

図 2 FEC-DOCによる腫瘍サイズ縮小率予測結果

皮膚発赤または皮膚浮腫、微細石灰化の付随、リンパ門の有無、ERは効きやすいものとして上がっている。

また、欠損値があった症例に関して、欠損値に取りうる値の最大値と最小値を入れて、どの程度の誤差範囲内で予測できるかを図 3 に示す。プロットしたもののうち 4 症例は、誤差が大きさにばらつきがあるが、すべて ER の情報が欠落していたものである。

表 2 重回帰分析で求められた係数

変数	偏回帰係数	p値	標準化偏回帰係数
BMI	-0.192	0.056	-0.190
家族歴	0.202	0.001	0.363
腫瘍最大径	0.564	1.91E-05	0.548
delle/dimp.	0.081	0.090	0.167
皮膚発赤または皮膚浮腫	-0.444	0.006	-0.327
微細石灰化の付随(エコー)	-0.234	0.015	-0.256
リンパ門の有無(エコー)	-0.091	0.042	-0.207
組織型	0.507	0.024	0.224
ER	-0.163	0.001	-0.358
定数項	-0.096	0.683	—

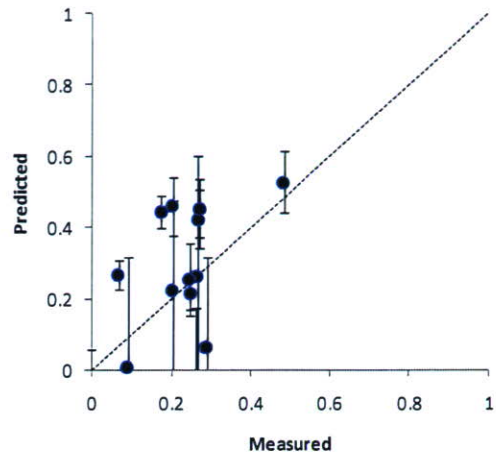


図 3 FEC-DOCによる腫瘍サイズ縮小率予測において、欠損値を含むデータの予測

重回帰分析で効くと予測された変数は従来知られている効果と逆のものが含まれる。Rouzier らの Nomogram[4]を見ると、例えば ER は positive より negative、組織型は lobular より ductal であるほど術前化学療法後に腫瘍サイズが 3cm 以下になるとされている。しかし実際に ER と縮小率の相関係数は-0.35、組織型は+0.13 となっており、組織型の計数に関してはこの Nomogram と一致するが、ER に関しては一致しない。その理由として、ER-の患者の腫瘍サイズが化学療法前から小さかったために、単純にサイズの比率で見ると ER+より大きくなってしまったか、そもそも術前化学療法を実施された人だけのデータを使っているために、他の検査項目などで術前化学療法が効くと判断された症例だけ対象としてモデルを作ったために、その症例の中では ER と化学療法の効果が逆の関係になったという 2 つが考えられる。実際、ER-と ER+で、初期サイズの平均は 26mm と 28.5mm であり、大きな違いは見られないので、後者の可能

性が高い。従って本結果で各変数の係数から予測因子を考える場合、もともと現在の診療アルゴリズムで術前療法を施されるとされる症例内に限ったものであることを注意しなければならない。全症例を対象とし、術前療法の効果があるかどうかの予測モデルや影響因子の解析結果は、C-3にて報告する。

C-2. リンパ節転移の予測

C-2-1. 既存の研究例とその問題点

センチネルリンパ節生検による結果は、術前化学療法や、腋窩郭清において意思決定の大きな判断材料となる。しかし、術前化学療法前には、腋窩リンパ節転移陽性と診断されていた患者が、術前化学療法後には陰性と診断されるケースがあるなど、センチネルリンパ節生検の結果だけから、本当に腋窩郭清を省略すべきかなど、意思決定をより複雑にさせる問題も発生している。

そこで、様々な臨床情報を用いて乳癌のリンパ節転移を予測する研究例として、前項と同様 Logistic 回帰を用いた Nomogram がいくつか報告されている。センチネルリンパ節生検が陽性だった症例において、nuclear grade、ER、多発性、組織型などを影響因子として考慮してリンパ節転移の予測、およびそのバリデーションを行っている例がある[9-14]。これらも、どの影響因子を Nomogram に入れる候補にするかという判断は専門医によって行われている。本研究では、術前化学療法における効果予測と同じく、入手可能なデータを全て用いてリンパ節転移に影響のある因子の組み合わせを探す試みを行う。

C-2-2. 学習に用いるデータ

前項と同じく、駒込病院において収集したグレード化されたデータベースから以下を予測するための症例を抽出した。1) 未治療状態でのリンパ節転移の予測として、術前化学療法を実施する前のセンチネルリンパ節生検の結果(35 症例)と手術先行の場合のリンパ節転移の病理結果(158 症例)。2) 術前化学療法後のリンパ節転移の予測として 49 症例。

グレード化や各変数は前項で利用したものと同じであるため割愛する。

C-2-3. 予測モデルの手法

予測方法としては、2 値の予測であるため、一般的に Logistic 回帰が用いられる。ただし、Logistic 回帰は重回帰分析と同様、多数の相関のある変数を入れられない、欠損値が多いデータでは保管をする、データを削るなどの処理を行わなければ解析を行えない問題がある。欠損値があり、2 値問題に適応しうる予測手法として、SVM や ANN があるが、これらはどちらも高精度な予測ができて影響因子の具体的な解釈が難しく、ブラックボックス的に使わざるを得ない。一方、各影響因子のルールがもっとも明確にわかるものでは、決定木タイプの C4.5[15]があるが、決定機の各要素で欠損値が1つでもあると、どちらのクラスか分類できない問題がある。また一般には予測精度を高めるために、同じデータから多数の決定木を生成させ、多数決をとってどちらのクラスかを予測するという方法 (bootstrap) がとられるが、これでは各因子の関係が不明瞭になり、決定機を用いる利

