

第14回JBFシンポジウム 2023/3/2  
バイオマーカー分析の実例とトランスレーショナル研究への応用

# バイオマーカー分析の多様性 - qPCR, FCM, IHCを例に -

田辺三菱製薬株式会社  
創薬本部 薬物動態研究所  
○山崎 真  
明石 知也, 遠藤 忠, 斎藤 昌良, 清水 浩之

## 医薬品開発においてバイオマーカーは成功確度を高めるために必要不可欠である

### バイオマーカー定義 :

正常な生物学的プロセス, 病原性プロセス, または治療的介入を含む曝露もしくは介入に対する反応の指標として測定される, 定義された特性.



### バイオマーカーの利用用途 :

- ✓ 最適な適応症と正しい患者の選択
- ✓ 標的分子寄与の確認
- ✓ 医薬品の薬効・副作用の確認
- ✓ 医薬品の作用メカニズムの理解

### 創薬ストラテジーの実証

- ✓ Right target
- ✓ Right tissue
- ✓ Right safety
- ✓ Right patients
- ✓ Right commercial potential

**OUTLOOK**  
Lessons learned from the fate of AstraZeneca's drug pipeline: a five-dimensional framework

David Cook, Daeng Brown, Robert Alexander, Ruth March, Paul Morgan, Gemma Satterthwaite and Menelas N. Pangalos

Abstract | Maintaining research and development (R&D) productivity at a sustainable level is one of the main challenges currently facing the pharmaceutical industry. In this article, we discuss the results of a comprehensive longitudinal review of AstraZeneca's small-molecule drug projects from 2005 to 2010. The analysis allowed us to establish a framework based on the five most important technical determinants of project success and pipeline quality, which we describe as the five 'R's: the right target, the right patient, the right tissue, the right safety and the right commercial potential. A sixth factor — the right culture — is also crucial in encouraging effective decision-making based on these technical determinants. AstraZeneca is currently applying this framework to guide its R&D teams, and although it is too early to demonstrate whether this has improved the company's R&D productivity, we present our data and analysis here in the hope that it may assist the industry overall in addressing this key challenge.

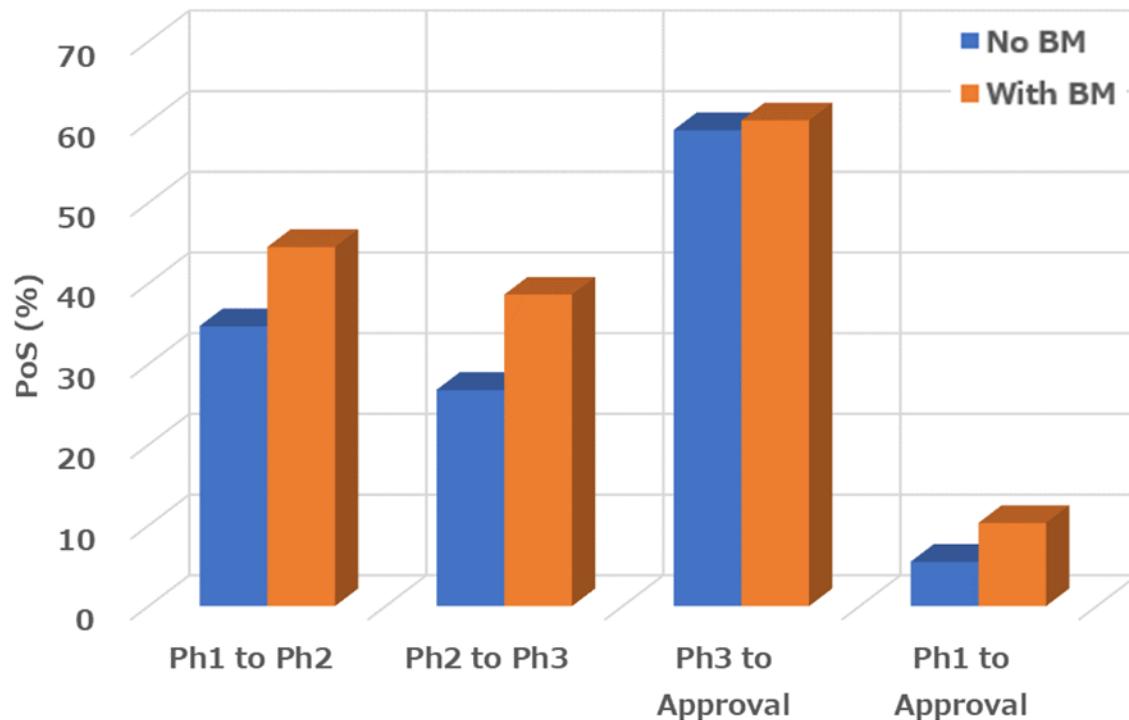
### バイオマーカーによる臨床試験デザインが開発を加速させる

- ✓ 患者ニーズに即したリクルーティング
- ✓ 明確な評価指標による迅速な意思決定
- ✓ 非臨床と臨床のTRサイクルを推進し, 切れ目のないプロダクトの創出

