

Quanticell[®]、細胞株と臨床組織片において細胞膜上に存在するPSMAの可視化および定量化するための新規の組織病理技術

Hemi Dimant¹, Ankit Gandhi¹, Michael Maker¹, Adam Markman¹, Jeanette Reinhardt¹, Stefan Collins¹, Jacob Hesterman¹, Joseph Krueger¹, Kenneth Bloom¹, Julie Bailis², Gloria Juan²

¹Invicro, A Konica Minolta Company, Boston, MA; ²Amgen, South San Francisco, CA; ³Amgen, Thousand Oaks, CA

背景

⁶⁸Ga-PSMA PETは一般的なイメージング手法に比べて高い検出率を有し、前立腺がんの診断において有望なモダリティです。PET/CTとPET/MRIを組み合わせたPSMA放射性トレーサーは非常に高感度でPSMA発現している腫瘍を検出することができます。しかしながら、PSMA-PETは低発現と高発現を区別するための感度が不足しています。ルテチウム-177 (¹⁷⁷Lu)-PSMA-617やPSMA-BiTE[®]分子 (AMG 212, AMG 160)などの放射性同位体標識分子はPSMA陽性疾患の検出に用いられてきました。臨床検体のPSMA発現評価には、PSMA-PETと組織利用免疫学的測定法が用いられますが、一般的な免疫組織化学と免疫蛍光法は前立腺がん組織生検の低発現PSMAの検出に十分な感度がありません。検出感度不足が適切な応答予測を阻むかもしれず、PSMA低発現でありPSMA療法の要件を満たしている患者の治療が認められない可能性があります。ここでは、前立腺がんにおけるPSMAの高感度検出と検出特異性を可能にしたQuanticellと呼ばれる新しい組織病理学分析を提案します。

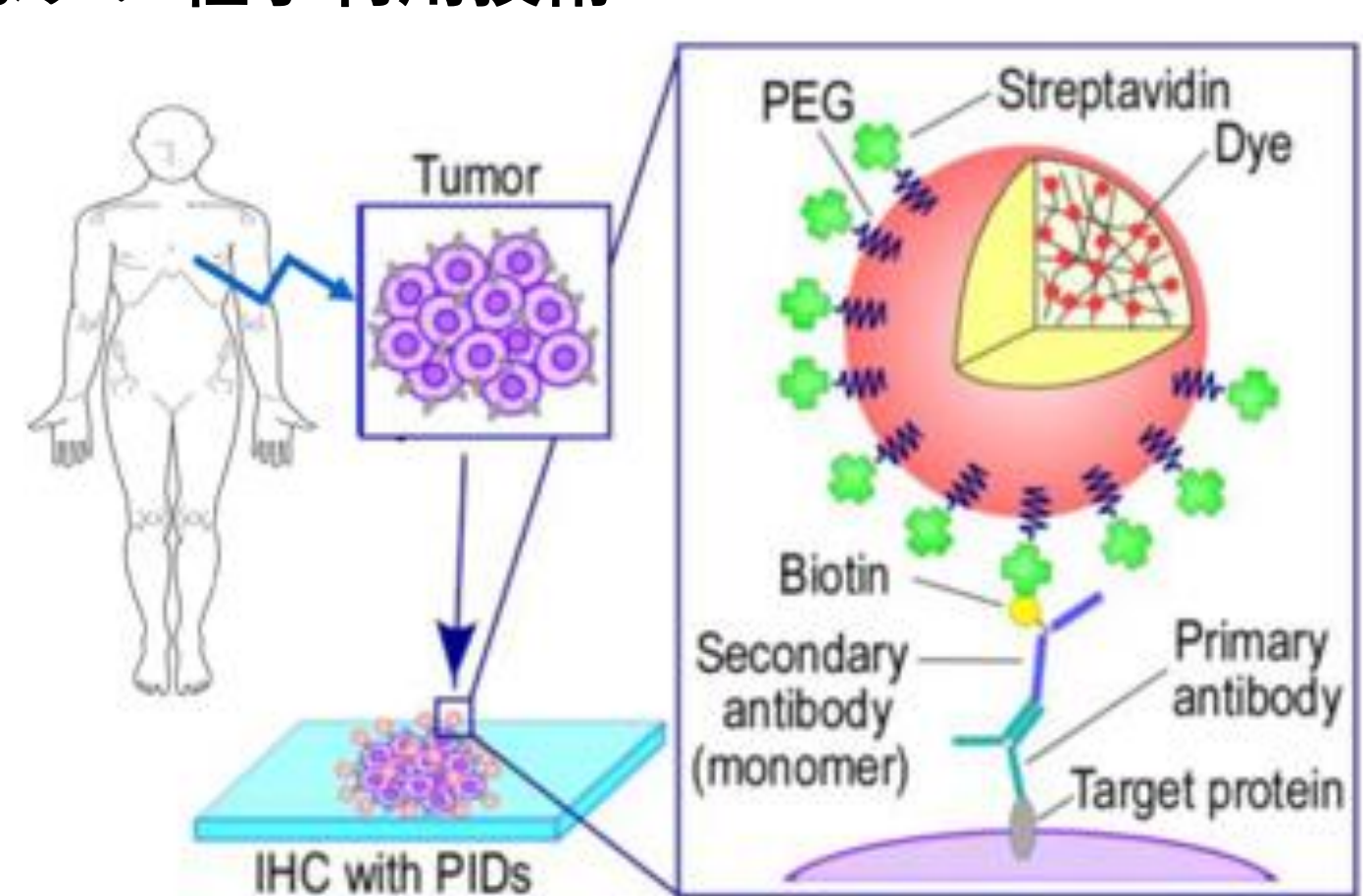
目的

これらの試験は、PSMA発現細胞株と臨床検体における新規蛍光粒子 (PID: Phosphor-Integrated Dots)を用いた検出技術による新しいQuanticell評価のために設計されています。下記の特徴についてQuanticell技術と一般的な免疫組織化学を比較しました。

