)は、Topoisomerase I阻害剤であるdexatecan derivative (Dxd) を利用しており、同じく抗Her2 ADCであるKadcyla (T-DM1, or ado-trastuzumab emtansine; 微小管阻害剤)に比べ、作用機序（MoA）の観点から有用であると考えられています。DS-8201のフェーズI試験からのデータは、Her2の免疫組織化学染色法によりHer2低発現（HER2 IHC 2+/1+）と分類された患者においても腫瘍の縮小することが証明されています。（※染色方法に用いたキットおよび、論文：Ventana HER2 (4B5) assay (Lancet Oncol. 2017 Nov;18(11):1512-1522) この結果は、deruxtecanの強力なバイスタンダー効果（Int J Cancer. 2019 May 14. doi: 10.1002/ijc.32408）と抗がん免疫作用の増強(Mol Cancer Ther. 2018 Jul;17(7):1494-1503)によるものと考えられています。

このようにtrastuzumab deruxtecanに対する患者の反応予測は、Her2の過剰発現やゲノム重複を評価する従来型のアプローチの範囲を超え、腫瘍と免疫反応の複雑な反応も関係した上で、Her2を高発現しない患者においても有効である可能性があります。こうした現状を踏まえ、Her2弱陽性患者を対象とした、抗HER2抗体と細胞毒性／免疫活性作用をもつペイロードを組み合わせた標的薬剤を開発するために、Her2-lowの検出法の確立が必要とされています。現在、これらの治療法を対象としたHer2弱陽性患者を層別する市販のサービス・検査薬は存在していません。このようなアプローチにおいては、Her2の免疫組織化学染色法と染色結果の解釈の両方の改良が必要となります。試験のパフォーマンス向上を目的として、ASCO/CAPにおいても１５年近く、臨床試験における染色スコア評価方法の改良への取り組みが行われてきましたが、既存のコンパニオン診断薬を用いた手法では実現できずにいます。

本研究では、新規技術によるヒトホルマリン固定パラフィン包埋組織（FFPE）を用いたHer2タンパク質検出について紹介しています。Quanticell®はコニカミノルタのPhosphor-Integrated Dot (PID)粒子技術を用いた超感度、in situ検出により、FFPE組織上でのHer２検出を可能とします。このアプローチでは、既存のIHC法では「Her2陰性」に分類される臨床検体のHer2発現を検出することが可能で、現存のHer2高発現を層別するカットポイントから、Her2陰性患者とHer2弱陽性を送別する臨床検査のカットポイントを設定するための新しいアプローチへの取り組みを加速します。

方法

既存のコンパニオン診断テストでHer2/neuがどのように染色されるかを確認するために 104ケース／208コアの乳がん組織FFPEマイクロアレイ(US Biomax, 20810)を用いて抗HER2/neu免疫組織化学染色を行った（一次抗体 4B5, Ventana i-VIEW検出システム ）。次に同じマイクロアレイ（連続切片）を用いてDABの代わりにコニカミノルタのPhosphor Integrated Dot (PID)蛍光ナノ粒子を用いたQuanticellで免疫組織化学染色を行いました。その他の基本条件は２つの試験で揃えています。TMAのDAB染色については、ASCO/CAPガイドライン基づいた患者のHer2スコアリングによるスタンダードな0+/1+/2+/3+の患者層別を行いました。Quanticell染色を行ったTMAについては、新規の定量的アプローチを行い、従来のスコアリング方法と比較を行いました。

