

Biomarker判定

独立行政法人広島市立病院機構
広島市立北部医療センター安佐市民病院
病理診断科・臨床検査部

金子 真弓



The Japanese Breast Cancer Society
since 1992



筆頭演者の利益相反状態の開示

すべての項目に該当なし

目次

- Biomarker検索—各解析段階における注意点
 - Preanalytical
 - Analytical
 - Postanalytical
 - 良いFFPE検体作成のために
 - 免疫染色評価方法の基本
- ER, PgR
- Her2
 - T-DXd適応拡大 ～Her2低発現について～
- Ki67
- PD-L1
- TIL

Biomarker検索 ～解析段階別に見る注意点～

Pre-analytical phase 解析前段階

- 検査依頼
- 組織採取
- 検体処理
 - 検体搬送
 - 組織固定
 - パラフィンブロック (FFPE)作成／保存
 - 包埋
 - 未染標本作成

Analytical phase 解析段階

- 検体選定
- 検査
 - 免疫染色
 - *In situ* hybridization
 - 遺伝子検索

Post-analytical phase 解析後段階

- データ解析
 - 病理診断
 - 染色結果判定
 - 遺伝子検索結果判定

良いFFPE検体のために

-Formalin Fixed Paraffine Embedded tissue-

FFPE (formalin fixed paraffine embedded)検体／パラフィン包埋材料

検体として利用されている検査

- 免疫染色(IHC法)
- In situ hybridization (ISH)法
 - mRNAの定量・局在
- DNA, mRNAの抽出
 - PCR
 - 多遺伝子アッセイ
 - ・ Oncotype Dx
 - 遺伝子パネル検査 (by 次世代シーケンサー)



血液検体も対象

FFPE (formalin fixed paraffine embedded)検体／パラフィン包埋材料

品質確保のための注意点

組織採取から固定まで

➤乾燥、核酸・蛋白変性を防ぐ

- 摘出から固定までの時間の短縮

室温 1 時間以内 (ASCO/CAP HER2検査ガイドライン)

30分以上室温放置は避けるべき

- 核酸・蛋白分解酵素の至適温度を避けるための冷蔵保存

冷蔵保存(4°C) でも 3 時間以内に固定が望ましい

- 中性緩衝ホルマリンの組織浸透速度は遅い 1mm/1h

ホルマリン液につけても中心部は固定不良となる。

大きな組織は、割を入れるなどしてホルマリン浸透を良くする工夫を



予め小さく切り出し特殊検査用ブロックを作成

FFPE (formalin fixed paraffine embedded)検体／パラフィン包埋材料

品質確保のための注意点

組織採取から固定まで

- 固定液：10%中性緩衝ホルマリン、検体容積の10倍量
- 固定時間：
 - 6～72時間 (ASCO/CAP HER2ガイドライン)
 - 48時間以内 (各種遺伝子検査)
- 石灰化に対する脱灰操作は遺伝子検査検体として不適

品質確保のための注意点

検体選定

- FFPE検体は長期間に保管される
 - 後ろ向き検査可能
 - 長期間保管、保管状況によりDNA, RNA劣化が進行
3年以内が望ましいとの報告あり

FFPE (formalin fixed paraffine embedded)検体／パラフィン包埋材料

品質確保のための注意点

パラフィン包埋材料から未染標本作成、解析まで

- IHC法 **4 μ m**厚の未染標本推奨
 - 切片厚は、染色強度に影響する
- 薄切後、室温保存で未染標本の染色性は劣化する
 - 薄切後すぐに染色できない場合、なるべく暗冷所（4℃）で保管
 - 室温保存の場合、**6週間以内**に染色することが推奨
 - 基本的には、薄切後速やかに解析することが望ましい

免疫染色評価方法の基本

免疫染色評価方法の基本

存在様式 ～染色強度～

- 有／無 センチネルリンパ節の転移がん細胞 サイトケラチン
- 連続的
 - 恣意的に強度を層別化 HER2、ホルモンレセプター

細胞内局在

- 核 ホルモンレセプター
- 細胞膜 HER2
- PD-L1(22C3) 癌細胞*
 - * 免疫細胞では、細胞膜、細胞質、いずれの陽性所見でも陽性細胞として評価
- 細胞質 サイトケラチン

免疫染色評価方法の基本

評価対象細胞

- 浸潤癌細胞 HER2, Ki-67
- 浸潤癌細胞 + 非浸潤癌細胞 ホルモンレセプター
- 免疫細胞 PD-L1 (SP142)
- 浸潤癌細胞 + 免疫細胞 PD-L1 (22C3)

陽性率

- 陽性癌細胞数 / 全癌細胞数 × 100 = % ホルモンレセプター、Ki-67
- IC% 陽性免疫細胞膜面積 / 腫瘍面積 PD-L1 (SP142)
- CPS (combined positive score) PD-L1 (22C3)
 陽性癌細胞数 + 陽性免疫細胞数 / 全癌細胞 × 100

免疫染色のための一次抗体

体外診断用医薬品 (In Vitro Diagnostic)

- 疾病の診断や予防、治療効果の判断のために、体外で患者の試料を対象に検査を行う際、使用される試薬
- 様々なクローンが存在 (抗原認識部位の違いなど)
 - ER、PgR
 - HER2(HER2低発現検索用以外)

コンパニオン診断薬

- 医薬品の安全性と有効性を担保するために、医薬品の投与に必須の診断薬
- 抗体のクローンのみならず、染色方法も厳密に規定される
 - HER2(HER2低発現検索用)
 - PD-L1

乳癌診療における Biomarker判定の実際

乳癌診断の推移 ～治療薬選択に特化した診断へ～

phenotype

- 組織型
- 異型度
- 浸潤径
- 脈管侵襲
- リンパ節転移

Intrinsic subtype

- Luminal A
 - ER and /or PgR +
 - HER2 -
- Luminal B
 - ER and /or PgR +
 - HER2 +
- HER2 overexpression
 - ER and PgR -
 - HER2 +
- Basal like
 - triple negative
 - CK5/6 +or EGFR +

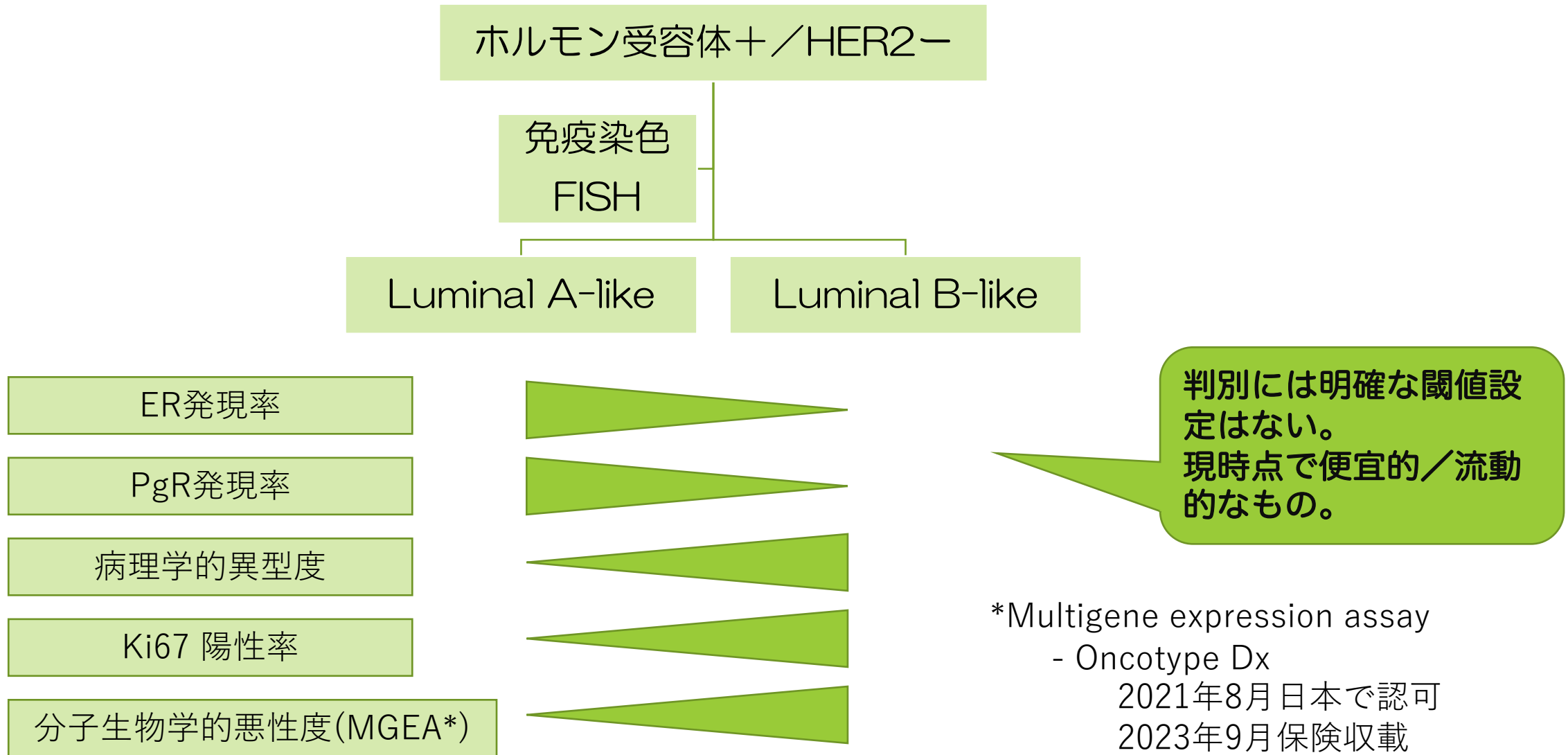
Gene expression profiling

- Multigene expression assay
 - Oncotype Dx
- ゲノム医療
 - Foundation one

ER, PgR検索の臨床的意義

- ERの発現は、内分泌療法効果予測因子として有用で乳癌診療上必須と考えられている。
- PgRはエストロゲンによりERを介し誘導されるERの標的物質の1つであり、PgRの発現の有無はエストロゲンとERの機能が正常に働いているかの目安となる。
- ER陽性乳癌でPgRは予後予測因子としての有用性が報告され、PgR検索も今日の乳癌診療上、必須と考えられてる。

