

)  
F2  
(5'-AAAGCTAGCTAAAGAACGTGGTCAGAGTAG-3')

CYP19A1 Reverse primers

R1

(5'AAACTCGAGGTTAAATCTCTCAGGTAAGT-3')

R2

(5'-AAACTCGAGCTCTGACCACGTTCTTTACTG-3')

構築されたオリゴヌクレオチドは pmirGLO Dual-luciferase miR Target Expression Vector の XhoI 及び NheI 切断領域に挿入した。作製したベクターの塩基配列をシーケンシングにより確認した。

Let-7f 5nM または scramble siRNA 5nM (Genolution Pharmaceuticals) と pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector (Promega) 5ng を Lipofectamine 2000 1  $\mu$ l (Invitrogen) を用い、24 穴培養細胞プレートに  $2 \times 10^4$  cells/ml に調整した MCF-7 に同時トランスフェクションした。標的配列を含むベクター pGL-V1 と pGL-V2 はそれぞれプライマー F2 と R1 (92 塩基), F1 と R2 (1164 塩基) にて作製し、標的配列を含まない pGL-V3 はプライマー F1 と R2 (1100 塩基) を用いて作成した。24 時間のトランスフェクション後に Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて、ルシフェラーゼアッセイを行った。ホタルルシフェラーゼ発現はコントロールレポーターとして機能するウミシイタケルシフェラーゼに対する比率として計算した。

#### 細胞増殖試験

24 穴の培養用プレートに培養した MCF-7 細胞に、let-7f (5nM, 10nM, 50nM) をトランスフェクションした。トランスフェクションの 0, 24, 48, 72 時間後に WST-8 colorimetric assay (Cell Counting Kit-8; 同人化学研究所、熊本) を用いて、let-7f の細胞増殖に及ぼす影響を評価した。455nm 及び 650nm における吸光度 (optical density: OD) をマイクロプレートリーダー (Model 680, Bio-Rad Laboratories, CA, USA) を用いて計測し、(OD 455nm-OD650nm) を各値とした。

#### 細胞遊走能 (Migration) アッセイ

細胞の遊走能を modified wound healing assay を用いて評価した。24 穴培養用プレートに ibidi Culture-Insert (ibidi, Martinsried, Germany) を挿入し、MCF-7 を培養し、その後 Culture-Insert を取り外すことで人工的に幅 500  $\mu$ m の細胞空白領域 Cell free gap (CF gap) を作製した。空白領域に遊走した細胞を顕微鏡で観察し、デジタルカメラにて撮影後、得られた画像を用いて CF gap を計測した。

#### 統計解析

統計解析には Stat View software (Stat View-J 5.0, SAS Institute Inc. NC, USA) を用いた。細胞増殖試験、qRT-PCR、PCR Assay は Bonferroni / Dunn の多重比較検定によって解析した。P 値が 0.05 未満のものを有意差ありと判断した。

#### (倫理面への配慮)

本研究は東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会 (No. 2009-203, 2010-509)、香港大学倫理委員会 (HK1821-02)、東北公済病院倫理委員会 (No. H17. 8. 5) の承認を受けている。

#### C. 研究結果

##### 1) 共培養及びアロマターゼ阻害剤投与に伴う aromatase mRNA の変動

共培養 MCF-7co では単独培養の MCF-7 に比して、aromatase mRNA 発現が有意に上昇した。一方、MCF-7co にレトロゾールを投与したところ、投与後の MCF-7co/le では aromatase mRNA 発現の減少が確認された ( $p < 0.05$ )。

##### 2) アロマターゼ阻害剤投与に伴う miRNA プロファイルの変動

AI 剤投与による aromatase の発現減少と miRNA との関連を検証するため、MCF-7co 及び MCF-7co/le を用いて癌関連 miRNA の PCR アレイ解析を行った。アレイの解析結果から、レトロゾール投与により 5 つの miRNA が発現減少、13 の miRNA が発現上昇することが示された。

##### 3) 乳癌組織及び乳癌細胞株におけるレトロゾール投与前後の let-7f 発現変動について

レトロゾール投与により変動した 18 の miRNA を前述の標的遺伝子予測プログラムを用いて、aromatase 遺伝子 (CYP19A1) を標的とする可能性について検討した結果、miRNA のうち唯一 let-7f の結合領域のみが CYP19A1 遺伝子の 3' 末端に存在することが示唆された。let-7 が腫瘍の増殖やエストロゲン制御機構に関与しているという既知の報告を踏まえ、以下 let-7f に着目して、実験を行った。MCF-7 における let-7f の発現を確認するため、let-7f に関する RT<sup>2</sup> miRNA qPCR assay を行った。ここでは、MCF-7co にレトロゾールを投与したところ、48 時間で MCF-7co/le における let-7f 発現が有意に上昇した ( $p < 0.05$ )。

