

ィーが守られるもの

4) 修正や確認が容易にできるものなどである。

1については、タッチパネルの端末を使い、すべて画面に触れるだけで入力できるようにした。また、基本的に1項目を1画面で入力できるようにし、内容の多いところでは複数の画面を用い、分けて入力できるようにした。2については上に述べた医療情報のカテゴリー化された内容を基本とし、数値もドロップダウンなどの機能を使用して選択できるようにし、キーボードなしで入力できるようにした。

3については患者が入力する端末とデータベースの本体があるサーバーとは切り離れた状態で入力を行い、患者は直接データベース本体にはアクセスできないようにし、他の患者情報の遺漏が起らないようにするつもりである。患者の入力する端末には該当する患者のみのデータベースを作って入力を行い、それをデータベースへ転送する方法で、医療情報をデータベース本体に取り込むようにする。そして、患者の使用した端末から患者情報が転送された後は端末に患者情報が残らないようにして、患者の医療情報の遺漏を防ぐことにしている。

4については、各画面で修正、前画面に戻ることができるようにし、また、入力終了後は、入力内容をリストにしてプリントアウトし、確認ができるようにするとともに患者控えとして患者に渡す予定である。これらの基本的な考えのもとに患者の入力システムを構築中である。

#### D 考察

これまでの原発性乳癌の集学的治療アル

ゴリズムの構築と意思決定過程の定式化の研究は、retrospective にデータベース化されている過去のデータをもとに解析してきたが、欠損データも多く、採用する項目をデータの比較的揃っているものに絞り込まざるを得なかった。また、それぞれの項目は予め定められた基準に従ってその内容を判断したものではないので、判断の幅が相当あると考えられる。実際、今回作成したデータベースに既存のデータベースからの医療情報を取り込んでみると、多くの欠損データがあり、また、項目の内容も異なるため、それを今回作成したデータベースの内容に転換しないと分析できないことが明らかになった。

#### E 結論

この研究をさらに進めるためには、患者の医療情報について項目を絞り込み、内容について予め判断基準を定めた上で、prospective に情報を収集していく必要がある。今回の検討により、データベースの構築と患者入力システムを用いて、適切で正確な医療情報を収集することの重要性が示された。

## 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

ホルモン陽性Stage II, IIIA, 閉経後乳癌に対するエキセメスタン24週間術前治療の有用性の検討に関する研究

分担研究者 古田 榮敬 (財)がん集学的治療研究財団

研究要旨：(財)がん集学的治療研究財団で実施しているJFMC34-0601「ホルモン陽性Stage II, IIIA, 閉経後乳癌に対するエキセメスタン24週間術前治療の有用性の検討（臨床第II相試験）」の付随研究として、エキセメスタンによる術前ホルモン療法で得られる腫瘍内および血清中の蛋白質およびペプチド発現変化を解析し、腫瘍縮小効果と長期予後改善効果の予測を目指した分子マーカーを同定する。

## A. 研究目的

ホルモン陽性Stage II, IIIA, 閉経後乳癌を対象にしたアロマターゼ阻害剤による術前ホルモン療法の臨床的効果（腫瘍縮小・長期予後改善）、組織学的効果の予測を目指した分子マーカーの同定を主目的とする。副次目的としてアロマターゼ阻害剤による副作用発現と相関する血清中分子マーカーの同定およびアロマターゼ阻害剤の腫瘍組織中、血清中作用メカニズムを解明する。

## B. 研究方法

対象となる症例は、(財)がん集学的治療研究財団で実施する多施設共同研究JFMC34-0601「ホルモン陽性Stage II, IIIA, 閉経後乳癌に対するエキセメスタン24週間術前治療の有用性の検討（臨床第II相試験）」に参加する症例で、腫瘍組織の一部と血液の提供が可能であり、本研究への参加に文書で同意している症例である。

エキセメスタン24週間術前治療の前後に針生検により腫瘍組織を採取し、パラフィン包埋標本およびRNAlater処理後凍結組織、未処理凍結組織とする。エキセメスタン投与開始前および4週後、12週後、24週後に血清を採取する。

パラフィン包埋標本は薄切後免疫染色をし、細胞増殖や細胞死に関するマーカー、細胞の走化性や遊

走能に関するマーカー、ホルモンや膜受容体関連因子の発現状況などを解析する。

RNAlater処理後凍結組織を用いてミトコンドリアDNA量やmiRNAなどを解析する。

未処理凍結組織を用いて細胞内ATP量、リン酸化プロテオミクスを解析する。

血清を用いて細胞死に関するマーカー、血管新生に関するマーカーなどの解析を行う。

## (倫理面への配慮)

本研究における遺伝子発現解析は、RNAを調べるため「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」の対象ではない。しかしその趣旨を踏まえたうえでの対応を行い、検体の提供者及びその家族への不利益を最小限に留めるよう配慮する。

本研究は(財)がん集学的治療研究財団の倫理委員会に承認されており、対象患者に対して十分な説明を行った後、書面にて同意を得ている。

検体提供者個人の識別に繋がる情報は取得せず、対象患者は登録番号で特定し、第三者が直接その患者を識別できないよう十分配慮する。

## C. 研究成果

JFMC34-0601には全国から37施設が研究参加し、116症例が登録され、2008年12月末で症例集積を終

了した。JFMC34-0601の付随研究である本研究には15施設から74症例が登録された。2009年8月をもって全症例手術が実施され、エキセメスタン24週間術前治療の効果判定を実施した。

#### D. 考察

JFMC34-0601は症例集積期間1年で110症例を集積する予定であったが、研究参加施設での倫理委員会等審査に時間がかかり登録開始が出遅れ、1年10か月の集積期間で116症例を集積し、付随研究に74症例（付随研究同意取得率63.8%）集積することができた。

本研究では臨床試験の精度向上と迅速性を担保する目的で、プロジェクト・コーディネーティングシステム(P.C.S.)を導入している。可能な施設では実務担当医師を事務的側面から補佐する施設データマネージャー(施設DM)を配置し、中央事務局とリアルタイムで交信し、データの精度向上に努め、臨床試験の質の向上を図っている。本研究の解析対象の腫瘍サンプルや血清の集積においても施設DMが貢献しているが、的確な検体採取や保管のためには看護師や臨床検査技師などのコメディカルとの協力体制が不可欠であり、今後更なる臨床試験サポート体制の拡充が求められる。

本研究により腫瘍縮小効果と長期予後改善効果のそれぞれと相関する分子マーカーが同定でき、ホルモン療法の長期予後改善効果予測システム確立に繋がれば、医療経済上や副作用回避を含めた患者利益の点で大きな変化をもたらすことができる。

#### E. 結論

ホルモン陽性Stage II, IIIA, 閉経後乳癌を対象にした、アロマターゼ阻害剤による術前ホルモン療法の臨床効果、組織学的効果の予測を目指した分子マーカー同定に関する研究を実施した。

科学性および倫理性を十分に配慮しながら、臨床病理学的マーカーや分子生物学的マーカーの検索を進める。

#### F. 研究発表

特になし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

原発性乳癌の集学的治療における意思決定過程の定式化  
研究年度終了報告書

分担研究者 富田 勝 慶應義塾大学環境情報学部 教授  
分担研究者 内藤 泰宏 慶應義塾大学環境情報学部 准教授  
研究協力者 高田 正泰 京都大学医学部付属病院 乳腺外科 医員  
研究協力者 杉本 昌弘 慶應義塾大学先端生命科学研究所 助教