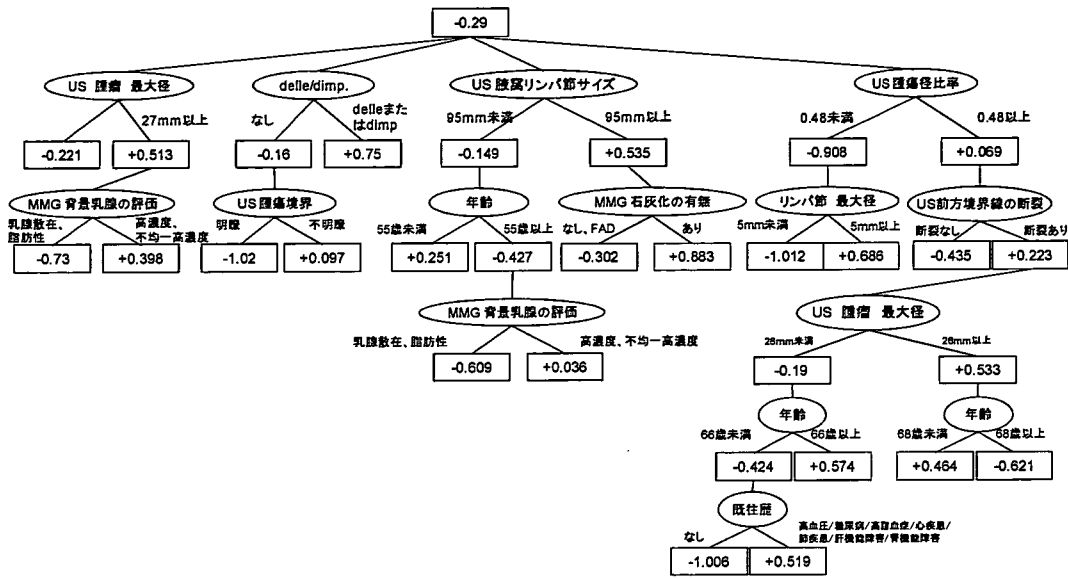


図 5 未治療状態でのリンパ節転移の予測

9

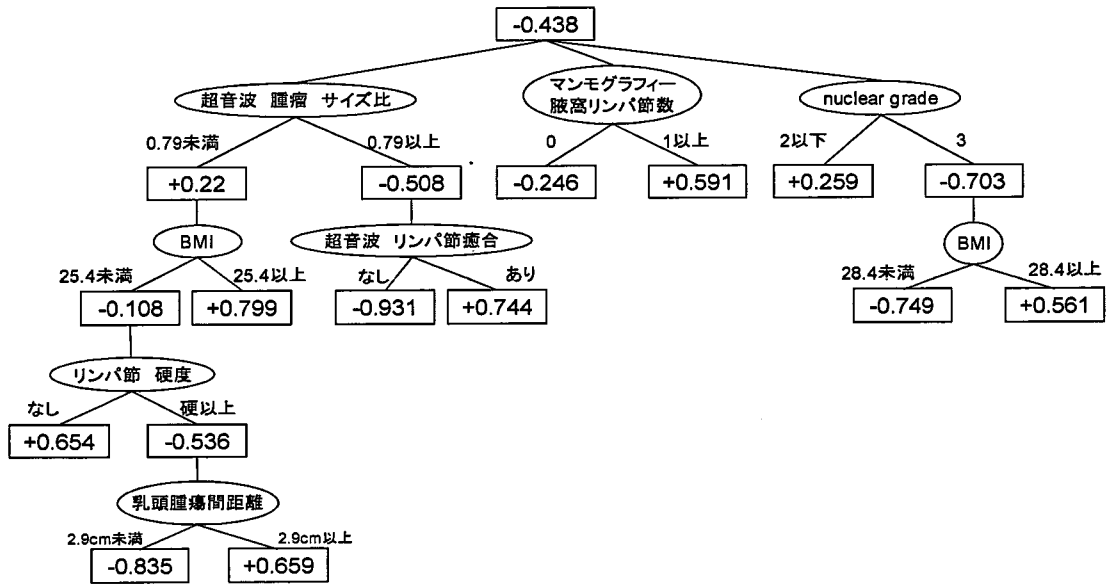


図 4 術前化学療法後のリンパ節転移の予測

点を失ってしまう。また C4.5 などは 1 変数で 2 クラスを分けることができる一定のスレッシュホールドを探し、それを決定木の形で組み合わせる手法なため、いわゆる線形分離の重ね合わせであるが、逆に変数に一定の重みを考慮してどちらのクラスに分類するかということができず、実際には境界上のデータがうまく分離できないことが多い。各変数を線形分離の要素として使う

だけではなく、より柔軟に変数の線形・非線形な重みを考慮できる Genetic Programming を使って Logistic 回帰よりも高い精度を出したという報告例 [16] もあるが、精度を高めるために bootstrap を行う必要があり、これも各要素の関係が不明瞭になる。

そこで、予測モデルを可視化することで各変数の関係を明確にすることを保てる方

法で、かつ高い予測精度が確保できる方法として、alternating decision tree (Adtree) [17]を用いる。本手法は、2値クラス分け問題で使われる decision stumps と決定木を組み合わせたもので、各変数の影響を定量的に評価することができ、かつ予測値もどの程度どちらのクラスである確率が高いかと定量的な出力が計算できる。また、C4.5をbootstrapした場合と予測精度に大きな変わりもないことも知られており、高い汎化能力も期待できる。また、ツリーに含まれる変数に欠損値がある場合も、どれだけの範囲で確率の揺らぎがあるかを評価することができ、欠損値の多いデータの解析にも適している。

C-2-4. 予測モデルの構築結果

図5に術前化学療法を行う前(未治療状態)でのリンパ節転移の予測モデルを示す。また、図5に術前化学療法を行った後のリン

パ節転移の予測モデルを示す。図5と図4のどちらも、ツリー全体のスコアがプラスの場合「転移あり」で、マイナスの場合「転移なし」と予測することを意味する。Adtreeの解釈を図6を用いて説明する。

表3に1症例の変数値を示す。この値は実際の症例の値ではなく、説明のために用意した仮想的な値である。Adtreeでは、スコアに関するスコアノード(図中四角で表示)と、変数に関する変数ノード(図中楕円形で表示)の2つの要素からなる。ツリーの一番上のスコアノードから出ているすべての枝に関して、変数ノードで条件の一致する枝の方をたどっていき、全スコアの和を計算する。その合計値が正の値か負の値かで、どちらのクラスである可能性が高いかを算出する。値が0に近い場合はどちらのクラスか判断がつかない場合であり、合計スコア絶対値が大きければ大きいほど、より特定のクラスである確率が高くなる。図6の場合、1番上のスコアノードから、A、