乳癌組織における let-7f の発現の検討も同様に RT<sup>2</sup> miRNA qPCR assay を用いて行った。CAAN 臨床試験で術前レトロゾール投与を受けた 3 症例では、うち 2 症例において、投与前に比べ投与後の let-7f 発現

の著明な上昇を確認した。なお、エキセメスタン投与を受けた5症例についても同様の解析を行ったが、let-7fの有意な発現変動は検出されなかった。

#### 4) 乳癌組織における let-7f と aromatase の発現及びその関連について

術前療法を受けていない乳癌凍結切片において RT<sup>2</sup> miRNA qPCR assay を用いて let-7f 発現を測定し、aromatase mRNA の関連について検討した結果、aromatase mRNA と let-7f の発現間に逆相関関係 ( $Y=34.708-18.713 \cdot X; R^2=0.498, p=0.015$ ) が見られた。

乳癌 FFPE 組織を用いた実験では、LCM によって切り出した癌細胞成分の let-7f 発現を RT<sup>2</sup> miRNA qPCR assay により検討し、免疫組織化学で評価した aromatase のタンパクレベルとの相関を検討した。その結果 aromatase の染色強度が強い (TS が高い) ほど、let-7f 発現が有意に低いことが示された ( $p<0.05$ )。

#### 5) ルシフェラーゼアッセイによる let-7f の標的 CYP19A1 (aromatase) 遺伝子の検証

CYP19A1 における let-7f の結合領域の存在を検証するため、ルシフェラーゼアッセイを行った。Let-7f 結合領域を含む pGL-V1, pGL-V2 では let-7f トランスフェクションによりルシフェラーゼ活性が大幅に減少した ( $p<0.05$ )。一方、let-7f 結合配列を含まない pGL-V3 では let-7f トランスフェクション下でもルシフェラーゼ活性の有意な減少は認められなかった。この結果はクローニングした CYP19A1 内の let-7f 標的配列に、細胞内に導入した let-7f が結合したことを示しており、let-7f が CYP19A1 を直接制御していることの直接証拠であるといえる。

#### 6) 乳癌細胞の増殖及び遊走動態への let-7f の関与

Let-7f の発現が乳癌細胞の増殖に及ぼす影響を、乳癌細胞 MCF-7 を用いて検討した。

##### a. Let-7f トランスフェクションによる細胞増殖の変化

通常培地での培養条件下で let-7f を MCF-7 にトランスフェクションし、let-7f の濃度 5, 10, 50nM とネガティブコントロール scramble siRNA における生細胞数を比較し、let-7f が乳癌の細胞増殖能に及ぼす影響を検討した。その結果トランスフェクション 24 時間では let-7f 50nM、48 及び 72 時間では 5、10、50nM 全ての let-7f 濃度において、scramble siRNA と比較して、濃度依存性に let-7f の有意な細胞増殖抑制が観察された (24hr; scramble siRNA =  $0.615 \pm 0.057$ , let-7f 50nM =  $0.2313 \pm 0.027^*$ , 48hrs; scramble siRNA =  $1.109 \pm 0.096$ , let-7f 5nM =  $0.722$

$\pm 0.055^*$ , let-7f 10nM =  $0.286 \pm 0.019^*$ , let-7f 50nM =  $0.118 \pm 0.008^*$ , 72hrs; scramble siRNA =  $1.680 \pm 0.126$ , let-7f 5nM =  $0.599 \pm 0.166^*$ , let-7f 10nM =  $0.136 \pm 0.016$ , let-7f 50nM =  $0.099 \pm 0.011^*$ .  $*P<0.05$ )

##### b. Let-7f トランスフェクションによる細胞遊走能の変化

通常培地で MCF-7 に scramble siRNA 10nM もしくは let-7f 10nM をトランスフェクションし、その前後の CF gap の面積を比較することにより、let-7f が乳癌細胞の遊走能に及ぼす影響を検討した。その結果、scramble siRNA では 48 時間以降、CF gap 内に遊走してきた多数の MCF-7 細胞によってその領域はほぼ消失した一方で、let-7f トランスフェクション群では CF gap の変化はなく、コントロール群に比し 48 時間で 18.5%、72 時間で 29.6% の CF gap の拡大が認められた ( $p<0.05$ )。

以上から let-7f が乳癌細胞において強力な細胞増殖及び細胞遊走を抑制する作用を有することが証明された。

## D. 考察

### 1) アロマターゼ阻害剤に伴う aromatase mRNA の変動

Aromatase 酵素は腫瘍内及び脂肪組織内に存在することが示され、aromatase mRNA もまた腫瘍内におけるその存在が明らかにされている。しかしながら、その存在意義については不明な点が多い。2010 年に Miller らの研究グループは AI ネオアジュバント治療を受けた乳癌組織において aromatase mRNA が低下することを報告したが、その機序については明らかにされていない。既出論文に従って共培養法を用い、乳癌細胞株 MCF-7 に aromatase を誘導した。同論文同様、本実験でも MCF-7 において、共培養による aromatase mRNA の上昇が確認できた。次に、共培養した MCF-7 に対して、2 種類の AI 剤、レトロゾールをそれぞれ投与し、投与に伴う aromatase mRNA の発現変動を検討した。その結果、AI 剤によって aromatase mRNA が有意に低下することが見出された。本研究は乳癌細胞株において共培養下での AI 剤投与実験を行った初めての報告であり、この結果は上述の Miller らの *in vivo* 実験結果に合致し、また共培養によって *in vitro* の腫瘍 microenvironment が再現されたことを示すものでもあると考える。