## 1. 研究目的

乳癌は集学的治療法の進展によって治療成績が向上し、現在、代表的な「治る癌」の一つと言えるが、診断から治療の各段階で多領域の知識・技術を駆使しなければならないため、適切な診断と治療を行うための意思決定過程は複雑なものとなっている。また、現在一般に行われている診療の標準化は、過剰治療による個人への負担増加だけでなく、医療経済的観点においても非効率化を引き起こす可能性もあるため、患者ごとに必要量のみを診療を提供する新しい診療アルゴリズムの開発が必要である。このためには、バイオマーカー等で得られる情報だけでなく、画像診断の詳細な診断結果や、家族歴など診療の意思決定を行うまでに入手可能な情報を最大限利用して判断を行う方法論の確立が必要となる。このような方法の開発には、従来行われてきた意思決定過程を客観的な指標で定式化し、解析する必要がある。このような定式化ができれば、従来の診療ガイドラインには記載されないような詳細な診療情報の関係を顕在化し、どの変数がどの診療に重要かを知ることができる。また、患者個人ごとに診療の最適化や、必要度の低い診療変数の提示など様々な解析を行うことが可能となる。また、知識の共有・医療の均てん化

にも貢献することができる。同時に、侵襲度の高い検査や治療の効果を、それらの施行に先だって非侵襲に得られる情報で予測可能であれば、治療方針の意思決定を行う際に補助的に活用することも可能である。

そこで、本研究の目的は、従来行われてきた乳癌診療の意思決定の過程を数理モデルを用いて定式化し、従来の統計解析では明確に捉えることができない変数の依存関係を明示化するなど、詳細な関係の可視化を試みる。また、侵襲性が高い診断や治療効果の予測を、実際の診断や治療を行う前までに入手可能な情報から予測する数理モデルを開発することである。

## 2. 研究成果

### 2.1. データベースの構築

本研究に必要な診療情報として、過去に行われた意思決定の根拠と結果（診療、治療の選択と結果）の収集が必要となる。本研究で扱うデータは、本来の研究目的から収集すべき変数は、例えばカテゴリーといった形で集約化されたものではなく、カテゴリーを決定する際に使用した素要素を用いる方が望ましい。しかし、1症例あたりの変数の数が多くなるため、診療の分岐があまりにも複雑であれば、数理モデルを学習する上で十分な症

例数を集めることができず、十分信頼のできる変数の関係が得られない懸念も出てくる。このため、診療方針が比較的岐の少ない術前療法を対象を絞り、データの収集を行った。

具体的に収集した変数としては、年齢・既往歴・家族歴などの身体的基本情報や病歴、多発・腫瘍部位・形状・サイズ、*delle*・*dimpling*・乳頭牽引などの視診・触診所見、超音波・マンモグラフィ(MMG)の画像所見、コアノードル生検などによる、組織型・ER・PgR・HER2・nuclear gradeなどの病理組織学的所見、術前センチネルリンパ節生検の結果の値が含まれる。また、手術の形式、選択した術前療法(術前化学療法、術前ホルモン療法など)と手術後に得られる病理診断結果も収集した。CEAとCE15-3の血中マーカーは、検査時期や頻度が患者によって異なるため、以降の解析からは除外した。

都立駒込病院から273症例、国立病院大阪医療センターから42症例を収集することができた。得られた変数の内、定性的なものは全て数値化(グレード化)を行った。データベース化を行った結果、収集できた変数の特徴として、

1. 同じ項目を別の検査・診察方法で収集しているため、相関の高いものも含まれる。
2. 欠損値が多い。

の2点があげられる。欠損値は、家族歴など患者ごとに情報収集のバラつきがあるために起きることよりも、低侵襲な検査で診断がついたため、侵襲性の高い検査での診断が行われていないために起きている。しかし、欠損値がないような変数だけを対象とするとカテゴリーのような抽象度の高い変数を対象とするだけか、症例数を大幅に減らす必要がある。このため、変数間の依存関係から可

能なものは補完処理を行った。それでも多くが欠損値であるため、そもそも欠損値を包含しても精度高く予測できるモデル化の方法を選択する必要がある。

## 2.2.意思決定定式化、および診断・治療効果予測モデルの方法

予測モデルの選択として、変数間の非線形な関係も抽出するにはニューラルネットワーク(ANN)や、精度だけを考慮した場合、サポートベクターマシン(SVM)などが考えられる。しかし、これらはいわゆる Black Box 型のモデルで構築したモデルの内部構造を解釈することが難しい。一方、C4.5のような決定木のモデルは解釈が容易であり、意思決定の定式化・可視化が目的の本研究には適しているようであるが、予測精度が低いことと、欠損値があった場合予測ができない問題がある。予測精度の向上と欠損値の対策として、C4.5の決定木を多数発生させて、集合和による予測を行う ensemble という方法が一般的に行われるが、可解釈性を失うというトレードオフの関係にある。このため、可解釈性を保ちつつ、欠損値への対応も可能な ADTree を予測モデルとして採用することにした。

また、ADTreeはそのモデル自身学習過程で変数を選択する機能を持つが、変数に欠損値やノイズがあるため、モデルの学習前に予測すべき変数に関係の低い変数がある程度除去する方が、予測精度と汎化能力(評価データなど学習に使わなかった未知のデータに対する予測精度)も高くなるのが一般的である。ただし変数を除去しすぎると、ADTreeへ入力できる変数が減り、十分な変数間の関係を調べることができない。また、

もともとデータ中には変数間の相関が高いものが含まれているため、相関関係の高い変数があっても安定に変数選択ができる SVM-FS(サポート・ベクター・マシン変数選択)を用いて変数に重要度のランク付けを行い、ランクの高い変数の集合体を ADTree の入力変数として扱う組み合わせにて学習モデルを作成する方法を開発した。

## 2.3. 学習モデルによる予測結果

### 2.1.3 診断結果の予測

開発した方法を用い、術前療法の診療の設計において、意思決定に重要な以下の検査結果の予測を行った。

- リンパ節転移の予測
- リンパ管侵襲の予測
- 静脈侵襲の予測

センチネルリンパ節は、センチネルリンパ節生検の結果、またはリンパ節郭清を実施した症例の転移の有無をそれぞれセンチネルリンパ節生検、または手術前までに得られる情報から予測した。リンパ管侵襲と静脈侵襲は手術後の病理診断を手術前までに入手な情報から予測した。リンパ節転移では、SVM-FS で全変数から 30 変数を一旦選択し、その中から ADTree によって 17 変数を選択し、転移の有無を予測するモデルとして学習データを全て用いた場合 ROC 曲線以下の面積が 0.95、評価データでは 0.85 と高い予測精度と汎化能力を示した。モデルに含まれる変数としては皮膚所見の delle/dimpling、組織型、MMG の石灰化分布、US の腫瘍 halo と最大径が常に影響変数として関係しており、例えば MMG 石灰化分布が乳頭に及ばない場合は PgR の影響があるなど、変数間の依存関係を明確に表すことができた。学習

したツリーは、単に依存関係だけでなく、それぞれの変数の重み付けも定量的に含んでいる。また、ANN、SVM、Logistic 回帰など他の手法と精度を比較して、提案する手法が最も汎化能力が高いことも示した。(詳細は平成 20 年度研究報告書に記載)

### 2.1.3 術前化学療法治療効果の予測

術前化学療法に関しては、同様の方法で奏効群と非奏効群の予測を行ったが、本手法は予測変数として 2 値を取るもののみ適応可能である。化学療法のように連続的に治療を行い、投与量に変化を与えることができるような治療であるので、本来縮小率を正確に予測することができれば、将来的に個人ごとに最適な投与量を提示できるツールになり得る。そこで、術前化学療法アンスラサイクリン系(FEC)に続きドセタキセル(DOC)を投与された患者に対して、化学療法を開始する前までに入手可能な情報から腫瘍縮小率の効果予測を行った。