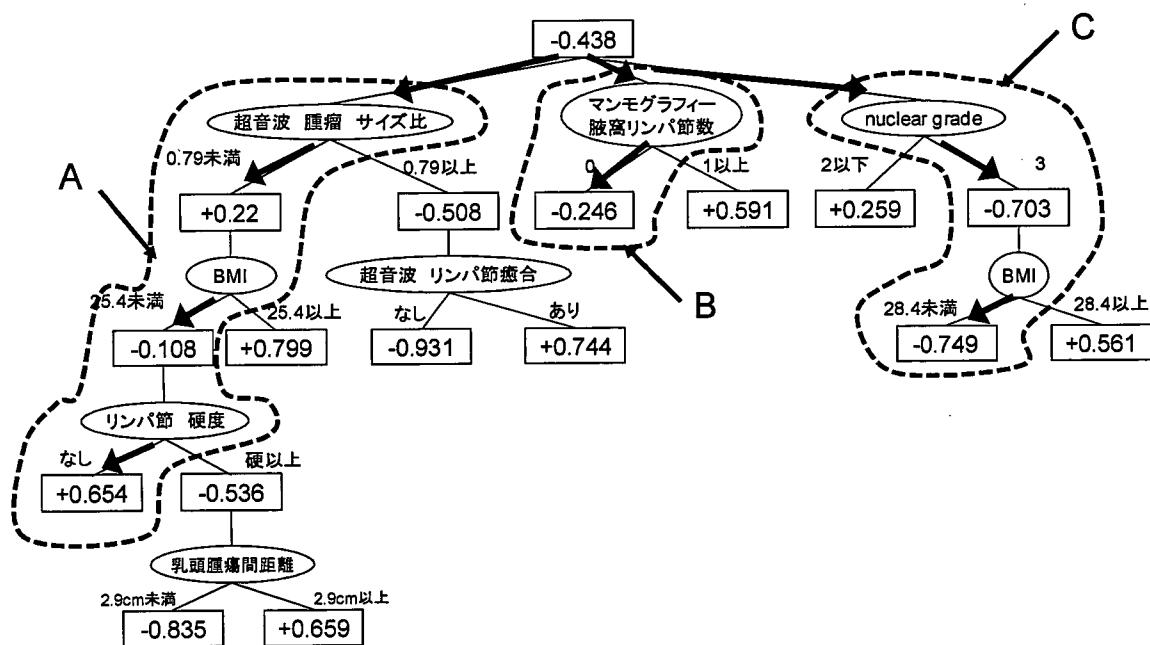


図6 Adtreeの計算例

B、Cの3本の枝がでており、それぞれのスコアを計算する。Aの場合最初にエコーでの腫瘍サイズ比の値が0.79未満であれば、+0.22(左のスコアノード)、0.79以上であれば-0.508(右のスコアノード)をたどることになる。表3の症例で街頭する変数は、0.65であるため、左側をたどる。同様にして枝をたどっていき、それ以上枝がないところまで計算をすすめる。B、Cについても同様の計算を繰り返す。図6の点線の枠で囲った箇所は表3の症例に従ってたどった箇所を示している。これらのスコアを全て足すと、

A: +0.22 -0.108 +0.654 = +0.766

B: -0.246

C: -0.703 -0.749 = -1.452

合計: -0.438 +0.766 -1.452 -0.438 = -1.37
となり、マイナスの値をとる。この場合、「転移なし」が予測値となる。

図5の術前化学療法を行う前のリンパ節転移の予測モデルの予測精度の正解率は89.6%となった。図7に全症例の予測スコアから計算できる転移確率の分布を示す。

表3 症例の1例(変数の各値は仮想の値)

項目	値
年齢	63
BMI	24.5
リンパ節 硬度	なし
超音波 腫瘍 サイズ比	0.65
乳頭腫瘍間距離(cm)	1
超音波 リンパ節癒合	なし
マンモグラフィー腋窩リンパ節数	0
Nuclear grade	3

左側は本来転移がないと診断された症例で、右側は転移があると診断された症例の予測値である。縦軸は転移の可能性を示しており、プロットが上の方にあるほど、転移の可能性が高いということを示している。左側は下半分、右側は上半分に収まるようにプロットが配置されれば、予測が正確である。Y軸が0.5のところ(転移確率が50%)で左側で上、右側で下に来ているプロットがあるが、右側の方が数が多い。これは、転移のない症例をないと予測するよりも、転移のある症例をあると予測するほうが精度が悪いことを意味している。ただし、本来の診断と逆に予測されたプロットも完全に逆の予測を出しているわけではなく、0.3~0.7(30%~70%)あたりに収まっている。従って、本予測モデルでは、確率が確実に0.3以下の場合、転移の可能性が低い、0.7以上の場合転移の可能性が高い、0.3~0.7の場合、どちらか判断できないという使い方が考えられる。

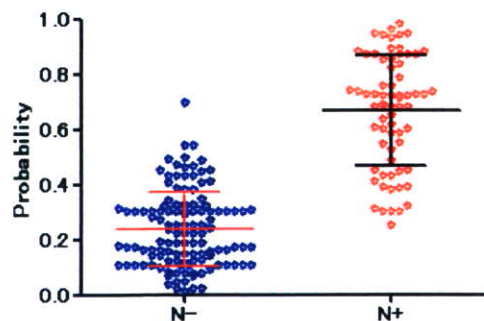


図7 未治療でのリンパ節転移予測モデルの予測確率の分布

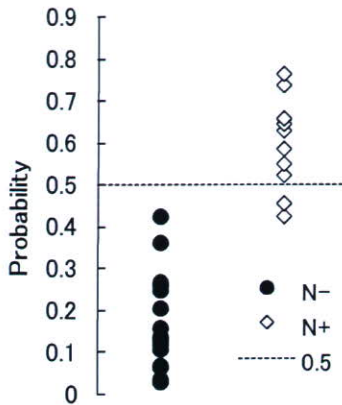


図 8 化学療法後のリンパ節転移予測モデルのスコアの分布

術前化学療法後の予測結果(図 4)では、転移なしと診断された 35 症例は全て予測可能で、転移ありと診断された 14 症例の内 2 症例は逆に転移なしと予測する結果となった。図 8 に予測モデルのスコアから計算できる転移の確率の分布を示す。こちらは、左側が転移なしとされたこちらも 2 症例は間違っただけの予測をしたものの、Y 軸で 0.5 付近に位置する。こちらも同様に確率が 0.3 以下の場合転移の可能性が低く、0.5 以上では転移の可能性が高い、0.3~0.5 あたりはどちらとも判断できない。