### 2) アロマターゼ阻害剤に伴う miRNA プロファイルの変動

AI 剤と miRNA の関連性を検証した過去の報告では、2010 年に Masri らは miR-128a を阻害することによってレトロゾール耐性乳癌細胞株が TGF $\beta$  を介し、感受性を再獲得するという報告している。また、

同年 Maillot らの研究グループはエストロゲン制御 miRNA (miR-21, miR-181b, miR-26a, miR-26b, miR-27b, miR-23b) がタモキシフェン+エキセメスタン治療後乳癌組織において上昇することを発表した。しかしながら、乳癌組織、乳癌細胞株のいずれにおいても、AI 剤の単剤投与によって miRNA の発現変動を検証した報告は未だ無い。本研究では、AI 剤投与により複数の miRNA の発現が変動することを初めて明らかにした。また、変動した個々の miRNA に着目すると、miR-126, let-7 等の過去に乳癌抑制 miRNA として報告されている miRNA が発現上昇 (回復) していることがわかる。それらがもたらす意義については、個々の miRNA の標的遺伝子の変動などさらなる検証が必要ではあるものの、AI 剤が癌抑制 miRNA を制御している可能性が示唆された。

### 3) レトロゾールによる let-7f の発現回復

Let-7f は let-7 family の一メンバーであり、史上 2 番目に発見された miRNA group に属する。Let-7 family は 12 のメンバーから構成され、乳癌を含め多くの悪性腫瘍で発現低下が認められる代表的な腫瘍抑制 miRNA である。

Let-7 の発現が低下している種々の癌においては、let-7 は治療標的としての役割も期待されている。肺癌においては let-7 とその標的遺伝子 ras の発現は逆相関し、let-7 の導入により ras や HMGA2 の翻訳が抑制され、腫瘍の成長を阻害することが報告されている。乳癌ではマウスモデルにおいて let-7 の導入によって ras や HMGA2 の翻訳が抑制され、癌細胞の増殖、マンモスフィア形成、未分化な腫瘍細胞数を著明に阻害させることが報告され、乳癌においても let-7 の治療への応用が期待されている。本研究では *aromatase* 遺伝子における let-7f 標的サイトを 3' 末端側に導入したベクターを用いたルシフェラーゼアッセイを用いて検証し、*CYP19A1* における let-7f の直接結合領域を確認した。本研究では let-7f が *aromatase* 遺伝子を抑制的に制御していることを裏付けるために、さらに培養細胞と臨床検体を用いた検討を行った。乳癌細胞株において、let-7f の発現を上昇 (トランスフェクション) させることによって *aromatase* mRNA の発現が低下することを確認した。また、乳癌臨床検体を用いた検討では、let-7f と *aromatase* mRNA 及び蛋白が負の相関を示すことを確認した。

*Aromatase* mRNA の腫瘍内における意義については、Ellis らが 2009 年に報告している。Ellis らは乳癌組織における *aromatase* mRNA 発現と AI 剤への治療反応性に関連は見られないものの、長期的予後との間に相関関係が見られることを示した。本研究から得られた結果と関連付けると、let-7 が低下している癌、すなわち *aromatase* mRNA 発現が亢進している癌

では、let-7 を介した抗腫瘍作用を有する AI 剤によって let-7 が回復し、それが長期的予後の改善につながっている可能性が考えられた。

一方で、AI 剤の耐性に関わる興味深い知見を Garcia-Casado らの研究グループが 2010 年に発表している。その分子生物学的機序は不明としているものの、彼らによると *CYP19A1* 遺伝子の 3' 末端の多様性が乳癌の発生や AI 剤に対する治療反応性に関与しており、治療経過中後天的に生じた AI 剤耐性の症例においても、*CYP19A1* の 3' 末端の遺伝的多様性が見出される。本研究で得られた結果から、*CYP19A1* の 3' 末端には腫瘍抑制 miRNA である let-7f の結合領域が存在することは明らかであり、その結合領域に変異を来たすことによって let-7 が結合できなくなり、耐性を生じる等、臨床経過に異変を生じる可能性は十分考えられる。