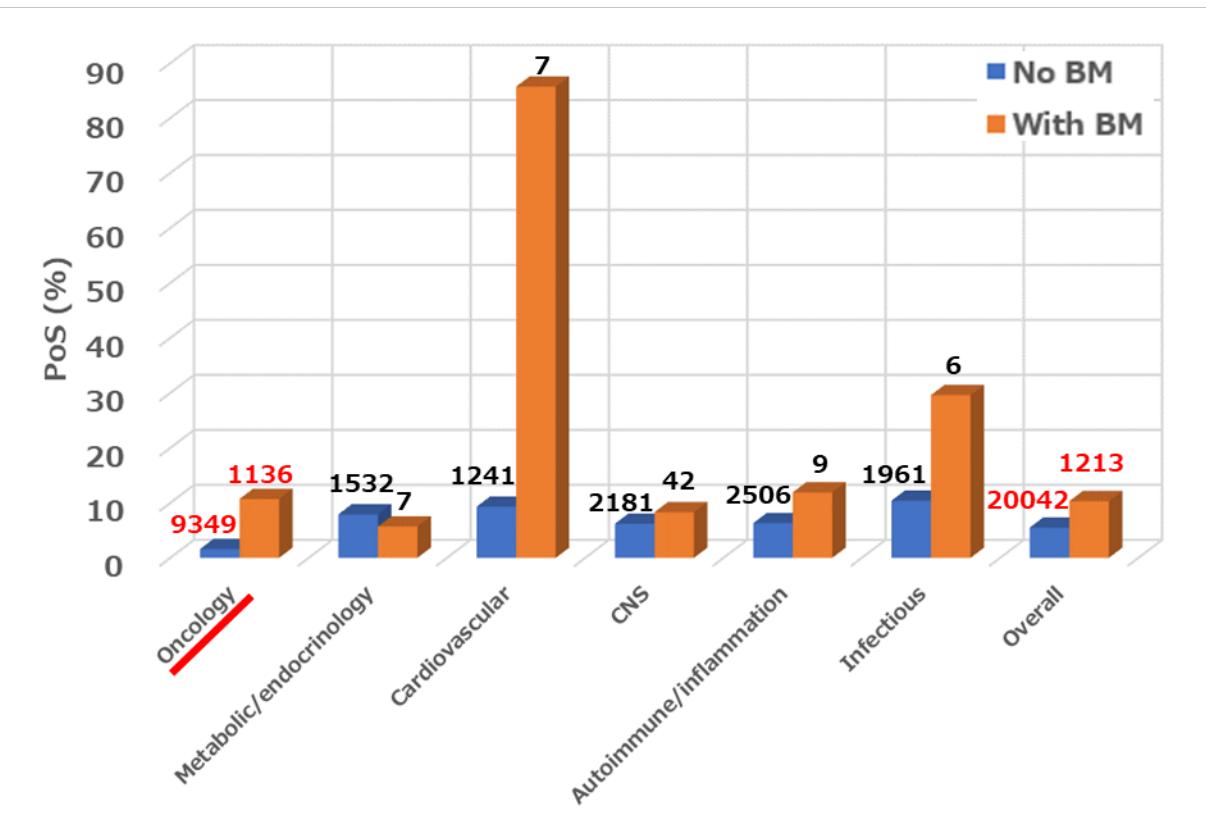
## バイオマーカーを用いた臨床試験では成功確率(PoS\*)が大幅に上昇した

\*PoS: Probability of success

全疾患領域の各治験相のPoS

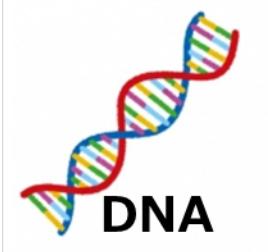


Ph1から承認までの疾患別のPoS(数値は件数)



データ引用: *Biostatistics* (2019)20, 2, pp. 273–286

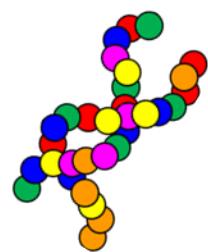
バイオマーカー評価分子は多種多様である  
バイオマーカー評価試料は多種多様である  
バイオマーカー分析手法は多種多様である