現状におけるintrinsic subtype分類方法 Luminal A-likeかLuminal B-likeか



BQ3. ホルモン受容体検査はどのような目的？

内分泌療法の適応判定のため、ホルモン受容体の発現状況を検索

検査には免疫組織化学法（IHC法）を用いる

対象は浸潤癌 + 非浸潤癌

➤ **J-Score:** 0 / 1 / 2 / 3a / 3b

陽性占有率をScore化

➤ **Allred Score:** 0 / 2 / 3 / 4 / 5 / 6 / 7 / 8

陽性占有率・陽性強度

それぞれScore化し組み合わせにより評価

ホルモン受容体 (ER, PgR) 評価法

J-Score

陽性細胞占有率

染色強度は問わない

陰性

Score 0

0%

Score 1

1%

Score 2

10%

Score 3a

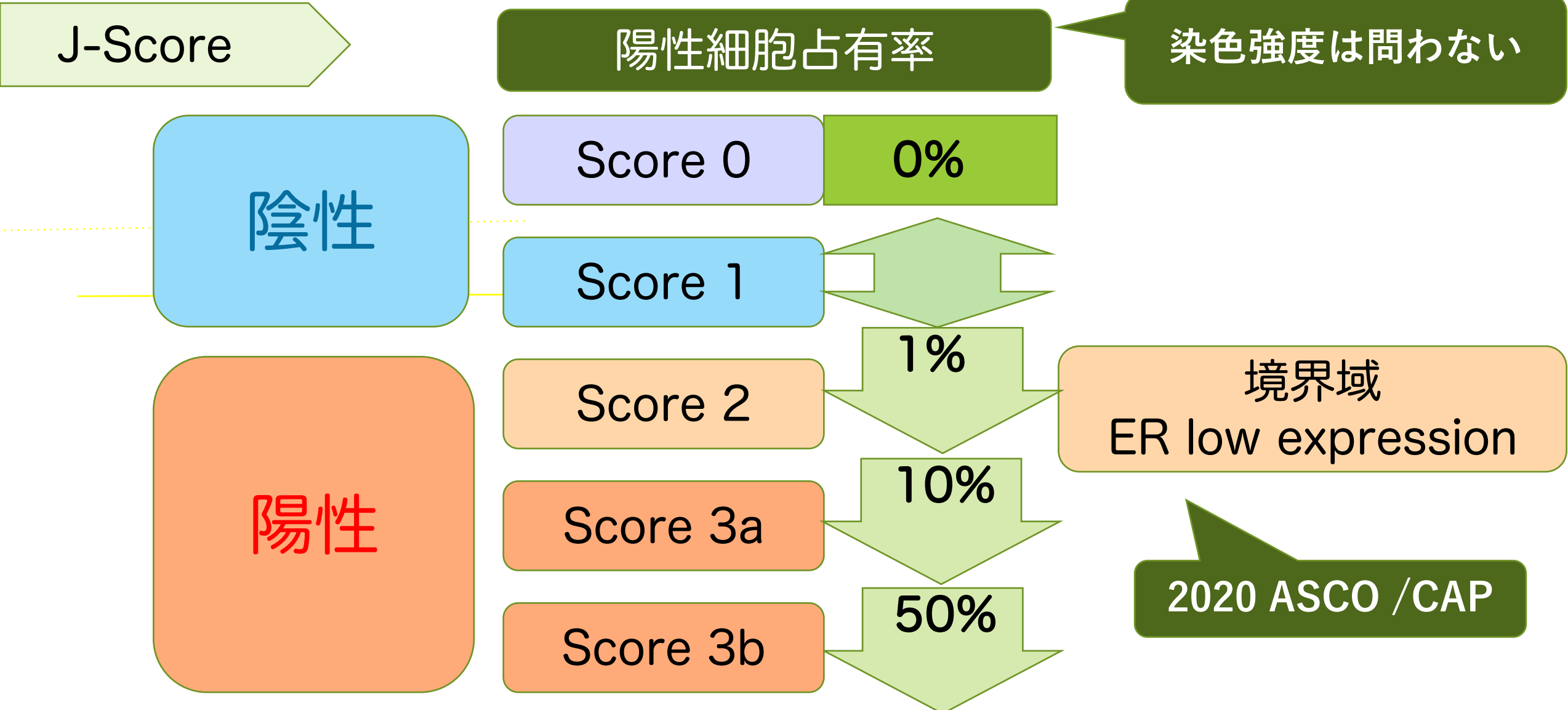
50%

Score 3b

陽性

境界域
ER low expression

2020 ASCO /CAP



ホルモン受容体 (ER, PgR) 評価法

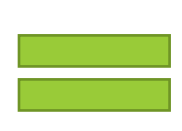
Allred Score

Total score (TS) = 0 / 2 ~ 8

Proportional Score
PS (陽性細胞占有率)



Intensity Score
IS (染色強度)



TS

Score 0

0%

Score 1

Score 2

1%

Score 3

10%

Score 4

1/3

Score 5

2/3

Score 0 : 陰性

Score 1 : 弱陽性

Score 2 : 中等度陽性

Score 3 : 強陽性

Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: ASCO/CAP Guideline Update

Kimberly H. Allison, MD¹; M. Elizabeth H. Hammond, MD²; Mitchell Dowsett, PhD³; Shannon E. McKernin⁴; Lisa A. Carey, MD⁵; Patrick L. Fitzgibbons, MD⁶; Daniel F. Hayes, MD⁷; Sunil R. Lakhani, MD^{8,9}; Mariana Chavez-MacGregor, MSc¹⁰; Jane Perlmutter, PhD¹¹; Charles M. Perou, PhD⁵; Meredith M. Regan, ScD¹²; David L. Rimm, MD, PhD¹³; W. Fraser Symmans, MD¹⁰; Emina E. Torlakovic, MD, PhD^{14,15}; Leticia Varella, MD¹⁶; Giuseppe Viale, MD^{17,18}; Tracey F. Weisberg, MD¹⁹; Lisa M. McShane, PhD²⁰; and Antonio C. Wolff, MD²¹

J Clin Oncol 38:1346-1366. © 2020 by American Society of Clinical Oncology

- ER/PgR：陽性細胞が1%以上であれば陽性
- 但し、1～10%の場合；ER low positiveと記載
- ER low positive症例では、陽性細胞%、染色強度、内部および外部コントロールの染色状況を記載
- DCIS症例で、内分泌療法適応決定のためER検査が推奨

内分泌療法奏功性に差異

BQ4. HER2検査はどのような目的で、どのように行うか？

抗HER2療法の適応判定のため、すべての浸潤性乳癌に対して、免疫組織化学法（IHC法）や*in situ* hybridization (ISH)法を用いた検査を行う

HER2とは

- 上皮成長因子受容体(EGFR)遺伝子と類似構造を有する癌遺伝子
- HER2蛋白は細胞膜に局在する受容体
- チロシンキナーゼ活性を有し、細胞増殖と分化に関連する
- 浸潤性乳癌の15～25%で遺伝子増幅ないし蛋白過剰発現あり
 - 抗HER2療法未施行の場合、予後不良

BQ4. HER2検査はどのような目的で、どのように行うか？

➤ トラスツマブなどの抗HER2療法の標的

体外診断用医薬品	会社名
ダコHercepTest II	アジレント・テクノロジー
ベンタナI-VIEW パスウェーHER2 (4B5)	ロッシュ・ダイアグノスティクス
ベンタナultraVIEW パスウェーHER2 (4B5)	ロッシュ・ダイアグノスティクス
ヒストファインHER2キット (MONO)	ニチレイバイオサイエンス
ヒストファインHER2キット (POLY)	ニチレイバイオサイエンス
BondポリマーシステムHER2テスト	ライカマイクロシステムズ

➤ 2018 ASCO/CAPにて判定法の改訂あり

浸潤病巣で評価！

HER2 IHC score判定

	2001 HER2検査ガイドライン	ASCO/CAP2011	ASCO/CAP2013 HER2検査ガイド第4版(2014)	ASCO/CAP 2018
0 陰性	細胞膜に陽性染色なし、あるいは細胞膜の陽性染色がある癌細胞<10% (細胞質陽性染色は判定対象外)			染色像が認められない、または不完全および、かすかな/かろうじて膜染色が認められる≤10%
1 +	かすかな細胞膜の染色性がある癌細胞≥10%細胞膜のみが部分的+			かすかな/かろうじて部分的な膜染色が認められる>10%
2 + equivocal	弱/中等度の完全な細胞膜の陽性染色がある癌細胞≥10%	既分類+強い完全な全周性の膜染色が認められる 10~30%	不完全/または弱/中等度の全周性の膜染色が認められる>10%, または強い完全な全周性の膜染色が認められる≤10%	弱/中等度の全周性の膜染色が認められる>10%
3 + 陽性	強い完全な細胞膜の陽性染色がある癌細胞≥10%	強い完全な全周性の膜染色が認められる >30%		強い完全な全周性の膜染色が認められる>10%