腫瘍縮小率の予測モデルには重回帰分析を用いたが、変数選択には、相関関係のない独立最少の変数の組み合わせを探し、かつ検索時に欠損値にも対応できるように、CFS (Correlation-based Feature Selection)に、大域的最適化の手法である遺伝的アルゴリズム(GA: Genetic Algorithm)を組み合わせた方法(CFS+GA)で選択した。都立駒込病院の 36 症例にて相関係数 0.59、国立病院大阪医療センターの 55 症例にて相関係数 0.67 で予測することができた。それぞれのモデルには、ER、PgR、nuclear grade、組織型だけでなく、リンパ門の有無や微細石灰化の有無など MMG や超音波での画像所見、また身体所見でのリンパ節の硬度などを含んだ。

ADTree で選択された変数との比較などを行い、学習したモデル全般的に類似した変数が選択されることも確認できた。(詳細は平成 19 年度、20 年度研究報告書に記載)

#### 2.1.4 治療方針選択の予測

過去に駒込病院にて行われた治療方針で術前化学療法／手術先行の選択を予測する ADTree も学習し構築を試みた。予測モデルには、組織が他、PgR などとともに、家族歴、超音波での halo、前方境界線の所見などが含まれた。本モデルに関しては、クロスバリデーションを行っても ROC 曲線以下の面積が 0.95 と極めて高い予測精度・汎化能力を示した。また、各検査項目を欠損した場合の予測精度の変化をシミュレートし、各変数の重要度の感度解析などを行った。(詳細は平成 19 年度研究報告書に記載) このようにモデル構築後は変数の重要度や検査項目を欠如時の予測精度の変化を測定し、単純な変数間の相関係数だけでは関連が低いと出てくる項目でも冗長性の評価などを行うことができる。

### 3. 研究結果に関する考察と今後の展望

本研究では、術前療法に焦点を絞り、診療の意思決定に大きく関与するリンパ節の転移、術前化学療法の効果など予測するためのモデルの構築を行ってきた。NeoAdjuvant Online のような術前療法の効果に関して数パラメータを用いて予測するもの、センチネルリンパ節生検が陽性の症例で非センチネルリンパ節の転移の有無を予測するものが類似研究として多い。これらは影響因子が予測すべき変数に直接的な関連がなければ得られず、変数間の依存関係など本研究の成果

のような複雑なものは得ることができない。

手法そのものとしては、研究開始時、従来のデータマイニング手法を適応し、精度の比較検証を行ったが、期待される精度を得ることができなかった。臨床情報特有の欠損率の高いデータ、相関関係にある変数群を適切に処理できる必要がある。また、研究目的であるモデルの可解釈性も維持するために、モデルの複雑度を上げずに高精度な予測を行う手法の開発が必要であった。SVM-FS による変数選択と ADtree を組み合わせることでこれらを実現化し、高精度な予測を達成することができた。

また、提案するような手法でのモデルの開発で汎化能力を確保して信頼できる結果を得るためには、従来の統計解析よりも 1 症例あたり多くの変数を扱うため、より多くの症例を必要とする。本研究において最も時間的なボトルネックとなったのは、データベースの構築であったため、今後別の診療データで学習を行ったり、大規模に評価試験を行ったりする場合は、電子カルテシステムと連動したデータ収集のシステム化、またはデータ入力を支援するユーザインターフェースの開発が必要となる。特に新しいバイオマーカーや診療方法の導入に対しても常に最新のデータをキャッチアップしてアルゴリズムを自動更新してゆけるようなシステムを構築することで、アルゴリズムそのものも動的な環境の変化に対応可能となり、また地域ごとのローカライズなども可能となる。

本研究では、術前療法の侵襲性の高い検査結果を、検査を行う以前の非侵襲的な情報で予測するモデルの開発を行った。今後は、前述のシステム構築によって大規模試験の実施と共に、より信頼性の高いアルゴリズムに発

展させて行く。また、再発症例や微小浸潤症例など、他の診療の意思決定の可視化にも適用し、予測適応範囲の拡大も行き、より実用化に近づけて行く。

#### 研究発表

##### 論文発表

1. Sato S, Arita M, Soga T, Nishioka T, Tomita M., Time-resolved metabolomics reveals metabolic modulation in rice foliage. *BMC Syst Biol.* 2008;2:51.
2. Shinoda K, Tomita M, Ishihama Y., Aligning LC peaks by converting gradient retention times to retention index of peptides in proteomic experiments. *Bioinformatics.* 2008;24(14):1590-5.
3. Ohno H, Naito Y, Nakajima H, Tomita M., Construction of a biological tissue model based on a single-cell model: a computer simulation of metabolic heterogeneity in the liver lobule. *Artif Life.* 2008;14(1): 3-28.
4. Shinoda K, Sugimoto M, Tomita M, Ishihama Y., Informatics for peptide retention properties in proteomic LC-MS. *Proteomics.* 2008;8(4):787-98.
5. 内藤泰宏, 細胞・組織シミュレーションの現状 薬効・毒性の予測にむけて *ファルマシア*, 44(9), 885-889, 2008

#### 知的所有権の取得状況

特になし

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

患者数が増加傾向にある原発性乳癌について病態・治療効果・予後を診断予測できることは大きな乳癌治療への前進となる。最近のタンパク質研究等の進歩に伴い、こうした診断予測を可能にするバイオマーカーの開発が可能になってきた。これを臨床の場に応用できれば、患者にとっても身体的・精神的・経済的に有用となる。

本研究では1. ホルモン療法応答性、2. 非浸潤性乳癌のバイオマーカーとして臨床利用可能な血清タンパク質を、プロテオミクス手法を駆使して探索する。

A. 研究目的

A-1 乳癌治療におけるバイオマーカーの必要性

乳癌の治療成績の向上は新しい診断・治療概念や手法の開発、世界規模での治療の標準化によりもたらされてきた。特に、原発性乳癌では局所療法、全身療法を組み合わせる集学的治療によって術後再発リスクの大きな減少に寄与している。一方、集学的な治療の標準化は過剰な治療にも偏りやすく、治療に伴う余分な毒性の軽減、医療の効率性、経済性という観点から集学化と同時に患者個々のレベルにおける至適な治療法の選択、治療の個別化の推進が必要と考えられている。このような治療の個別化は科学的・臨床的な根拠のもとに行われる必要がある。

現在乳癌について個別の治療を施す指標となっている例が、その発現によって腫瘍増殖における女性ホルモンの依存性を反映する腫瘍内エストロゲン受容体（ER）であり、また予後不良を反映する腫瘍の増殖能と密接に関連するHER2遺伝子である。

しかし乳癌が本質的に有する多様性はこれらの因子のみで捉えることが困難でありさらに複数のマーカーを用いることにより、さらなる個別化対応を推進できるはずである。

また既存の治療に対してその効果を予測できることや効果を上げうる個人を特定できることは患者、医療者を問わず大きな利益となる。

本研究は、多くの情報を含み、病態を経時的に観測しやすい血清を解析材料として、プロテオミクスの技術を駆使して実施した。

A-2 ホルモン療法応答性に関するバイオマーカーの探索

原発性乳癌においては約60~70%がERを発現しており、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る2年から10年以上に及ぶ治療を手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の同定には有用であるが、応答例の同定に関しては必ずしも有用でない。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マーカー、或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-3 非浸潤性乳癌に関するバイオマーカーの探索

浸潤性乳癌は局所療法単独での治療が期待できる癌であり、早期発見の意義はきわめて高い。全乳癌に占める非浸潤性乳癌の割合は、マンモグラフィ検査等が普及している欧米では20%前後、わが国では10%前後と言われる。

わが国においても今後、非浸潤性乳癌の発見増加が見込まれているが、非浸潤性乳癌の多くは腫瘍非触知であり現行の画像診断検査等ではスクリーニング適正

に関して限界があることが知られている。従って、非浸潤性乳癌の新しい検出法を開発する試みが活発化している。非浸潤性乳癌に関するバイオマーカーの探索は原発性乳癌の治療アルゴリズムを改善してゆく上で極めて重要である。

