

モン療法開始後 3 日目、術前ホルモン療法終了時（治療開始後約 12 週）、手術終了後 8 週から 9 週の時点で採取された血液材料を用いてプロテオミクス解析を行った。13 例中奏効率 50%以上の奏効例は 6 例、非奏効例は 7 例であった。

B-1-2. サンプル前処理

採取後直ちに、血清分離を行い凍結、融解されることなく保存された血清材料を用いた。今回のアッセイにおいては、サンプルを氷上で融解し、20,000 x g、10 分間遠心した後、上清を回収した。前分画処理には、96 ウェルフォーマットフィルタープレートを使用し、全ての工程を DPC Micromix 5 shaker を搭載した Biomek 2000 Laboratory Work Station (Beckman Coulter) を用いて行なった。血清サンプル 20ul に変性バッファー、U9 (9M urea, 2% CHAPS, 50mM Tris-HCl, pH9) 30ul を加え、20 分間 4°C で振とうした。BioSeptra Q Ceramic HyperD F は 50mM Tris-HCl, pH9 にて前もって平衡化し、50% slurry に調製した。レジン 180ul をフィルタープレートの各ウェルに加え、U1 バッファー (U9 バッファーを 50mM Tris-HCl, pH9 にて 9 倍希釈したもの) 200ul で 3 回、平衡化を行なった。U9 で変性させた血清サンプルをレジンに加え、サンプルウェルを U1 バッファー 50ul で共洗いし、併せてレジンに加え、30 分間、4°C にて振とうした。非吸着画分を回収し、50mM Tris-HCl, pH9, 0.1% OGP 100ul をレジンに加えた。この洗浄液を回収し、非吸着画分と合わせ、Fraction1 とした。この後、pH5.8、pH4 の段階的な pH 勾配によってタンパク質を溶出させ、それぞれ Fraction2, 3 とした (各溶出バッファー、100ul x 2)。

最後に、レジンに強固に結合したタンパク質を有機溶媒で溶出し、Fraction4 とした。調製したフラクションは 96 ウェルプレートに 40 μ L ずつ分注し、使用時まで -80°C で保存した。なお、本前処理に使用したバッファー組成は以下のとおりである。

バッファーリスト :

1. U9 (9M Urea, 2% CHAPS, 50mM Tris-HCl, pH9)
2. U1 (1M Urea, 0.22% CHAPS, 50mM Tris-HCl, pH9)
3. Wash buffer 1 (50mM Tris-HCl / 0.1% OGP, pH9)
4. Wash buffer 2 (100mM Sodium Acetate / 0.1% OGP, pH5.8)
5. Wash buffer 3 (100mM Sodium Acetate / 0.1% OGP, pH4)
6. Wash buffer 4
(33.3% Isopropanol / 16.7% Acetonitril / 0.1% Trifluoroacetic acid)

B-1-3. ProteinChip システム

バイオマーカー探索は、サイファージェン社製の ProteinChip システム (ProteinChipSystem, Series 4000 Enterprise AutoBiomarker Edition) を使用して実施した。ProteinChip システムは、血清・血漿や尿、培養液、細胞抽出液など様々なサンプルから ProteinChip に対する親和性を利用し捕捉したタンパク質やペプチドの質量数と相対発現量を測定するため、ラベルやタグを必要とせず、操作性に優れたチップの上で簡便にタンパク質やペプチドの解析が可能である。特に、多検体による評価を必要とする各種臨床サンプルの比

較解析に適性が高い。ProteinChip システムの構成ユニットは、サンプル処理用の ProteinChip アッセイ用ロボット、サンプル中のタンパク質やペプチドを群選択的に捕捉、解析するための各種官能基を表面に修飾した ProteinChip、飛行時間型の質量分析計を応用した測定用の ProteinChip リーダー、測定・解析用コンピューターよりなる。サンプル前処理に使用する陰イオン交換樹脂、ProteinChip システムによるバイオマーカー探索に使用する ProteinChip 等の消耗品ならびにデータ解析に使用するソフトウェアについては、陰イオン交換樹脂（血清前処理用の陰イオン交換樹脂として、Q Ceramic HyperDF 樹脂を使用した）、ProteinChip {陽イオン交換基（カルボキシメチル基）および金属イオン結合基（ニトリロトリ酢酸基）を表面に修飾した ProteinChip を使用した}、エネルギー吸収分子（EAM）{ProteinChip リーダーによる測定には、ProteinChip に捕捉されたタンパク質およびペプチドをイオン化する必要がある。エネルギー吸収分子は本イオン化を促進する目的で使用し、シナピン酸（sinapinic acid）を使用した}、CIPHERGEN Express バイオマーカー解析ソフトウェア（サンプル情報の管理から ProteinChip システムでの測定、データ解析をサポートする総合的なバイオマーカー探索ソフトウェアで、多数のサンプル情報を管理する Virtual Notebook、データの取得と一次データ処理を行う Data Analysis Module および種々の t 検定や ROC 解析によるシングルマーカー解析、主成分解析や階層的クラスタリングによるマルチマーカー解析を行う Biomarker Analysis Module か

ら構成される）を用いた。

B-1-4. ProteinChip システムによるバイオマーカー探索

ProteinChip システムによるバイオマーカー探索は、以下の手順で実施した。

(ア) サンプルの前処理

血清サンプル中に大量に含まれるアルブミン等が解析に与える影響を最小限に抑えるために、血清を予め、陰イオン交換樹脂により 4 画分に分離する

(イ) サンプルの添加

前処理後のサンプルを直接、ProteinChip 上の直径 2mm のスポットに添加し、スポット上の官能基によりサンプル中のタンパク質やペプチドを群特異的に捕捉する

(ウ) ProteinChip の洗浄

水や緩衝液でスポットを洗浄し、官能基と親和性が低い物質ならびにサンプルや緩衝液中の塩や界面活性剤を除去する

(エ) エネルギー吸収分子の添加

ProteinChip に捕捉されたタンパク質やペプチドのイオン化を促進するために、スポットにエネルギー吸収分子を添加し、乾燥させる

(オ) ProteinChip リーダーによる測定

ProteinChip に捕捉されたタンパク質やペプチドの質量数と相対発現量を、飛行時間型の質量分析計で測定する。この際、タンパク質やペプチド分子のイオン化に必要なエネルギーは UV パルスレーザー照射により供給される。

(カ) データ解析

測定されたタンパク質およびペプチ

ドの質量数と相対発現量を単変量解析あるいは多変量解析で解析することでバイオマーカーを抽出する

B-1-5. ProteinChip によるサンプル処理

本研究では、陽イオン交換チップ (CM10) および金属イオン修飾チップ (IMAC30) を使用してバイオマーカー探索を実施した。また、プロテインチップへのサンプル添加、洗浄、エネルギー吸収分子の添加は、Biomek 2000 (Beckman Coulter) を用いた。それぞれの ProteinChip におけるサンプル処理方法を以下に説明する。

(キ)陽イオン交換チップ pH4 (測定条件名 : CM4)