リフレックステスト (同じ検体を用いてISH法で)、または新たな検査 (可能な限り新たな検体を用いてIHC法またはISH法で) を実施しなければならない。

トラスツズマブ デルクステカンT-DXd適応
HER2 低発現乳癌の診断

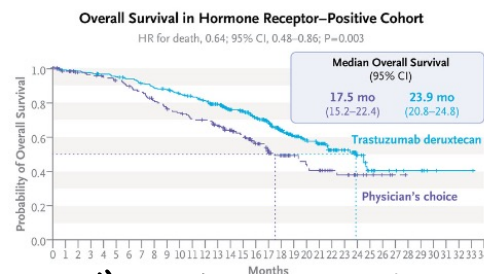
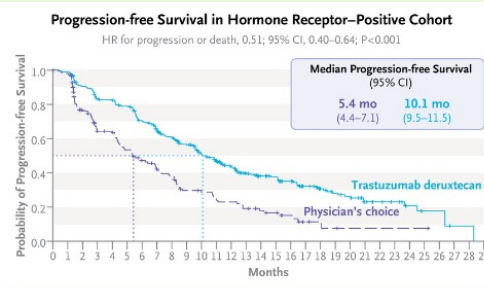
HER2 低発現乳癌に対するトラスツズマブ デルクステカン T-DXdと、そのコンパニオン診断CDx 認可まで

✓ 2022. Destiny-Breast04 trial



Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Low Advanced Breast Cancer

S. Modi, W. Jacot, T. Yamashita, J. Sohn, M. Vidal, E. Tokunaga, J. Tsurutani, N.T. Ueno, A. Prat, Y.S. Chae, K.S. Lee, N. Niihara, Y.H. Park, B. Xu, X. Wang, M. Gil-Gil, W. Li, J.-Y. Pierga, S.-A. Im, H.C.F. Moore, H.S. Rugo, R. Yerushalmi, F. Zagouri, A. Gombos, S.-B. Kim, Q. Liu, T. Luo, C. Saura, P. Schmid, T. Sun, D. Gambhire, L. Yung, Y. Wang, J. Singh, P. Vitazka, G. Meinhardt, N. Harbeck, and D.A. Cameron, for the DESTINY-Breast04 Trial Investigators*



CONCLUSIONS

Trastuzumab deruxtecan significantly prolonged progression-free and overall survival among previously treated patients with HER2-low metastatic breast cancer, regardless of hormone-receptor status.

- ✓ 2023. 3.27 T-DXd (トラスツズマブ デルクステカン) が、「化学療法歴のあるHER2低発現の手術不能又は再発乳癌」に適応拡大
- ✓ 2023. 4.28 T-DXd (トラスツズマブ デルクステカン) 適応判定のためのコンパニオン診断CDxが保険償還承認
- ✓ 2023. 5. 1 保険診療としてCDxによる再検査実施可能に

T-DXd適応判定のためのコンパニオン診断の注意点

✓HER2低発現：

HER2 IHC法 1+、または、IHC法 2+かつISH法陰性の乳癌

✓コンパニオン診断：

ベンタナultraView パスウエーHER2 (4B5) (以下CDx) 必要

✓CDxによるHER2低発現の診断結果は2023年3月27日 (T-DXd適応追加承認日) 以降のものが必要

✓CDxを用いたHER2再検査の医学的な対象：

過去のHER2検査で陰性 (IHC 0, 1+, 2+かつISH陰性)、かつ、今後T-DXdの使用を考慮する場合

✓T-DXdの適応は、従来のHER2陽性 (IHC法3+、または、IHC法2+かつISH法陽性) とHER2低発現の両者となるため、T-DXd使用においてISH法による確認は不要

T-DXd適応判定のためのコンパニオン診断の注意点

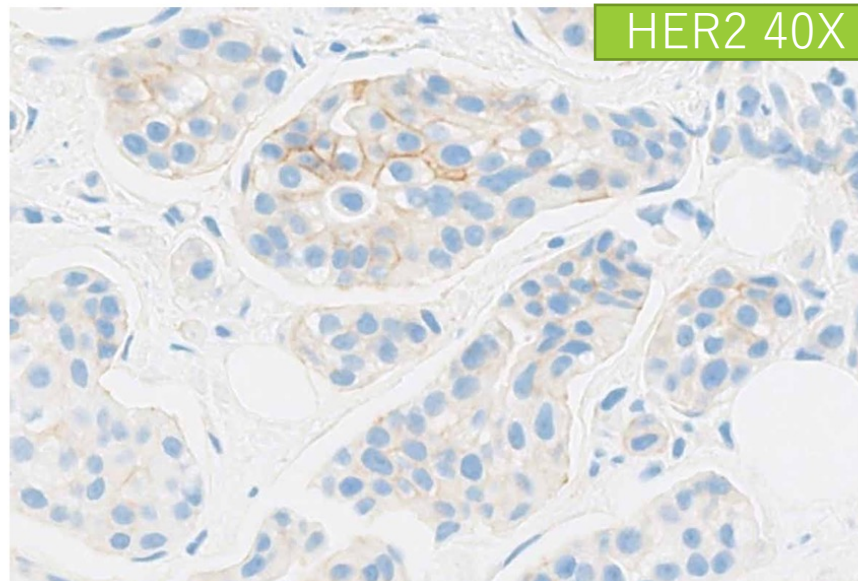
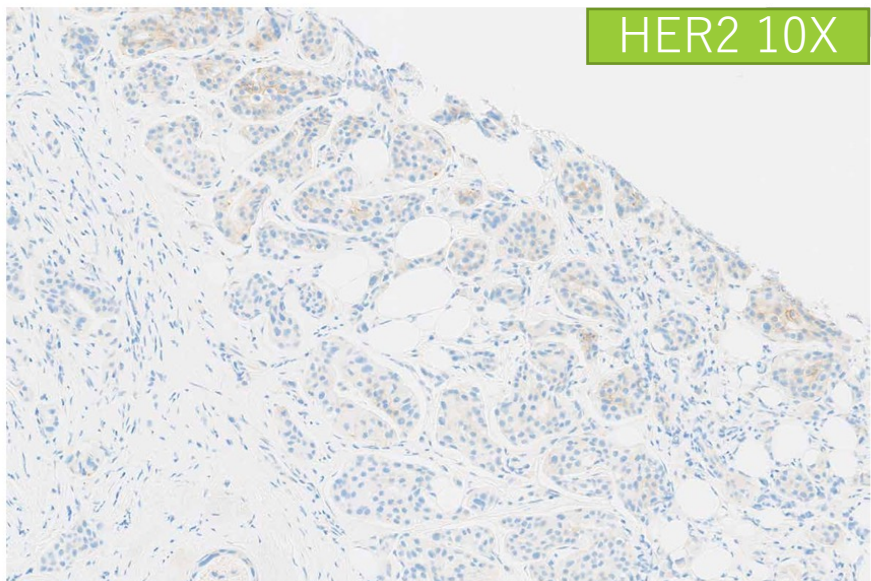
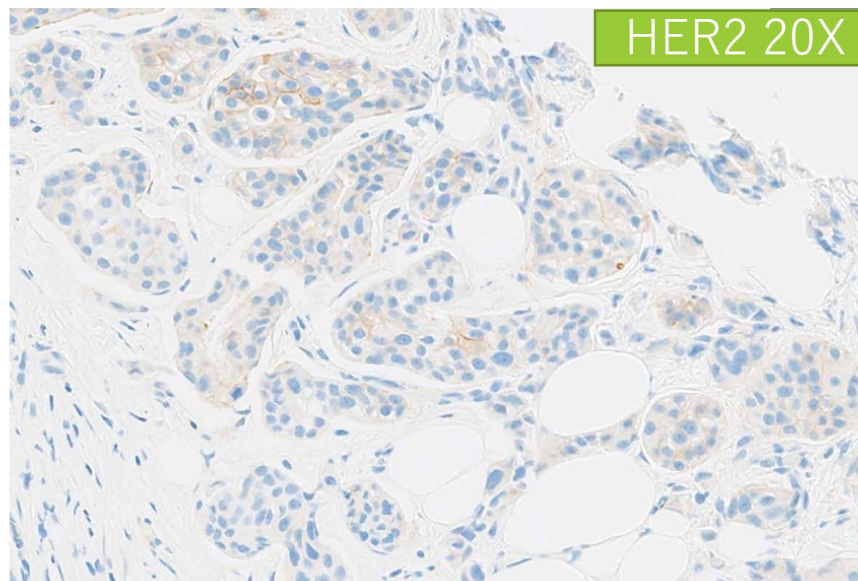
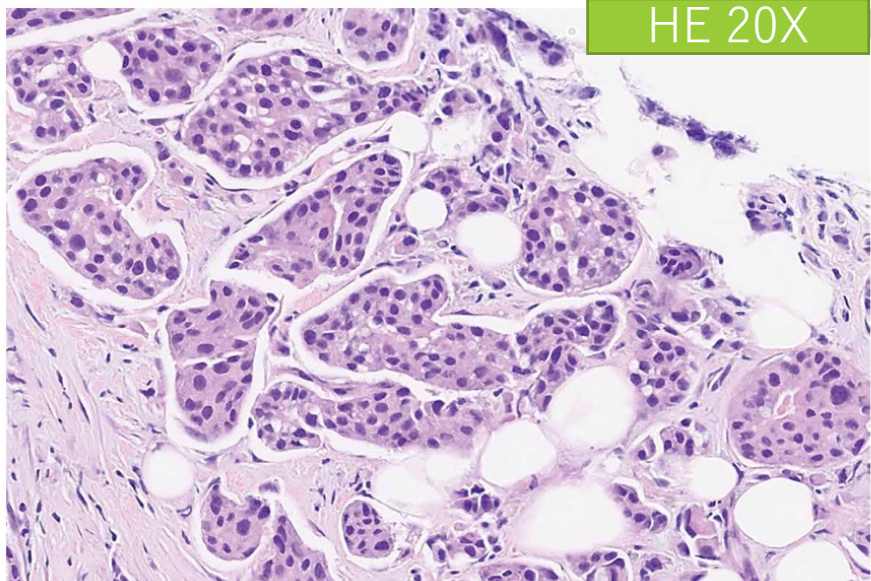
✓ HER2低発現：HER2 IHC法 1+、または、IHC法 2+かつISH法陰性の乳癌