C-2-5. 予測モデルの考察

図 5 の術前化学療法を行う前のリンパ節転移の予測モデルを要約すると、以下のようになる。

- エコーでの腫瘍最大径が大きい場合、リンパ節転移の可能性が高く、かつマンモグラフィ(MMG)で背景乳腺の評

価が高濃度、不均一高濃度の場合さらにリンパ節転移の可能性が高くなる。

- delle/dimpling の所見でどちらかがあがる場合、リンパ節転移の可能性が高くなる。ない場合はエコーでの腫瘍境界が不明瞭な場合転移の可能性が高くなる。
- エコーでの腋窩リンパ節のサイズが大きい場合はリンパ節転移の可能性が高くなる。このとき MMG で石灰化の所見がありであれば更に転移の可能性が高くなる。腋窩リンパ節のサイズが小さい場合は年齢が低い場合に転移の可能性がある。年齢が高い場合は、MMG 背景乳腺の評価も影響する。
- エコーでの腫瘍径の比率が大きい場合(丸くない場合)、リンパ節転移の可能性が高くなる。さらにエコーでの前方境界線の断裂があり、エコーでの腫瘍最大径が大きければさらにその可能性は高まる。エコーでの腫瘍最大径が小さい場合は年齢が高ければ転移の可能性が高く、低い場合は既往歴で何もない場合のみ可能性が低くなる。また、US 腫瘍径比率が小さい場合は、身体所見でのリンパ節の最大径が大きい場合転移の可能性が高くなる。

また、図 4 の術前化学療法後のリンパ節転移の予測モデルでは、以下のようになる。

- エコーでの腫瘍サイズ比が大きい(丸くない)場合、リンパ節転移の可能性が引く可能性が高い。またこの場合、エコーでの超音波リンパ節癒合がない場合リンパ節転移の可能性がより

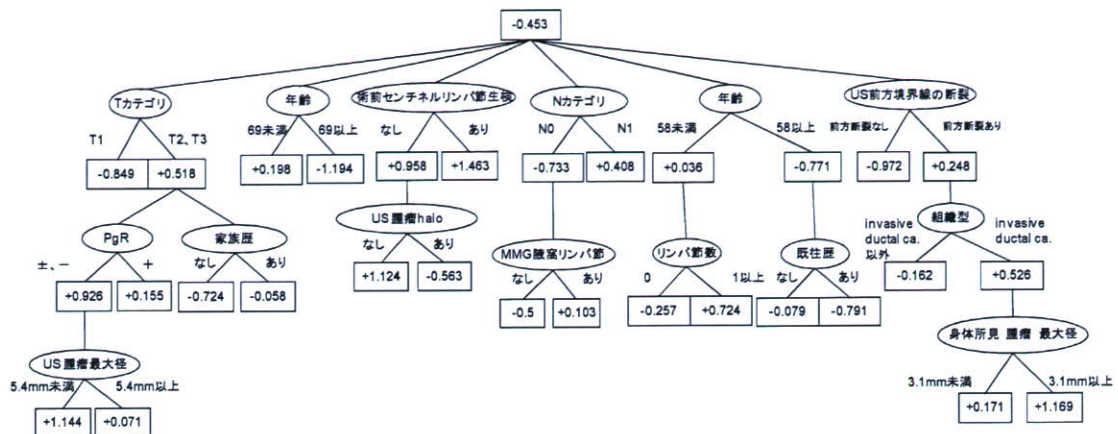


図 9 術前化学療法/手術先行の選択の意思決定木

低くなる。腫瘍サイズ比が小さい場合、BMI の小さければ転移の可能性は低く、さらに身体所見のリンパ節硬度が「硬」以上、乳頭腫瘍間距離が小さい場合、転移の可能性が低くなる。

- MMG で腋窩リンパ節が1つでもある場合、リンパ節転移の可能性が高くなる。
- nuclear grade が3の場合、リンパ節転移の可能性が低くなる。また、このとき、BMI が低ければより転移の可能性が低くなる。

図 4 の結果の解釈の 2 番目では腋窩リンパ節があれば転移の可能性が高くなるという比較的關係が明確なものが含まれているが、これら両方の結果を比べると、エコーの腫瘍サイズ比の効果が逆になっていることに気づく。またリンパ節硬度が低いほど転移の可能性が高くなるなど、従来知られている知見にそぐわないルールも含まれている。これは、未治療の症例と化学療法を受けた症例で前者の症例数が多く、後者が少ないことも1つの要因ではあるが、特に後者に関しては、ある程度化学療法の効果があると診断された症例に限ったことであるので、

それぞれの変数が偏ったものであると推測される。これは術前化学療法による腫瘍縮小率と同じ現象であり、ツリーの予測が適応できる症例がかなり限られると考えられる。

C-3. 術前化学療法/手術先行の意思決定の可視化

C-3-1. 既存の研究例とその問題点

特定の治療や検査項目の予測では、ある時間までに入手できた情報（入力）からその後起きる結果（出力）を予測していたが、治療の意志決定の可視化も同じく、意志決定を行う前に蓄積されてきた情報（入力）を元に、何らかの意思決定（出力）を下すというとらえ方をすれば情報工学的には手法を使うことができる。どのような手法が、またそれらのどのような組み合わせが適切かという比較検討を行っている研究例は数多くあり（例えば[18]など）、ほとんどは何をもってよしとするかは出力の予測精度で評価している。乳癌においては、C4.5 による決定木を用いて再発のリスクを予測し、専門医と予測精度を比較し、決定木の予測精度を評価するという研究例が報告されて