結合・洗浄バッファー (100mM Sodium Acetate, pH4) を 150ul/spot 添加して 5 分間室温にて振とうし、バッファーを取り除いた。この操作を 2 回繰り返して、チップ表面を平衡化させた。次に各フラクション 10ul を結合・洗浄バッファー 90ul に加え (10 倍希釈)、30 分間室温にて振とうしながらサンプル中のタンパク質をチップ表面に吸着させた。結合・洗浄バッファーを 150ul/spot 添加して 5 分間室温にて振とうし、チップ表面を洗浄、これを 3 回繰り返して非吸着成分を取り除いた後に 200ul/spot の超純水で 2 回脱塩処理を行った。チップを風乾した後、50% 飽和 CHCA

(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) を 1ul/spot 添加・風乾させた。この操作を 2 回繰り返した。

(ク)陽イオン交換チップ pH7 (測定条件名 : CM7)

結合・洗浄バッファー (50mM HEPES, pH7) を 150ul/spot 添加して 5 分間室温にて振とうし、バッファーを取り除いた。この操作を 2 回繰り返して、チップ表面を平衡化させた。次に各フラクション 10ul を結合・洗浄バッファー 90ul に加え (10 倍希釈)、30 分間室温にて振とうしながらサンプル中のタンパク質をチップ表面に吸着させた。結合・洗浄バッファーを 150ul/spot 添加して 5 分間室温にて振とうし、チップ表面を洗浄、これを 3 回繰り返して非吸着成分を取り除いた後に 200ul/spot の超純水で 2 回脱塩処理を行った。チップを風乾した後、50% 飽和 CHCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) を 1ul/spot 添加・風乾させた。この操作を 2 回繰り返した。

(ケ)銅イオン修飾チップ (測定条件名 : IMAC)

銅イオンをチップ表面に固定化するため 100mM CuSO_4 を 50ul/spot 添加し、10 分間室温にて振とうした後に 200ul/spot の超純水で 2 分間・2 回洗浄、さらに 0.1M Sodium Acetate, pH4 を 50ul/spot 添加し 5 分間室温にて振とうした後に 200ul/spot の超純水で 2 分間洗浄を行った。

次に結合・洗浄バッファーを 150ul/spot 添加して 5 分間室温にて振とうし、バッファーを取り除いた。この操作を 2 回繰り返して、チップ表面を平衡化させた。次に各フラクション

10ul を結合・洗浄バッファー 90ul に加え（10 倍希釈）、30 分間室温にて振とうしながらサンプル中のタンパク質をチップ表面に吸着させた。結合・洗浄バッファーを 150ul/spot 添加して 5 分間室温にて振とうし、チップ表面を洗浄、これを 3 回繰り返して非吸着成分を取り除いた後に 200ul/spot の超純水で脱塩処理を行った。チップを風乾した後、50% 飽和シナピン酸（sinapinic acid : SPA）を 1ul/spot 添加・風乾させた。この操作を 2 回繰り返した。

B-1-6. ProteinChip リーダー（Model PCS4000, Enterprise）による測定

測定データ取得は CiphergenExpress™ Data Manager version 3.0 により行った。測定範囲は低分子領域データとして 0-100,000 m/z (Focus mass: SPA-Low /6,500) , 高分子領域データとして 10,000-200,000 m/z (Focus mass: SPA-High / 20,000) とした。

B-1-7. ProteinChip システムによるデータ解析

データ解析は CiphergenExpress™ Data Manager version 3.0 を用いて行った。測定されたスペクトルからベースライン補正を行った後、質量数校正を行った。質量数校正に用いたタンパク質は以下の通りであった。

分子校正用タンパク質	分子量 m/z	低分子領域データ SPA	高分子領域データ SPA
Dynorphin (procine)	2147.5	○	
ACTH (1-24) (human)	2933.5	○	
Insulin (β -chain) (bovine)	3495.94	○	
Insulin (human)	5807.65	○	
Hirdin recombinant	6963.5	○	○
Cytochrome C (Bovine)	12230.9	○	○
Myoglobin (equine)	16951		○
Enolase (S. Cerevisae)	46671		○

質量数校正後、Total Ion Current (TIC) Normalization により正規化処理を行った。正規化処理は、以下に示すそれぞれの測定条件毎（全 24 条件）に実施し、同一の正規

化処理を実施したデータ群間で比較解析を実施した（各条件で検出されたピーク数も併記）。

	ProteinChip 測定条件	前処理 Fraction	EAM	解析領域	検出 ピーク数
1	CM4_Fr1	Fraction 1	SPA	m/z2500-10000	60
2	CM4_Fr1	Fraction 1	SPA	m/z10000-200000	195
3	CM4_Fr2	Fraction 2	SPA	m/z2500-10000	50
4	CM4_Fr2	Fraction 2	SPA	m/z10000-200000	130
5	CM4_Fr3	Fraction 3	SPA	m/z2500-10000	47
6	CM4_Fr3	Fraction 3	SPA	m/z10000-200000	67
7	CM4_Fr4	Fraction 4	SPA	m/z2500-10000	65
8	CM4_Fr4	Fraction 4	SPA	m/z10000-200000	152
9	CM7_Fr1	Fraction 1	SPA	m/z2500-10000	85
10	CM7_Fr1	Fraction 1	SPA	m/z10000-200000	186
11	CM7_Fr2	Fraction 2	SPA	m/z2500-10000	56
12	CM7_Fr2	Fraction 2	SPA	m/z10000-200000	191
13	CM7_Fr3	Fraction 3	SPA	m/z2500-10000	43
14	CM7_Fr3	Fraction 3	SPA	m/z10000-200000	100
15	CM7_Fr4	Fraction 4	SPA	m/z2500-10000	56
16	CM8_Fr4	Fraction 4	SPA	m/z10000-200000	218
17	IMAC_Fr1	Fraction 1	SPA	m/z2500-10000	65
18	IMAC_Fr1	Fraction 1	SPA	m/z10000-200000	169
19	IMAC_Fr2	Fraction 2	SPA	m/z2500-10000	73
20	IMAC_Fr2	Fraction 2	SPA	m/z10000-200000	89
21	IMAC_Fr3	Fraction 3	SPA	m/z2500-10000	67
22	IMAC_Fr3	Fraction 3	SPA	m/z10000-200000	68
23	IMAC_Fr4	Fraction 4	SPA	m/z2500-10000	60
24	IMAC_Fr4	Fraction 4	SPA	m/z10000-200000	98

B-1-8. ProteinChip システムによるバイオ
マーカー候補の抽出

解析対象は Signal/Noise>2.5 以上のピー
クとし、以下の検定ならびに解析を実施し
た。

(コ)Permutation 検定

各タイムポイント (d0、d3、OP、OP35)
における奏効群と非奏効群の比較なら
びに同一群内における経時変動の解析
には Permutation 検定を使用した。p
値<0.05 を有意差の目安としてマーカ
ー候補を抽出した。