score	ASCO/CAP 2018	ISH法	これまでのHER2判定	HER2低発現判定のための新たなHER2判定
0	染色像が認められない、または不完全およびかすかな/かろうじて膜染色が認められる≤10%		HER2陰性	HER2陰性
1+	かすかな/かろうじて認識できる不完全な膜染色が認められる>10%			HER2低発現
2+	弱/中等度の全周性の膜染色が認められる>10%	増幅なし	HER2陽性	HER2陽性
		増幅あり		
3+	強い完全な全周性の膜染色が認められる>10%		HER2陽性	HER2陽性

この鑑別大事

Score 0

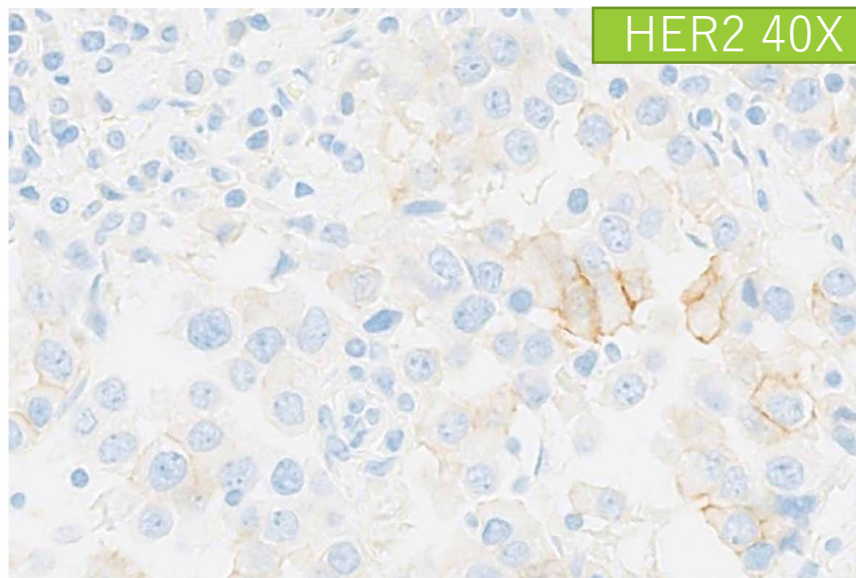
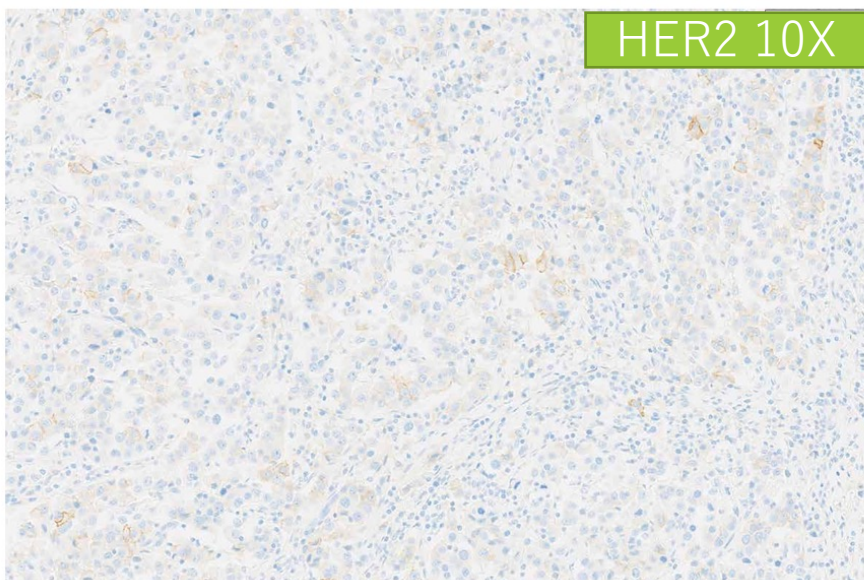
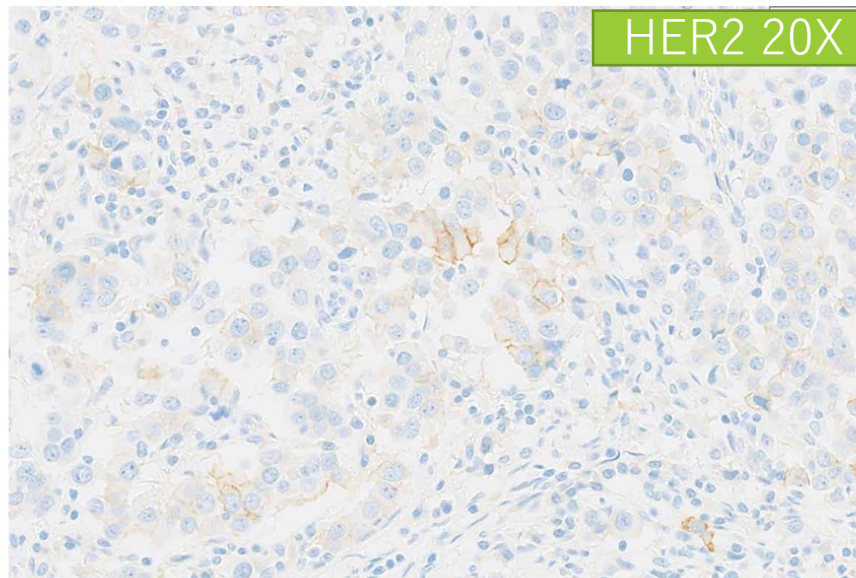
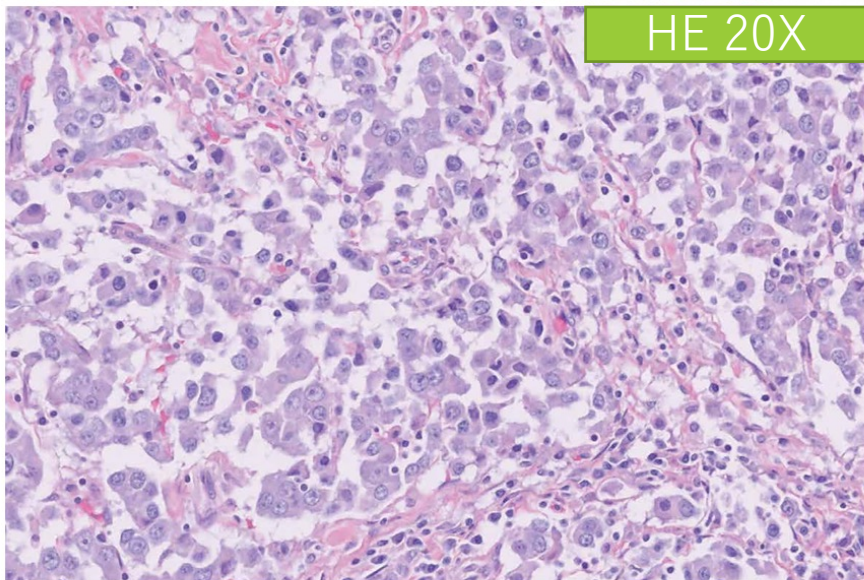
- 不完全な微かな～弱い膜染色の割合(%)が9%
- HER2 IHCスコア1+のカットオフ値に近い→判定困難例