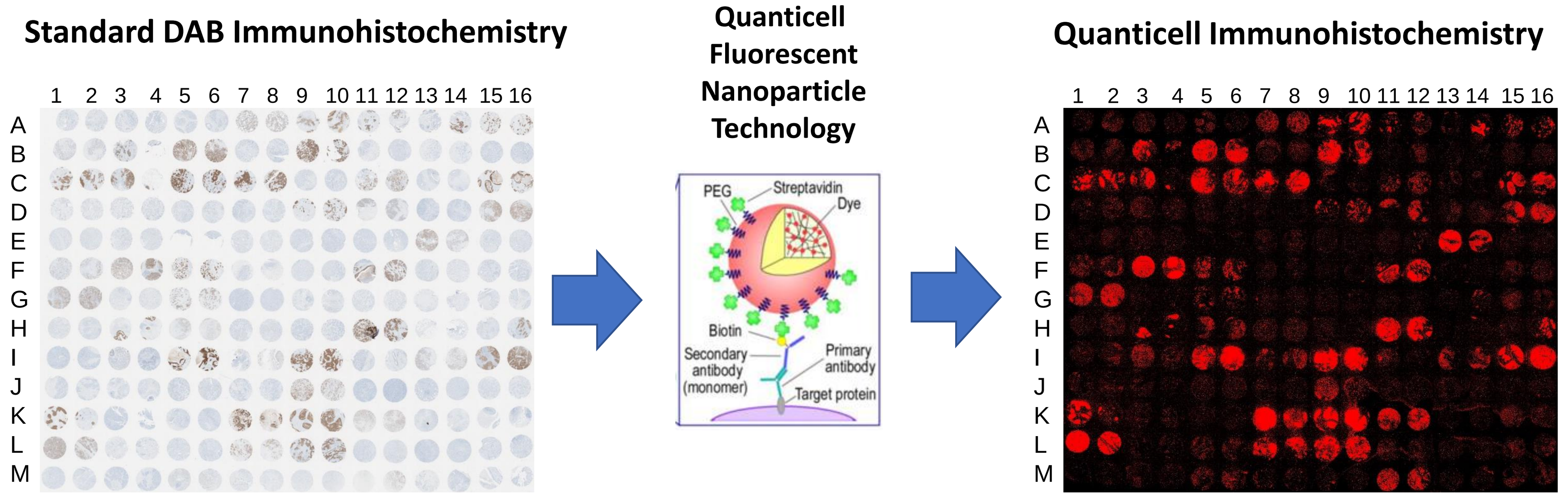


Figure1: 比較解析. 抗Her2治療に対する応答を予測するためのコンパニオン診断の条件（Ventana 4B5)において通常のDAB染色を行いました。DAB染色と比較するとQuanticellによる解析では圧倒的に高感度、かつダイナミックレンジの広さを示し、Her2発現の強弱に関わらず、すべての患者検体についてHer2の明瞭な発現と定量的な解析が可能となっています。