- ・ 特異性
- ・ 検出感度
- ・ ダイナミックレンジ
- ・ 定量解析

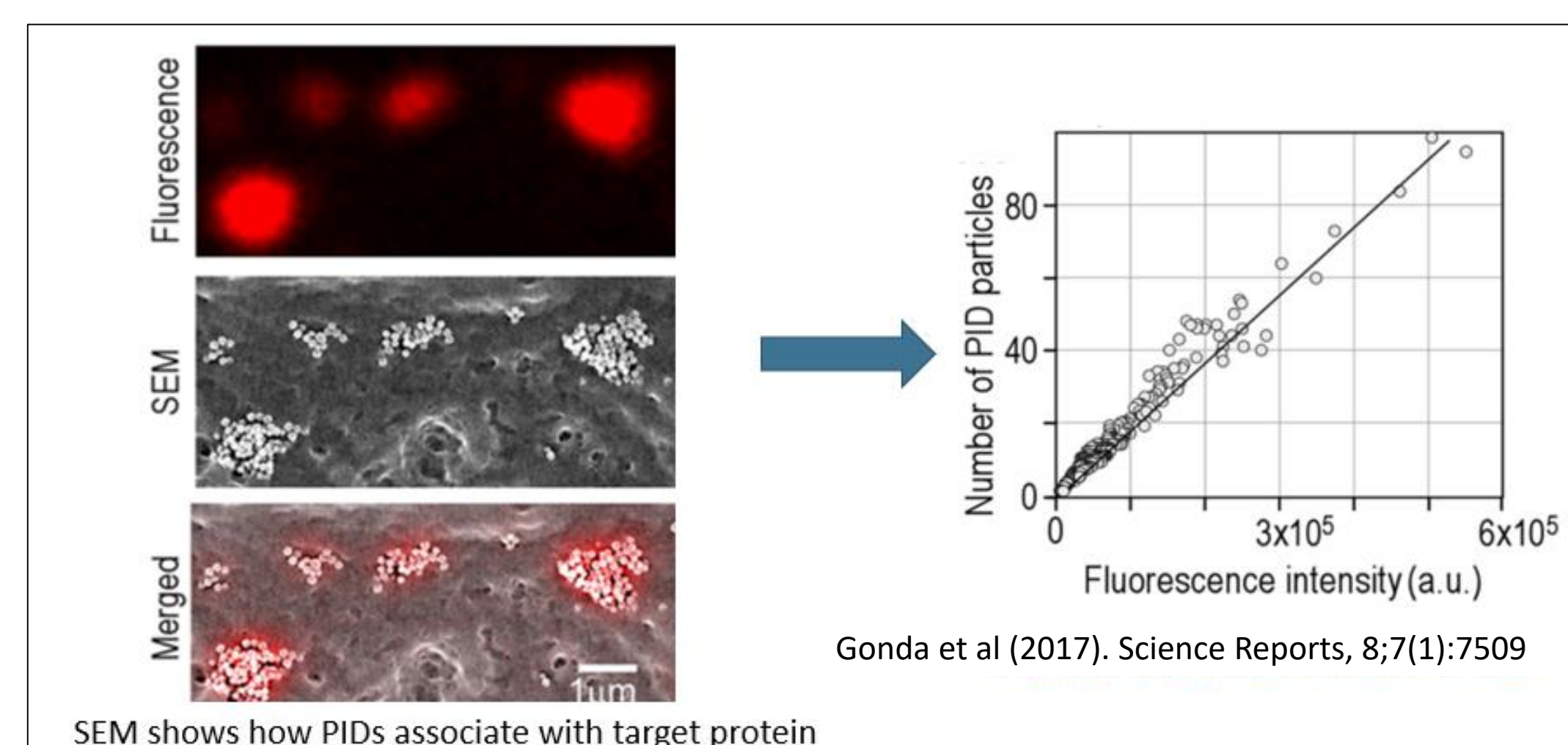
方法

新規なナノ粒子利用技術



Quanticell概略図。Quanticellは高感度で非常に多くのストレプトアビジンで被覆されたナノ粒子によって構成されています。Quanticell技術は市販の一次抗体とビオチン二次抗体を用いた一般的な免疫染色のワークフローを伴います。

定量解析



Quanticell定量評価法。蛍光顕微鏡と電子顕微鏡に基づいたPID粒子数を、それぞれの蛍光強度に対してプロットしました。顕微鏡画像の粒子数を評価するために、専用の解析ソフトウェアを開発しました。