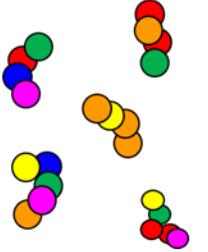
DNA



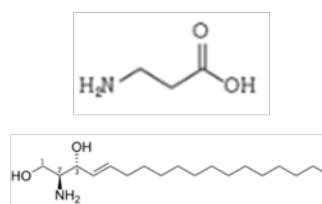
mRNA



タンパク質



ペプチド



代謝物・脂質



血液



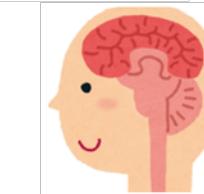
細胞



生検組織



生検標本



生体組織

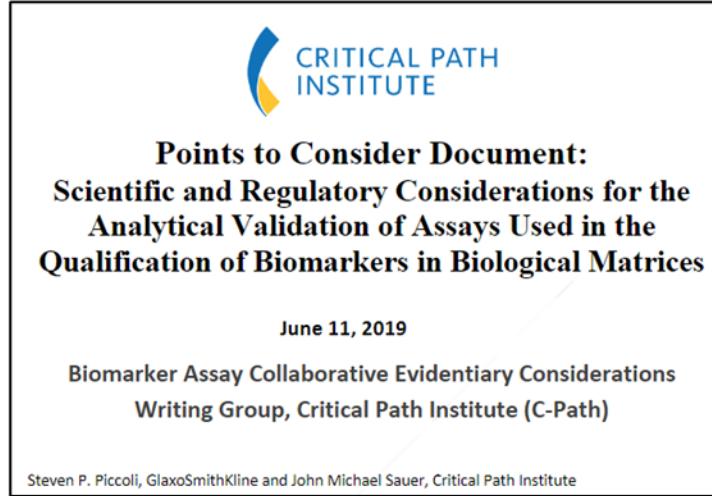


## 分析手法

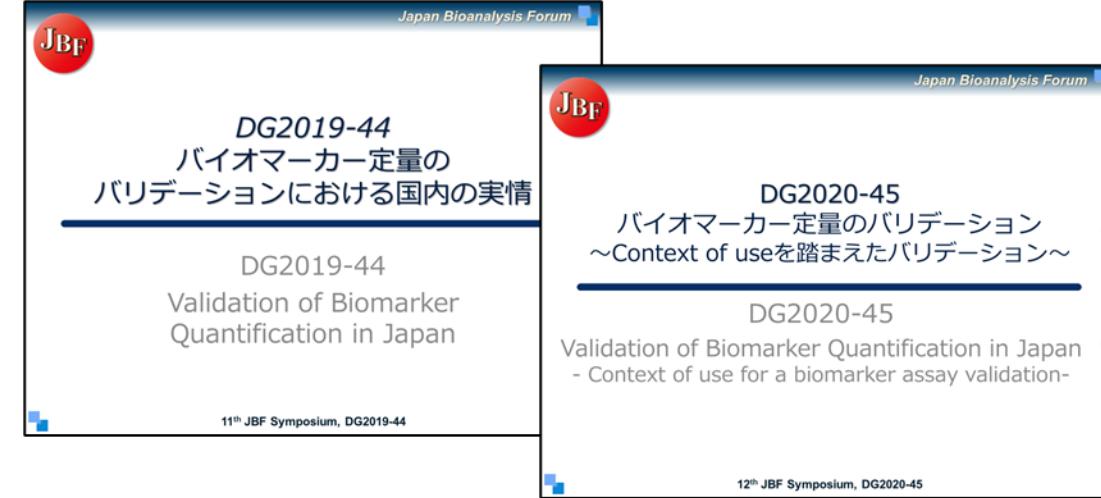
NGS, PCR  
LBA, LC-MS/MS  
FCM, Lab.test  
ISH, ICH  
CT, PET, MRI  
and New Tech.

## 臨床試験におけるバイオマーカー分析レギュラトリが各極で協議されてきた

### C-Path White paper(2019)



### JBF DG(2019 to 2020)



The left slide is titled 'DG2019-44 バイオマーカー定量のバリデーションにおける国内の実情' and 'DG2019-44 Validation of Biomarker Quantification in Japan'. It is dated '11<sup>th</sup> JBF Symposium, DG2019-44'. The right slide is titled 'DG2020-45 バイオマーカー定量のバリデーション～Context of useを踏まえたバリデーション～' and 'DG2020-45 Validation of Biomarker Quantification in Japan - Context of use for a biomarker assay validation-'. It is dated '12<sup>th</sup> JBF Symposium, DG2020-45'.

- バイオマーカー分析に関しては試験におけるバイオマーカー利用用途(**Context of Use, COU**)を理解して、必要十分な分析バリデーション、実測定の精度管理を行う
- 代謝物や脂質のLC-MS/MS分析やタンパク質のLBAは薬物濃度分析ガイドラインを参考にする
- LC-MS/MS, LBAではケーススタディを示してCOUに沿ったバリデーション事例を紹介した一方で…

その他分析手法のバリデーション事例に関しては参考とする情報がほとんどない

遺伝子、細胞及び病理も医薬品開発においてバイオマーカーとして活用されている一方で、それぞれの分析法である定量PCR(qPCR)、フローサイトメーター(FCM)及び免疫組織染色(IHC)については薬物濃度測定で用いられないため、参考情報がほとんどない\*。

本発表ではqPCR、FCM及びIHCの分析バリデーションについてCOUを明示し、検討項目や留意事項及び課題を紹介する。その妥当性について参加者の皆さんと議論させていただきたい。

\*DG2016-27, 2017-33で議論、それ以降はなし

# Case of qPCR

## バイオマーカー定義:

- ✓ 薬力学/応答マーカー
- ✓ 非臨床で確認済である既知の血中に漏出する組織障害RNAマーカー
- ✓ Secondary endpoint

## COU:

- ✓ 薬剤投与による病態改善サロゲートマーカーとして次相の用量設定及びPKPD解析データとして利用する
- ✓ 副次的に患者背景データとして主要項目との関連性を精査する

## 要求データ:

- ✓ 投薬前 vs. 投薬後, Placebo vs. 投与(用量別)
- ✓ 相対値( $\Delta\Delta Ct$ )でも可能だが、PKPD解析精度向上のため定量値(コピー数)を希望

## 事前検討

- 重要試薬準備(合成RNA作製, プライマー設計)  
⇒検量線範囲の確認
- ブランク血漿マトリクス準備(健康成人及び患者試料)  
⇒検出確認, 高発現症例選定
- 内標準遺伝子の決定  
⇒市販TaqMan™ Endogenous Control Panelを用いてブランクマトリクスの検出再現性から選定