QuanticellとDABによるHer2スコアの比較

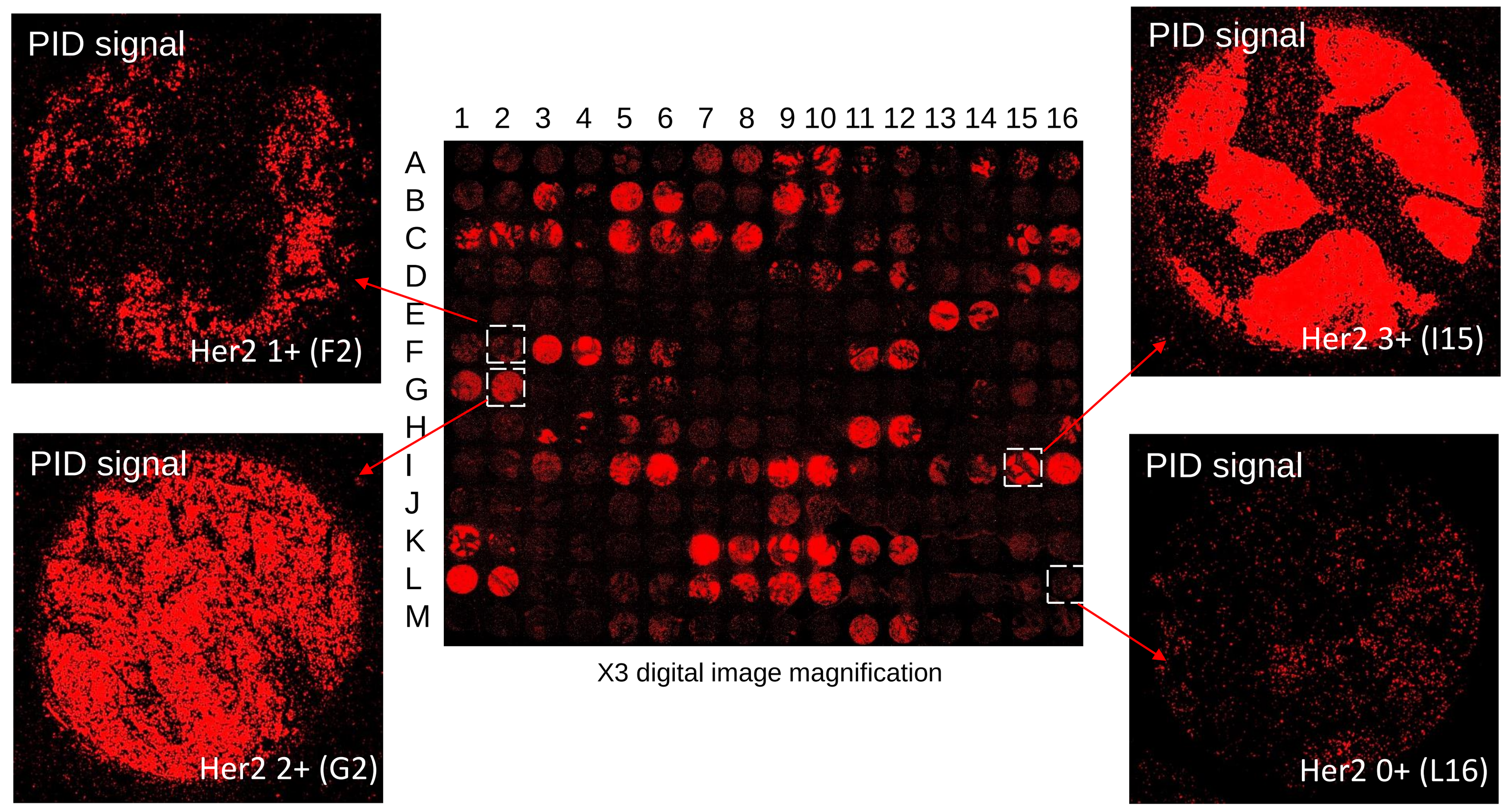


Figure 2: コニカミノルタの新規蛍光免疫組織化学染色技術、Quanticellを用いたアッセイ
The Quanticellによるアプローチは DABと比べて高感度を示し、Her2弱陽性のサンプルにおいても明瞭なシグナルを検出しています。 このアッセイは非常に広いダイナミックレンジを有しており、Her2高発現（３＋）サンプルと同様にHer2弱陽性（１＋）サンプルにおいても同時に検出することが可能です。さらに重要な点は、Quanticell アッセイは Her2陰性（０＋）に分類されるサンプルにおいても非常に弱いHer2発現の検出と定量を行うことができることです。