### 4) アロマターゼ阻害剤の第 2 の作用

本研究で得られた結果からわれわれは、第 3 世代 AI 剤の閉経後 ER 陽性乳癌に対する作用機序には、全身並びに腫瘍内の *aromatase* 活性を阻害し、エストロゲンを抑制するという従来の作用に加えて、腫瘍抑制 miRNA である let-7 の発現回復によって ras や HMGA2 等の腫瘍促進遺伝子を阻害し、腫瘍抑制効果を発揮するという新たな第 2 の作用が存在する可能性があると考えられる。

## E. 結論

本研究において、アロマターゼ阻害剤による microRNA の変動についての解析を総合的に行った。以下に結論を示す。

○ アロマターゼ阻害剤投与により *aromatase* mRNA は低下する。

○ レトロゾール投与により乳癌細胞株及び乳癌組織において、癌抑制 miRNA let-7f が上昇 (回復) する。

○ 乳癌細胞株及び乳癌組織において、let-7f と *aromatase* の発現は負の相関関係を示す。

○ *Aromatase* 遺伝子の 3' 末端に let-7f の標的配列が存在する。

○ Let-7f は乳癌細胞において、強い細胞増殖及び遊走能抑制作用を有する。

miRNA は乳癌の分類、治療、予後因子、治療標的、腫瘍マーカーなどあらゆる面において着目されている。本研究の結果より、第 3 世代のアロマターゼ阻害剤には、エストロゲン生成の最終律速酵素 *aromatase* を阻害することで全身のエストロゲン活性を低下させるという従来の作用に加えて、miRNA の発現を調節することによる第 2 の作用 = 腫瘍抑制効果を有している可能性が示唆される。これらの結果はさらに、抗腫瘍剤としてのアロマターゼ阻害剤の新たな可能

性を予期させ、治療効果予測マーカーとしての let-7 の検証、let-7 を標的とした新たな治療法の開発の可能性を示すものと考えられた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Barh D, Malhotra R, Ravi B, et al: MicroRNA let-7: an emerging next-generation cancer therapeutic. *Curr Oncol* 2010;17:70-80

2. Ellis MJ, Miller WR, Tao Y, et al: Aromatase expression and outcomes in the P024 neoadjuvant endocrine therapy trial. *Breast Cancer Res Treat* 2009;116:371-378

3. Onodera Y, Miki Y, Suzuki T, Takagi K, Akahira JI, Sakyu T, Watanabe M, Inoue S, Ishida T, Ohuchi N, Sasano H.

Runx2 in human breast carcinoma: its potential roles in cancer progression.

*Cancer Sci.* 101:2670-2675, 2010 (原著)

4.

5. Miyashita M, Ishida T, Ishida K, Tamaki K, Amari M, Watanabe M, Ohuchi N, Sasano H.

Histopathological subclassification of triple negative breast cancer using prognostic scoring system: five variables as candidates.

*Virchows Arch*:458:65-72, 2011 (原著)

6. Kasajima A, Pavel M, Darb-Esfahani S, Noske A, Stenzinger A, Sasano H, Dietel M, Denkert C, Röcken C, Wiedenmann B, Weichert W.

mTOR expression and activity patterns in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours.

*Endocr Relat Cancer.* 18:181-192, 2011 (原著)

7. Miki Y, Abe K, Suzuki S, Suzuki T, Sasano H. Suppression of estrogen actions in human lung cancer.

*Mol Cell Endocrinol*;340(2):168-174. 2011 (総説)

8. Geisler J, Sasano H, Chen S, Purohit A.

Steroid Sulfatase Inhibitors: Promising New Tools for Breast Cancer Therapy?

*J Steroid Biochem Mol Biol.* May;125(1-2):39-45. 2011 (総説)

9. Verma MK, Miki Y, Sasano H.

Aromatase in human lung carcinoma.

*Steroids.* Jul;76(8):759-764. 2011 (総説)

10. Brown KA, McInnes KJ, Takagi K, Ono K, Hunger NI, Wang L, Sasano H, Simpson ER.

LKB1 expression is inhibited by estradiol-17 $\beta$  in MCF-7 cells.

*J Steroid Biochem Mol Biol*;127(3-5):439-443. 2011

(原著)

11. Fujishima F, Suzuki T, Nakamura Y, Taniyama Y, Ono K, Sugawara A, Miyazaki S, Moriya T, Sato A, Satomi S, Sasano H.

Retinoid receptors in human esophageal squamous cell carcinoma: Retinoid X receptor as a potent prognostic factor.

*Pathol Int.* 2011 Jul;61(7):401-408. 2011 (原著)

12. Chanplakorn N, Chanplakorn P, Suzuki T, Ono K, Wang L, Chan MS, Wing L, Yiu CC, Wing-Cheong Chow L, Sasano H.

Increased 5 $\alpha$ -Reductase Type 2 Expression in Human Breast Carcinoma following Aromatase Inhibitor Therapy: The Correlation with Decreased Tumor Cell Proliferation.