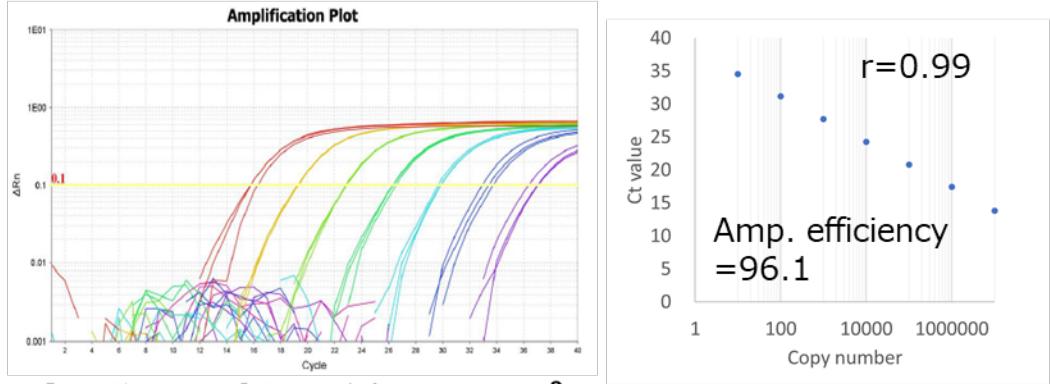
## バリデーション項目&クライテリア

- 合成RNAを用いた評価(3重測定)
  - 増幅効率, 相関係数, 定量下限の確認 ⇒ **増幅効率 $\geq 80\%$ ,  $r^2 \geq 0.9$**
  - 検量線再現性(日内, 日間, 分析者間,  $n=3 \times D3 \times 2$ 名) ⇒ **上記項目のCV $\leq 20\%$**
- ヒト試料を用いた評価(3重測定)
  - RNA抽出品質確認
  - 再現性(日内, 日間, 分析者間,  $n=3 \times D3 \times 2$ 名) ⇒ **各項目のCV $\leq 20\%$**
  - 抽出後安定性(健康成人vs.患者の $\Delta\Delta Ct$ )
  - 凍結保存安定性(同上)

**★品質・安定性はクライテリアなし**

## バリデーションポリシーは再現性を重視

検量線は $10^1 \sim 10^7$  copies/ $\mu\text{L}$ の7点、標品RNA～cDNA合成～PCRの再現性は高い



n=3  
3 days  
2名

全てで增幅効率 $\geq 80\%$ ,  $r^2 \geq 0.9$ を満たす  
n=18の再現性  
増幅効率 CV=1.129,  $r^2$  CV=0.055

実試料は検量線からコピー数算出したが、RNA回収バラつきが大きいため、CVクライテリアが未達だった  
再現性データ

| Analyst | Sample Name | Ct         |       |       | Copy Number           |    |       |
|---------|-------------|------------|-------|-------|-----------------------|----|-------|
|         |             | Ct Average | SD    | CV(%) | copies/ $\mu\text{L}$ | SD | CV(%) |
| A       | 1           | 22.849     |       |       | 67769                 |    |       |
|         | 2           | 22.576     |       |       | 81574                 |    |       |
|         | 3           | 22.832     |       |       | 68653                 |    |       |
|         | 4           | 22.123     |       |       | 113697                |    |       |
|         | 5           | 22.457     |       |       | 90131                 |    |       |
|         | 6           | 22.141     |       |       | 111289                |    |       |
|         | 7           | 22.698     |       |       | 79851                 |    |       |
|         | 8           | 22.768     |       |       | 76121                 |    |       |
|         | 9           | 23.436     |       |       | 49841                 |    |       |
| B       | 10          | 21.040     | 0.651 | 2.896 | 270989                |    |       |
|         | 11          | 21.490     |       |       | 199754                |    |       |
|         | 12          | 21.322     |       |       | 223876                |    |       |
|         | 13          | 22.831     |       |       | 85824                 |    |       |
|         | 14          | 22.678     |       |       | 95114                 |    |       |
|         | 15          | 23.211     |       |       | 66561                 |    |       |
|         | 16          | 22.287     |       |       | 131149                |    |       |
|         | 17          | 22.878     |       |       | 88717                 |    |       |
|         | 18          | 23.083     |       |       | 77649                 |    |       |

実試料の品質も考慮し、qPCRのコピー数算出は難しいと判断  
COUとして相対値評価も可能であることと本結果を考慮  
実測では $\Delta\text{Ct}$ 及び $\Delta\Delta\text{Ct}$ を用いることを推奨  
測定精度の観点で合成標品RNA検量線、QCを利用