## B 研究方法

### B-1 ホルモン療法応答性に関するバイオマーカーの探索

#### B-1-1 対象

術前ホルモン療法臨床試験 CAAN スタディにおけるアロマターゼ阻害剤術前投与患者より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。

術前ホルモン療法前、ホルモン療法開始後 3 日、術前ホルモン療法終了時（治療開始後約 12 週）、手術終了後 8～9 週の血清試料を使用。

- ・ Letrozole 治療群血清 13 例 50% 奏効で群分けし奏効 6 例、非奏効 7 例
- ・ Exemestane 治療群血清 9 例 50% 奏効で群分けし奏効 5 例、非奏効 4 例

#### B-1-2 サンプル測定

適正な採取・保存を行った血清サンプルを用いて Urea 変性後、ペプチド、タンパクの PI 値による性質を利用した陰イオン交換樹脂での分離を 4 段階で行ったものを陽イオン交換プロテインチップ [CM10]（結合・洗浄条件 pH4、pH7）、金属イオン（銅イオン）修飾チップ [IMAC30] に添加した。エネルギー吸収分子として SPA（シナピン酸）を添加した。

ProteinChip リーダーを使用してタンパク質やペプチドの質量数と相対発現量について飛行時間型質量分析計測定を行った。

#### B-1-3 データ解析

データ解析は Protein Chip Data Manager version 3.0 を用いて行った。質量数校正、イオン計測正規化処理を測定条件毎に実施し、同一の正規化処理を行ったデータ群間で比較解析を実施した。

#### B-1-4 バイオマーカー候補の抽出

解析対象はシグナルノイズ比 (S/N) > 2.5 以上のピークとし、Permutation 検定、ロジスティック回帰分析、経時変動パターン解析により総合的にまた特異性により判断、抽出した。

#### B-1-5 二年に亘る解析結果でのマーカー候補比較再現性

Letrozole 治療群血清 13 例 と Exemestane 治療群血清 9 例での重複マーカー候補を対象に分析を実施する。

Permutation 検定 ( $p < 0.05$ ) で絞り込まれたピークを変動パターンによる分類で特徴づけ、これを基に候補選択を行った。

経時変動パターンは薬剤投与前 (d0)、投与 3 日後 (d3)、手術前 (op)、術後 35 日 (op35) のそれぞれの時点で 0 (2 群間に有意差なし) と 1 (2 群間に有意差あり) で表現する。

・ 薬剤投与前には有意差がなく、投与直後から奏効群-非奏効群間の有意差が手術時まで持続するパターン (0110、0111)：治療の効果を判定する指標になるマーカーの候補。

・ 薬剤投与前に有意差があり、手術時には有意差がなくなるパターン。(1000、1001)：治療の奏効性を予測する指標になるマーカーの候補。

・ 薬剤投与前に有意差があり、投与後手術時まで有意差が持続するパターン。(1110、1111)：治療の奏効性を予測し同時に効果の判定も行えるマーカーの候補。

2006 年度の候補ピーク (Letrozole 治療群血清より得られたもの) に対して、2007 年度の解析結果 (Exemestane 治療群血清より得られたもの) 中に近似分子量 (m/z) がのピークが 29 個あり、この中から①類似の変動パターンを示すもの、②分子量の近似性、によってマーカー候補を 3 つまで絞った。

第一候補 m/z 9713  
Letrozole における変動パターン 1000  
Exemestane における変動パターン 1011

第二候補 m/z 26517  
Letrozole における変動パターン 1001  
Exemestane における変動パターン 1000

第三候補 m/z 3252

Letrozole における変動パターン 0110  
Exemestane における変動パターン 0010

上記第一候補の精製・同定を試みる。

#### B-1-6 マーカー候補の精製

陽イオン交換樹脂を想定した CM10 プロテインチップと、陰イオン交換樹脂を想定した Q10 プロテインチップへの吸着条件がイオン交換樹脂への吸着条件を、また塩濃度によるプロテインチップからの溶出条件がイオン交換樹脂からの溶出条件をシミュレーションできることを利用して、精製条件を検討した。本シミュレーション結果に基づき目的のピークの相対量が多いサンプル血清を使用し、目的のピークができるだけ多く残り、別のペプチド、タンパク質が除かれるよう精製を進めた。さらに Tricine-SDS PAGE を行いゲル上に目的タンパクを分離した。

#### B-1-7 マーカー候補の同定

Tricine-SDS-PAGE によって分離された目的ピーク分子量付近のゲル中に目的ピークのタンパクが含まれているかどうかを、ゲルからタンパク質を抽出後に、プロテインチップで確認した上で、同部分のゲルを LC-MS/MS 解析して同定を試みた。目的のピークが含まれたゲル部分を Trypsin 消化し LC-MS/MS 装置によって測定解析した。断片化されたペプチドは、アミノ酸の配列によって固有の組み合わせ（分子量）を持つことから多くの消化断片データを解析ソフトに入力することでゲル中に存在するペプチド、タンパク質名称候補が推定できる。タンパクは精製後も単離はできていないこと、プロテインチップシステムで確認できない（イオン化されない）ペプチド、タンパク質を含むこと、分解されたタンパク質断片が存在すること、これらの理由から、目的のピークタンパクを推定するために、精製等で得られたピークの性質条件[分子量、等電点 (PI)、親水性、疎水性]等によって選択した。

### B-2 非浸潤性乳癌に関するバイオマーカーの探索

#### B-2-1 対象

非浸潤性の乳癌と診断された治療前の患者でインフォームドコンセントが得ら

れた 20 例の血清 (b 群)、対象群として浸潤性乳癌血清 18 例 (a 群)、良性乳腺疾患血清 10 例 (c 群)。

治療前 1 ヶ月以内 (T1)、治療 (手術) 後 3 週間 (T2)、治療 (手術) 後 3 ヶ月 (T3) の 3 ポイントでの採血を行った。

#### B-2-2 サンプル測定

適正な採取・保存を行った血清サンプルを用いて Urea 変性後、ペプチド、タンパク質の PI 値による性質を利用した陰イオン交換樹脂での分離を 4 段階で行ったものを陽イオン交換プロテインチップ [CM10] (結合・洗浄条件 pH4)、逆相プロテインチップ [H50] (結合・洗浄条件 pH7)、金属イオン修飾プロテインチップ [IMAC30] (銅イオン) に添加した。エネルギー吸収分子として CM10、IMAC30 には SPA (シナピン酸) を H50 には CHCA を添加した。ProteinChip リーダーによりタンパク質やペプチドの質量数と相対発現量について飛行時間型質量分析計測定を行った。

#### B-2-3 データ解析

データ解析は Protein Chip Data Manager version 3.0 を用いて行った。質量数校正、イオン計測正規化処理を測定条件毎に実施し、同一の正規化処理を行ったデータ群間で比較解析を実施した。

#### B-2-4 バイオマーカー候補の抽出

解析対象はシグナル・ノイズ比 (S/N) > 2.5 以上のピークとし、Permutation 検定、ロジスティック回帰分析、経時変動パターン解析により総合的にまた特異性により判断し抽出した。経時変動パターンは、治療前 1 ヶ月以内、治療 (手術) 後 3 週間、治療 (手術) 後 3 ヶ月をそれぞれ 0 (各 2 群間に有意差なし) と 1 (各 2 群間に有意差あり) で表現する。マーカーとして有用なパターンとして以下が考えられる。

- ・ 治療 (手術切除) 前に有意差があり治療後有意差のなくなるパターン (100、110) : 診断のマーカーとなり得る。
- ・ 治療 (手術切除) 前に有意差がなく治療後有意差が出るパターン (011) : 治療効果判定のマーカーとなり得る。