*Horm Cancer*;2(1):73-81. 2011 (原著)

13. Tamaki K, Ishida T, Miyashita M, Amari M, Ohuchi N, Tamaki N, Sasano H.

The correlation between mammographic findings and the corresponding histopathology: A potential predictors for biological characteristics of breast diseases.

*Cancer Sci*:102, 2179-2185. 2011 (原著)

14. Tamaki K, Ishida T, Miyashita M, Amari M, Ohuchi N, Tamaki N, Sasano H.

Correlation between mammographic findings and corresponding histopathology: Potential predictors for biological characteristics of breast diseases.

*Cancer Sci*;102(12):2179-2185. 2011 (原著)

15. Tamaki K, Ishida T, Miyashita M, Amari M, Mori N, Ohuchi N, Tamaki N, Sasano H.

Multidetector row helical computed tomography for invasive ductal carcinoma of the breast: Correlation between radiological findings and the corresponding biological characteristics of patients.

*Cancer Sci.* 2011 Oct 8. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02116.x. (原著)

16. Suzuki S, Takagi K, Miki Y, Onodera Y, Akahira JI, Ebata A, Ishida T, Watanabe M, Sasano H, Suzuki T.

Nucleobindin 2 in human breast carcinoma as a potent prognostic factor.

*Cancer Sci.* 2011 Oct 11. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02119. (原著)

17. Hiroki E, Suzuki F, Akahira JI, Nagase S, Ito K, Sugawara J, Miki Y, Suzuki T, Sasano H, Yaegashi N.

- MicroRNA-34b functions as a potential tumor suppressor in endometrial serous adenocarcinoma. *Int J Cancer*. 2011 Nov 2. doi: 10.1002/ijc. (原著)
18. Sakurai M, Miki Y, Masuda M, Hata S, Shibahara Y, Hirakawa H, Suzuki T, Sasano H. LIN28: A regulator of tumor-suppressing activity of let-7 microRNA in human breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011 Nov 3 (原著)
19. Tamaki K, Ishida T, Miyashita M, Amari M, Ohuchi N, Uehara K, Kamada Y, Tamaki N, Sasano H. Retrospective analysis of mammographic findings for Japanese women: A potential predictor for breast malignancies. *Cancer Sci*;103(3):472-476. 2012 (原著)
20. Iida S, Miki Y, Ono K, Akahira J, Nakamura Y, Suzuki T, Sasano H. Synergistic anti-tumor effects of RAD001 with MEK inhibitors in neuroendocrine tumors: A potential mechanism of therapeutic limitation of mTOR inhibitor. *Mol Cell Endocrinol*; Mar 5; 350(1): 99-106. 2012 (原著)
21. Tamaki K, Ishida T, Miyashita M, Amari M, Ohuchi N, Kamada Y, Uehara K, Tamaki N, Sasano H. Breast Ultrasonographic and Histopathological Characteristics Without Any Mammographic Abnormalities. *Jpn J Clin Oncol*;42(3):168-174. 2012 (原著)
22. Suzuki S, Takagi K, Miki Y, Onodera Y, Akahira J, Ebata A, Ishida T, Watanabe M, Sasano H, Suzuki T. Nucleobindin 2 (NUCB2) in human breast carcinoma as a potent prognostic factor. NUCB2 immunoreactivity was detected in the carcinoma cells of DCIS. *Cancer Sci*. 2012 Jan;103(1):Jancover. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02146.x. No abstract available. (原著)
23. Knowler KC, To SQ, Takagi K, Miki Y, Sasano H, Simpson ER, Clyne CD. Melatonin suppresses aromatase expression and activity in breast cancer associated fibroblasts. *Breast Cancer Res Treat*;132(2):765-71. Epub 2012 Jan 12. (原著)
24. Nagasaki S, Nakamura Y, Maekawa T, Akahira J, Miki Y, Suzuki T, Ishidoya S, Arai Y, Sasano H. Immunohistochemical analysis of gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) and possible regulation by estrogen receptor  $\beta$  in human prostate carcinoma. *Neoplasma*; 59(2): 224-232. 2012 (原著)
25. Miki Y, Ono K, Hata S, Suzuki T, Kumamoto H, Sasano H. The advantages of co-culture over mono cell culture in simulating in vivo environment. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2012 Jan 9. [Epub ahead of print] (原著)
26. Chan MS, Wang L, Chanplakorn N, Tamaki K, Ueno T, Toi M, Loo WT, Chow LW, Suzuki T, Sasano H. Effects of estrogen depletion on angiogenesis in estrogen-receptor-positive breast carcinoma--an immunohistochemical study of vasohibin-1 and CD31 with correlation to pathobiological response of the patients in neoadjuvant aromatase inhibitor therapy. *Expert Opin Ther Targets*. Suppl 1:S69-78. 2012 (原著)
27. Verma MK, Miki Y, Abe K, Niikawa H, Sasano H. Cytoplasmic estrogen receptor  $\beta$  as a potential marker in human non-small cell lung carcinoma. *Expert Opin Ther Targets*. Suppl 1:S91-102. 2012 (原著)
28. Sase T, Suzuki T, Miura K, Shiiba K, Sato I, Nakamura Y, Takagi K, Onodera Y, Miki Y, Watanabe M, Ishida K, Ohnuma S, Sasaki H, Sato R, Karasawa H, Shibata C, Unno M, Sasaki I, Sasano H. Runt-related transcription factor 2 in human colon carcinoma: A potent prognostic factor associated with estrogen receptor. *Int J Cancer*. 2012 Mar 7. doi: 10.1002/ijc.27525. [Epub ahead of print] (原著)
29. Shibahara Y, Miki Y, Onodera Y, Hata S, Chan MS, Yiu CC, Loo TY, Nakamura Y, Akahira JI, Ishida T, Abe K, Hirakawa H, Chow LW, Suzuki T, Ouchi N, Sasano H. Aromatase inhibitor treatment of breast cancer cells increases the expression of let-7f, a microRNA targeting CYP19A1. *J Pathol*. 2012 Mar 9. doi: 10.1002/path.4019. [Epub ahead of print] (原著)
30. Zuguchi M, Miki Y, Onodera Y, Fujishima F, Takeyama D, Okamoto H, Miyata G, Sato A, Satomi S, Sasano H. Estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2012 Mar 29. doi:

10.1111/j.1349-7006.2012.02288.x. [Epub ahead of print] (原著)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1) 特許取得

なし。

2) 実用新案登録

なし。

3) その他

## バイオマーカーや遺伝子解析を用いたホルモン受容体陽性乳がんに対する術前 内分泌療法の効果予測因子の検証

研究分担者

山城大泰 京都大学医学研究科・乳腺外科 非常勤講師

石黒 洋 京都大学医学部附属病院(探索医療センター検証部・外来化学療法部)改革推進講師

稲本 俊 天理よろづ相談所病院・乳腺外科嘱託部長

研究要旨 乳癌全体の約 60%を占めるホルモン受容体陽性手術可能乳癌患者は術後補助内分泌療法を受けるが、その効果予測は不十分である。内分泌療法の適応を適切に判断することは毒性軽減や医療費削減に寄与する。組織グレードや ki-67 陽性細胞率などのバイオマーカーと内分泌療法の効果を検討したところ経口化学療法を併用することで奏功率が向上することが

### A. 研究目的

薬物療法の内容を決定する際のガイドラインとして St.Gallen コンセンサス (2011)<sup>1)</sup>、NCCN(national Comprehensive Cancer Network)<sup>2)</sup>、乳がん診療ガイドライン(日本乳癌学会編<sup>3)</sup>)などがあるが乳癌に対する術前・術後の全身薬物療法の適応は十分に決定されているとは言えない。(表1,2)組織学的グレードについては全体の約 50%がグレード2に分類される上、ki-67 などの増殖指標は cut-point の定義が十分で、測定方法や判定基準も定められていない。

化学療法ではpCR(組織学的完全緩解)が得られた患者の予後が改善することが知られているが、ホルモン受容体陽性乳癌は pCR が得られにくく<sup>4)</sup>また高齢者に対して安全に施行するためにはどのような治療レジメンにすべきかは明らかになっていない。同時にホルモン受容体陽性乳癌に対するアロマターゼ阻害剤やタモキシフェンを用いた術前内分泌療法は低毒性で、化学療法に匹敵する腫瘍縮小効果が得られることが知られている。<sup>5)</sup>

近年化学療法における休薬期間を必要とする用量制限毒性を避けるために低用量の細胞障害性抗癌剤を頻回に投与する‘Metronomic chemotherapy’が注目されている。この治療は増殖速度の遅い内皮細胞に対して、低用量の細胞障害性抗癌剤を持続的に

等押して曝露させることにより、腫瘍の血管/脈管申請を阻害して間接的に腫瘍細胞を標的とする治療法である。この利用法では内皮細胞の増殖が特異的に阻害され、その内皮細胞は apoptosis をおこしやすくなることが報告されている。<sup>6)</sup>

本研究の目的はホルモン受容体陽性乳癌に対する内分泌療法、内分泌化学療法 (metronomic) の効果予測因子を検討することである。

### B. 研究方法

ホルモン受容体陽性(HR+)かつ HER2 陰性の手術可能乳癌(T<sub>1c-3</sub> N<sub>0</sub> M<sub>0</sub>(>1cm) / T<sub>1-3</sub> N<sub>1</sub> M<sub>0</sub>)に対する術前内分泌療法、経口化学療法剤を併用した術前内分泌化学療法の手術前後のバイオマーカーと、臨床病理学的な治療効果との関係を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、介入を行わない、既存試料を用いた後ろ向き観察研究で、疫学研究の倫理指針に沿って行った。