## 実測時の安定性担保は参考データとして取得

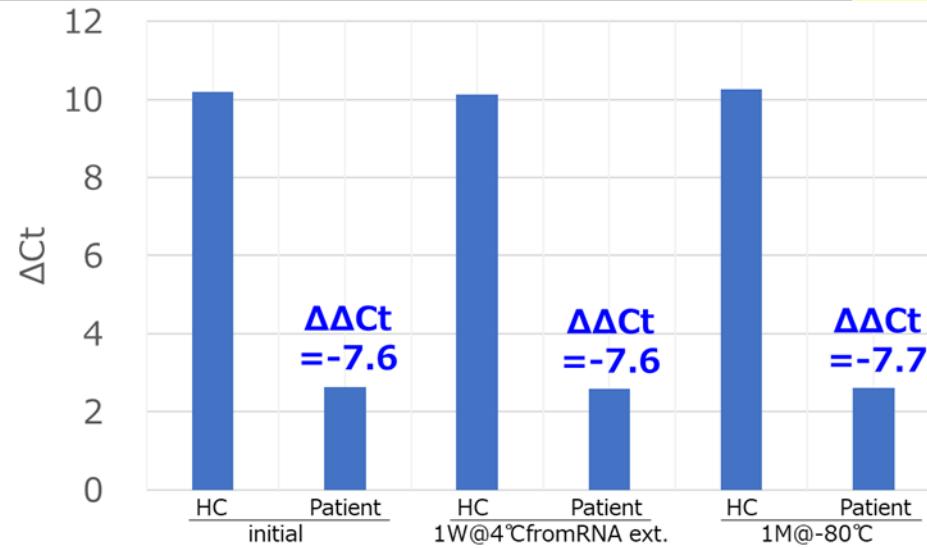
実測時は全検体採取後の一括測定を予定しているため、検体保管全期間を担保する安定性は実施しない  
参考として**1か月冷凍保管した血漿試料の安定性を実施した**

また実測時にRNA抽出とPCRを別日で実施するため、**RNA抽出後1週間安定性を実施した**

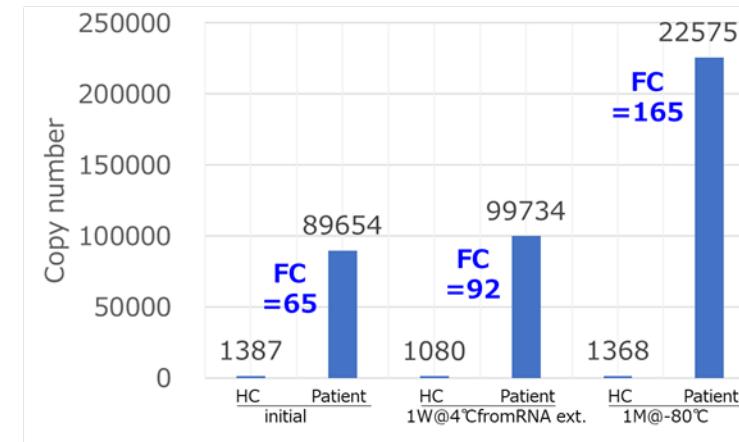
コピー数評価が難しいため、安定性比較も実測に即して**患者/健康成人のΔΔCt変動を指標とした**

今回は血漿試料だが、PAXgeneやRNAlaterを使用することで安定は担保されることが一般的である

ΔΔCt安定性データ



**ΔΔCt評価にて安定性に問題ないことを確認した**  
**ちなみにコピー数評価だと下記の通り評価は難しかった**



# Case of FCM

### バイオマーカー定義:

- ✓ 薬力学/応答マーカー
- ✓ 作用機序仮説に則った4種のT細胞サブセット
- ✓ Exploratory

### COU:

- ✓ 新鮮血利用による治験施設-分析施設輸送条件の決定
- ✓ 薬剤投与による標的分子下流の作用メカニズムの立証
- ✓ 免疫細胞変化とクリニカルエンドポイントの関連性の検証

### 要求データ:

- ✓ 安定性情報
- ✓ 同一症例の経時的な細胞サブセット変動データ

## 事前検討

- 検出条件検討(標識抗体種検討, 反応条件検討)  
⇒各サブセットの検出条件の決定
- 新鮮血液の準備と安定性検討(研究倫理対応, 採血管検討, 短期安定性)  
⇒血液取り扱い条件の決定

## バリデーション項目&クライテリア

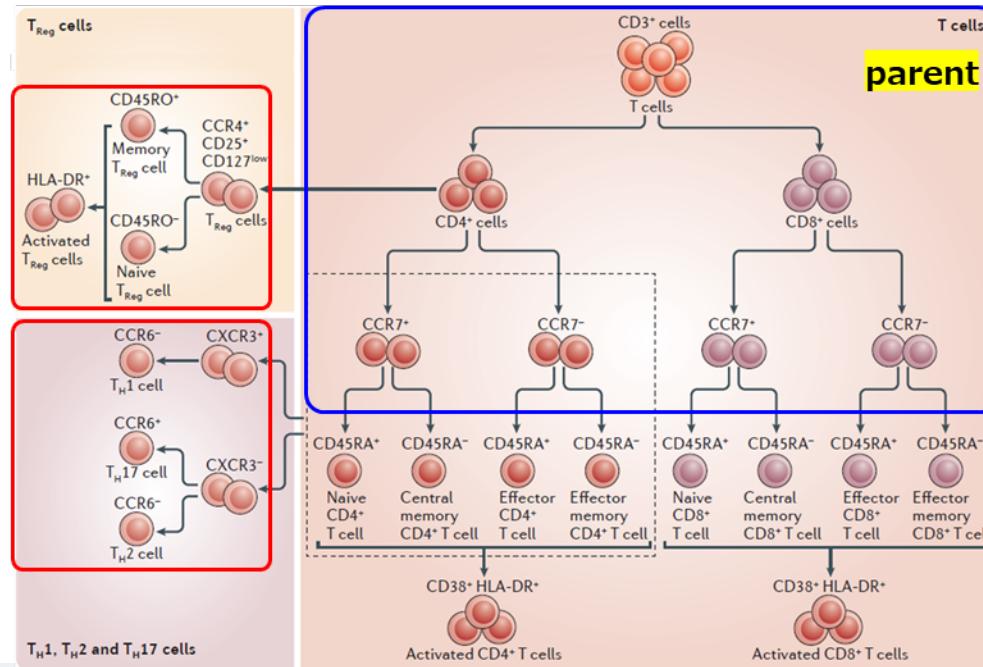
- 再現性
  - QC試料(IMMUNO-TROL cells),  $n=6 \times D3 \Rightarrow$ 各サブセットの%parent CV $\leq 15\%$
  - 健康成人10例, 各n=6⇒各サブセットの%parentのCV $\leq 30\%$
  - 個体差検証
- 血液中保存安定性
  - 健康成人6例, 各n=3, 採血直後, 24, 48, 72, 96hr  
⇒各サブセットの採血直後に対する変化率 $\leq \pm 30\%$
  - 細胞処理後安定性