いる[19]。ここでも、検査・治療効果予測と同じく精度を上げるためにはツリーをbootstrap する必要があり可視化と精度にトレードオフの関係があるため[15]、前項と同じく予測精度を確保しつつ、ある程度の可視化を実現できる Adtree を利用する。Adtree に関しては、アルツハイマーの心理学的苦痛の影響因子分析に利用されて報告例がある[20]。乳癌の再発リスクを予測する[19]でも影響因子は前知識で絞り込んでいるが、本手法と入手可能なすべての因子を用い、ダイレクトにどの因子がどのように影響があるのかをマイニングする。

C-3-2. 学習に用いるデータ

ここでも、これまで同じく、駒込病院において収集したグレード化されたデータベースを学習データとする。この中から術前化学療法(FEC→DOC)を実施された 73 症例と、手術先行の 182 症例を抜き出した。

グレード化や各変数は前項で利用したものと同じであるため割愛する。

C-3-3. 予測モデルの学習結果

図 9 に予測したモデル、図 10 に予測したモデルが出力する術前化学療法/手術先行選択の確率の分布を示す。

図 10 と図 11 は、10-fold クロスバリデーション(CV)を行った時に得られる結果(テストデータを集めた結果である。一方図 9 は、CV 時と同じパラメータを用い、全データを学習データとして予測したときの結果である) 10-fold CV 時の予測性能は正解率としては 91.4%、ROC の面積は 0.954 とかなり高い精度での予測ができて

いる。図 10

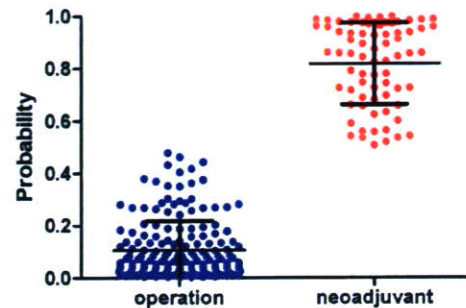


図 10 術前化学療法/手術先行選択の予測確率の分布

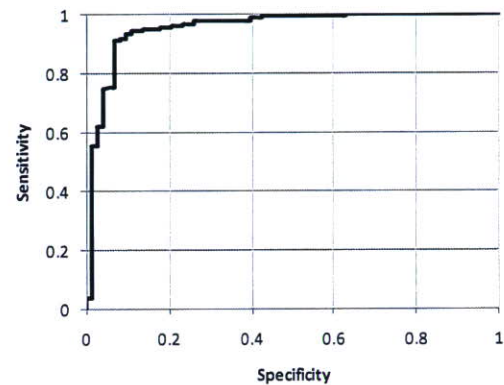


図 11 術前化学療法/手術先行選択予測モデルの ROC 曲線

のプロットのばらつきをみると、予測が間違っただけのものもほぼ $Y=0.5$ 近傍に存在し、大きく逆側に外れているものはないことがわかる。

今回ツリーを作る際に先立って、サポート・ベクター・マシン(SVM)を用いて変数の重要度選択を行った。全変数を用いて線形 SVM でクラス分類を行い、変数を 1 つずつ外していき予測精度の劣化を評価することで変数を重要度順にランキングするというものである。重要度が高い変数では、N カテゴリ、組織型、T カテゴリ、年齢、

身体所見・腫瘍の形状、エコー・前方境界線の断裂、エコー・halo、PgR などである。第 20 位より、nuclear grade、術前センチネルリンパ節の結果、ER、Her などが並ぶ。今回、幾つかの変数の情報が集約された T カテゴリや N カテゴリが上位に出てきたことが確認され、これらのカテゴリが意思決定の指標として有効に働いていること（つまりカテゴリの計算指標の設計そのもの）が、データ解析から確認できたため、今回作成するツリーではこれらの値も含めて解析を行った。

C-3-4. 予測モデルの考察

図 9 の術前化学療法/手術先行選択のモデルの解釈は以下ようになる。

- T カテゴリが T1 の場合は手術先行になる可能性が高くなる。T カテゴリが T2, T3 の場合は、PgR と家族歴と PgR の影響もある。PgR が ±、- の場合は術前化学療法の可能性が高くなり、さらにエコーでの腫瘍最大径が小さければ更にその可能性は高くなる。家族歴は何もない場合のほうが手術先行の確率が高くなる。
- 年齢は低い方が術前化学療法の可能性が高くなる。
- 術前センチネルリンパ節生検の結果で転移ありとの診断の場合、術前化学療法の可能性が高くなる。なしの場合はエコーの halo がなしであれば術前化学療法の可能性がより高くなる。
- N カテゴリが N1 の場合は術前化学療法の可能性が高くなる。N0 の場合は MMG での腋窩リンパ節転移がありであれば

術前化学療法の可能性が高くなる。

- 年齢が低い場合、術前化学療法の可能性が高くなるが、リンパ節数が 1 以上で更にその可能性が高くなる。年齢が高い場合は既往歴が何もなければ手術先行の可能性が高くなる。
- エコーの前方境界線の断裂がなければ手術先行の可能性が高くなる。断裂があれば、組織型に依存し、invasive ductal carcinoma の場合術前化学療法の可能性が高くなり、更に身体所見の腫瘍最大径が大きい場合その可能性が高くなる。

これらのうち、年齢が低い、転移性の所見、腫瘍径が大きい場合、術前化学療法の可能性が高くなるという従来のルールが含まれている。このほか、エコーでの腫瘍 halo や前方境界線の断裂など、浸潤に関する変数が含まれている。その他組織型などもあり、概して、年齢、転移性、腫瘍径、浸潤性の 4 つの大きなパラメータの組み合わせによって、術前化学療法と手術先行の意思決定がなされていることがわかる。

C-3-5. 検査項目削除による影響の調査

本研究にて得られたモデルを駒込病院以外の施設で活用することを想定し、一部の検査ができないなど、変数を削除させて、どの程度予測精度が悪化するかのシミュレーションを行った。図 12 に、いくつかのパターンで変数を削除した場合の ROC 曲線下の面積の違いを示した。示したすべての結果は、10fold-CV の結果である。一番左は全ての変数を使った場合の予測精度で、右側は、X 軸の下に記載の項目がない場合の