特異性

PSMA発現細胞株上のみの特異的なシグナル

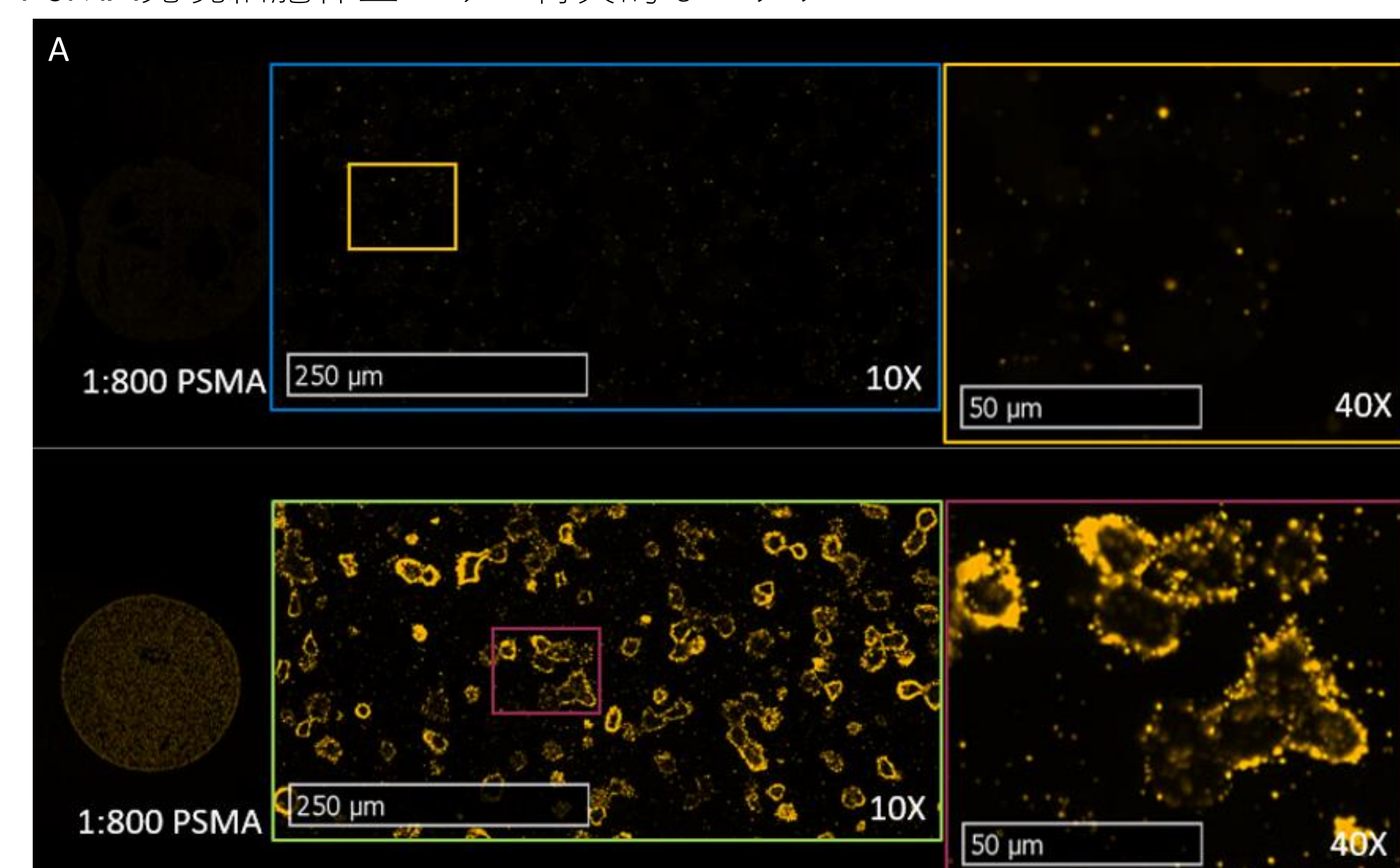


Figure 1: QuanticellのプロトコルはPSMA発現レベルの異なる様々な細胞株を用いて開発されました。高発現PSMA-CHO細胞株 (A, 下図)に比べ、非発現CHO細胞株(A, 上図)ではシグナルが見られないことから、PSMAへの特異的な染色を確認しました。PSMA低発現であるVCAP前立腺がん細胞をプロトコルの最適化に使用しました(データは示していません)。(B) CHO、VCAP、PSMA-CHO細胞株におけるQuanticellシグナルの定量評価。VCAP細胞株は陰性コントロールの標準偏差3SDよりも高いシグナルを示すことから、PSMA陽性の染色結果であると断定しました。