体外診断用医薬品ベンタナ
ultraView パスウェーHER2
(4B5) 判定ガイド～乳癌編～

Score 1+

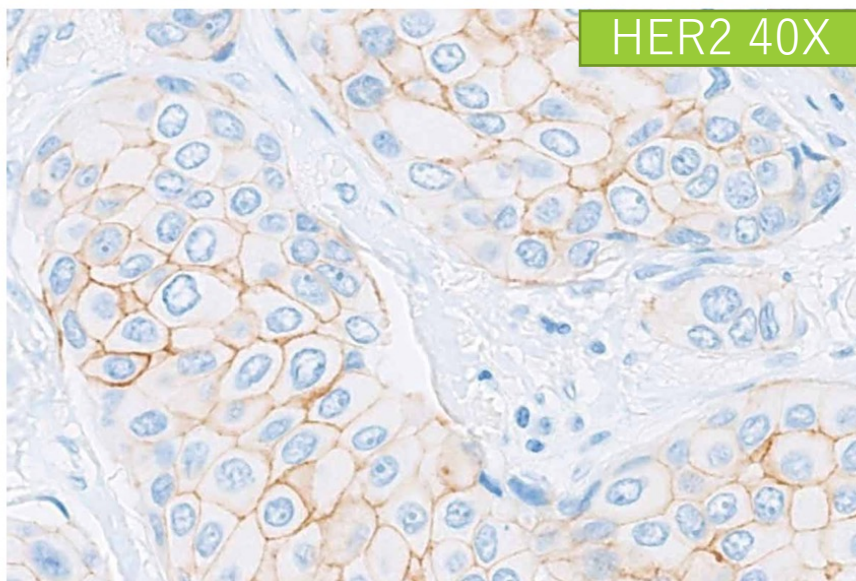
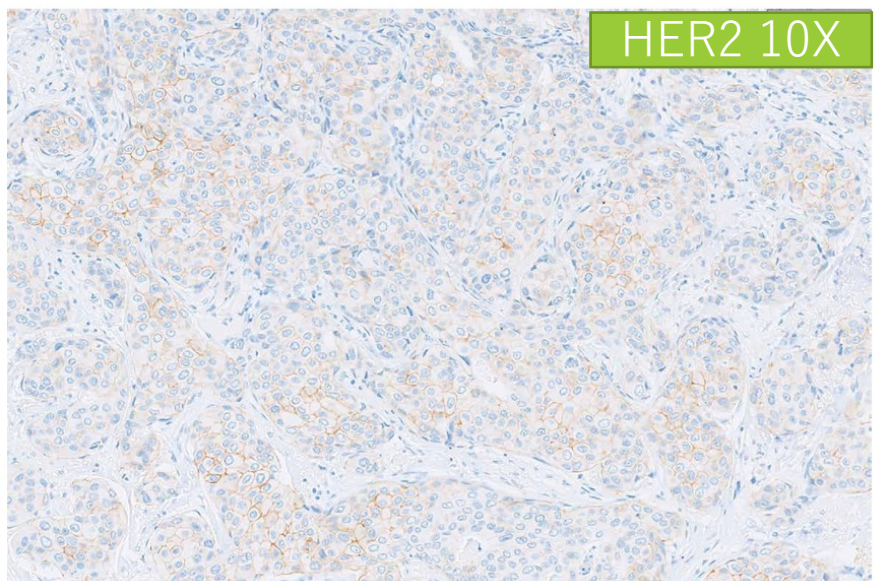
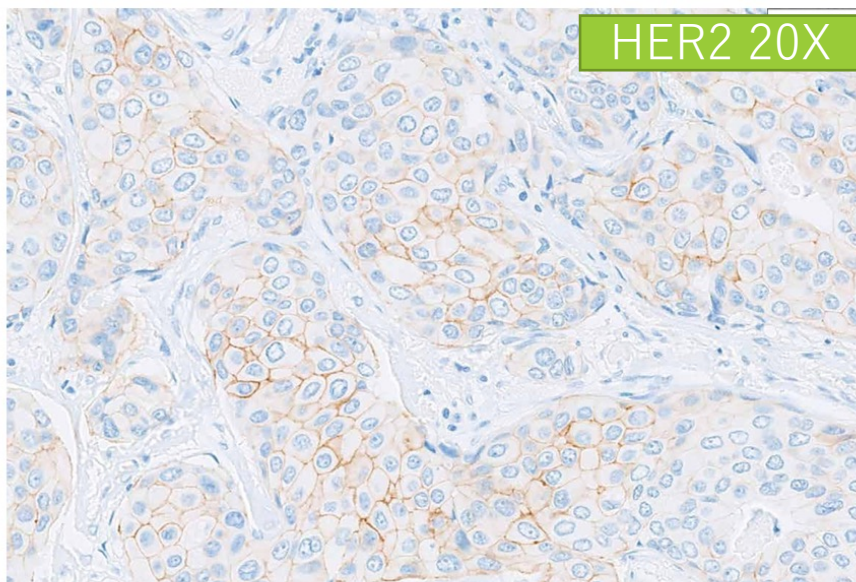
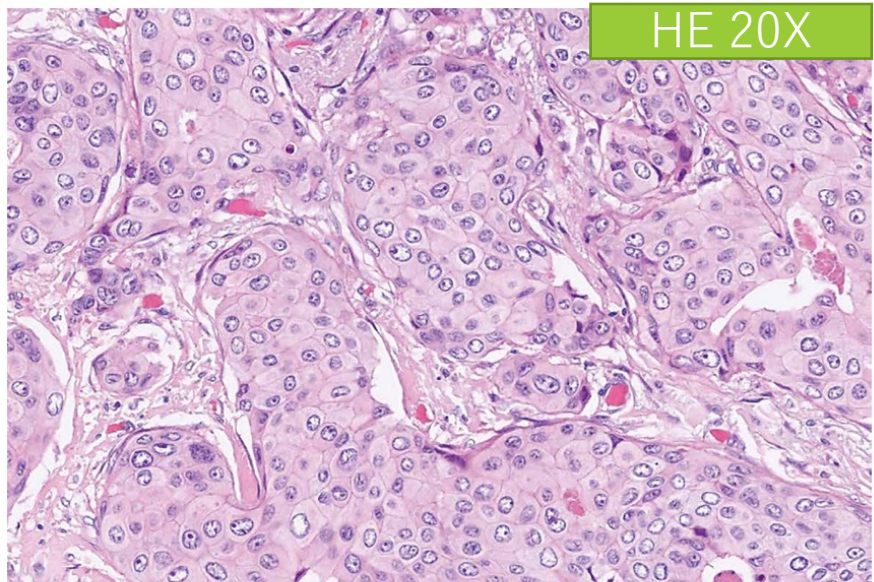
- 弱い完全な膜染色を示す細胞、10%未満
- 不完全な膜染色陽性細胞を合わせると15%に陽性



