

研 究 報 告 書  
一般課題：A  
(平成28年度)

令和2年8月30日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀 田 知 光 殿

研究施設 (公財) がん研究会 がん研究所

住 所 東京都江東区有明3丁目8-31

研究者氏名 大迫 智



(研究課題)

病理標本を基盤とした形態診断と分子診断を統合した新しい乳癌再発予測モデルの開発

平成29年1月25日付助成金交付のあった標記一般課題：Aについて研究が終了致しましたのでご報告いたします。

## 【背景・目的】

乳癌の術後薬物療法では、各患者のベースライン再発リスク（無治療であった場合の再発率）を正確に推定することでその患者に適した治療選択が可能となる。日常臨床での再発リスク評価には、年齢、腫瘍径、グレード、ホルモン受容体発現、HER2 発現、Ki67 など臨床病理学的因子が用いられるが、実地臨床で再発リスク評価に悩むことが多い。また、欧米ではこれらの因子を組み合わせた再発予測モデルが作成されているが、アジア人、若年者および高悪性度の癌で予測性能が劣ることが知られている。このことから、日本人（アジア人）乳癌のベースライン再発リスク予測モデルができると、個々の患者の再発リスクをより正確に評価でき、治療選択の個別化に貢献できる。

このような再発リスク予測モデルを作成するためには、術後薬物療法が標準的ではなかった 1980 年代以前の乳癌症例を多数集積する必要がある。研究者の所属施設ではその年代にも多数の手術症例があり、全症例の臨床病理データおよび病理標本が保管されているので、本研究を遂行できる本邦で数少ない施設の 1 つである。しかし、多数症例の病理組織ブロック検体を通常の whole section で薄切・染色すると、膨大な労力および費用が必要である。その労力および費用を減らす技術の 1 つとして組織マイクロアレイ（tissue microarray: TMA）の作製が知られている。

しかし、従来の TMA では、腫瘍細胞を評価するバイオマーカーでの whole section との一致率が比較的高いことが知られているが、間質の免疫微小環境を評価するバイオマーカーでの一致率については知られていない。そこで今回、再発リスク予測モデル作成の準備段階として、腫瘍細胞を評価するバイオマーカーに加えて、間質の免疫微小環境を評価するバイオマーカーにおいても代表ブロック whole section と判定の一致・相関の高い TMA を開発することを目的に研究を行った。

## 【対象】

1979～82 年および 2005～2006 年に手術が行われた乳癌 248 症例。

## 【方法】

### 1) 代表病理組織ブロックの選定

手術材料で最も浸潤癌が多く含まれる病理組織ブロック 1 つを代表ブロックとして選定した。代表ブロックは whole section で以下のバイオマーカーの評価を行った。

### 2) TMA の作製

手術材料で代表ブロック以外の病理組織ブロック（非代表ブロック）から、2 種類の TMA ブロックを作製した。1 つ目の TMA は、浸潤巣の辺縁から 2mm 径のコアをランダムに 3 本採取し、1 ブロックに最大 13 症例 39 コアを搭載した TMA（3 コア TMA）である。もう 1 つの TMA は浸潤巣の中心部から 2mm 径のコアを 1 本採取し、1 ブロックに最大 39 症例 39 コアを搭載した TMA（1 コア TMA）である。

### 3) バイオマーカーの評価

代表ブロック whole section、3 コア TMA および 1 コア TMA それぞれで、エストロゲン受容体（estrogen receptor: ER）、プロゲステロン受容体（progesterone receptor: PgR）、HER2、Ki67、PD-L1 および腫瘍浸潤リンパ球（tumor-infiltrating lymphocytes: TIL）の 6 つのバイオマーカーを評価した。なお、ER、PgR、HER2、Ki67 は腫瘍細胞を評価するバイオマーカーであり、PD-L1、TIL は間質の免疫微小環境を評価するバイオマーカーである。