検出感度

比較可能な解析ワークフローを用いた、QuanticellとDABによる検出能の比較

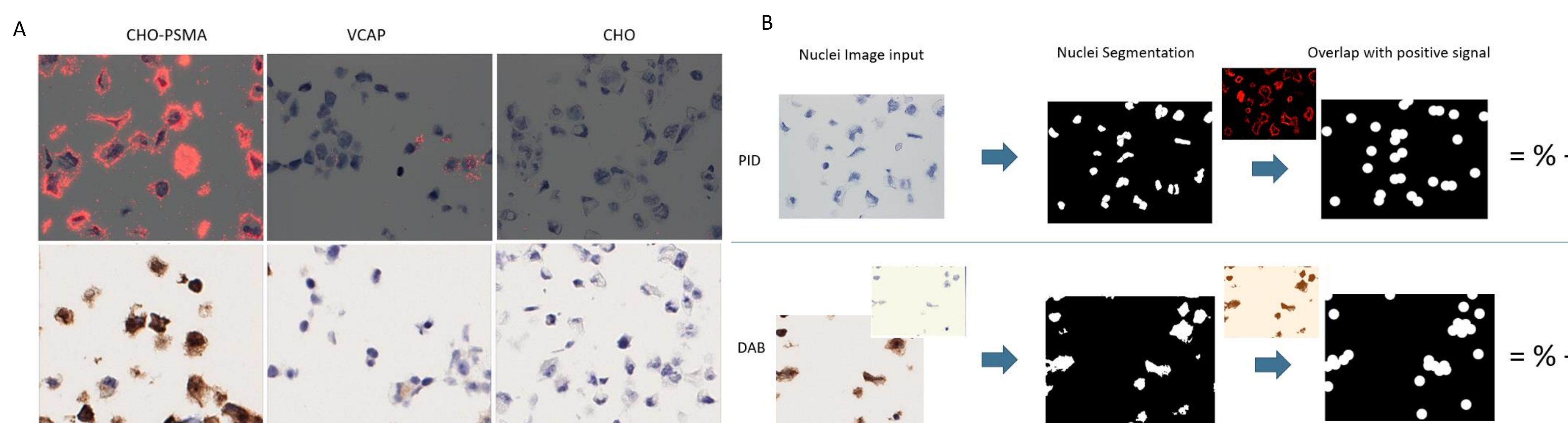
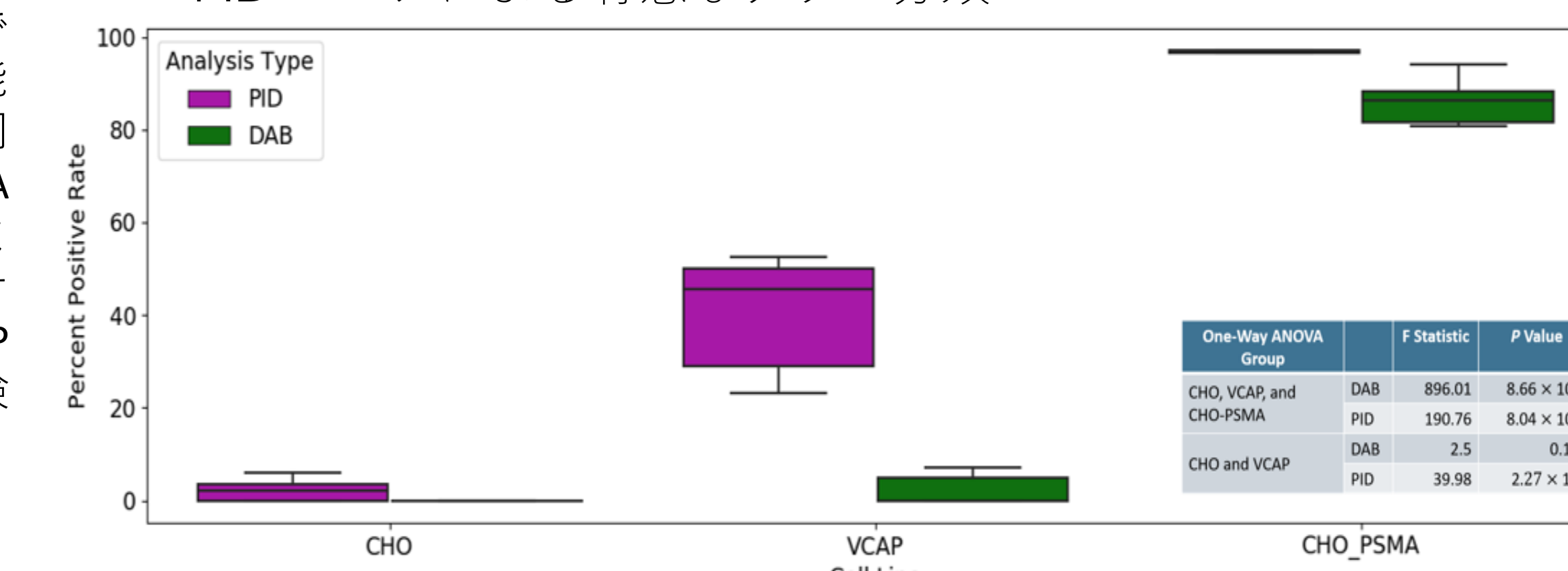


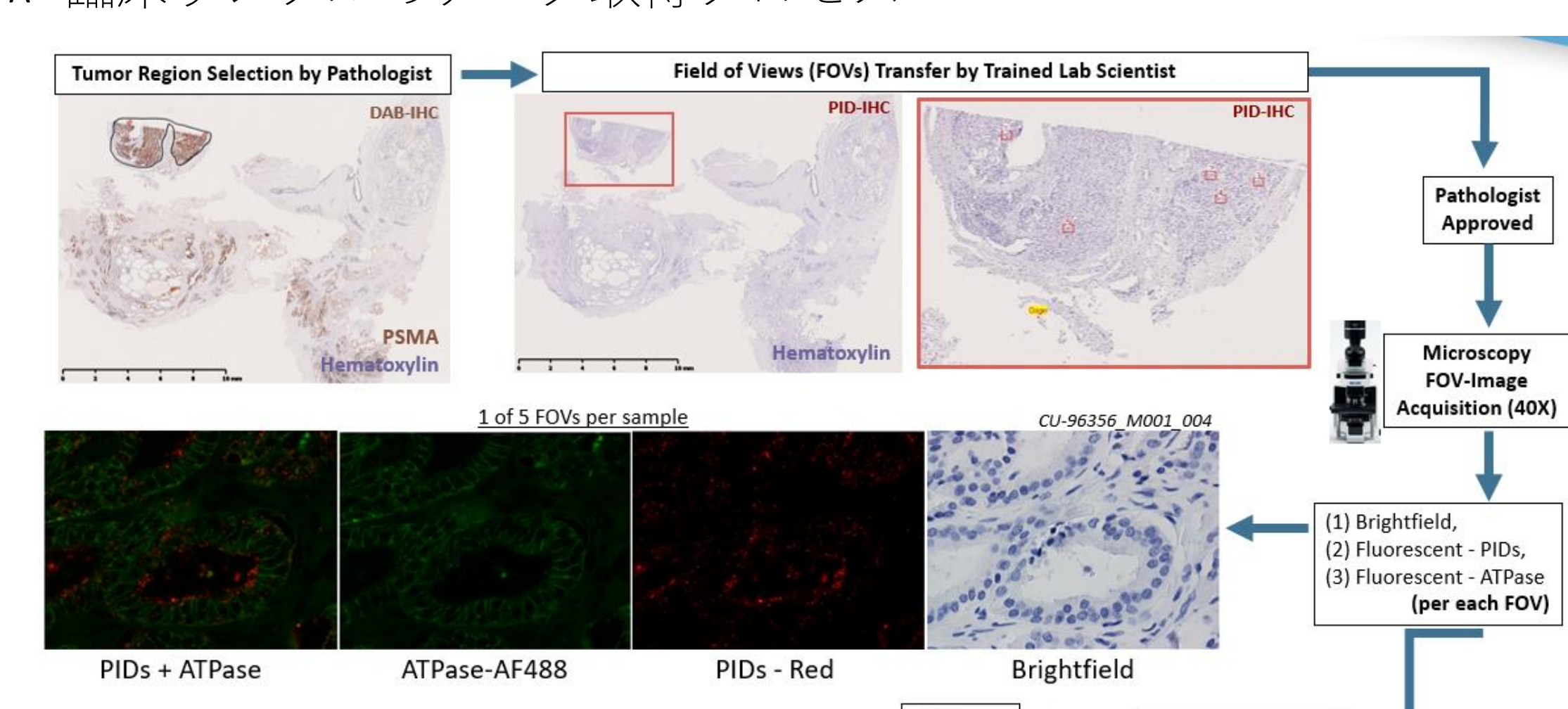
Figure 2: PSMAの検出におけるQuanticellの感度を、ジアミノベンジジン (DAB)発色と比較しました。(A) 細胞はQuanticell (上図)およびDAB (下図)によって染色しました。私達は、それぞれの技術で同定されたPSMA陽性細胞の割合を定量評価するために比較可能な解析方法を開発しました。両検出方法において、細胞数を同定、計測するためにヘマトキシリン染色を実施しました。PSMA陽性細胞の割合 (%)を測定するためにQuanticellの蛍光シグナルまたはDABの発色シグナルをヘマトキシリン画像の上に重ね合わせました (B)。QuanticellではPSMA陰性のCHO細胞とPSMA陽性VCAP細胞を有意に分類し、PSMA低発現レベルにおけるQuanticellの検出感度が向上しています。