また、経時変動に関しては、各群に

において以下の 3 タイムポイント間での変化量を Permutation 検定で解析し、 p 値 <0.05 を有意差の目安としてマーカー候補を抽出した。

- ① d0 から d3 の変化量 : d0_3
- ② d0 から OP の変化量 : d0_OP
- ③ d3 から OP の変化量 : d3_OP

(サ) ロジスティック回帰分析

Permutation 検定で抽出されたバイオマーカー候補ピークを相関解析によりさらに絞り込んだ後、多変量解析としてロジスティック回帰分析を実施した。回帰分析後、Bootstrap 法により解析結果の安定性を評価した。

(シ) バイオマーカー候補の経時変動パターン解析

Permutation 検定結果に基づき、各タイムポイントにおいて以下の群間有意差を示すピークパターン (全 16 パターン) を抽出した。

群間に優位な差がある場合を 1、差がない場合は 0 として表現し、サンプルのタイムポイント 4 時系列を左から順に並べた 4 桁の数字をパターンとする。

- 0000 : すべてのタイムポイントで有意差を観察しない
- 0001 : d4 のみで有意差を観察
- 0010 : d3 のみで有意差を観察
- 0011 : d3、d4 で有意差を観察
- 0100 : d2 のみで有意差を観察
- 0101 : d2、d4 で有意差を観察
- 0110 : d2、d3 で有意差を観察
- 0111 : d2、d3、d4 で有意差を観察

- 1000 : d1 のみで有意差を観察
- 1001 : d1、d4 で有意差を観察
- 1010 : d1、d3 で有意差を観察
- 1011 : d1、d3、d4 で有意差を観察
- 1100 : d1、d2 で有意差を観察
- 1101 : d1、d2、d4 で有意差を観察
- 1110 : d1、d2、d3 で有意差を観察
- 1111 : すべてのタイムポイントで有意差を観察

B-1-8. 乳癌細胞株 MCF7 より得られたエストロゲン応答性遺伝子シグナチャーの研究

東北大学の林慎一教授、笹野公伸教授との共同研究により乳癌細胞株 MCF7 より得られたエストロゲン応答性遺伝子シグナチャーを用いた検討を行う。乳癌ホルモン療法効果予測における有用性を検討することを目的とし、その検索プラットフォームの作成を行う。

B-2. 抗 HER2 療法応答性に関するバイオマーカーの探索

抗HER2療法を施行したHER2陽性再発乳癌症例75例について、予後と原発性腫瘍組織中のHER family蛋白発現との関係を検討した。HER family蛋白発現はeTAG法などの定量性を有する抗体ベースのアッセイ系を用いた。組織は中性ホルマリンで固定されたパラフィン包埋材料を用いた。手法は既報の如くとした(Chan-Hui PY, Stephens K, Warnock RA, Singh S. Applications of eTag trademark assay platform to systems biology approaches in molecular oncology and toxicology studies. Clin Immunol. 2004 111:162-74.)。

B-3. 化学療法に関するバイオマーカーの探索

ER陽性、腋窩リンパ節転移陰性の原発性乳癌で抗エストロゲン剤あるいは卵巣機能抑制+抗エストロゲン剤単独による術後補助療法が施行され、かつ術後5年以上を経た症例を対象に21遺伝子シグナチャーを測定することとした。検索対象は中性ホルマリンで固定されたパラフィン包埋切片とした。術前の FEC(5FU, epirubicin, cyclophosphamide)4サイクル-Docetxel4サイクル療法施行例において、治療前、治療中、治療後に血清を採取保存した。プロテオミクス法による解析を予定した。

B-4. 非浸潤性乳癌に関するバイオマーカーの探索

これまでに浸潤性乳癌との比較において非浸潤性乳癌に特異的なバイオマーカーの探索例はない。したがって、原発性乳癌と良性乳腺疾患との比較ならびに非浸潤性乳癌と浸潤性乳癌の比較において、非浸潤性乳癌に特異的な血清バイオマーカーを探索することとした。

原発性乳癌の選択基準は年齢：組織学的に非浸潤性乳癌あるいは浸潤性乳癌、20歳以上の女性、Performance status (PS) ECOGの規準0-2、切除断端陰性を目的とした根治手術が行われる予定の症例で、患者本人から文書による同意が得られた症例とした。他癌（両側性乳癌を含む）を有する症例、組織増殖性病変を有する良性疾患（自己免疫疾患、緑内障、創傷治癒期等）症例は今回の検討から除外した。

良性乳腺疾患の選択基準は、組織学的に良

性乳腺疾患（繊維腺種など）と診断された20歳以上の女性、Performance status (PS)はECOG規準で0-2、患者本人から文書による同意が得られた症例とした。増殖性乳腺症患者、組織増殖性病変を有する良性疾患（自己免疫疾患、緑内障、創傷治癒期等）の患者は検討から除外した。

原発性乳癌患者に対しての採血は原発性乳癌の切除前後、すなわち、治療を行っていない乳癌切除前1ヶ月以内、乳癌切除後21日-28日、乳癌切除後90日-100日の3ポイントにて施行し、血清を調製した。1回あたりの採血量（全血）は10mlとし、採血は通常の診療時に実施し、がんを複数回切除した場合には、最終切除日を基準とした。良性乳腺疾患患者に対しては診療時に1回採血し、採血量（全血）は10mlとする。良性乳腺疾患組織を切除し、患者の同意が得られた症例では、切除後3ヶ月以内に1回採血を行った。

血清サンプルは非浸潤性乳癌が17例、浸潤性乳癌20例、良性乳腺疾患10例よりえられた。年齢は33歳から83歳、浸潤性乳癌の病期はStage Iが16例、Stage IIが4例であった。良性乳腺疾患例の内訳は乳頭腫5例、繊維腺種3例、その他2例であった。プロテオミクス法による解析は、B-1と同様に行った。

C. 研究結果

C-1. ホルモン療法応答性に関するバイオマーカーの探索

C-1-1. 陽イオン交換 pH4 Fraction1 (CM4_Fr1) の解析

本解析に際し、特定のデータ (CM4_Fr1 : 2 データセット) を対象として予備的なデ

ータ解析を実施した。予備解析では合計 255 ピークが解析対象となった。バイオマーカー候補は、Permutation 解析、相関係数による絞り込みで抽出し、ロジスティック回帰分析ならびに Bootstrap 法による評価を

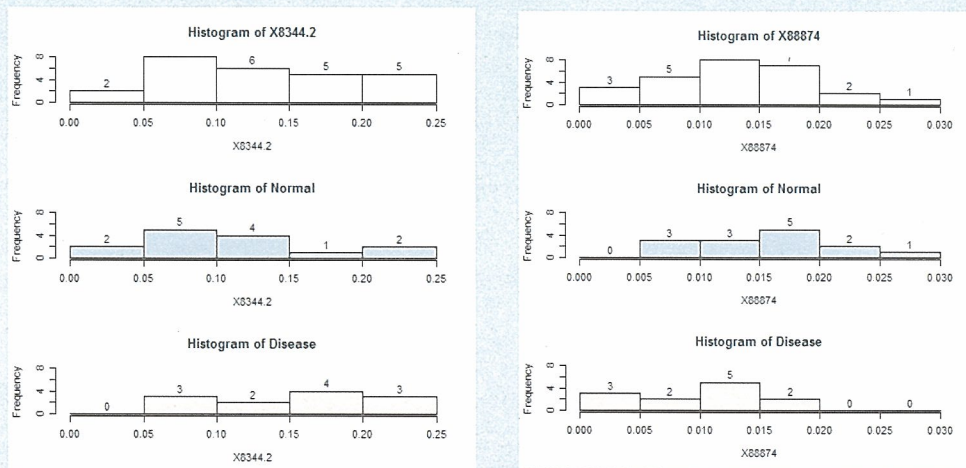
実施した (表 1)。各サンプリングポイント (4 ポイント) における奏効群と非奏効群の比較解析に関しては、サンプル数、マーカー候補ピーク数、およびデータの分布を確認した (図 1)。