これらを考慮に入れマーカー候補を 3 つに絞った

第一候補 m/z10250 (変動パターン 100)  
 第二候補 m/z4643 (変動パターン 110)  
 第三候補 m/z4658 (変動パターン 110)

第一候補の m/z10250 ピークの抽出、同定を行った。

#### B-2-5 マーカー候補の精製

特異的に目的ピークの高い患者血清を用いて競合するペプチド、タンパク質をできるだけ取り除く。

Serum 50  $\mu$ l

↓

Agilent カラムを用いて高含有量タンパク質除去

↓

Q spin column

↓ (pH9 Buffer でスルー)

Tricine-SDS-PAGE 16.5%

#### B-2-6 マーカー候補の同定

Tricine-SDS-PAGE によって分離された目的ピーク分子量付近のゲル中に目的ピークのタンパク質が含まれているかを、ゲルからタンパク質を抽出し、プロテインチップで確認した上で、同部分のゲルを LC-MS/MS 解析して同定を試みた。目的のピークが含まれたゲルを Trypsin 消化し LC-MS/MS 装置で解析した。断片化されたペプチドはアミノ酸の配列によって固有の組み合わせ (分子量) を持つことから、消化断片データを解析ソフト (UniProt/SwissProt) に入力することでゲル中に存在するペプチド、タンパク質名称候補が推定できる。

タンパク質は精製後も単離はできていないこと、プロテインチップシステムで確認できない (イオン化されない) ペプチド、タンパク質を含むこと、分解されたタンパク質断片が存在すること、これらの理由から、目的のピークタンパクを推定するために、精製等で得られたピークの性質 [分子量、等電点 (PI)、親水性、疎水性] 等によって選択した。

#### B-3 倫理面への配慮

本研究に使用した患者血清は全て患者本人の研究使用への承諾を受けたものであり、別の目的での使用は行わない。また患者の個人識別ができないよう検体番号の暗号等の配慮を行った。

### 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 精製ピークの Exemestane 治療群血清 9 例の m/z9713 についてのデータ分布

奏効群 (E)、非奏効群 (U) と時間経過薬剤投与前 (d0)、投与 3 日後 (d3)、手術前 (op)、術後 35 日 (op35)

変動パターン 1 0 1 1 : 治療の奏効性を予測する指標になるマーカーの候補となる。

奏効群として振り分けた 92 番のサンプルは奏効群のはずれ値となっているが、奏効率は 50% でありカットオフのボーダーラインとなっているので、非奏効群としての扱いの適応も考えられる。(図 1) (図 2)

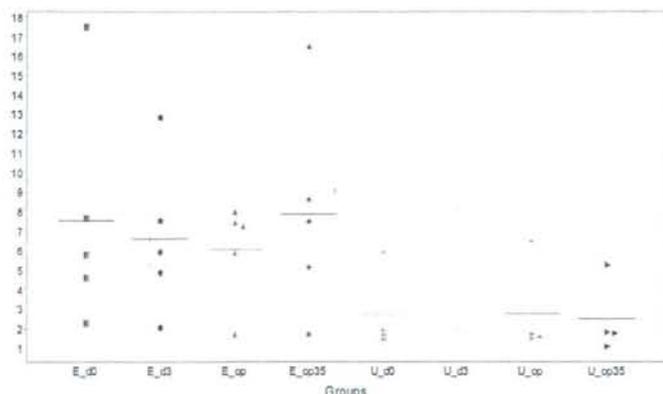
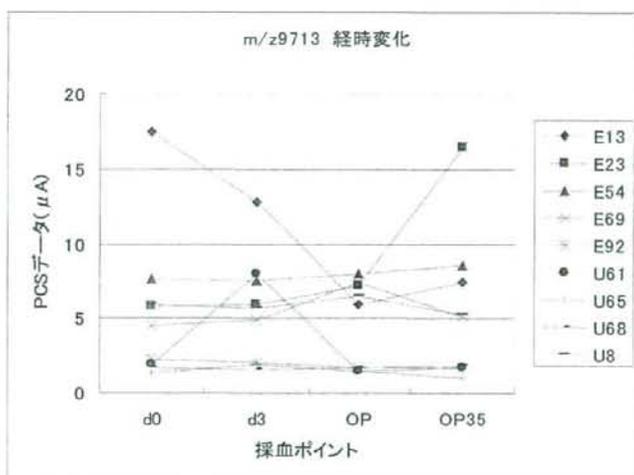


図 1. Exemestane 術前補助療法患者血清の ProteinChip リーダー測定経時変化効果群別分布 m/z9713



E: 奏効群 U: 非奏効群

図2. Exemestane 術前補助療法患者血清のProteinChipリーダー測定経時変化 m/z9713

C-1-2 精製過程

血清からQ スピンカラム (陰イオン交換) で有機溶媒画分に溶出したものをHPLCのC4 カラムでさらに分離した。  
Q カラム精製後 COSMOSIL でフラクシオン分離した。

C-1-3 同定

ゲルをプロテアーゼ消化し LC-MS/MS 解析により得られたペプチド、タンパク質の候補から目的分子名を推定した。

条件
同定した領域が m/z 9740 以下のもの
血清にあるもの
m/z 9742 付近にあるもの (内部補正)
プロセッシングによって m/z がマッチするもの

表1. LC-MS 結果より目的ピークの同定条件1

以上のような選択作業の結果、候補として13のタンパク質が選択された。現在抗体を使用して同定を進めている。

C-2 非浸潤性乳癌に関するバイオマーカーの探索

C-2-1 精製ピークの3群における経時変化分布

a 群: 浸潤性乳癌 T1: 治療前1ヶ月以内

浸潤性乳癌群と非浸潤性乳癌群、良性乳腺疾患群を完全に区別するバイオマーカー候補ピークは抽出されなかったが有意差のある特徴的なピーク (m/z10250) をマーカー候補として特定した。浸潤性乳癌群のデータ分布は限局された範囲に留まるが、非浸潤性乳癌群、良性乳腺疾患群では優位に高値のデータが散見され (図3)、また手術で患部を切除した後に低値に移行する挙動を示した。(図4)

b 群：非浸潤性乳癌 T2：治療（手術）後 3 週間  
 c 群：良性乳腺疾患 T3：治療（手術）後 3 ヶ月

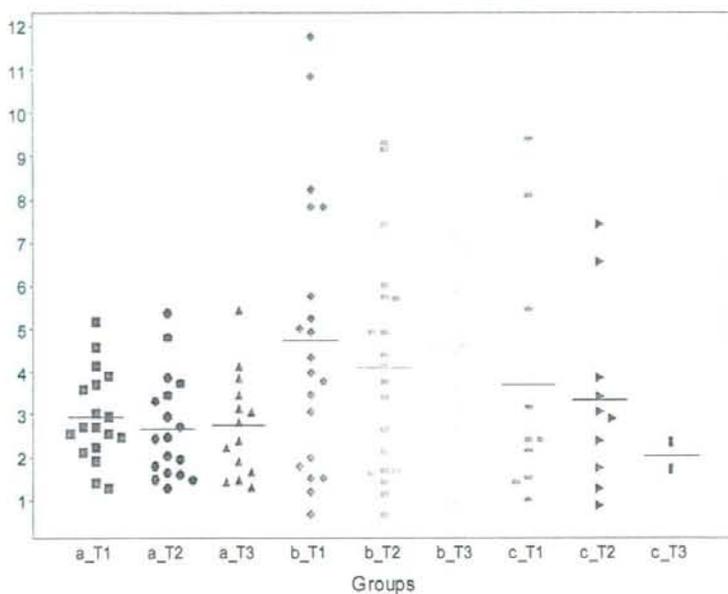
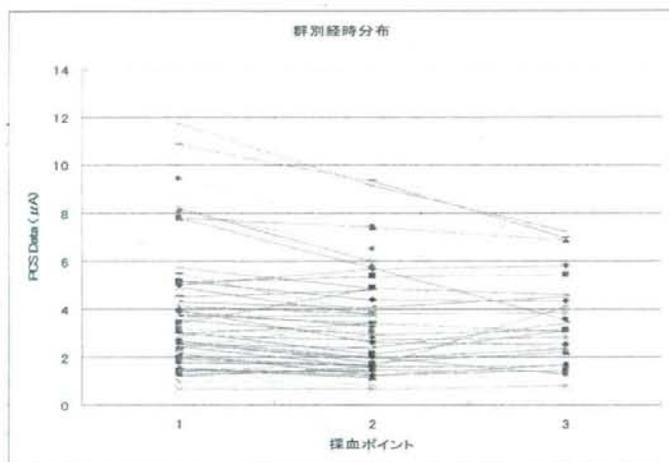