c PIDスコアによる有意なクラス分類



定量解析とダイナミックレンジ

A 臨床サンプルのデータ取得プロセス



B 細胞膜解析のワークフロー: FOV画像データ

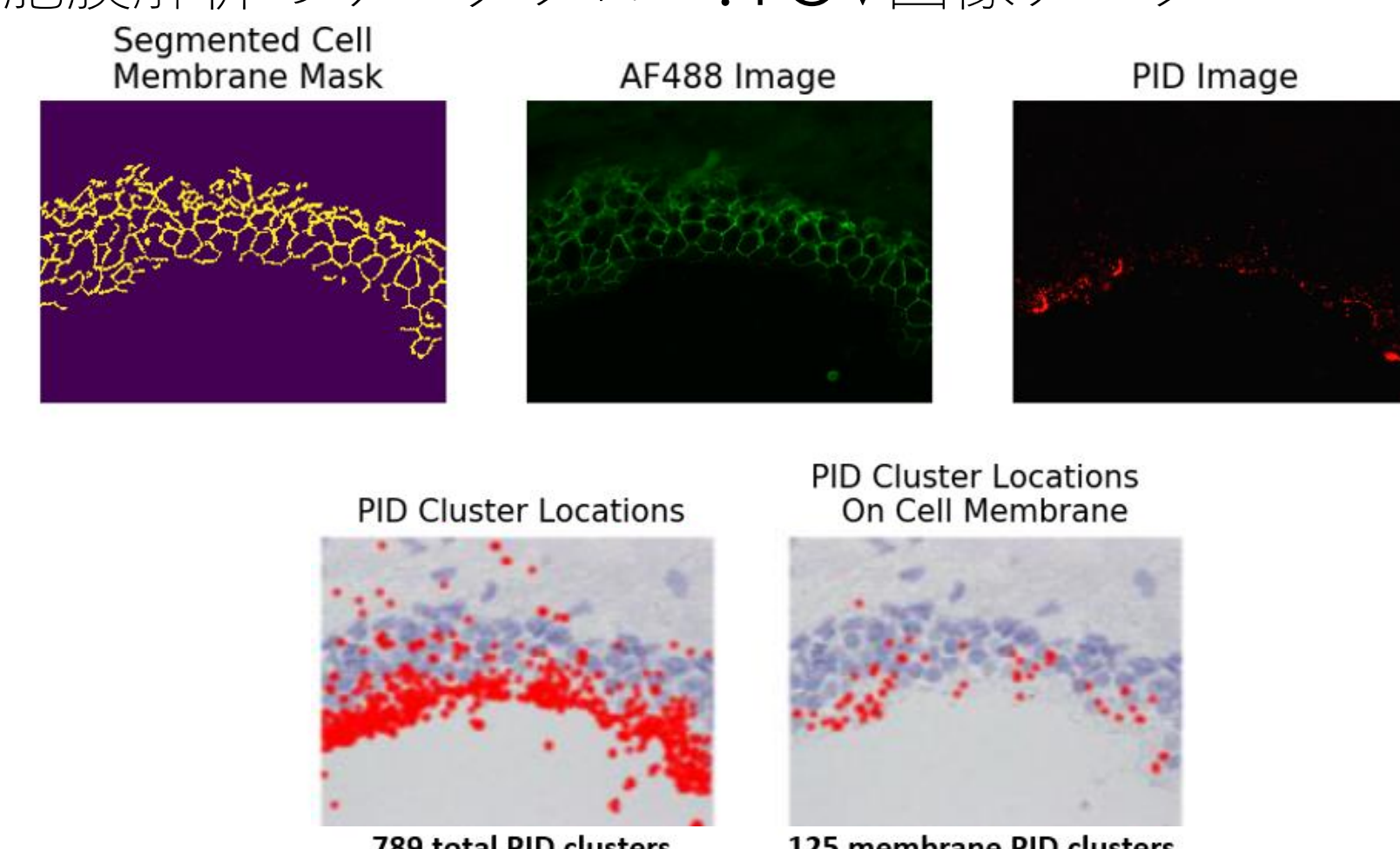
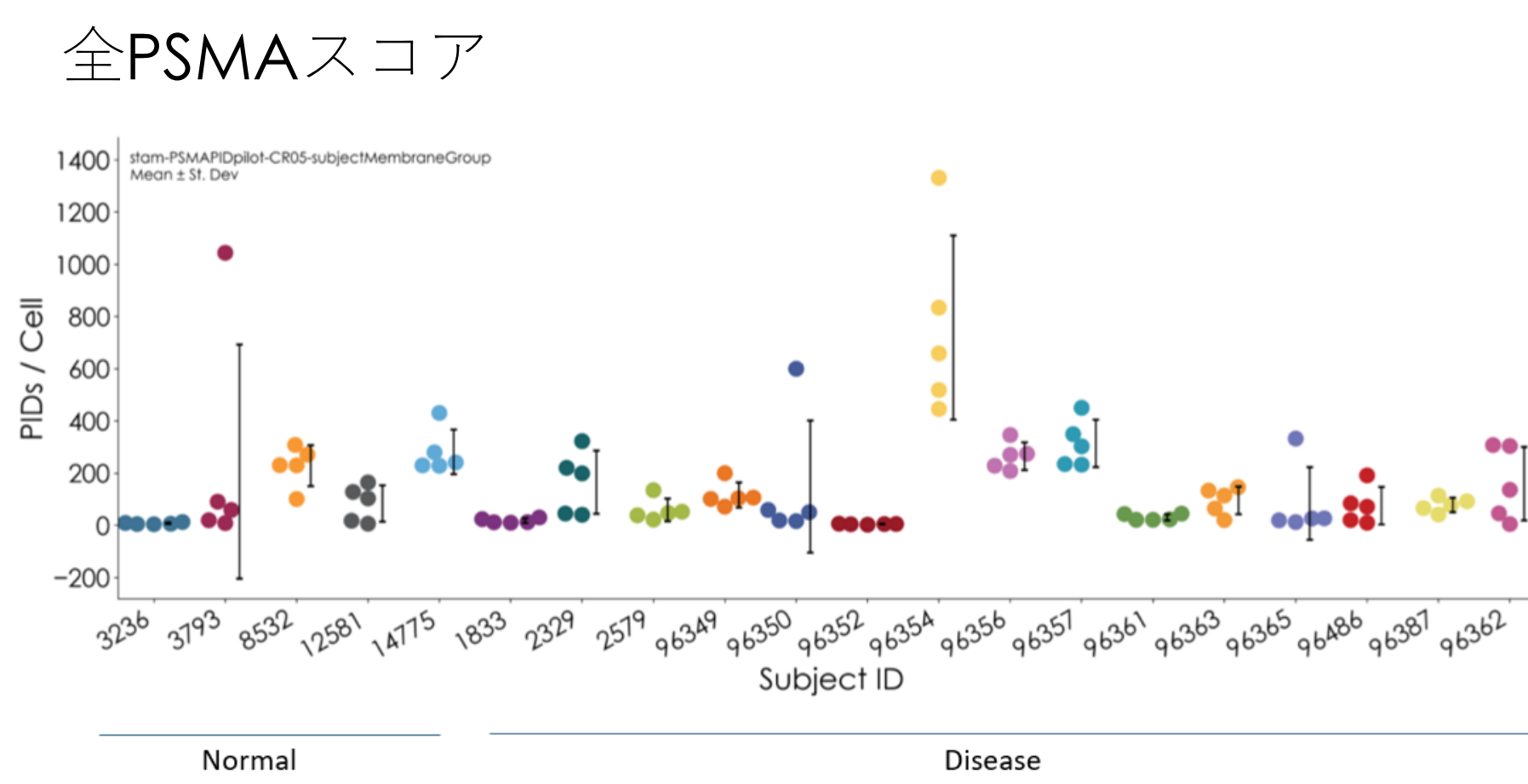
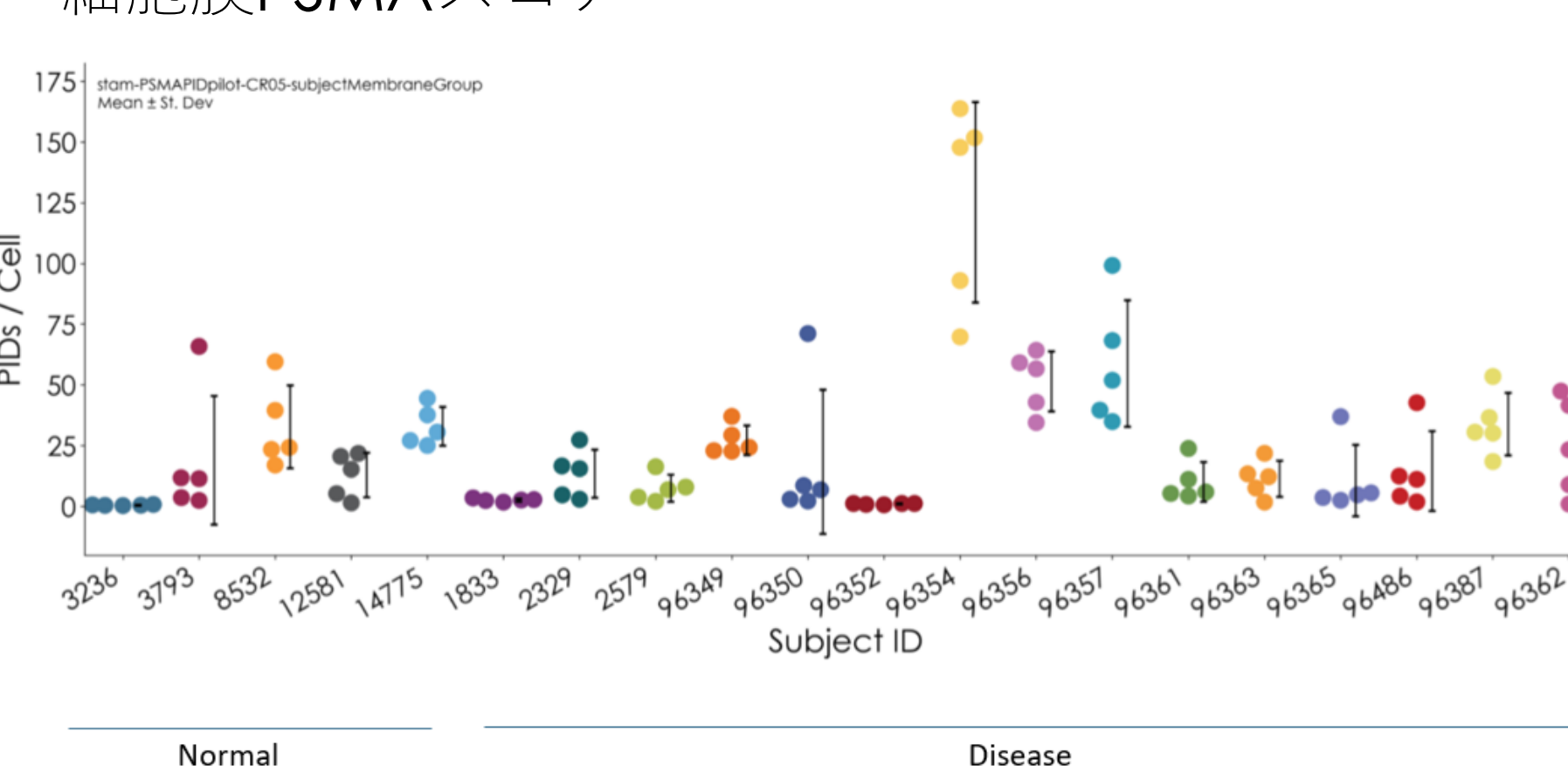