## 標識抗体選定は安定性 vs. 特異性 vs. コストを考慮

### T細胞サブセット特定方法検討の課題

- ✓ 細胞内サイトカイン染色(市販キット) ⇒ 保管血液だと活性化試薬による細胞障害があり断念
- ✓ 細胞表面抗原染色 ⇒ 測定装置のレーザー数制限で6カラーで4種のT細胞サブセット評価に工夫が必要
  - ⇒ 2バッチに分けて細胞当たりの標識抗体を増やすと特異性は高まるがコストは倍になる
  - ⇒ メジャーサブセットの標識抗体はキット化されているがマイナーサブセットは論文から標識抗体を選定

*Nature Rev. Immunol.* (2012)12, 191-200



Parent細胞標識に半数以上のカラーを使用  
残りカラーでTregやTh細胞を特定が困難  
⇒ 詳細サブセットは断念し、代表的な表面抗原を選択

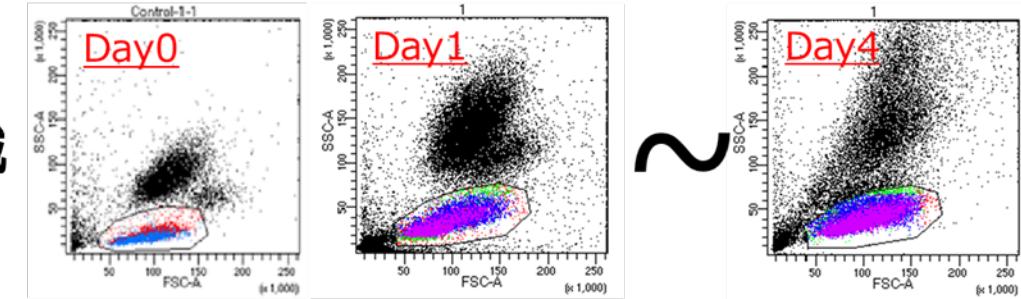
## 臨床計画策定に採血後の安定性情報が必要

採血管選択、治験施設で採血後の輸送時間、分析施設での用時分析計画等が安定性情報に依存



事前検討時に安定性評価が難航

安定化が報告されていた採血管でも24時間で多くの細胞が死滅  
輸送時間を担保できず、安定化担保が急務となつた



採血管3種×保管温度2条件×5時点×3個体×細胞処理条件…  
検討時に大量の全血を用時調達した

【安定性検討事項】

- ✓ 採血条件の検討
- ✓ 染色抗体と処理試薬の変更
- ✓ 保管温度検討
- ✓ 前処理プロセスの変更⇒溶血-洗浄-染色の回数と順番で結果が大きく改善!
- ✓ 注入細胞数&ゲート条件の検討⇒細胞流動と蛍光検出の安定化