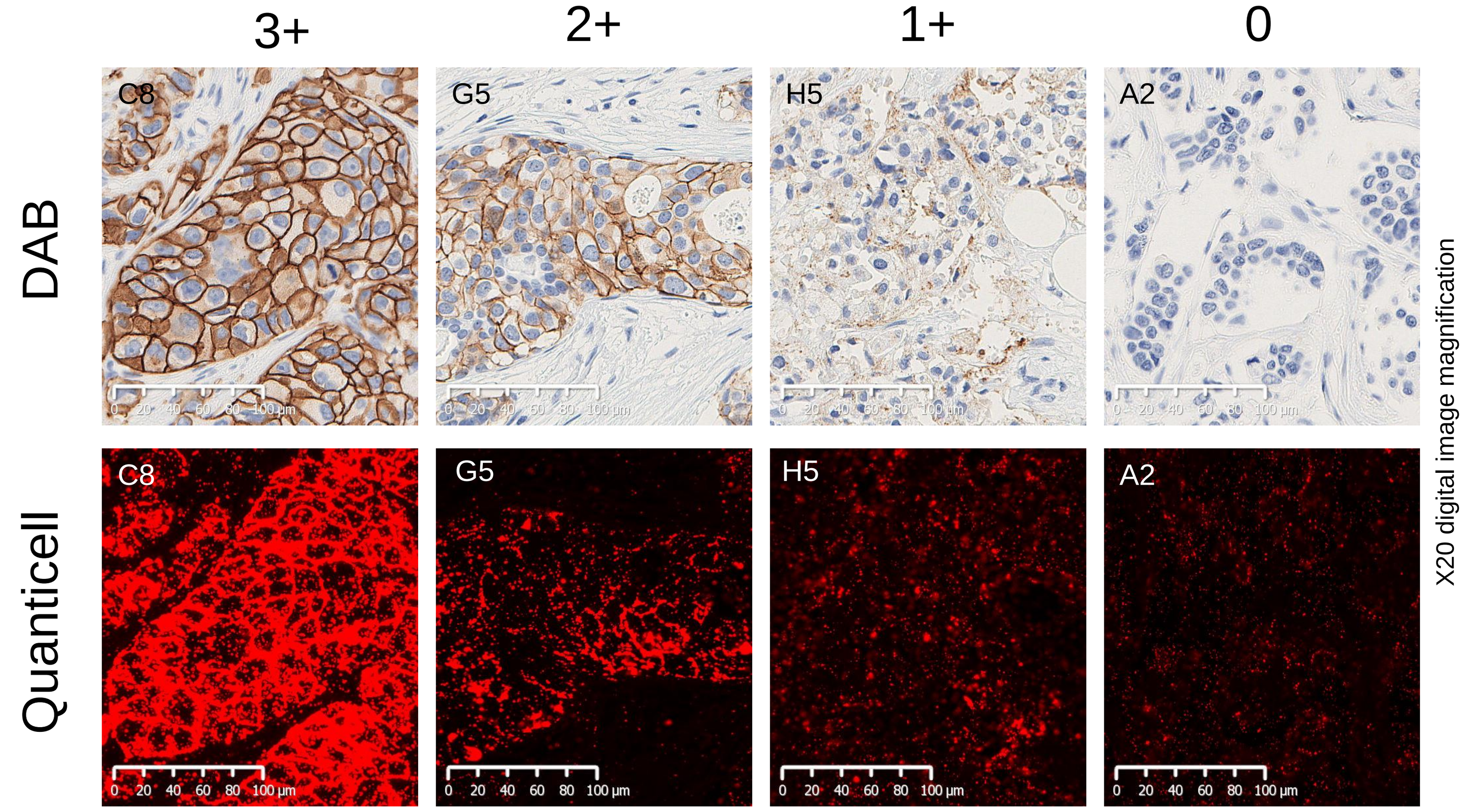
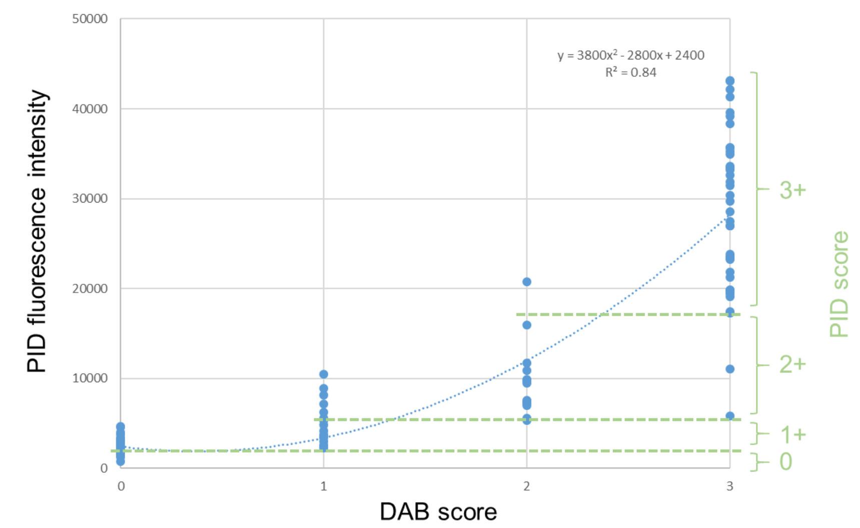