体外診断用医薬品ベンタナ
ultraView パスウェーHER2
(4B5) 判定ガイド～乳癌編～

Score 2+

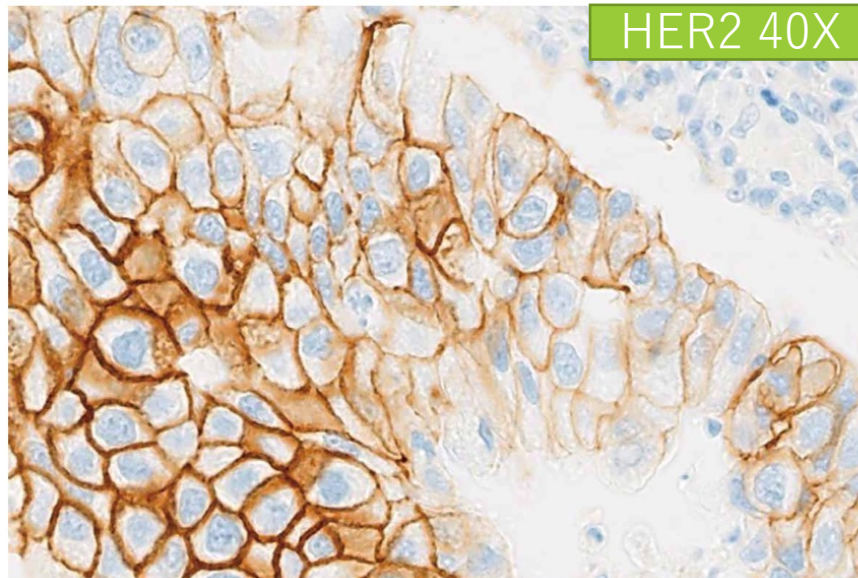
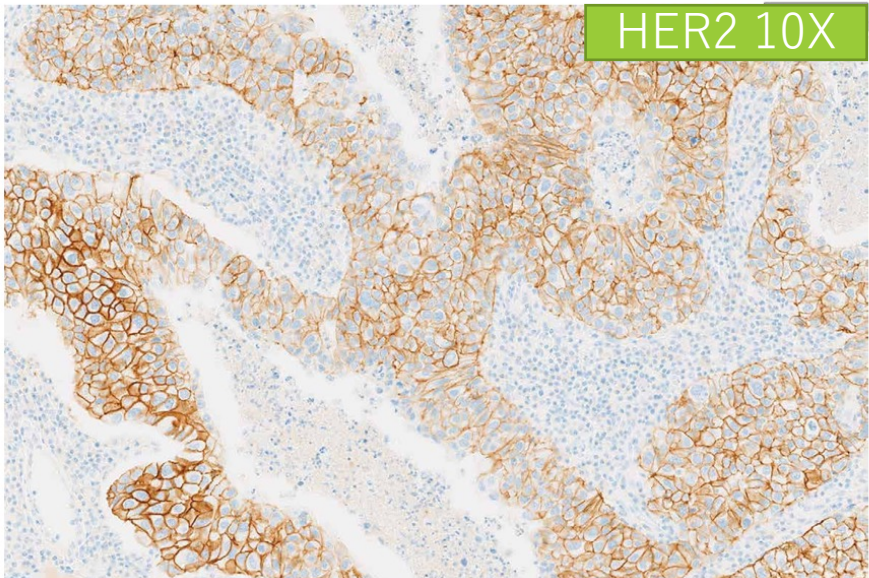
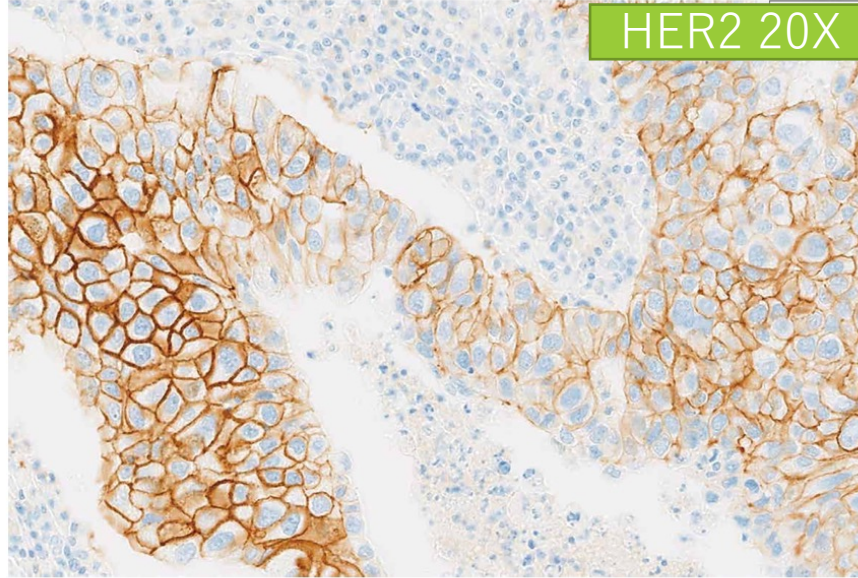
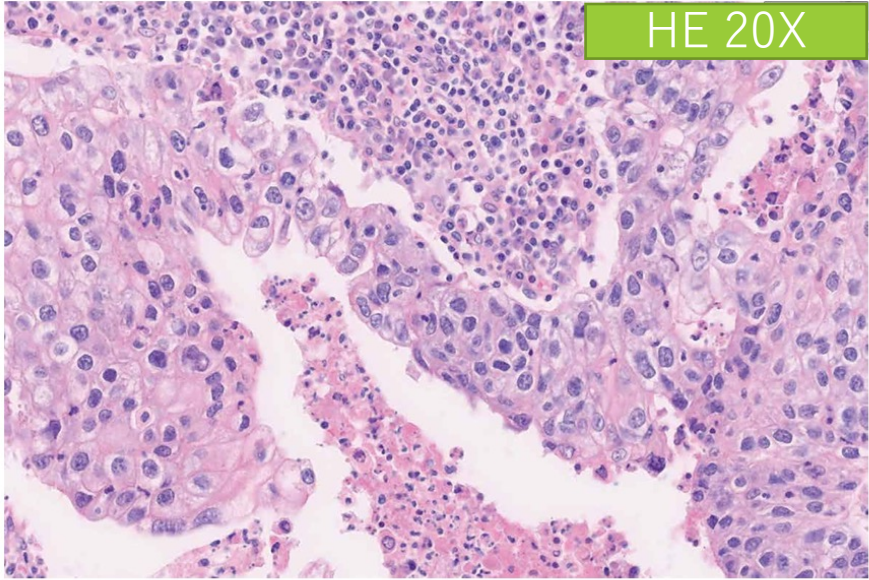
• 完全な弱~中等度の膜染色を示す細胞、15%



体外診断用医薬品ベンタナ
ultraView パスウェーHER2
(4B5) 判定ガイド~乳癌編~

Score 3+

- 不均一な弱～中等度～強い膜染色を呈する。
- 腫瘍細胞の全体の20%に完全な強い膜染色を示す



体外診断用医薬品ベンタナ
ultraView パスウェーHER2
(4B5) 判定ガイド～乳癌編～

FRQ1. 浸潤性乳癌におけるKi-67検査はどのような症例に勧められるか？評価方法は？

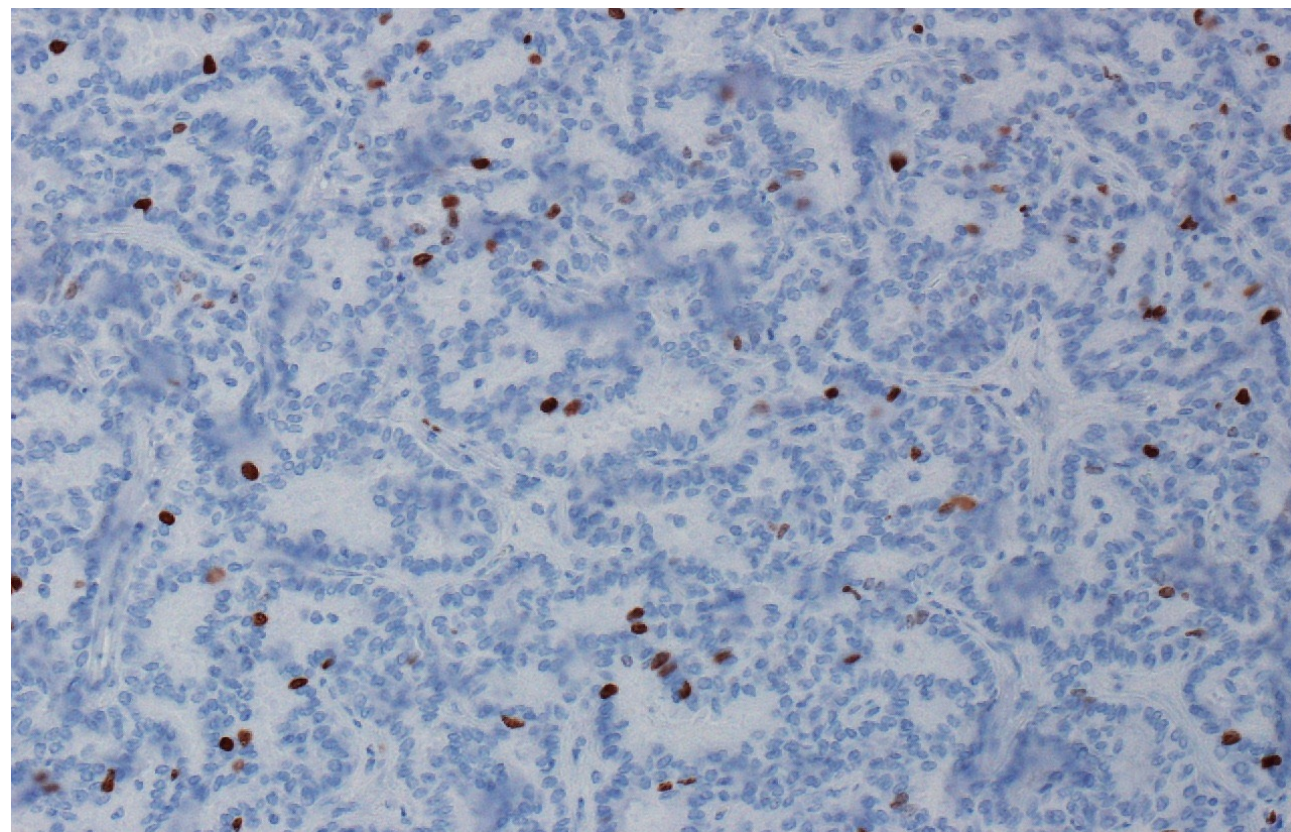
- ✓ ER陽性・HER2陰性乳癌において、Ki67は予後予測に有用であるが、薬物療法の治療効果予測には有用であるとは言えないため、Ki67の結果単独で、治療方針を決定するべきではない。
- ✓ Ki67の評価方法は未だ標準化されていない。