採血直後の強細胞と保管後の弱細胞の前処理耐性の違い

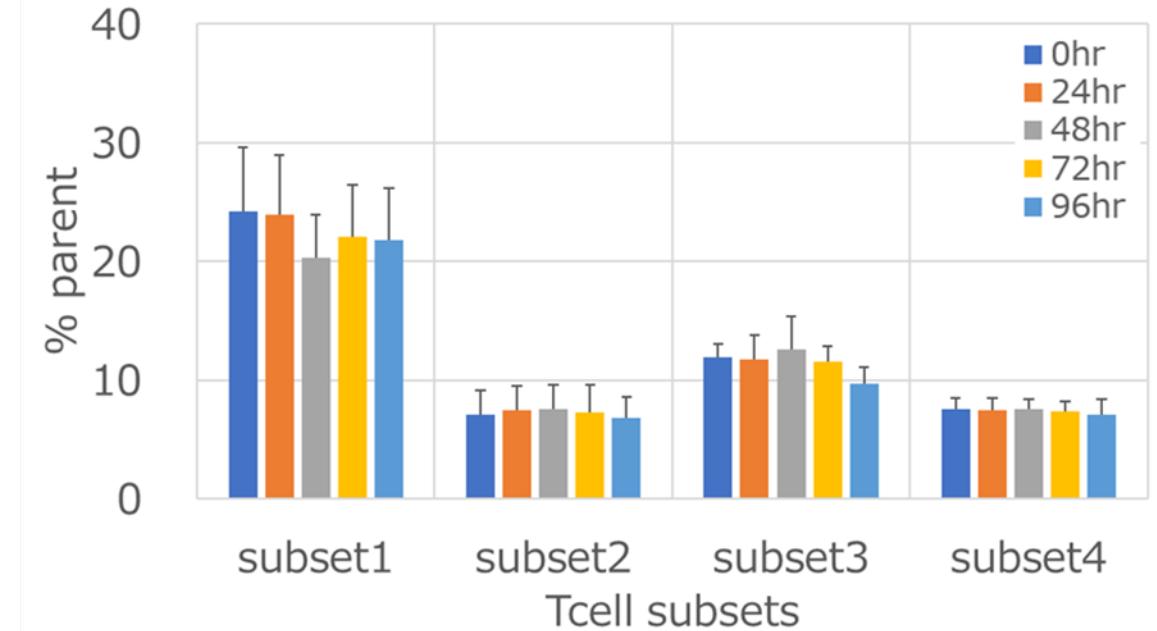
## 臨床計画策定に採血後の安定性情報が必要

男性3例/女性3例平均における安定性最大変動は-18.5%で概ね-10%以内で安定化ができた  
個体別でも安定性最大変動は-25.6%であり、クライテリアを達成した  
96時間安定性を担保でき、治験時のオペレーションが決定できた

### 治験オペレーション

- Day0 (PM)採血施設の検体集荷
- Day1 (AM)分析施設にて検体受領  
(PM)細胞前処理
- Day2 (All)FCM測定
- Day3-4 再測定予備日

血液中保存安定性結果



# Case of IHC

### バイオマーカー定義:

- ✓ 感受性/リスクマーカー, 予測マーカー
- ✓ 対象組織の標的分子発現
- ✓ Exploratory

### COU:

- ✓ 標的疾患, 標的組織における標的分子発現確認によるターゲットバリデーションの実施
- ✓ レトロスペクティブ解析による奏功性の高い患者層の探索

### 要求データ:

- ✓ 発現陽性エリアのスコア化
- ✓ 想定陽性部位と擬陽性部位の区別

## 事前検討

- 染色抗体検討(複数の市販抗体を用いた染色条件検討、自動化装置と用手法の比較)  
⇒スポンサー提供陽性標本を用いて使用抗体メーカー&ロットを選定し、染色条件を決定
- 市販標本10例を用いた染色検討  
⇒明確な染色強度及び染色部位特異性が確認された標本を選定し、バリデーション試験の陽性標本とする
- 画像解析方法検討(ソフトウェアHALOを用いた染色結果のスコア化、陽性細胞or陽性面積の選定)  
⇒非特異染色領域(ハウスキーピングエリア)の除外と解析アルゴリズムの決定  
⇒指定した解析領域面積に対する陽性面積の割合(%)をスコアとした
- 標的細胞との共染色  
⇒ターゲットバリデーションの一環で予備検討として実施、研究データとして社内利用

## バリデーション項目&クライテリア

- 再現性
  - 連続切片(HE/Isotype/Analyte)を用いた日内( $n=3$ )、日間(D3)のスコアCV算出
  - 個体差検証(陽性標本3例)
- 病理医同等性
  - 画像解析結果と認定病理医の鏡検結果を比較し、解析プロセスの妥当性を判断する

★全項目クライテリアなし

## 陽性標本の選定が重要

HEにて組織学的に同等である標本を揃えても、染色が確認できた陽性標本は一部であった  
本試験においても10例のうち、強染色が確認できた標本は5例であった

### 強陽性標本



### 弱陽性標本



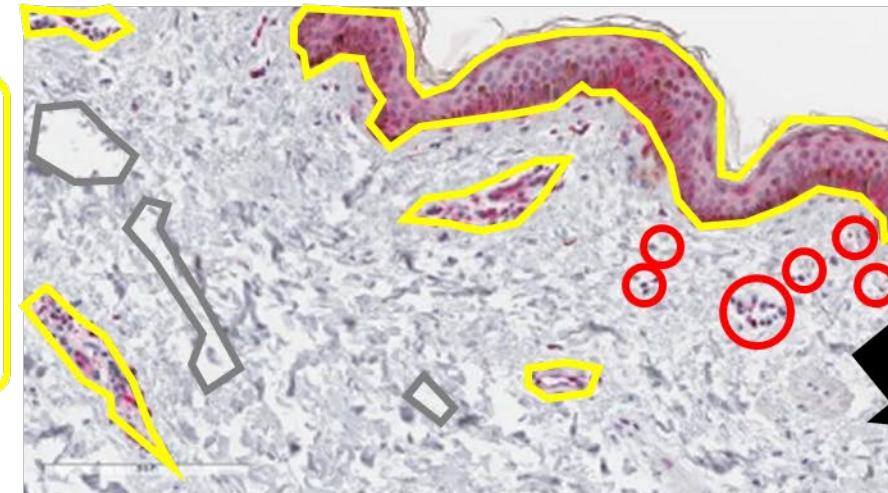
### 【市販標本購入時の注意】

- Clinical Information⇒類似性 or 多様性  
(Age, Sex, Ethnicity, Country, Diagnosis)
- 標本サイズ⇒薄切枚数に影響、生検手法を参考  
(Surgery, Biopsy, Autopsy)
- HE画像確認⇒ミクロな標的部位の有無