予測精度である。身体所見、TカテゴリとNカテゴリに関しては、予測精度に大きな違いは起きていない。これは、例えばTカテゴリ、Nカテゴリではそれぞれのカテゴリを計算する素要素がツリーに入り込むことで、補完出来ているなどが考えられる。また身体所見に関しても、例えば腫瘍の最大径は、エコーでも同様の項目があり、それらの変数が代わりに入り込んで補完されている可能性が考えられる。これらに比べ、マンモグラフィとエコーの変数を削除した場合はやや予測精度が落ちている。続いて基本情報、術前センチネルリンパ節生検の結果、病理所見 (PgR, ER など) の欠落による予測精度の悪化が著しい。特に術前センチネルリンパ節生検は、実施している症例が本予測モデルに用いた症例の中で12%と低いにもかかわらずほとんどが欠損値であるにも関わらず、影響の大きさを示している。今回は試験的にマンモグラフィ全体を削除するなど大ざっぱなシミュレーションを行ったが、実用化を考えた場合、

画像所見でも読影者によって揺らぎが多い可能性のものだけを外すなど、検査項目の予算や浸襲性などを考慮し、省略可能であるかどうか検討すべき項目として優先度の高いものについて同様の検証を行うべきである。

D. 考察

本研究では、原発性乳癌の術前療法に関して、術前化学療法の効果予測、リンパ節転移の予測、術前化学療法/手術先行の意思決定の可視化のモデルを構築した。都立駒込病院で収集された均一で高品質なデータベースを学習データとすることができたため、どのモデルも比較的高い予測精度を出すことができた。特に術前化学療法/手術先行の意思決定の可視化のモデルに至っては10-fold CVで90%以上とかなり高い予測精度を出すことができた。

リンパ節転移の予測と術前化学療法/手術先行の意思決定に関しては Adtree を用いることによって、それぞれ影響因子のルールを解釈可能な複雑さで明示化することもできた。本報告書内でツリーの解釈としての記載は簡略化のために定性的な記載をしているが、実際は各項目に定量的なスコアも付けられており、ツリーから一定のルールでスコアを計算することにより、出力部分の具体的な確率を計算することができる。このような方法で、あらゆる箇所の意思決定を再現しいき、変数削除のシミュレーションと組み合わせ、駒込病院以外でどの程度構築したモデルの汎用性があるかを今後検証していく必要がある。

また、術前化学療法時の腫瘍縮小率に関しては、一定のサイズ以下になる確率でな

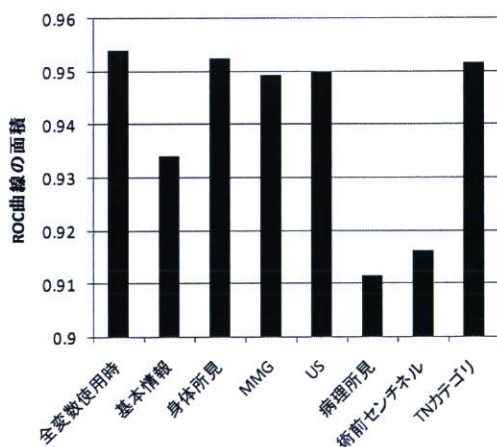


図 12 変数欠損時の ROC 曲線の面積

く縮小率を直接予測するモデルの開発を行った。ただしこのモデルに含まれる変数の係数は従来知られている知見に一致しないものがあつたが、これらの変数の係数が有効なのは、あくまでも学習データに用いたれた症例に類似する症例内のみ限定される。つまり今回の場合、駒込病院の診療において、術前化学療法を行われるべきと診断された症例に関してのみ有効であるため、この結果から全ての患者の縮小率が予測できるわけではない。このため、新たに診療アルゴリズムを設計していく上では、術前化学療法がされるべきか否かのツリーのサブモデルとして、縮小率予測のモデルが存在すべきである。

E. 結論

本研究では開発したモデルのうち、術前化学療法の効果予測、リンパ節転移の予測に関しては、他施設での評価試験の実施を、京都大学倫理委員会の審査中の段階である。個別の予測モデルとしては高い予測精度を得られたが、変数欠損のシミュレーションのような必要項目の解析と、各モデルの統合、また今回報告書には記載していない他箇所の意思決定の可視化モデル（例えば、術前療法を実施するとなった場合、術前ホルモン療法と術前化学療法のどちらを行うべきか）も順次構築し統合してゆくことを今後行う。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

参考文献

1. Ravdin, P.M., et al., *Computer program to assist in making decisions about adjuvant therapy for women with early breast cancer*. J Clin Oncol, 2001. 19(4): p. 980-91.
2. Siminoff, L.A., et al., *A decision aid to assist in adjuvant therapy choices for breast cancer*. Psychooncology, 2006. 15(11): p. 1001-13.
3. Rouzier, R., et al., *Nomograms to predict pathologic complete response and metastasis-free survival after preoperative chemotherapy for breast cancer*. J Clin Oncol, 2005. 23(33): p. 8331-9.
4. Rouzier, R., et al., *Development and validation of nomograms for predicting residual tumor size and the probability of successful conservative surgery with neoadjuvant chemotherapy for breast cancer*. Cancer, 2006. 107(7): p. 1459-66.
5. Hall, M.A., *Correlation-based Feature Subset Selection for Machine Learning*, in *Department of Computer Science*. 1999, University of Waikato.
6. Goldberg, D.E., *Genetic algorithms in search, optimization, and machine learning*. Reading. 1989: Addison-Wesley Publishing Company.