Ki67とは？

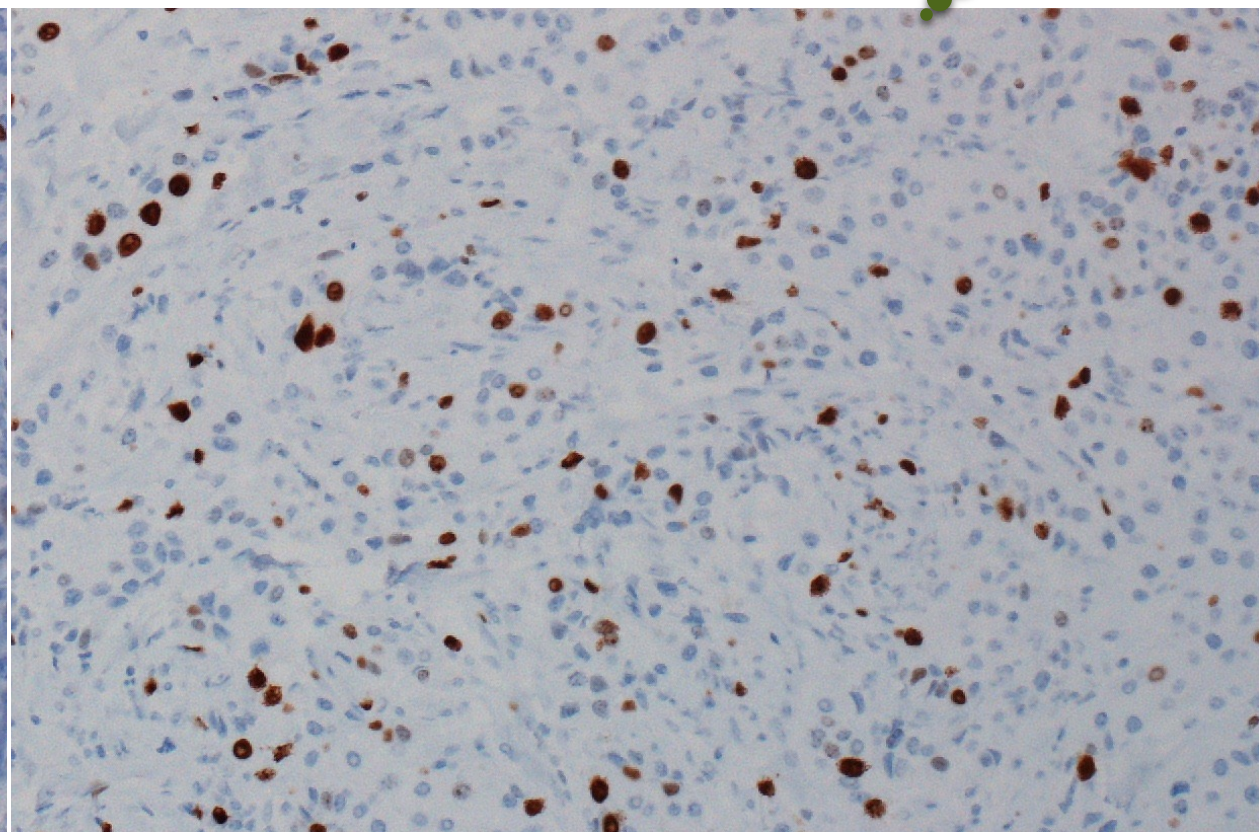
- 1991年に同定された核内蛋白質でMK167 gene 1によりコード
- 細胞分裂およびribosomal RNA転写に関与
- G0期（休止期）以外の細胞周期（G1,S,G2,M期）にある
全ての細胞の核内に発現
- 増殖マーカーとして、多くの臓器の腫瘍で使用

Ki67免疫染色

茶色が陽性
(DAB発色)



6%



24%

Ki67 IHCの実際

確定事項

- ✓ 浸潤病巣のみを評価
- ✓ 腫瘍細胞の核の陽性所見を評価
- ✓ 陽性細胞の全腫瘍細胞に占める数的割合の%で表示

不確定事項

- ✓ 染色強度のカットオフ値、陽性部位の核内の局在（核小体、核膜など）は問わない。
- ✓ 評価部位（hot spot or 病巣全体の平均） 規定なし
- ✓ 評価する細胞数 規定なし

これら、不確定な項目に関しては各施設ごとに一定にすることが推奨

FRQ5. 浸潤性乳癌におけるPD-L1検査はどのように行うか？

浸潤性乳癌におけるPD-L1検査は、使用予定の薬剤にあった試薬と判定方法を用いて行うべきである。

- PD-L1陽性、Triple negative症例の手術不能、または再発乳癌
→ 2種類の免疫チェックポイント阻害薬が保険承認 (2021. 10)
 - アテゾリズマブ
 - ペムゾブロリズマブ
- いずれの薬剤もIHC法による事前PD-L1検査が必須で、それぞれ検査法が異なる

Triple negative乳癌に投与される 免疫チェックポイント阻害薬とコンパニオン診断薬

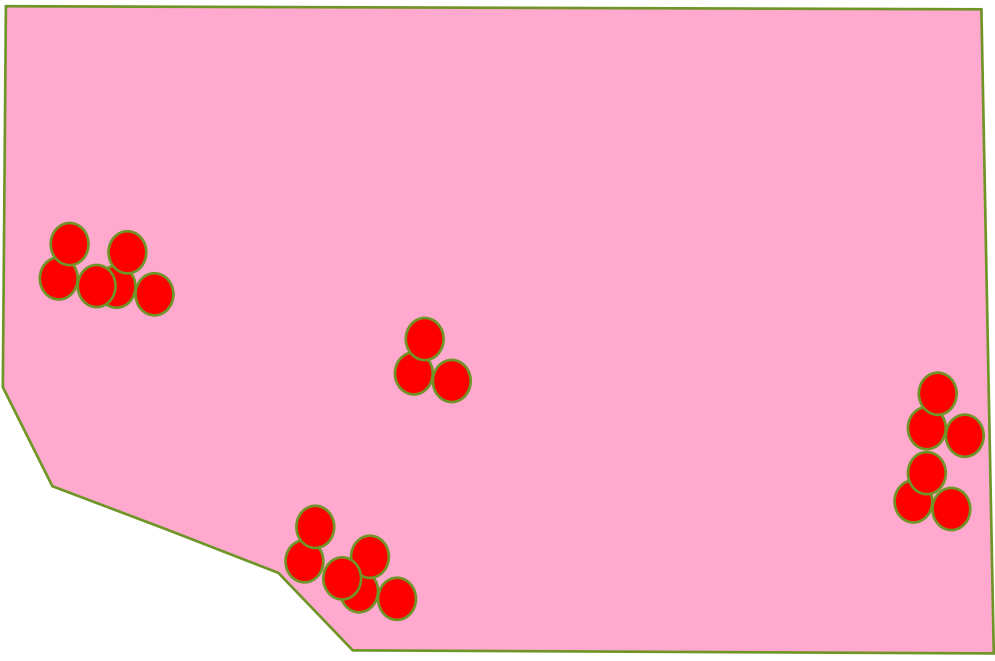
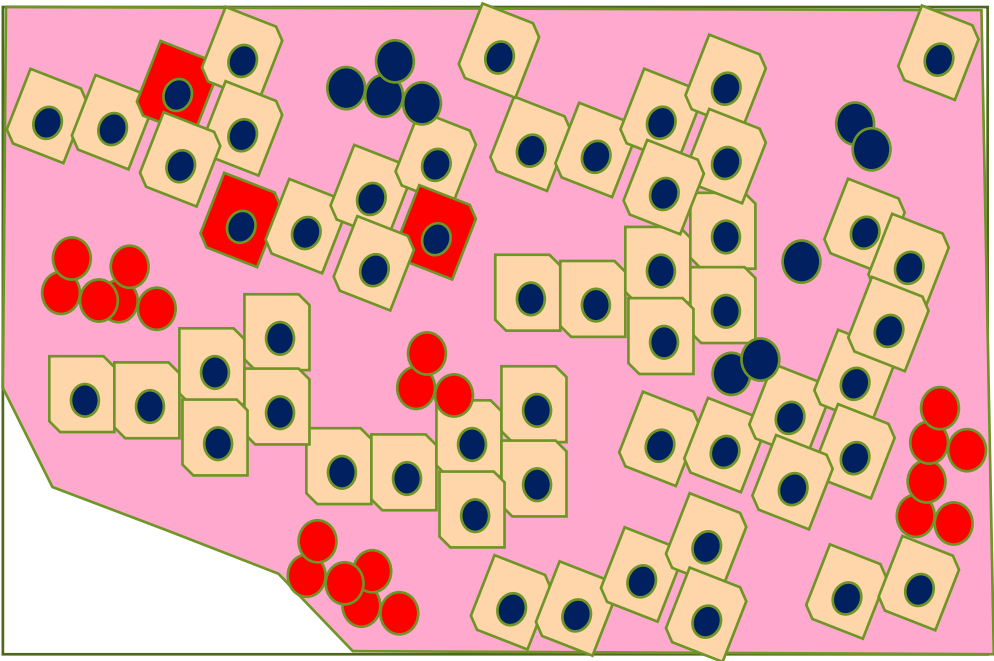
PD-L1検査 (製品名)	ベンタナOptiView PD-L1 (SP142)	PD-L1 IHC 22C3 pharmDx 「ダコ」 (Autostainer Link 48用)
販売元	ロッシュ・ダイアグノスティックス株式会社	アジレント・テクノロジー株式会社
対応薬剤	アテゾリズマブ 抗PD-L1ヒト化モノクローナル抗体	ペムブロリズマブ 抗PD-1ヒト化モノクローナル抗体
一次抗体	抗PD-L1ウサギモノクローナル抗体 (SP142)	抗PD-L1マウスモノクローナル抗体 (22C3)
PD-L1の抗体 結合部位	細胞質内ドメイン	細胞外ドメイン
染色装置	ベンタナベンチマークULTRA® ベンタナベンチマークXT® ベンタナベンチマークGX®	ダコ Autostainer Ling 48®
判定方法	IC%	CPS
薬剤投与 判定基準	IC 1%以上	CPS 10以上

PD-L1 IHC判定方法

PD-L1検査 (製品名)	ベンタナOptiView PD-L1 (SP142)	PD-L1 IHC 22C3 pharmDx 「ダコ」 (Autostainer Link 48用)
販売元	ロッシュ・ダイアグノスティックス株式会社	アジレント・テクノロジー株式会社
対応薬剤	アテゾリズマブ 抗PD-L1ヒト化モノクローナル抗体	ペムブロリズマブ 抗PD-1ヒト化モノクローナル抗体
判定方法	IC% IC: Tumor-infiltrating immune cells	CPS: combined positive score
	<ul style="list-style-type: none"> 腫瘍領域を対象とする 染色強度に関係なく、SP142による陽性反応が認められるICが存在する領域（面積）の割合 免疫細胞：リンパ球、マクロファージ、樹状細胞、顆粒球 	<ul style="list-style-type: none"> 分子：PD-L1を発現している浸潤癌細胞とリンパ球及びマクロファージの総数 分母：浸潤癌細胞の総数 100倍してCPSを算出（上限100） 免疫細胞：リンパ球、マクロファージ
薬剤投与 判定基準	IC 1%以上	CPS 10以上