## 画像解析のアルゴリズム設定がポイント

実測の評価数が少なければ病理医が用手法で実施すればよいが、評価数が多い場合は全行程 or 一部工程を自動化し、多検体処理の標準化を行う必要がある  
⇒今回の染色条件では自動染色装置に適合できなかったため、画像解析のみ自動化した

### 画像解析ソフトウェア「HALO」を用いた解析自動化



特定部位の陽性領域は除外  
(表層や管腔はハウスキーピング)  
薄切れ領域の除外  
(HE染色で部位特定)

**有効解析領域設定**

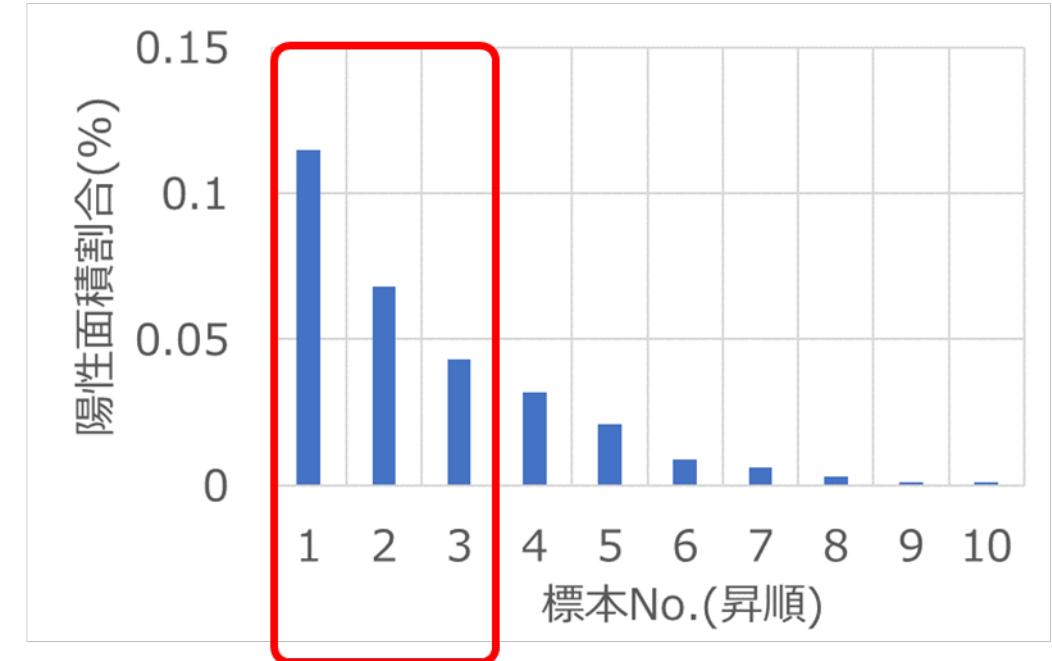
陽性細胞数 or 陽性面積の設定  
実質部分の陽性のみをカウント  
⇒今回は細胞特定が難しいため面積利用

**画像解析のスコア化**  
**解析領域に対する陽性面積の割合(%)**

## 画像解析のアルゴリズム設定がポイント

陽性標本を用いて作成した画像解析アルゴリズムを用いて全評価標本染色結果をスコア化

| 標本 | 有効解析領域<br>(mm <sup>2</sup> ) | 陽性面積(μm <sup>2</sup> ) |       |          |        | 陽性面積割合<br>(%) |
|----|------------------------------|------------------------|-------|----------|--------|---------------|
|    |                              | total                  | weak  | moderate | strong |               |
| A  | 51                           | 58543                  | 31175 | 13854    | 13514  | 0.115         |
| B  | 29                           | 19638                  | 11341 | 4568     | 3729   | 0.068         |
| C  | 128                          | 55233                  | 34927 | 9867     | 10439  | 0.043         |
| D  | 44                           | 14103                  | 7080  | 2703     | 4321   | 0.032         |
| E  | 19                           | 3925                   | 2729  | 728      | 467    | 0.021         |
| F  | 156                          | 14709                  | 12337 | 1745     | 627    | 0.009         |
| G  | 115                          | 6589                   | 4481  | 1136     | 973    | 0.006         |
| H  | 104                          | 3180                   | 2546  | 446      | 188    | 0.003         |
| I  | 93                           | 987                    | 813   | 106      | 69     | 0.001         |
| J  | 168                          | 1709                   | 1459  | 163      | 86     | 0.001         |



スコアの高い上位3標本をバリデーション試験で使用  
同じ条件で購入した標本でもスコア差がとても大きい

qPCR, FCM及びIHCのレギュラトリを想定したバイオマーカー分析  
バリデーション事例を紹介した。

どの手法もバリデーション項目やクライテリアはLC-MS/MSやLBAに比べて簡易であるがCOUに応えるための最低限の評価を実施した。元々は定性要素の強い分析手法であるため、定量性を高めるための課題が多く、課題解決のための事前検討に多くの時間を費やした。当方も経験を重ねながら評価内容を見直しているが、分析ポリシー上位にはCOUがあるためケースバイケースでの取り進めが現状である。

同じ境遇にある方は参考にしていただければ幸いである。