表 1

Permutation検定、相関分析、ロジスティック回帰分析(ステップワイズ法)、Bootstrap法による絞り込み:255のピークから絞り込みを行った さらに、ステップワイズ法、Bootstrap法により安定性を確認した。

	d0	d3	d30	d65	d0-3	d0-30	d3-30
Permutation検定 (P値 \leq 0.05)	38	41	14	31	35	15	15
相関分析 (相関係数 $<$ 0.8)	17	24	11	18	20	6	9

図 1: データ確認の例



分布が重なる

分布がずれる(完全には分離しない)

また、経時的な変動解析については、サンプリングポイント間でのピーク強度の差を計算して解析を実施した（図2）。2群間の比較検定ならびに経時変動検定には

Permutation 解析を用い、p 値が 0.05 よりも大きいデータを排除することで、バイオマーカー候補として 189 のピークを得た（表2）。

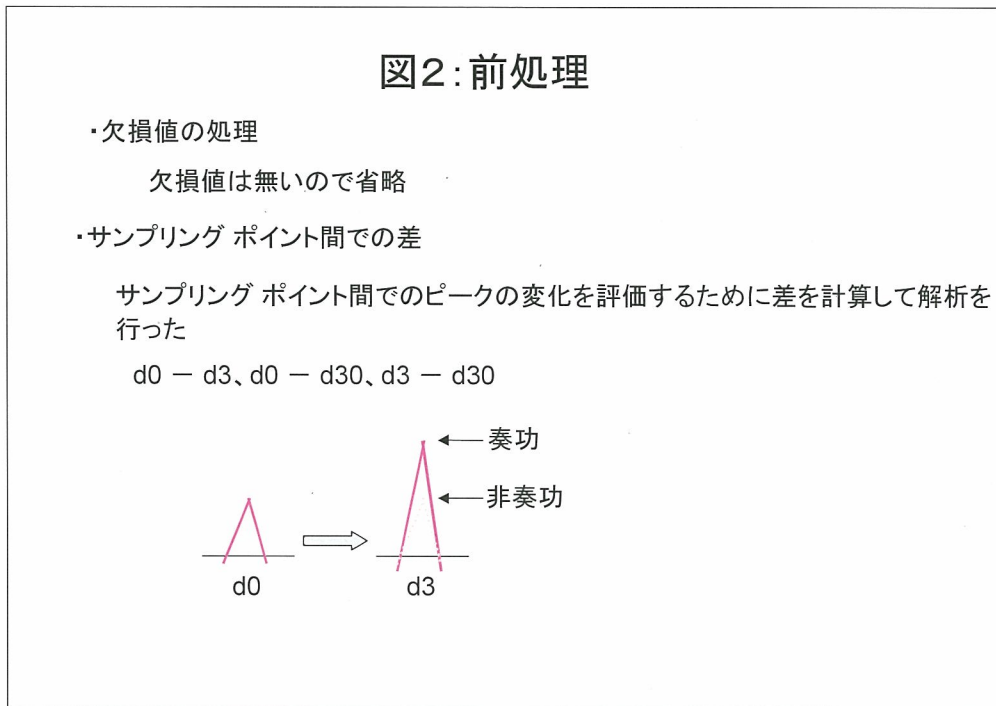


表2: 有意差が確認されたピーク

結果
255 ⇒

d0	d3	d30	d65	d0-3	d0-30	d3-30
38	41	14	31	35	15	15

次に、ロジスティック回帰解析の前処理として、189 ピークを対象に相関係数による絞り込みを実施した。この際、測定システムの特徴を考慮し、質量数 (m/z) がより小さいものをマーカー候補ピークとして選択した。その結果、バイオマーカー候補ピ

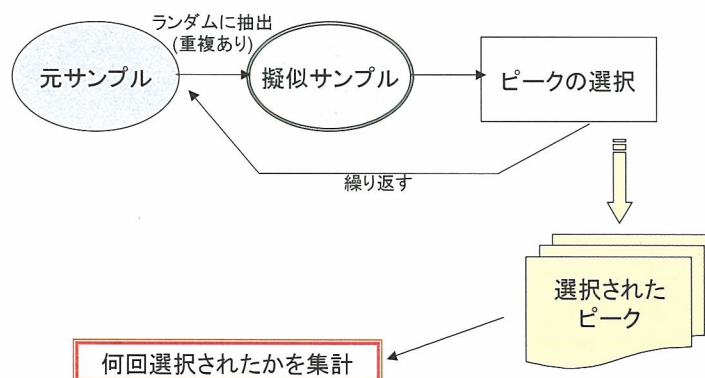
ークとして 105 ピークを得た (表 3)。105 のバイオマーカー候補ピークを対象としてロジスティック回帰分析を実施した結果、3 つの候補ピークを組み合わせることで奏効群と非奏効群を 100% 区別するパネルを複数構築することが可能であった。

表3:相関係数による絞り込み

- ・相関係数が0.8以上の組み合わせの片方を排除
- 2つの組み合わせのうち、前よりのピークを採用
(後ろに行くにつれてピークがブロードになるシステムの性質を考慮)

	d0	d3	d30	d65	d0-3	d0-30	d3-30
Permutation 検定	38	41	14	31	35	15	15
相関分析	17	24	11	18	20	6	9

図3: Bootstrap法による選択回数の評価



しかし、ロジスティック解析に適用したサンプル数が少数であったことから、Bootstrap 法（図3）を用いて、構築したパネルの信頼性を評価した。その結果、Bootstrap 法により一定回数以上選択されたバイオマーカー候補ピークは存在したが、50 回以上選択されたピークは 7 種類、100 回以上選択されたピークは 0 種類であった。

以上の予備解析結果から以下の結論を得た。①Permutation 検定により抽出されたバイオマーカー候補ピークのロジスティック回帰分析により、奏効群と非奏効群とを

十分に区別することができる評価パネルを構築することができた。②Bootstrap 法による交差妥当性の評価では、群間識別力が特に高いバイオマーカー候補が選択されなかった。③今後の課題として、交差妥当性を評価するためにサンプル数を増やすことと、バイオマーカー候補の絞り込みに臨床情報等のパラメーターを導入すること、が挙げられた。