PD-L1 IHC判定方法

SP142 IC% $\geq 1\%$



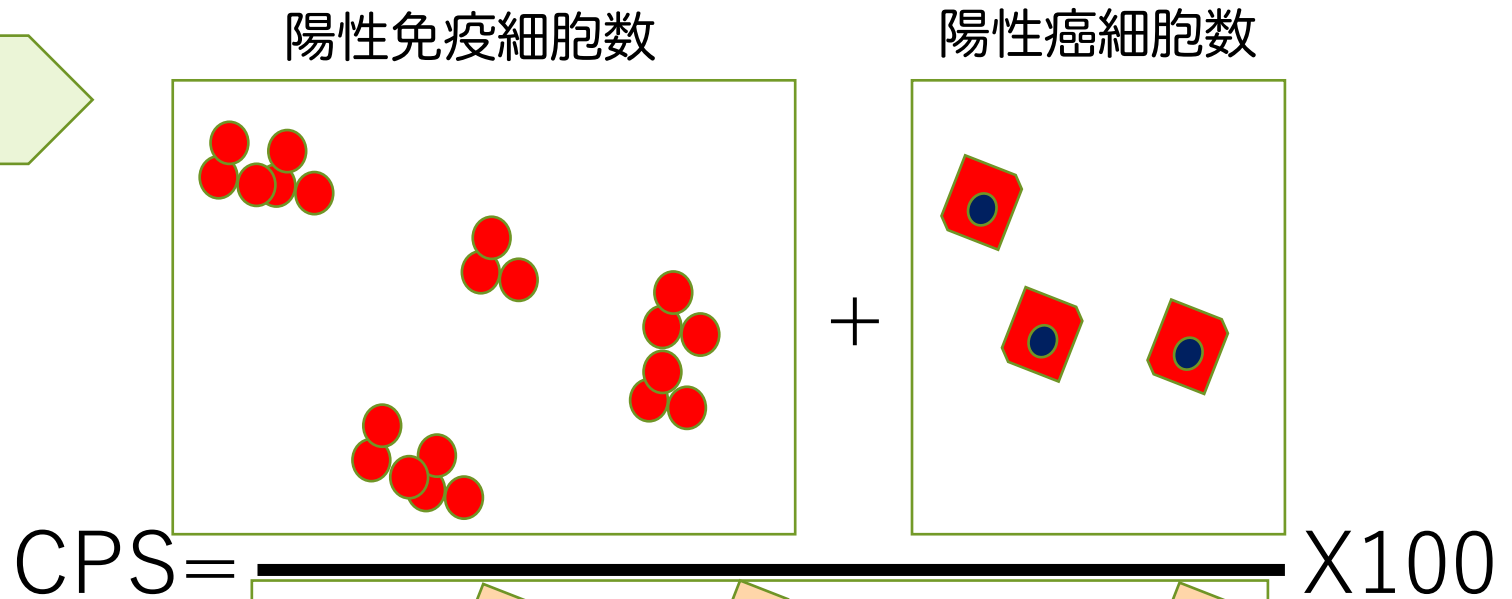
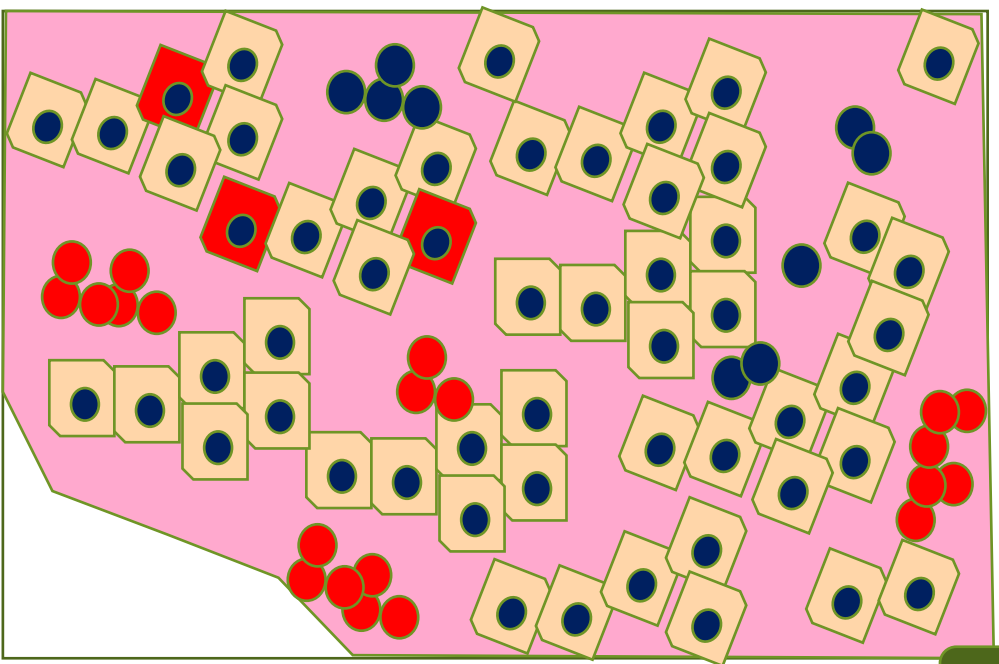
- 癌細胞 (Cancer cell)
- 陽性癌細胞 (Positive cancer cell)
- 免疫細胞 (Immune cell)
- 陽性免疫細胞 (Positive immune cell)

$$IC\% = \frac{\text{陽性免疫細胞の面積}}{\text{癌細胞の面積}} \times 100$$

免疫細胞：リンパ球、マクロファージ、樹状細胞、顆粒球

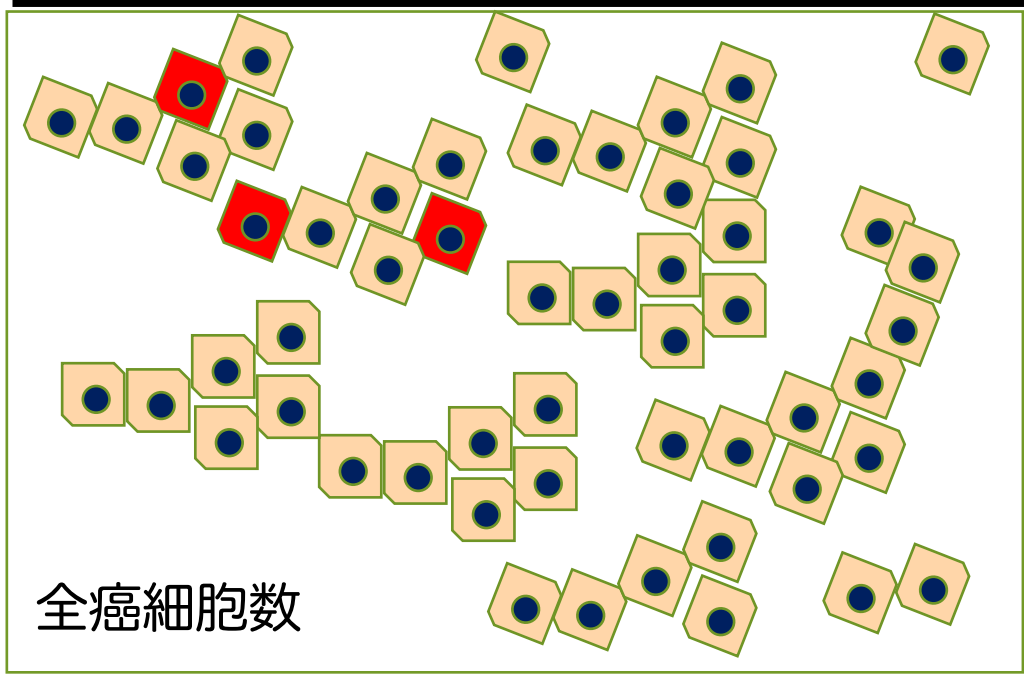
PD-L1 IHC判定方法

22C3 CPS ≥ 10



- 癌細胞 (Light yellow square with blue circle)
- 免疫細胞 (Blue circle)
- 陽性癌細胞 (Red square with blue circle) - 細胞膜陽性
- 陽性免疫細胞 (Red circle) - 細胞膜/細胞質陽性

免疫細胞：リンパ球、マクロファージ



FRQ4. 浸潤性乳管癌における腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の診断は有用か？

TIL高値は一部の乳癌の予後良好因子であり、術前化学療法の効果予測因子としての有用性も示されつつある。

評価方法の標準化が進められているが、診断再現性についての検証が必要。

TILの検査を実施しても良いが、現時点では必須ではない。

まとめ

- Biomarkerに関する定義、解釈は年々アップデートされており、ガイドラインなどで最新情報入手することが重要である。
- 乳癌でもコンパニオン診断が必須となる薬剤が増加しつつあるが、コンパニオン診断の際には、コンパニオン診断薬のみならず、それに特化した検査方法があることに留意する必要がある。
- FFPE検体はほとんどのBiomarker検査の対象となっており、いかに良質のFFPE検体を準備できるかが、検査結果に大きな影響を与える。適切な病理検体の取り扱いについて基本事項を念頭に置いておくことが肝要である。