7. Gewehr, J.E., M. Szugat, and R. Zimmer, *BioWeka--extending the Weka framework for bioinformatics*. *Bioinformatics*, 2007. 23(5): p. 651-3.
8. Frank, E., et al., *Data mining in bioinformatics using Weka*. *Bioinformatics*, 2004. 20(15): p. 2479-81.
9. Lambert, L.A., G.D. Ayers, and F. Meric-Bernstam, *Validation of a breast cancer nomogram for predicting nonsentinel lymph node metastases after a positive sentinel node biopsy*. *Ann Surg Oncol*, 2007. 14(8): p. 2422-3.
10. Lambert, L.A., et al., *Validation of a breast cancer nomogram for predicting nonsentinel lymph node metastases after a positive sentinel node biopsy*. *Ann Surg Oncol*, 2006. 13(3): p. 310-20.
11. Van Zee, K.J., et al., *A nomogram for predicting the likelihood of additional nodal metastases in breast cancer patients with a positive sentinel node biopsy*. *Ann Surg Oncol*, 2003. 10(10): p. 1140-51.
12. Specht, M.C., et al., *Predicting nonsentinel node status after positive sentinel lymph biopsy for breast cancer: clinicians versus nomogram*. *Ann Surg Oncol*, 2005. 12(8): p. 654-9.
13. Cserni, G., *Comparison of different validation studies on the use of the Memorial-Sloan Kettering Cancer Center nomogram predicting nonsentinel node involvement in sentinel node-positive breast cancer patients*. *Am J Surg*, 2007. 194(5): p. 699-700.
14. Ponzone, R., et al., *Comparison of two models for the prediction of nonsentinel node metastases in breast cancer*. *Am J Surg*, 2007. 193(6): p. 686-92.
15. Quinlan, J. *Bagging, boosting, and C4.5*. in *The Proceedings of the Thirteenth National Conference on Artificial Intelligence*. 1996. Menlo Park, CA: AAAI Press.
16. Biesheuvel, C.J., et al., *Genetic programming outperformed multivariable logistic regression in diagnosing pulmonary embolism*. *J Clin Epidemiol*, 2004. 57(6): p. 551-60.
17. Freund, Y. and L. Mason. *The alternating decision tree learning algorithm*. in *Proceeding of the Sixteenth International Conference on Machine Learning*. 1999. Bled, Slovenia.
18. West, D. and V. West, *Model selection for a medical diagnostic decision support system: a breast cancer detection case*. *Artif Intell Med*, 2000. 20(3): p. 183-204.
19. Razavi, A.R., et al., *Predicting metastasis in breast cancer:*

- comparing a decision tree with domain experts. J Med Syst, 2007. 31(4): p. 263-73.*
20. Zhou, X., J. Xu, and Y. Zhao, *Machine learning methods for anticipating the psychological distress in patients with Alzheimer's disease. Australas Phys Eng Sci Med, 2006. 29(4): p. 303-9.*

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

原発性乳癌の治療に関連するバイオマーカーの探索

主任研究者 戸井 雅和
京都大学医学部附属病院乳腺外科教授
分担研究者 黒井 克昌
東京都立駒込病院臨床試験科外科部長

研究要旨

年々増加傾向にある乳癌での原発病変に関するバイオマーカーをプロテオミクス手法による特異的なタンパクの探索を行うことで特定するため、昨年度より 1. ホルモン応答性、2. 抗 Her2 療法応答性、3. 化学療法予後予測、4. 非浸潤性乳癌を対象に計画着手した。今年度は昨年度に得たホルモン療法応答性バイオマーカー候補の探索を検証するため同様の効果をもたらす別の薬剤使用患者群検体を解析の対象とした。
さらに2つの試験の結果から抽出した候補タンパクの同定を試みる。

研究目的

A-1 ホルモン療法応答性に関するバイオマーカーの探索

昨年度より引き続き新規バイオマーカーの探索を行う。

原発性乳癌では約60～70%がER（エストロゲンレセプター）を発現していることで、何らかのホルモン感受性を有すると考えられている。

ER陽性の乳癌症例の多くが卵巣機能抑制、抗エストロゲン剤、アロマターゼ阻害剤により2年から10年の長期にわたり標準治療として術前後に受けている。

ホルモン受容体の発現に関する情報はホルモン療法不適応例の同定には有用であるが応答・効果の程度を的確に判断するために有効なファクターであるとは言い難い。

従ってホルモン療法応答性に関して、治療

奏効のモニタリングを可能にする、あるいは治療奏効や応答性を予測するマーカーの探索を目的とする。

A-2 ホルモン療法応答性マーカー候補の検証

昨年度の研究の一つとして行ったホルモン療法応答性に関するバイオマーカーの探索では術前ホルモン療法臨床試験を行った Letrozole 投与群の検体を分析に使用した。Letrozole は非ステロイド性アロマターゼ阻害剤であり同時にステロイド性アロマターゼ阻害剤の Exemestane の投与群での試験が行われている。

それぞれの薬剤の作用機序には差異があるが同様の効果を期待し得るホルモン療法剤であり効果応答性への同一タンパクの関与が予測される。

今年度はこの関与が予測される同一のタンパクを探索し、また昨年度抽出したマーカー候補を絞り込むため Exemestane 投与群の検体で新たに測定解析を行う。

A-3 ホルモン療法応答性マーカー候補の精製・同定

Letrozole 投与群試験、Exemestane 投与群試験双方に共通のマーカー候補タンパクの精製・同定を行いタンパクの特定を行う。

B 研究方法

B-1 対象

術前ホルモン療法の臨床試験である CAAN スタディにおける、非ステロイド性アロマターゼ阻害剤 Letrozole 治療群の中からインフォームドコンセントが得られ研究可能な乳癌症例 13 例を対象にした昨年の研究に対して、今年度はステロイド性アロマターゼ阻害剤である Exemestane 治療群から同様の過程を経た 9 例を測定解析対象とする。

それぞれ術前療法前、ホルモン療法開始後 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 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。

9 例中奏効率 50%以上の奏効例は 5 例、非奏効例は 4 例であった。

B-2 サンプル前処理

採取後遅滞なく血清分離を行い凍結し融解されることなく保存された血清材料を用いた。凍結・融解の過程で発生するタンパク像、量の変化を最小限に止めるため使用時の小分け分注も同じ融解条件のもとで行

う。前回のアッセイと同様にサンプルは氷上で融解され 20,000×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 5shaker を搭載した Biomek2000 Laboratory Work Station (Beckman Coulter)を用いて行った。血清サンプル 20 μl に変性バッファー、U9 (9M urea, 2% CHAPS, 50mM Tris-HCl, pH9) 30 μl を加え、20 分間 4℃で振とうした。BioSeptra Q Ceramic Hyper DF は 50mM Tris-HCl, pH9 にて前もって平衡化し、50% slurry に調整した。