### C. 研究結果

2007年3月から2011年7月まで京都大学医学部附属病院乳腺外科で治療が行われた原発性手術可能乳癌のうち、術前内分泌療法あるいは内分泌化学療法を受け、手術後の病理組織検査が行われ治療効果及び

手術後のバイオマーカー探索結果が判明している50例について検討した。患者背景を表3に示す。

治療レジメと奏効率を表4に示す。ホルモン療法では奏効率 38%、内分泌化学療法では 76%で経口化学療法を奏効した方が奏効率が高かった。

超音波検査やMRI検査による臨床効果と病理組織学的治療効果の関係について図1に示す。臨床効果と、組織学的治療効果は有意に相関しており、特に内分泌化学療法の場合に相関関係が強かった。

治療前後のバイオマーカーの変化を図2、3、4、に示す。治療後にER、PgR、ki-67 labeling index は治療前より低下していた。ERの低下はホルモン療法単独で、PgRの低下はホルモン療法、内分泌化学療法の両者で、ki-67の低下は内分泌化学療法で有意であった。

組織学的治療効果とバイオマーカーの関係を表5に示す。先に示したように臨床効果と組織学的治療効果には相関が認められるが、MRIによる治療効果判定、特に腫瘍最長径の縮小率ではなく、腫瘍容量を3次元で定量化した volumetry での腫瘍容量低下率と組織学的治療効果は良く相関していた。治療後の ki-67 labeling index 及びその低下率は内分泌化学療法の治療効果と相関していた。

#### D. 考察

Luminalタイプ乳癌に対する術前内分泌療法単独で完全奏効を得た症例はなかった。経口化学療法を併用することで奏効率は増加する。

治療開始前に治療効果を予測する因子はなかったが、内分泌療法や内分泌療法+経口化学療法の組織学的治療効果と ki-67 labeling index、MRIによる volumetry は相関関係があり、これらを指標にしながら治療開始後に更に治療を継続するか、他の治療に変更するかなどを検討(tailoring)できる可能性がある。

#### E. 結論

術前内分泌療法の奏効率は高くないが、適切な指標を用いて tailoring できる可能性がある。生命予後との関連が今後の検討課題である。

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
なし。



表1 St Gallen コンセンサス 生物学的サブタイプの定義 (文献1より改変)

Intrinsic subtype	臨床病理学的特徴	特記事項
Luminal A	ER and/PgR 陽性 HER2 陰性 Ki-67 低値(<14%)	Ki-67 ラベリングインデックスの Cut-point は PAM50 intrinsic subtype に基づいて定められた。 Ki-67 染色実施機関による地域制度管理が重要である。
Luminal B (HER2 陰性)	ER and/PgR 陽性 HER2 陰性 Ki-67 高値	多遺伝子解析では、高増殖能を示す遺伝子は予後予測因子とはならない。信頼できる ki-67 の測定が不可能なら、Gradeなどを腫瘍増殖の代替指標として' Luminal A' と' Luminal B'を区別しても良い。
Luminal B (HER2 陽性)	ER and/PgR 陽性 HER2 過剰発現・増幅 Ki-67 低～高	内分泌療法および抗 HER2 療法の両方が適応となりうる
Erb-B2 過剰発現	HER 過剰発現・増幅 ER and PgR 陰性	
Basal like	Triple Negative (乳管癌) ER and PgR 陰性 HER2 陰性	Triple negative (TN)と Basal like の約80%が一致するが、TN は髄葉癌や遠隔再発リスクの低い腺様嚢胞癌などの特殊型の一部を含む。 真の Basal like の鑑別には基底細胞のケラチンを染色する方法があるが、これは一般的に使用するには再現性が乏しいと考えられる

表1 St. Gallen コンセンサス 薬物療法の適応基準 (文献1より改変)

サブタイプ	治療	特記事項
Luminal A	内分泌療法単独	ごく少数の患者で化学療法併用が必要 (リンパ節転移多数症例など)
Luminal B (HER2 陰性)	内分泌療法±化学療法	化学療法の適応と内容は、ホルモン受容体の発現レベル、再発リスク、そして患者の希望によって選択する
Luminal B (HER2 陽性)	化学療法+抗 HER2 療法+内分泌療法	この群で化学療法を省略できるというデータはない
Erb-B2 過剰発現	化学療法+抗 HER2 療法	非常に低リスク (例: n0/p T1a)の患者では全身療法を行わず経過観察も可能である
Basal like	化学療法	
特殊型	ホルモン療法 化学療法	髄葉癌や腺様嚢胞癌はリンパ節転移陰性なら術後化学療法は必要ないかもしれない