Figure 3: (A) 臨床サンプルの染色全体画像から、腫瘍細胞を含んだ複数の視野 (FOV)画像を取得するために高倍率蛍光顕微鏡を用いました。画像取得は3チャンネルを用いて行いました: PIDによるPSMA染色 (赤色チャンネル)、細胞膜標識のためのsodium potassium ATPase (Alexa Fluor 488)、核染色のためのヘマトキシリン染色 (明視野画像)。(B) 細胞膜関連PSMAの解析を可能にするために、QuanticellまたはPIDチャンネルの細胞膜をセグメント化して細胞膜をマスクしました。(C) 作成した画像と画像解析のワークフローを使用して、全PSMAの発現(上図)と細胞膜特異的なPSMAの発現(下図)をスコア化するために、解析用の独自アルゴリズムを開発し、適用しました。解析には健康者の生検 (n=5)と前立腺がん患者の生検 (n=15)を用いて行いました。PSMAシグナル (PID/cell)はFOV毎に測定し、それぞれのデータポイントで5 FOVを患者毎に解析しました。(D) 全PSMAスコアと細胞膜PSMAスコアに対して、高い相関関係が得られました。(E) 全PSMA解析より、患者間の相違とQuanticellによるダイナミックレンジを示すために、全20患者における患者毎の最も高いFOVスコアをプロットしました。