レジン 180 μl 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) 200 μl で 3 回、平衡化を行った。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 50 μl で共洗いし、併せてレジンに加え、30 分間、4℃にて振とうした。

非吸着画分を回収し、50mM Tris-HCl, pH9, 0.1% OGP 100 μl 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、100 μl × 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。調整したフラクションは 96 ウェルプレートに 40 μl ずつ分注し、使用時まで -80℃で保存した。なお本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

U9 (9M Urea, 2% CHAPS, 50mM Tris-HCl , pH9)

U1 (1M Urea, 0.22% CHAPS, 50mM Tris-HCl , pH9)

Wash buffer 1 (50mM Tris-HCl / 0.1% OGP , pH9)

Wash buffer 2 (100mM Sodium Acetate / 0.1% OGP , pH5.8)

Wash buffer 3 (100mM Sodium Acetate / 0.1% OGP , pH4)

Wash buffer 4 (33.3% Isopropanol / 16.7% Acetonitrile / 0.1% Trifluoroacetic acid)

B-3 Protein Chip システム

バイオマーカー探索は、バイオ・ラッドラボラトリーズ社製の 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補足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正が高い。

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補足、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 Hyper DF 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 に補足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}、ProteinChip 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-4 Protein Chip システムによるバイオマーカー探索

Protein Chip 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。

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分画に分離する。

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補足する。

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。

エネルギー吸収分子の添加

ProteinChipに補足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。

ProteinChipリーダーによる測定

ProteinChipに補足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。

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検出する。

B-5 ProteinChipによるサンプル処理

本研究では昨年度の研究との比較のため同様に陽イオン交換チップ(CM10)および金属イオン交換チップ(IMAC30)を使用してバイオマーカー探索を実施した。また、ProteinChipへのサンプル添加、洗浄、エネルギー吸収分子の添加は、Biomek2000(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。

陽イオン交換チップ pH4 (測定条件名: CM4)

洗浄・結合バッファー(100mM Sodium Acetate, pH4)を150 μ l/spot添加して5分間室温にて振とう、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10 μ lを結合・洗浄バッファー90 μ l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150 μ l/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200 μ l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%飽和シナピン酸(sinapinic acid: SPA)を1 μ l/spot添加・風乾させた。この操作を2回繰り返した。

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150 μ l/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10 μ lを結合・洗浄バッファー90 μ l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150 μ l/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200 μ l/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%飽和シナピン酸(sinapinic acid: SPA)を1 μ l/spot添加・風乾させた。この操作を2回繰り返した。

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 CuSO₄を50 μ l/spot添加し、10分間室温にて振とうした後200 μ l/spotの超純水で2分間、2回洗浄を行った。さらに0.1M sodium acetate, pH 4を50 μ l/spot添加し、10分間室温にて振とうした後200 μ l/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150 μ l/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10 μ lを結合・洗浄バッファー

90 μ l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150 μ l/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200 μ l/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1 μ l/spot添加・風乾させた。この操作を2回繰り返した。

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

測定データ取得はProteinChip 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-7 ProteinChipシステムによるデータ解析

データ解析はProteinChip 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、質量数校正に用いたタンパク質は以下の通りであった。(表1)

表1 分子質量校正用標準品

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）。（表2）

表2 測定条件

	ProteinChip 測定条件	前処理 Fraction	EAM	解析領域	検出ピーク数
1	CM4_Fr1	Fraction1	SPA	m/z2500-10000	58
2	CM4_Fr1	Fraction1	SPA	m/z10000-200000	156
3	CM4_Fr2	Fraction2	SPA	m/z2500-10000	60
4	CM4_Fr2	Fraction2	SPA	m/z10000-200000	148
5	CM4_Fr3	Fraction3	SPA	m/z2500-10000	70
6	CM4_Fr3	Fraction3	SPA	m/z10000-200000	70
7	CM4_Fr4	Fraction4	SPA	m/z2500-10000	68
8	CM4_Fr4	Fraction4	SPA	m/z10000-200000	110
9	CM7_Fr1	Fraction1	SPA	m/z2500-10000	85
10	CM7_Fr1	Fraction1	SPA	m/z10000-200000	198
11	CM7_Fr2	Fraction2	SPA	m/z2500-10000	62
12	CM7_Fr2	Fraction2	SPA	m/z10000-200000	156
13	CM7_Fr3	Fraction3	SPA	m/z2500-10000	47
14	CM7_Fr3	Fraction3	SPA	m/z10000-200000	67
15	CM7_Fr4	Fraction4	SPA	m/z2500-10000	58
16	CM7_Fr4	Fraction4	SPA	m/z10000-200000	121
17	IMAC_Fr1	Fraction1	SPA	m/z2500-10000	70
18	IMAC_Fr1	Fraction1	SPA	m/z10000-200000	184
19	IMAC_Fr2	Fraction2	SPA	m/z2500-10000	73
20	IMAC_Fr2	Fraction2	SPA	m/z10000-200000	119
21	IMAC_Fr3	Fraction3	SPA	m/z2500-10000	63

22	IMAC_Fr3	Fraction3	SPA	m/z10000-200000	81
23	IMAC_Fr4	Fraction4	SPA	m/z2500-10000	73
24	IMAC_Fr4	Fraction4	SPA	m/z10000-200000	115

B-8 ProteinChip システムによるバイオマーカー候補の抽出

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。

Permutation 検定

各タイムポイント (d0, d3, OP, OP35) における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。

また経時変化に関しては、各群において以下の 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。

d0 から d3 の変化量：d0_3

d0 から OP の変化量：d0_OP

d3 から OP の変化量：d3_OP

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。

バイオマーカー候補の経時変動パターン解析

Permutation 検定に基づき、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：全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：全てのタイムポイントで優位差を観察

B-9 昨年度の解析結果とのマーカー候補比較再現性

昨年度のバイオマーカー候補絞り込み

昨年度の ProteinChip システムによる術前ホルモン療法 Letrozole 奏効群、非奏効群でのバイオマーカー候補の探索は、検出