図3. 非浸潤性乳癌患者血清の ProteinChip リーダー測定経時変化効果群別分布  $m/z10250$



a：浸潤性乳癌 b：非浸潤性乳癌 c：良性乳腺疾患

図4. 浸潤、非浸潤群別の ProteinChip リーダー測定経時変化  $m/z10250$

### C-2-2 精製過程

目的ピークを多く含有する患者血清を精製サンプルとして精製ステップを実行した。

Agilent カラムを用いて高含有量タンパクを除去した後、濃縮し、Urea 変性を行った。

Q spin column 精製において pH9 Buffer で吸着しなかったか画分を再び濃縮し、Tricine-SDS-PAGE (ゲル濃度 16.5%) でゲル上に分離した。

泳動ゲルにバックグラウンドが白く染ま

る Negative Gel Stain を施し、染色されない部分を切り出した。切り出した部分に目的のタンパクが含まれていることを ProteinChip リーダーによる測定で確認した。

### C-2-3 同定

切り出した Tricine-SDS-PAGE ゲルを、Trypsin 消化を行った後、LC-MS/MS 解析した。

条件
同定した領域が $m/z$ 10250 以下のもの
PI 値が 8 以上のもの
複数のバンドで同定されたタンパク質数
A と B に共に検出されたタンパク質
A または B で MS/MS で同定領域が二つ以上あるもの
上の条件で A と B に検出されたもの

表 2. LC-MS 結果より目的ピークの同定条件 2

以上の検討により、非浸潤性乳癌群と浸潤性乳癌群に有意差を示すバイオマーカー候補として 7 つのタンパク質が選択された。

現在免疫抗体実験によって同定作業を進めている。

Goncalves らは、アジュバント化学療法を受けたハイリスク原発乳がん患者のがん転移予測に有効な血清タンパク質のプロファイルを報告している (Goncalves et. al., Oncogene (2006) 25, 981-989)。本報告では、血清中のタンパク質発現パターンを ProteinChip SELDI システムで解析し、がん転移患者群と非転移患者群との間で発現量が異なる 40 種類のタンパク質 (バイオマーカー候補) を抽出した。これら 40 種類のタンパク質の発現プロファイルを多変量解析 (Partial Least-Squares 法と Logistic Regression Model) し、がん転移群と非転移群を効率的に識別するマルチタンパク質識別パネル (Multiprotein-based Classification) を構築、本パネルで 2 群に区別された原発乳がん患者の 5 年生存率 (94% vs. 49%) および非転移 5 年生存率 (84% vs. 22%) に有意差を見出した。

本研究では、Goncalves らが探索した 40 種類のバイオマーカー候補のうち、16 種類については、本研究期間で同一のタンパク質を抽出できた可能性が高いと考えている。さらに、2008 年度に実施した検証用研究により、 $m/z$  9713 のバイオマーカー候補が抽出された。

したがって、本バイオマーカー候補 ( $m/z$  9713) は、初年度の探索研究、次年度の検証用研究、および Goncalves らの研究の、独立した 3 種類の研究により、乳がんとの関連性が確認されたバイオマーカー候補である。さらに、本バイオマーカー候補は、Goncalves らの報告では同定されておらず、本分子がどのようなタンパク質 (あるいはタンパク質の分解物等) であるのかを明らかにすることは、当該分子と乳がんとの関連性を検討する上で価値が高い。

今後は、本バイオマーカー候補の精製同定を完結させるとともに、本年度の検証用研究で再現性が確認された複数のバイオマーカー候補による奏功性予測パネルの構築を推進したい。

非浸潤性原発性乳癌に関するバイオマーカーの探索についても、今後、同定された

タンパクを用いて検証試験を行い早期の発見・治療に寄与していきたい。

この際、他の検査値とバイオマーカーの関連性が研究できれば、米国での非浸潤性癌の全乳癌に対する20%の発生率とわが国における10%の発生率との差の間に非浸潤性癌からの病態の進行を関連付けることができる可能性も含んでいる。

サンプル数の少なさに起因する不安定性は依然存在しており、同定されたタンパクを臨床診断等で応用してゆくためには、試験検体を多数用いた検証(バリデーション)が必要になる。本研究の到達目的となっている治療意思決定のためのアルゴリズム構築に組み込むことができるバイオマーカー開発のために、構築中のアルゴリズムにバイオマーカー候補を組み込んだ演算を行い、逆の検証を行う可能性も視野に入れて研究を行うことが必要である。

#### D. 健康危険情報 特になし

#### E. 研究発表 論文発表

1: Kuroi K, Shimozuma K, Ohashi Y, Hisamatsu K, Masuda N, Takeuchi A, Aranishi T, Morita S, Ohsumi S, Hausheer FH. Prospective assessment of chemotherapy-induced peripheral neuropathy due to weekly paclitaxel in patients with advanced or metastatic breast cancer (CSP-HOR 02 study). Support Care Cancer. 2008 Dec 17. [Epub ahead of print]

2: Kuroi K, Shimozuma K, Ohashi Y, Takeuchi A, Aranishi T, Morita S, Ohsumi S, Watanabe T, Bain S, Hausheer FH. A questionnaire survey of physicians' perspectives regarding the assessment of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in patients with breast cancer. Jpn J Clin Oncol. 2008 Nov;38(11):748-54.

3: Saji S, Kuroi K.  
Application of selective estrogen receptor modulators for breast cancer treatment according to their intrinsic nature. Breast Cancer. 2008;15(4):262-9.

4: Masuda N, Toi M, Takatsuka Y, Nakamura S, Iwata H, Ohno S, Kuroi K, Kusama M, Hisamatsu K, Yamazaki K, Eisei S, Sato Y, Kaise H, Kashiwaba M, Iwase H, Kurosumi M, Tsuda H, Akiyama F; Japan Breast Cancer Research Group. [Results of survey conducted on perioperative chemotherapy and supportive care in primary breast cancer (JBCRG01)] 癌と化学療法. 2007 Oct;34(10):1609-15. Japanese.

5: Toi M, Nakamura S, Kuroi K, Iwata H, Ohno S, Masuda N, Kusama M, Yamazaki K, Hisamatsu K, Sato Y, Kashiwaba M, Kaise H, Kurosumi M, Tsuda H, Akiyama F, Ohashi Y, Takatsuka Y; Japan Breast Cancer Research Group (JBCRG). Phase II study of preoperative sequential FEC and docetaxel predicts of pathological response and disease free survival. Breast Cancer Res Treat. 2008 Aug;110(3):531-9.

6: Ono M, Imai H, Kuroi K, Ohsumi S, Shimozuma K. Quality of Japanese health care evaluated as hospital functions. Breast Cancer. 2007;14(1):88-91.