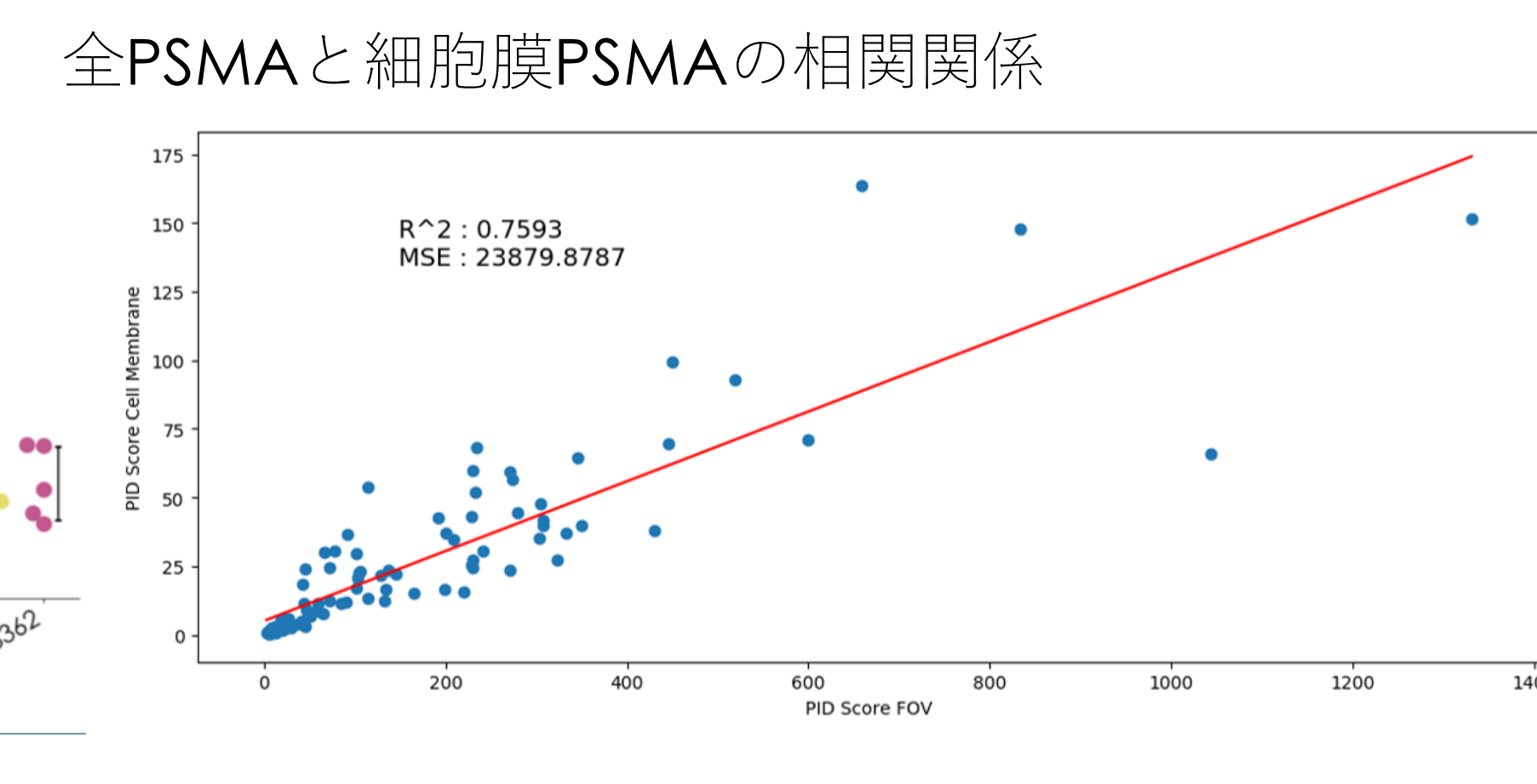
C 全PSMAスコア



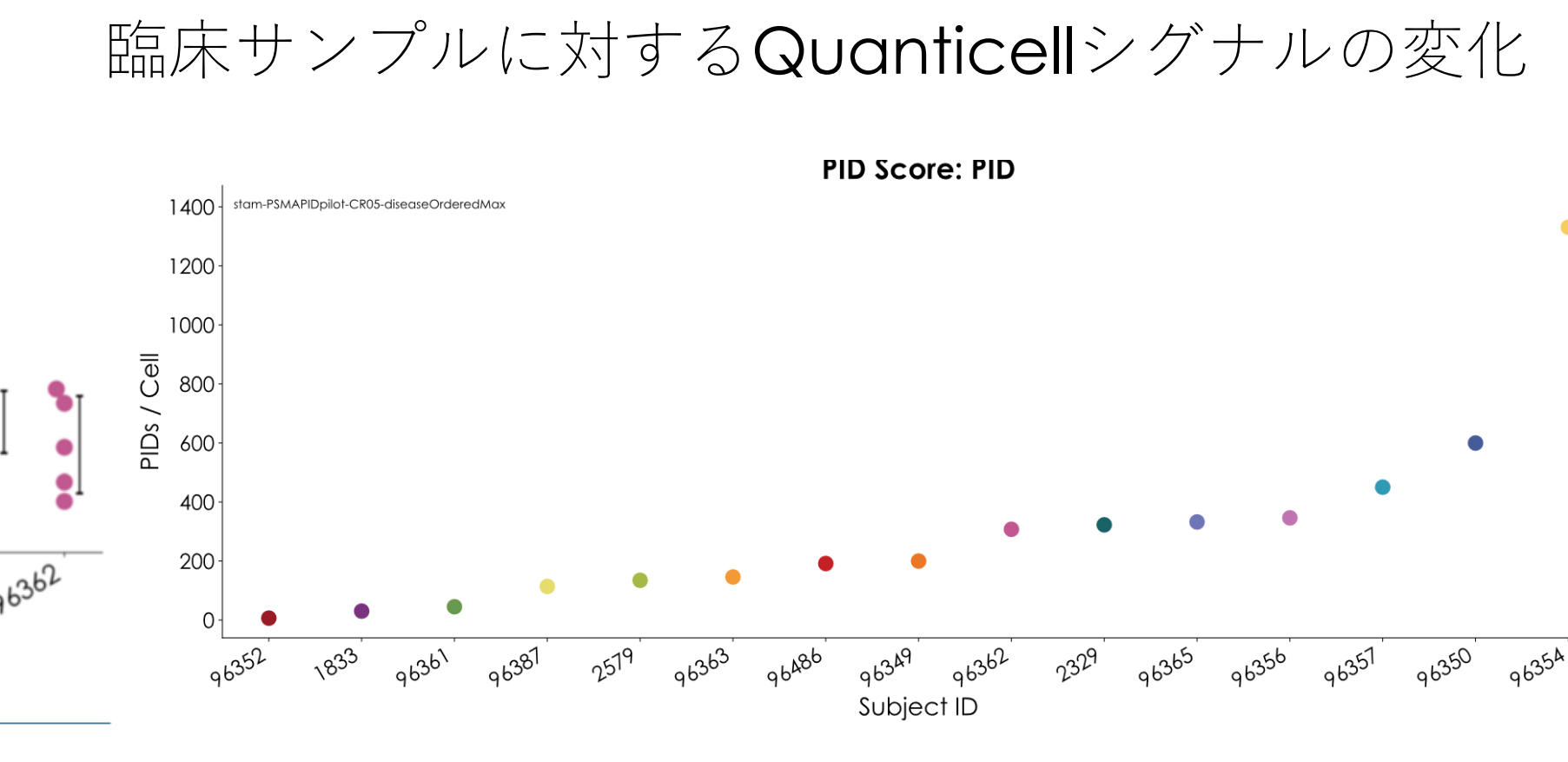
細胞膜PSMAスコア



D 全PSMAと細胞膜PSMAの相関関係



E 臨床サンプルに対するQuanticellシグナルの変化



まとめ

Quanticell技術は標的分子の発現レベルを定量評価するために必要な検出感度と特異性を提供し、ヒト腫瘍サンプルの評価に適用することが可能です。

特異性

PSMAに対するPID染色では、高いPSMA検出特異性を示しました。

検出感度

- 高いPSMA特異的なシグナルと最小のバックグラウンドシグナルにより、最適なS/N比を実現しました。
- PIDは一般的なIHCに比べ、PSMA低発現細胞検出において高い検出感度を示しました。

定量解析

Quanticellは細胞あたりのPSMAレベルを定量解析するのに最適な手法です。

ダイナミックレンジ

Quanticellは広い範囲の発現レベルに対して、PSMA発現を評価することができる可能性があります。

Disclosures

This study was funded by Amgen, Inc. JB is employed by and holds stock in Amgen Inc. JG was employed by and held stock in Amgen Inc. at the time the work was done.