表4:4つのタイムポイントで有意差のあるピーク

	d0	d3	d30/OP	d65/OP35	
BR003_CM4_Fr1	X8344.2	X8344.2	X8344.2	X8344.2	
	X8940.9	X8940.9	X8940.9	X8940.9	○
BR003_CM4_Fr2					
BR003_CM4_Fr3	C06436.8	C06436.8	C06436.8	C06436.8	□
BR003_CM4_Fr4					
BR003_CM7_Fr1	C08939.5	C08939.5	C08939.5	C08939.5	○
BR003_CM7_Fr2	C06444.4	C06444.4	C06444.4	C06444.4	□
BR003_CM7_Fr3	C06443.3	C06443.3	C06443.3	C06443.3	□
	C06642.3	C06642.3	C06642.3	C06642.3	
BR003_CM7_Fr4					
BR003_IMAC_Fr1	C08945.0	C08945.0	C08945.0	C08945.0	○
BR003_IMAC_Fr2					
BR003_IMAC_Fr3					
BR003_IMAC_Fr4					

異なる実験条件でもほぼ近いm/zのピークで有意差が確認できた。



同じタンパク質が検出されているとすれば、奏効/非奏効を鑑別するマーカーとして有効か？

C-1-2 本解析

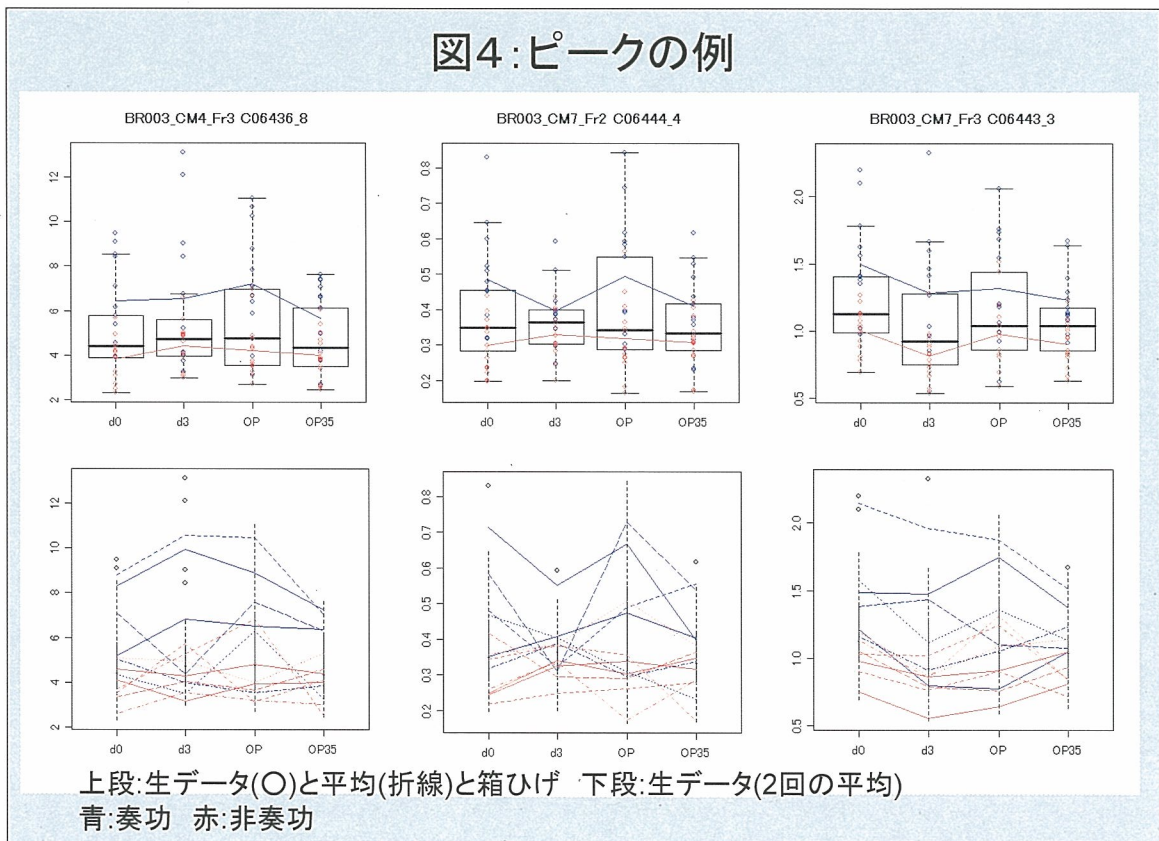
予備解析結果に基づき、その他の 22 データセットについて Permutation 検定、Permutation 検定結果による変動パターンの出現頻度、変動パターンによるバイオマ

ーカー候補の絞り込みを実施した。Permutation 解析等は予備検討と同様の方法により実施した。その結果、4 つのタイムポイントのすべてにおいて、奏効群と非奏効群の間に有意差が観察されたピークが観

察された (表 4)。さらに、測定上の質量数がほぼ同一なピークが、複数の測定条件において同一の有意差を示す例が観察された (図 4)。この結果は、これらのピークが同一分子であると仮定した場合、同様の変化が複数の測定条件で観察されたことを意味し、これらバイオマーカー候補の「確からしさ」が他の候補に比べて高いことが推測できる。以上の解析結果から以下の結論を得た。①Permutation 検定により複数のバ

イオマー化候補が抽出された。②異なる測定条件において、同一の分子だと考えられるバイオマーカー候補ピークが同一の有意差を示す可能性が示唆された。③生データにおいても、奏効群と非奏効群を区別できる可能性が示された。今後の課題として、バイオマーカー候補の絞り込みに臨床情報等のパラメーターを導入すること、奏効群と非奏効群の区別基準 (奏効率) による検討が挙げられた。

図4:ピークの例



C-1-3. バイオマーカー候補のパターン化

研究目的に沿ったバイオマーカー候補を抽出するために、タイムポイント毎の Permutation 検定結果に基づき、バイオマーカー候補の変動パターンを分類し、すべ

ての測定条件における変動パターンの出現頻度を表 1 に整理した。観察されたピーク総数は 2390、その中で 0000 変動ピーク数は 1763 (74%)、1111 変動ピーク数は 10 (0.4%)、1000 変動ピーク数は 96 (4%)

であった。

バイオマー化候補の絞り込み：変動パターンの中から、特に下記の変動パターンに注目し、バイオマーカー候補を絞り込んだ。

0110 :

0111 :

1000 :

1001 :

1110 :

1111 :

それぞれの変動パターンを示したバイオマーカー候補ピーク例を（表5）にあげる。これらの変動パターンを示すバイオマー化候補ピークの詳細情報についてさらに検討を進めている。

表5:パターン 0111

	ID	Var	d0	d3	OP	OP35	d0_3	d0_OP	d3_OP	pattern
CM7_F r3	27	C0649 6_9	0.058	0.001	0.046	0.025	0.466	0.803	0.196	0111
	30	C0685 1_8	0.074	0.007	0.003	0.008	0.649	0.419	0.817	0111
IMAC_ Fr1	59	C0839 1_3	0.546	0.030	0.025	0.040	0.242	0.253	0.916	0111

C-1-4. B-1-8. 乳癌細胞株 MCF7 より得られたエストロゲン応答性遺伝子シグナチャーのを用いた検索プラットフォームの作成を行った。臨床サンプルを用いた解析は次年度以降に行うこととした。