7: Imai H, Kuroi K, Ohsumi S, Ono M, Shimozuma K. Economic evaluation of the prevention and treatment of breast cancer—present status and open issues. Breast Cancer. 2007;14(1):81-7.

8: Kuroi K, Shimozuma K, Ohsumi S, Imai H, Ono M. Current status of health outcome assessment of medical treatment in breast cancer. Breast Cancer. 2007;14(1):74-80.

9: Ohsumi S, Shimozuma K, Kuroi K, Ono M, Imai H. Quality of life of breast cancer patients and types of surgery for breast cancer—current status and unresolved issues. Breast Cancer. 2007;14(1):66-73.

10: Shimozuma K, Imai H, Kuroi K, Ohsumi S, Ono M. Recent topics of health outcomes research in oncology.

Breast Cancer. 2007;14(1):60-5.

11: Kuroi K, Toi M  
Diagnostic and prognostic molecular  
markers in breast cancer  
Clinical Application of Molecular

Diagnosis in Cancer, Radiation  
Effect, and Human Diseases, 2009

F. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

研究協力者

石濱 泰 慶応義塾大学先端生命科学研究所 准教授

佐治 重衡 都立駒込病院臨床試験科・外科医長

有賀 智之 都立駒込病院外科

高田 正泰 京都大学医学部附属病院乳腺外科

関根 進 都立駒込病院外科

関根 勝枝 都立駒込病院外科

廣瀬 真紀子 都立駒込病院外科

非浸潤性乳管癌における性ステロイドホルモン局所濃度および合成／代謝酵素の発現に関する研究

分担研究者 笹野 公伸 東北大学病理診断学 教授  
研究協力者 渋谷 里絵 東北大学病理診断学 大学院

研究要旨

性ステロイドはヒトの浸潤性乳管癌(IDC; invasive ductal carcinoma)の発育で重要な役割をしている事が知られている。しかし、IDCの先駆病変ともされている非浸潤性乳管癌(DCIS; ductal carcinoma in situ)における性ステロイドの生物学的／臨床的な意義に関してはまだ不明瞭な部分が多く残っており、これにはDCIS組織内の性ステロイド濃度の検索がまったくなされていない事も一因となっている。そこで今回の研究では、私はまずDCIS内のestradiolと5 $\alpha$ -dihydrotestosterone (DHT)の濃度をliquid chromatography / electrospray tandem mass spectrometryにて測定した。

DCISの腫瘍内estradiolおよびDHT濃度はいずれも非腫瘍性の乳腺組織より3倍高値を呈しており、またエストロゲン産生酵素(aromatase, steroid sulfatase, 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1(17 $\beta$ HSD1))およびアンドロゲン産生酵素(17 $\beta$ HSD5, 5 $\alpha$ -reductase type 1(5 $\alpha$ Red1))ともにreal-time PCRおよび免疫組織化学的解析にてDCIS内で高い発現が認められた。腫瘍内のDHT濃度はDCISよりもIDCで有意に低く、癌細胞および腫瘍内間質細胞のaromatase mRNA発現はDCISよりもIDCの方で有意に高い値を示した。DCIS症例での性ステロイド産生酵素に対する免疫組織化学的検討では、5 $\alpha$ Red1の発現動態がKi-67 labeling indexおよびhistological gradeと正相関しており、再発のリスクの上昇とも正相関を示した。

以上今回の私の研究の結果、estradiolおよびDHTがDCIS組織内でも産生される事によって、これら性ステロイドのDCIS組織内濃度が増加する可能性が示唆された。従って、estradiolおよびDHTは浸潤癌同様にヒト乳癌DCIS病変の発達／進展にも重要な役割を果たしていると考えられる。

A. 研究目的

乳癌は女性の悪性新生物の中では世界的に最も発症頻度が高い癌の一つであり、本邦でもこの傾向は近年顕著に見られるようになってきている。特に最近の20年間で、集団検診などでマンモグラフィなどの画像診断を用いたスクリーニングが多くの人に対して行なわれるようになり、非浸潤性乳管癌(DCIS; ductal carcinoma in situ)と診断される患者数が著明に増えてきている。国際的に、現在では乳癌として見つかる患者の約20%をDCISが占めるようになってきている<sup>(1)(2)(3)</sup>。このDCISは浸潤性乳管癌(IDC; invasive ductal carcinoma)の先駆病変とも考えられており、DCISと診断された患者でIDCが発生する頻度は健康な女性の4~10倍と報告されている<sup>(4)(5)</sup>。従って、このように発生頻度が本邦でも顕著に増加しているDCISの臨床／生物学的動態を知る事が、乳癌の発生、発展を正しく理解するにあたり極めて重要である。

乳腺が性ステロイドの標的臓器であることはよく知られている。性ステロイドの中でも特にエストロゲンはIDCの発生／進展過程で極めて重要な役割を果たしており<sup>(6)</sup>、近年ではtamoxifenなどの抗エストロゲン剤やアロマターゼ阻害剤、luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH) agonistが腫瘍内のエストロゲン作用を遮断する目的で

患者に内分泌療法として広く処方されてきている。DCISにおいても大部分の症例では性ステロイドレセプター(estrogen(ER), progesterone(PR), androgen(AR) receptors)が発現していることは従来からよく知られており<sup>(7)(8)(9)(10)(11)</sup>、DCISでも多くのIDC症例と同様に性ステロイドホルモンが何らかの生物学的役割を果たしている事が想定される。実際にthe National Surgical Adjuvant Breast Project (NSABP) P-1 trialにてtamoxifenが非浸潤性乳癌のリスクを50%下げると報告されており<sup>(12)</sup>、NSABP B-24 trialではadjuvant tamoxifen therapyがER陽性のDCISに臨床的効果があり非浸潤性の再発率を27%下げると報告もされている<sup>(13)</sup>。このようにエストロゲン作用を遮断するとDCISの発生は明らかに低下する事が種々のデータから明らかになりだして来ており、乳癌の化学的予防に関する重要な裏付けデータのの一つとなっている。

ところで、生物学的に活性を持つエストロゲンであるestradiolの濃度は形態的に正常な乳腺組織よりもIDC内で優位に高くなっており<sup>(14)</sup>、estradiolは血中を循環している不活性ステロイドから種々のエストロゲン産生酵素によってIDC組織内で“intracrine機構”により局所合成されると考えられている(図1参照)<sup>(15)</sup>。

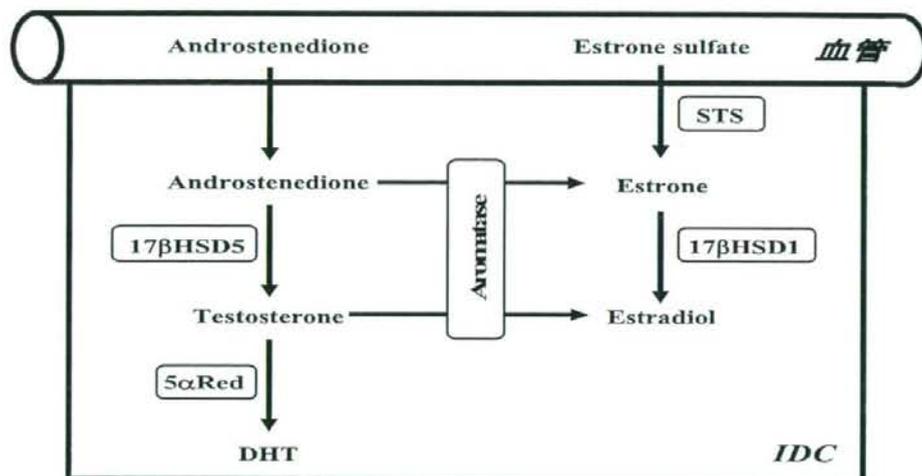


図1. ヒト浸潤性乳管癌(IDC)における性ステロイドの腫瘍内局所合成の概要。STS; steroid sulfatase, 17βHSD1; 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1, 17βHSD5; 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 and 5αRed1; 5α-reductase