ER および PgR は ASCO/CAP ガイドラインに従い、免疫染色での陽性率 1% をカットオフとした。HER2 は ASCO/CAP ガイドラインに従い、免疫染色と in situ hybridization 法を組み合わせて判定した。Ki67 は免疫染色で hot spot において 500 個以上の癌細胞をカウントし、標識率（%）を算出した。PD-L1 は、抗 PD-L1 抗体薬アテゾリズマブの添付文書に従い、免疫染色で腫瘍領域内の免疫細胞の陽性率 1% をカットオフとした。TIL は International TILS Working Group のガイドラインに従い、ヘマトキシリン・エオジン染色標本で腫瘍領域内間

質に占めるリンパ球・形質細胞の割合(%)を判定した。

#### 4) 統計解析

代表ブロック whole section のバイオマーカー評価を基準(gold standard)として、3コア TMA および 1コア TMA での判定を比較した。陽性・陰性とカテゴリー判定される ER、PgR、HER2、PD-L1 は、一致率(%)および一致度( $\kappa$ 係数)を算出した。連続変数(%)として判定される Ki67 および TIL は、級内相関係数(intraclass correlation coefficient)を算出した。 $\kappa$ 係数および級内相関係数は、過去の報告から 0~0.4 を不良(poor)、0.4~0.6 を中等度(moderate)、0.6~0.8 を良好(good)、0.8~1.0 を非常に良好(excellent)とした。

#### 【結果】

1) 3コア TMA での判定は、腫瘍細胞を評価するバイオマーカー(ER、PgR、HER2、Ki67)と間質の免疫微小環境を評価するバイオマーカー(PD-L1、TIL)の双方において、代表ブロック whole section と非常に良好な一致・相関を示した(表1、表2)。

2) 1コア TMA での判定は、すべてのバイオマーカーで 3コア TMA よりもやや低い一致・相関であった(表1、表2)。しかし、ER および HER2 では非常に良好な一致、PgR、Ki67、TIL でも良好な一致・相関であった。一方、PD-L1 の一致度は中等度であった。

表1. 代表ブロック whole section を基準とした場合の 3コア TMA および 1コア TMA の ER、PgR、HER2、PD-L1 判定の一致率および一致度

	3コア TMA		1コア TMA	
	一致率 (%)	一致度 ( $\kappa$ )	一致率 (%)	一致度 ( $\kappa$ )
ER	97.2	0.92	94.8	0.86
PgR	91.1	0.82	88.7	0.77
HER2	100.0	1.00	99.2	0.96
PD-L1	91.9	0.82	80.2	0.54

表2. 代表ブロック whole section を基準とした場合の 3コア TMA および 1コア TMA の Ki67、TIL 判定の級内相関係数

	3コア TMA	1コア TMA
Ki67	0.90	0.75
TIL	0.92	0.76

#### 【考察・展望】

今回、代表ブロックを将来の研究のために温存し、非代表ブロックから 3コアと 1コアの 2種類の TMA を作製する手法を開発した。

3コア TMA は、腫瘍細胞を評価するバイオマーカーと間質の免疫微小環境を評価するバイオマーカーの双方において、代表ブロック whole section での判定と非常に良好な一致・相関を示した。この 3コア TMA をバイオマーカー判定に用いることで、whole section での判定と比較すると、ブロック薄切や染色の労力と費用を 13 分の 1 に減少させることができる。また、1コア TMA は、腫瘍内不均一性の低いバイオマーカーにおいて、代表ブロック whole section での判定と非常に良好な一致・相関を示した。腫瘍内不均一性の低いバイオマーカーにおいて 1コア TMA を用いることで、労力と費用を 39 分の 1 に減少させることができる。

今後、これらの TMA 作製手法を活用して、過去の多数症例のバイオマーカー評価を効率的に行い、乳癌ベースライン再発リスク予測モデルの開発を進めたい。