C-2. 抗HER2療法応答性に関するバイオマーカーの探索

HER2・HER2ホモダイマーを多く発現する乳

癌症例はそうでない症例に比べ、有意に長期に生存する傾向が示唆されたが、現在、確認試験を企画遂行中である。

C-3. 化学療法に関するバイオマーカーの探索

2 1 遺伝子シグナチャーの解析、プロテオミクス法による解析、いずれも検体の集積あるいは調整中であり、具体的なアッセイ

は次年度早々に行う。

C-4. 非浸潤性乳癌に関するバイオマーカーの探索

C-4-1. バイオマーカー候補の抽出

すべてのデータセット（表6）について Permutation 検定、Permutation 検定結果に

よる変動パターンの出現頻度に関する解析を実施した。Permutation 解析は以下の方法で行った。

手順はホルモン療法応答性に関するバイオマーカーの探索と同様である。

表6: Permutation検定(P値 \leq 0.05)、
 関連分析、変化パターンの集計結果

	000	001	010	011	100	101	110	111	ピーク数
CM4 Fra1	54	12	1	5	2	0	2	7	83
CM4 Fra2	59	9	6	1	0	1	0	6	82
CM4 Fra3	47	3	1	0	0	0	0	0	51
CM4 Fra4	84	16	0	0	4	0	1	2	107
H50 Fra1	51	11	1	3	8	2	5	3	84
H50 Fra2	16	0	0	0	1	0	0	0	17
H50 Fra3	67	8	2	0	1	0	1	0	79
H50 Fra4	105	5	0	1	3	1	0	1	116
IMAC Fra1 SPA	60	11	3	2	6	4	3	13	102
IMAC Fra2 SPA	64	6	4	0	1	1	0	6	82
IMAC Fra3 SPA	88	5	11	0	3	0	1	2	110
IMAC Fra4 SPA	96	9	1	0	3	0	0	1	110
	791	95	30	12	32	9	13	41	

C-4-1-1. バイオマーカー候補のパターン化

研究目的に沿ったバイオマーカー候補を抽出するために、タイムポイント毎の Permutation 検定結果に基づき、バイオマーカー候補の変動パターンを分類し、整理した。

観察されたピーク総数は 1023、その中で 000 変動ピーク数は 791 (77 %)、111 変動ピーク数は 41 (4 %)、100 変動ピーク数は

32 (3 %) であった。

C-4-2. バイオマーカー候補の絞り込み

変動パターンの中から、特に下記の変動パターンを、それぞれの理由により注目し、バイオマーカー候補を絞り込んだ(表7)。

100 :

011 :

110 :

それぞれの変動パターンを示したバイオマーカー候補ピークについて、各タイムポイントでの有意差とともに、経時変動の有意差も評価した。

以上の解析結果から以下の結論を得た。

①Permutation 検定により複数のバイオマーカー候補が抽出された。②異なる測定条件において、同一の分子だと考えられるバイオマーカー候補ピークが同一の有意差を示す可能性が示唆された。③非浸潤性乳癌と浸潤性乳癌を区別するバイオマーカーが存在する可能性が示された。

D. 考察

本研究において、術前ホルモン療法の奏効性に関連する新規血清バイオマーカー候補として 5 種類のピークを抽出したが、これらのピークはホルモン療法の奏効性を事前に予測するためのバイオマーカー、あるいは、ホルモン療法の奏効性を、ホルモン療法実施後の早い時期に予測するためのバイオマーカー、そして手術による腫瘍除去に関連し、腫瘍の再発をモニタリングするためのバイオマーカーに分類できる。新規のホルモン療法の効果予測に関するバイオマーカーを探索することが可能であると考えられる。

臨床的に有用なバイオマーカーを開発するためには、バイオマーカーの探索に続いて、探索されたバイオマーカーの再現性を確認し、多サンプル解析によるバリデーション試験を行うことが重要となる。本解析は術前ホルモン療法奏効群 7 例、非奏効群 6 例、合計 13 例による解析であり、単変量解析 (Permutation 解析) では一定の解析

結果が期待できるが、多変量解析では少数のサンプル数に起因した不安定性を有する。従って、Permutation 検定結果の基づく変動パターンの変化から上記のバイオマーカー候補を絞り込んだが、今後はサンプル数を増やした再現性試験を実施し、本研究により抽出されたバイオマーカー候補の再現性を確認するとともに、奏効性との関連性解析 (ロジスティック回帰分析)、その他の臨床病理学的因子を組み合わせた多変量解析を実施することによって、臨床的に有用なホルモン療法の奏効性予測に関連するバイオマーカーを開発できると思われる。既存のホルモン療法効果予測因子と組み合わせることで、予測精度はさらに高まると考えられる。

抗 HER2 療法の効果予測は、現在、免疫組織学的あるいは FISH 法による HER2 発現の解析にとどまっている。これらの手法は発現の有無を判別する上で極めて重要で、一般臨床に広く導入されているが、抗 HER2 療法無効例の選別には有用であっても、奏効例の選別には必ずしも有用でない。従って、新しいアイデア、手法が必要である。現在取り組んでいるアッセイシステムは HER family 蛋白分子数十種類についてその磷酸化、非磷酸化体を含め、定量的にかつ永久組織標本を用いて計測できる点がユニークである。最終的な解析結果を出すまでにはさらに追加研究、追加解析が必要であるが、将来的には有望と考えられる。

遺伝子シグナチャーを用いて術後の化学療法の必要性を判断するシステムの導入は臨床的に極めて意義が大きい。全体の原発性乳癌患者の 30%–40%が対象になり可能性がある。ホルモン療法単独で良好な予後

がえられ、化学療法を回避できれば、QOLの面からも患者にとっては大変な朗報であり、化学療法に伴う経済負担を回避できるという面でもその効果は小さくない。ただ、現在までの海外の、ある特定の患者群を対象にした解析結果があるのみでさらに検証的試験が必要である。今年度はプロトコルの作成、IRB・倫理委員会へのプロトコル提出と症例の絞込みを行ったが、次年度はこれらの対象例サンプルを用いてアッセイを行い、その臨床的インパクトを解析する予定である。

非浸潤性原発性乳癌に関するバイオマーカーの探索は極めて重要なテーマである。現

在までのところ、臨床的に有用な特異的マーカーはまだ存在しない。今回われわれは新しい考え方、手法をとり入れ検討解析を行った。まだ初期的段階ではあるが、いくつかの候補が出てきており、今後さらなる絞込みと分子の同定が可能と考えている。バイオマーカーのパターンとしては非浸潤性乳癌切除前後に発現量に変化する分子に特に着目したが、その中から浸潤性乳癌、良性病変との区別が可能なマーカーを抽出したいと考えている。その上でさらに症例を拡大した検証的試験を行いたいと考えている。