Figure 3: Quanticell染色とDAB染色の比較. Quanticellを用いたアプローチは、既存のコンパニオン診断薬ではHer2陰性に分類される患者群にも薬効が認められる可能性のある、抗Het2抗体が結合したADC療法のための新しい患者層別の方法を作成します。

アッセイごとのHer2層別



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

PID score

DAB score	3+	2+	1+	0	Total
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

Figure 4: DABスコアリングとQunaticellスコアリングの比較

現行のHer2 に対する従来型のDAB染色を用いたASCO/CAP スコアリング法では、ある種の染色像が観察される細胞の割合を基に、臨床医が0+/1+ or 2+/3+ に層別する必要があります。最も重要な決定は、従来の抗Her2治療方針の決定のために、患者を0+/1+か2+/3+のどちらに分類するかであり、突き詰めると、Her2陽性患者と陰性患者に二分することとなります。この段階では、もし患者が2+に分類された場合でも、Her2のFISHテストが陽性であれば、治療を受けることができます。

しかしながら、近年の抗Her2 ADCは、従来はHer2陰性（0+/1+)に分類されていた患者にも薬効が認められることが報告されています。臨床的な理由から従来の試験が継続している一方で、より高感度またはキャリブレーション可能なHer2検出システムを用いることで、Her2弱陽性の患者を層別し、適切なHer2 ADC治療を行える可能性があります。

Quanticell は0+/1+か2+/3+の層別を用いることなく、Her2発現量を正確に決定できる直線上の定量的スコアを用いることでこの要望に答えることが可能です。Quanticellによるアプローチは、抗Her2 ADCへの応答性を反映した新しい患者層別の手法に用いることができます。グラフはこの可能性を表しており、Her2のQuanticellスコアとDAB Her2分類の関係を示しています。

Figure 5: 混同行列によるQunaticellを用いた推定スコアとDAB層別との比較

Quanticellスコアが治療方針の決定に用いる際に考えられる方法論を基に、数値解析に基づいた新規の0+/1+/2+/3+の層別を行いました。

・従来の抗Her2治療においては、Quanticell 3+に分類された患者のみHer2陽性と判定されます。このアプローチでは従来のDABに基づいた3+の層別と同様の分類となりました。

・従来の抗Her2治療においては、２+に分類された患者は、Her2 FISHによる試験結果に基づき治療方針が決定されます。従来型のDAB基づいた2+/1+の分類とQuanticellの2+/1+の分類は一部で一致しておらず、抗Her2 ADCのためのQuanticellによる異なる層別の可能性を強調しています。

・従来の抗Her2治療においては、1+, 0+に分類された患者はみ「Her2陰性」と判定されます。しかしながら、２つの検出方法間での1+, 0+の層別については大きな違いが認められました。DABにより0+に層別された患者は、新規のQuanticell 1+, 0+の分類に振り分けられました。この分類は、抗Her2 ADC治療に有用な、Quanticell を用いたHer2弱陽性患者とHer2陰性患者の層別が可能性を示しています。

Discussion

DS-8201などの新規の抗Her2治療からもたされた臨床データによると、"Her2陰性"患者にも治療効果が認められています。このことから、"Her2陽性患者"と"Her2陰性患者"を再定義し、Her2弱陽性の分類を作る必要があるかもしれないと考えられています。本発表では我々はQunaticell IHC法を用いた新たな"Her2強陽性"、"Her2弱陽性"、"Her2陰性"の新たな分類を作成することで、新規の抗Her2 ADC治療に対する患者の薬効予測に基づいた患者層別の可能性を示しました。