このIntracrine機構は、血液中のエストロゲン濃度が顕著に低下する閉経期以降の婦人でエストロゲン依存性の乳癌がより多く発生してくる事実に対する大きな理由の一つであり、このIntracrine機構に基づき開発され投与されるアロマターゼ阻害剤は閉経期以降のエストロゲン依存性の乳癌における現在もっとも有効な内分泌療法となっている。このIntracrine機構を理解するには、乳癌組織の中でどのようなエストロゲン合成/代謝酵素が発現し、病変内でエストロゲンがどのように産生されどのように代謝されるのかという事を理解するのが極めて重要になる。DCISでもaromataseおよび17βHSD1の免疫学的な局在は既に報告されており<sup>16)17)18)</sup>、IDC同様に性ステロイドが局所合成されている可能性が強く示唆されている。しかし、実際にエストロゲン合成/代謝酵素が発現しているのかどうかが知る事が極めて重要であるのだが、DCISにおいてはこの局所性ステロイド濃

度を測定した研究は未だになく、IDC同様に本当に組織内でエストロゲン濃度が亢進しているのかどうかは未だ不明である。すなわちこれらDCIS病変内で発現している種々の合成/代謝酵素には本当に意義があるのかどうかは今までよく知られてこなかった。更にDCISにおけるアンドロゲン合成酵素の発現に関する情報も未だ得られてはいない。DCISにおける性ステロイドの臨床的・生物学的動態に関して得られる情報は現在非常に限られており、IDCに比べて不明瞭な部分が多く残されている。今回の研究で、私はまずDCISにおけるestradiolおよびDHTの腫瘍内濃度と性ステロイド産生酵素の発現を検索し、それらの結果を非腫瘍性の乳腺組織やIDCと比較検討した。さらに、性ステロイド産生酵素の免疫学的な局在と臨床病理学的な因子との関連を83件の純粋なDCIS症例にて検討し、性ステロイドのDCISにおける意義に関して更に検討を加えた。

## B. 研究方法

### B-I 患者・組織 (表1 参照)

東北大学病院および東北公済病院にて2001-2004年の間に外科的切除された女性の乳腺組織よりDCIS12症例、IDC12症例を選択した。また、total mastectomyを受けたIDC12件中8件より、非腫瘍性の乳腺組織を得た。これらの組織において一部をステロイド抽出およびRNA分離用にsnap frozen・-80°Cで保存し、また免疫組織化学検索用に一部を10%ホルマリン固定・パラフィン包埋処理した。病理組織の悪性度分類に関しては、DCISはthe Van Nuys classification<sup>19)</sup>、IDCはElston & Ellis変法<sup>20)</sup>にて評価した。東北大学病院および東北公済病院いずれの症例においても、研究目的での使用に際して患者の同意を得た。

また、免疫組織化学用に1990-2005年の間に東北大学学病院にて外科的切除されたpure DCIS検体を83件使用した。これらの患者の平均年齢は57.0歳(30-80)で、いずれも術前に放射線化学療法やホルモン療法は受けていなかった。この内78件にて術後経過データが得られ、そのフォローアップ期間は平均54ヶ月(8-117月)であった。いずれの検体にも10%ホルマリン固定およびパラフィン包埋処理を行った。

以上の全ての症例・検体の使用に関して、倫理委員会の承認を受けた(東北大学: 受付番号2005-178, 2005-68/東北公済病院: 平成17年8月5日承認)。

表1. 症例の背景

永久標本のpure-DCIS検体(83件)	外科的切除されたDCIS検体(12件)
年齢* (年)	57.0 (30-80)
閉経	56.0 (42-72)
閉経前	27
閉経後	56
Van Nuys classification	
Group 1	27
Group 2	40
Group 3	16

\*: LI中央値(min-max(%))をMann-Whitney's U testにて解析。

### B-II Liquid chromatography / electrospray tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

DHTおよびestradiolの濃度測定をLC-MS/MS解析(Teizo Medical Co. Kawasaki, Japan)にて行った。乳癌組織(それぞれ32-89mg)を1mlの蒸留水で均質化し、

100pgのEstradiol-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>(Hayashi Junyaku, Tokyo, Japan)ないしDHT-<sup>3</sup>H<sub>3</sub>(CDN Isotope, Quebec, Canada)を加えた後、diethyl etherにてhomogenateよりステロイドを抽出した。分離した有機層を蒸発させた後、それらをpicolinic anhydrideを入れたtetrahydrofuran (THF)溶液100 μlとtriethylamine20 μlの混合液に溶解し、Bond Elut C<sub>18</sub> columnに入れ、80%acetonitrile溶液でステロイド誘導体を溶出した。そして誘導されたDHTおよびestradiolをLC溶媒(Agilent 1100, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)に溶解した。

LCとAPI 4000 triple-stage quadrupole mass spectrometer(Applied Biosystems, Ontario, Canada)を組み合わせ、electrospray ionizationで陽イオン化し、Cadenza CD-C<sub>18</sub> column(3X150mm, 3.5 μm, Imtakt, Kyoto, Japan)にてクロマトグラフィ分離した。注入量は20 μlで、mobile phaseは溶剤A(0.1%ギ酸)およびB(acetonitrile)を使用して0.4ml/minで導出し、total run timeは10分とした。初期段階ではA&B割合(30:70)を使用し、注入後は100%B溶剤に4分で直線的に変化させていき、3分間維持(0.05分で初期の割合に戻り、2.95分間維持)した。貯留時間はestradiolでは5.3分、DHTでは5.8分、イオン化環境は4.5kV、450°Cとした。

estradiolおよびDHTの最少検出量はともに0.2pgであり、変動係数は20%を越えなかった。

### B-III Real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)

TRIzol試薬(InVivoGen Life Technologies, Inc.)にてtotal RNAを抽出し、reverse transcription kit (SUPERScript II Preamplification system (Gibco-BRL))にてcDNA合成を行った。Real-time PCRのmRNA発現レベルの半定量にはLight Cycler System (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)を使用した(primer sequenceはそれぞれ表2を参照)。温度環境に関しては、初期変性95°C10分、増幅サイクル40回を95°Cで10秒、annealingにはそれぞれ60°C(17βHSD1)、64°C(17βHSD5, STS)、68°C(aromatase, 5αRed type1(5αRed1), 5αRed2, ribosomal protein L13a (RPL13A))で10秒とし、elongationを72°C12秒とした。ステロイド産生酵素のmRNAレベルは、RPL13Aの割合(%)と同様にまとめた。

表2. real-time PCR解析におけるprimer sequencesのまとめ

cDNA (Gene symbol; Accession no.)	Sequence (Position in cDNA)	Size (bp)	参照
Aromatase* (Aromatase; X13589)	FWD: 691-712, REV: 786-806	116	
STS* (STS; M16505)	FWD: 1,550-1,569, REV: 1,683-1,702	153	
17βHSD1* (HSD17B1; NM000413)	FWD: 1,300-1,321, REV: 1,604-1,625	326	
17βHSD5* (AKR1C3; NM003739)	FWD: 969-992, REV: 1,052-1,071	103	
5αRed1* (SRD5A1; NM001047)	FWD: 658-677, REV: 796-815	158	
5αRed2 (SRD5A2; NM000348)	FWD: 500-520, REV: 794-814	315	Suzuki <sup>42)</sup>
RPL13A (RPL13A; NM012423)	FWD: 487-509, REV: 588-612	125	Vandesompele <sup>41)</sup>

\*: Oligonucleotide primers used in this study were designed in the different exons.