研究協力者氏名 佐治重衡
東京都立駒込病院臨床試験科・外科医長

研究協力者氏名 有賀智之
東京都立駒込病院外科

研究協力者氏名 高田正泰
京都大学医学部付属病院乳腺外科医員
前東京都立駒込病院外科

研究協力者氏名 関根 進
東京都立駒込病院外科

研究協力者氏名 廣瀬真紀子
東京都立駒込病院外科

研究協力者氏名 関根 勝枝
東京都立駒込病院外科

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍 なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
1. Kondo M, <u>Toi M.</u>	Cost-effective treatment options in first-line therapy for advanced breast cancer in Japan.	Expert Rev Anticancer Ther	6	197-204	2006
2. 近藤正英	トラスツズマブの経済評価－薬剤経済学入門－	がん分子標的治療	5(1)	70-76	2007
3. 近藤正英、星淑玲、戸井雅和	乳癌高リスク者によるタモキシフェン予防内服の費用効果分析	日本公衆衛生雑誌	53(10S)	613	2006

For reprint orders, please contact reprints@future-drugs.com



Cost-effective treatment options in first-line therapy for advanced breast cancer in Japan

Masahide Kondo and Masakazu Toi[†]

Concern regarding the economic aspect of cancer care has been increasing in the face of mounting healthcare expenditure in Japan. The need, not only for effective, but also for efficient treatment options in breast cancer care have been recognized in a broader context. In clinical practice, treatment options in first-line therapy for advanced breast cancer have become similar to those in Western countries in the past 5 to 10 years in the context of so-called 'evidence-based medicine' employing clinical evidence; whereas evidence of cost-effectiveness has been less acknowledged. Limited economic evidence suggests that current Japanese practice in first-line hormonal therapy is cost-effective. However, the efficiency of other options, such as chemotherapy, remains unknown. The expanding use of an expensive molecular-targeting agent, trastuzumab, has great implications for a treatment algorithm for breast cancer as well as for cost-effectiveness of care. Trastuzumab, of which use in first-line therapy was not found to be cost-effective in Western countries, is expected to be used for a number of HER2-overexpressing primary breast cancers in Japan. The extension of indication of this single agent would increase national healthcare expenditure by 0.1%. The authors believe explicit discussion on value for money of new expensive drugs would be unavoidable, not only among health policy makers, but also leading breast cancer specialists in Japan in the near future.

Expert Rev. Anticancer Ther. 6(2), 197–204 (2006)

Breast cancer has become one of the leading causes of death and morbidity in Japan. It is the fifth largest cause of death from cancers of major sites among females after stomach, lung, colon and liver. Mortality is rising continuously [1], although its age-adjusted mortality standardized to world population (8.3/10,000 population) is lower than those in Northern America (19.2) or Western Europe (22.3), according to an international comparison by the International Agency for Research on Cancer in 2002 [2]. The latest estimated incidence of breast cancer among females standardized to world population (33.8/100,000 in 1998) is the highest among cancers for major sites and is rising continuously [3]. The number of incident cases in 1999 was 36,139, which is remarkably larger than 11,123 in 1975; and the age-adjusted incidence standardized to Japan's standard population increased 2.14-times during the same period [4]. Notable

increases among the younger generation implies that it could become as high as those in Northern America (99.4) or Western Europe (84.6) [2] in the near future [3]. Although there is no established estimate for the number of advanced breast cancer cases, a proportion of cases with metastasis or invasion among newly diagnosed cases reported from a well-organized cancer registration (38.5%) [5], and unavoidable expectation of recurrence among early cases suggest that a number of cases are subject to first-line therapy for advanced breast cancer.

The increasing number of breast cancer cases combined with the use of resource-consuming therapies has grave implications for healthcare resources in Japan. Healthcare expenditure for cancer as a whole is reported to be US\$283 billion, which accounts for 11.4% of the national healthcare expenditure in 2002. This is increasing steadily both in amount and

CONTENTS

Treatment strategy for advanced breast cancer

Treatment options in first-line therapy for advanced breast cancer

Cost-effectiveness

Summary & conclusions

Expert commentary & five-year view

Key issues

References

Affiliations

† Author for correspondence
Tokyo Metropolitan Cancer and
Infectious Disease Center
Kamagome Hospital, Department
of Clinical Trials and Research,
Department of Surgery and Breast
Cancer Research Program,
Kamagome Hospital,
3-18-22, Honkomagome, Bunkyo,
Tokyo 1138677, Japan
Tel.: +81 338 232 101
Fax: +81 338 241 552
mekami17@wa2.so-net.ne.jp

KEYWORDS

breast cancer, cost-effectiveness,
expenditure, first-line therapy,
guideline, healthcare, molecular-
targeting agent, treatment option

share [6]. The breakdown for breast cancer is estimated to be US\$18 billion, accounting for 8.5% of healthcare expenditure for all cancers [7].

These increasing trends, which are commonly observed in industrialized countries, demand not only effective, but also efficient or cost-effective, treatment strategies for breast cancer.

Breast cancer is a solid carcinoma developed from the mammary gland. It is, however, widely acknowledged as a systemic disease, especially in the case of advanced breast cancer that requires combined modality therapy. It is also characterized by the involvement of sex hormones in its pathophysiology. Chemotherapy and endocrine therapy play major roles in its treatment, along with surgery and radiation therapy. Innovative – often expensive – antitumor and hormonal agents have been intensively developed and introduced widely in industrialized countries, including Japan.

This review, therefore, will focus on drug therapy strategies for advanced breast cancer and will discuss current options for first-line therapy in light of cost-effectiveness in Japan. Major drugs used in breast cancer treatment are summarized in BOX 1.

Treatment strategies for advanced breast cancer

Treatment strategies for breast cancer in Japan are arguably harmonizing with global standards with the recent development of a series of guidelines.

A consensus that evidence-based therapy should be provided for patients, despite the evidence being evaluated by breast cancer specialists in Western countries and, therefore, there are probably some unknown ethnic differences [8], has been rapidly formulated in the last 5–10 years. When there was a sudden interest in so-called ‘evidence-based medicine’ in the Japanese medical arena in the late 1990s [9], wide clinical practice variations in breast cancer treatment are acknowledged and the development of guidelines for breast cancer treatment was launched. The variations were surveyed by breast cancer specialists [10,11] and efforts were made to establish a consensus. The first guideline was published as a report of the Ministry of Health, Labor and Welfare funded research in 2003 [12], which was then revised by the Japanese Breast Cancer Society in 2004 [13]. In 2005, the Japan Society of Clinical Oncology published a guideline for appropriate drug use in the treatment of breast cancer [14]. The voice of the patient groups strongly supported the creation of such guidelines for good clinical practice.

The treatment strategy for advanced breast cancer in the latest guidelines [14] is summarized in FIGURE 1. Clearly, this is consistent with National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Clinical Practice Guidelines in Oncology [15,101], and its development was based on Hortobagyi’s algorithm [16].

Treatment options in first-line therapy for advanced breast cancer

The guideline clearly identifies two types of first-line therapies, depending on the nature of the disease: hormonal therapy for hormone-responsive and non life-threatening disease, and chemotherapy for hormone-unresponsive or life-threatening disease; however, it leaves the use of human epithelial growth factor receptor (HER)2-overexpression screening and trastuzumab

Box 1. Major drugs used in breast cancer treatment

Hormonal drug

- Antiestrogen
 - Tamoxifen
 - Toremifene
- Gestogen
 - Progesterone
 - MPA
- LH-RH analog
 - Goserelin
 - Leuprolide
- Selective estrogen receptor modifier
 - Fulvestrant*
- Aromatase inhibitor
 - Anastrozole
 - Letrozole*
 - Exemestane
 - Fadrozole

Anticancer drug

- Alkylating agent
 - Cyclophosphamide
- Metabolic antagonist
 - Folate metabolism antagonist
 - Methotrexate
 - Pyrimidine metabolism antagonist
 - 5-FU
 - 5’DFUR
 - Capecitabine
 - UFT
- Mitotic inhibitor
 - Vinca alkaloid
 - Vinorelbine
 - Taxane
 - Paclitaxel
 - Docetaxel
- Antitumor antibiotic
 - Anthracycline
 - Doxorubicin

Human monoclonal antibody

- Trastuzumab

*Not yet made available in Japan.

5-FU: 5-fluorouracil; 5’DFUR: 5’-deoxy-5-fluorouridine;

MPA: Medroxyprogesterone acetate; UFT: Uracil and tegafur.

unclear in the strategy. Furthermore, the guideline identifies two subtypes of first-line hormonal therapy depending on the menopausal status. For premenopausal disease, combined therapy with a luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH) analog (e.g., goserelin 3.6 mg/4 weeks or leuprolide 11.25 mg/12 weeks) and tamoxifen (20 mg) is strongly recommended compared with

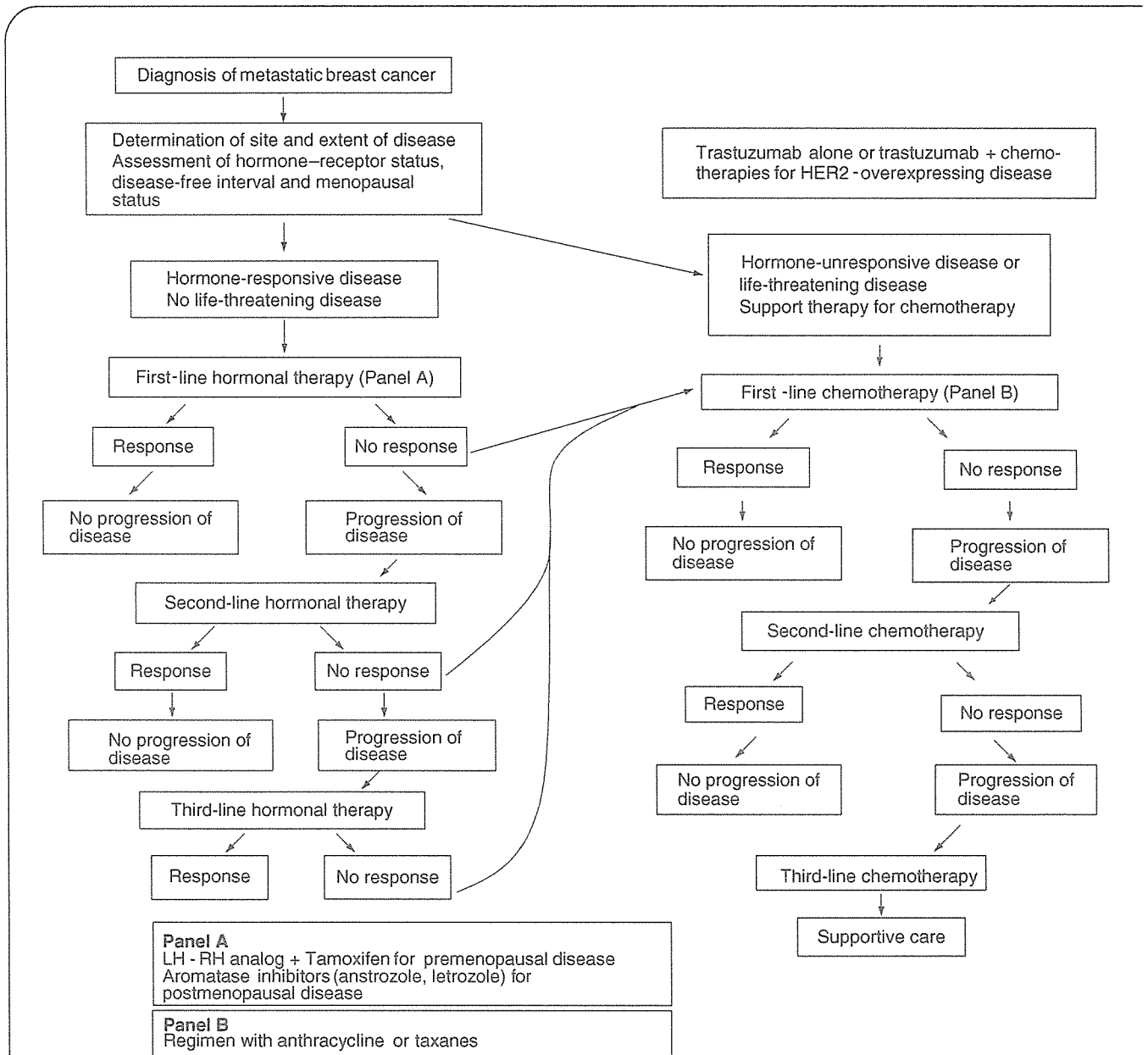


Figure 1. Japanese guidelines for treatment strategies for advanced breast cancer.
LH-RH: Luteinizing hormone-releasing hormone; HER2: human epithelial growth factor receptor type 2

single-agent therapy with ovarian function inhibitors or tamoxifen. For postmenopausal disease, aromatase inhibitors, anastrozole or letrozole, are strongly recommended compared with selective estrogen receptor modifiers or progesterone. As first-line chemotherapy, regimens with anthracycline or taxanes are recommended based on results from randomized trials and systematic reviews. Suggested regimens are doxorubicin and cyclophosphamide (AC), cyclophosphamide, doxorubicin and 5-fluorouracil (CAF) and doxorubicin and paclitaxel (AT).

In practice, however, treatment options in first-line therapy are not totally consistent with those recommended in guidelines due to two factors: use of trastuzumab and variation of preoperative or postoperative adjuvant therapy. Trastuzumab is one of the most innovative agents introduced into breast cancer treatment

since the 1990s, which is famous as an example of the product of genome-based drug discovery. It is a human monoclonal antibody, targeting HER2, and its use, combined with chemotherapy for advanced breast cancer, has been proven effective in several clinical trials [17]. Assessment of HER2-overexpressing status is routinely performed following a guideline formed by the Pathology Committee of Trastuzumab in 2001 [18] and, presently, regimens including trastuzumab are usually applied as first-line therapy for HER2-overexpressing disease. Current treatment strategy for advanced breast cancer in practice, taking HER2-overexpression status into account, is shown in FIGURE 2.

For non life-threatening and hormone-responsive disease, single-agent therapy is often chosen regardless of HER2-overexpression status, which is in accordance with Hortobagyi's algorithm.