表3 患者背景

年齢(平均)	閉経状況		T			N		
	閉経前	閉経後	1	2	3	0	1	2
58.32	18	32	19	28	3	32	16	2

Grade			ER		PgR	
1	2	3	+	-	+	-
14	31	3	50	0	44	6

表4 治療レジメンと奏効率

ホルモン療法単独(H)		21	ホルモン療法+経口化学療法(H+C)		29
TAM+LHRHa		5	LET+CPA		20
PD		0	PD		0
SD		3	SD		6
PR		2	PR		13
CR		0	CR		1
LET		8	LHRHa+LET→LHRHa+LET+CPA		2
PD		0	PR		2
SD		5	LET+CPA→TOR+CPA		2
PR		3	PD		1
CR		0	PR		1
LHRHa+LET		5	TAM+LHRH+UFT		1
PD		0	PR		1
SD		2	TAM+LHRHa→TAM+LHRH+UFT		1
PR		3	PR		1
CR		0	LHRHa+LET+CPA		1
TAM+LHRHa→LHRHa+LET		1	PR		1
SD		1	LHRHa+TAM+CPA		1
TAM		1	PR		1
SD		1	LET→LET+CPA		1
ANA		1	PR		1
SD		1			
PD		0	PD		1
SD		13	SD		6
PR		8	PR		21
CR		0	CR		1
奏効率(%)		38	奏効率(%)		76

TAM;Tamoxifen、LET;Letrozole、LHRHa;luteinizing hormone-releasing hormone analogue、ANA;Anastrozole、CPA;Cyclophosphamide、TOR;Toremifene、

図1 臨床効果と組織学的効果

Spearman の順位相関：全体<0.0001 H=0.0831 H+C=0.0003

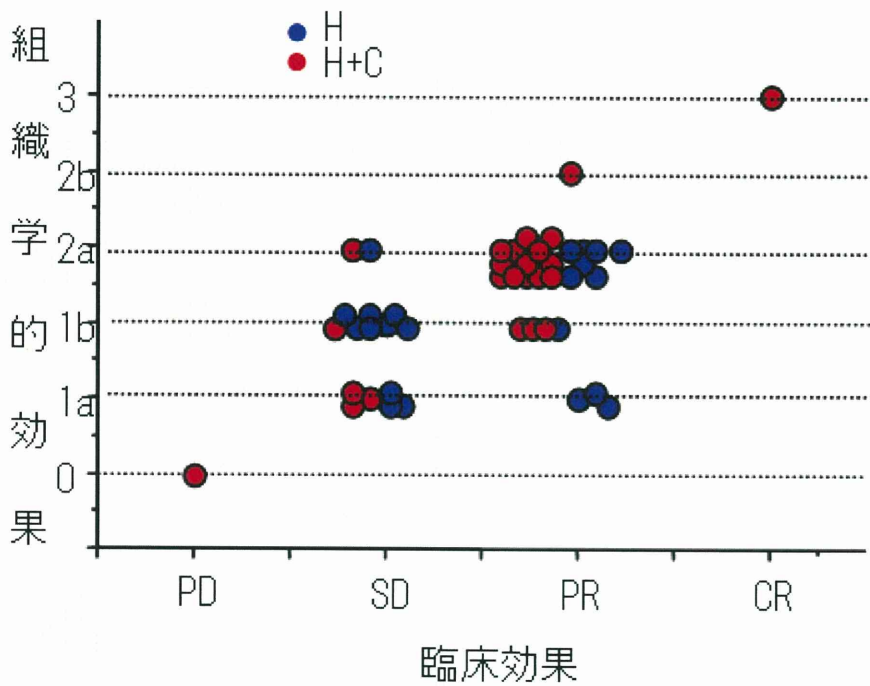


図2 治療前後のバイオマーカーの変化 ER

## バイオマーカーの変化(ER)

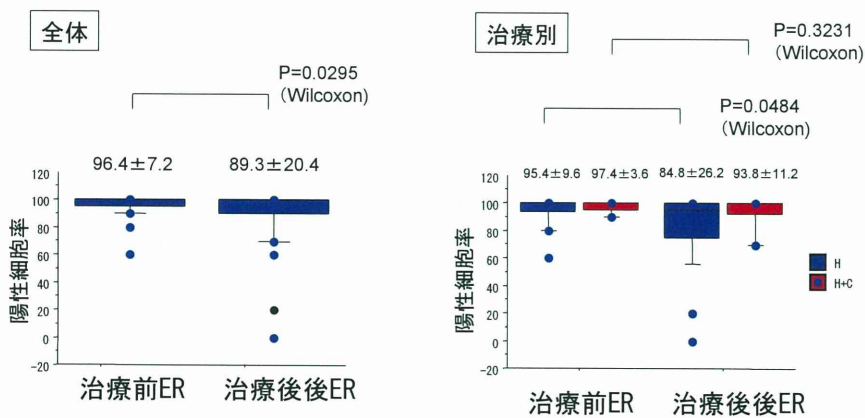


図3 治療前後のバイオマーカーの変化 PgR

## バイオマーカーの変化 (PgR)

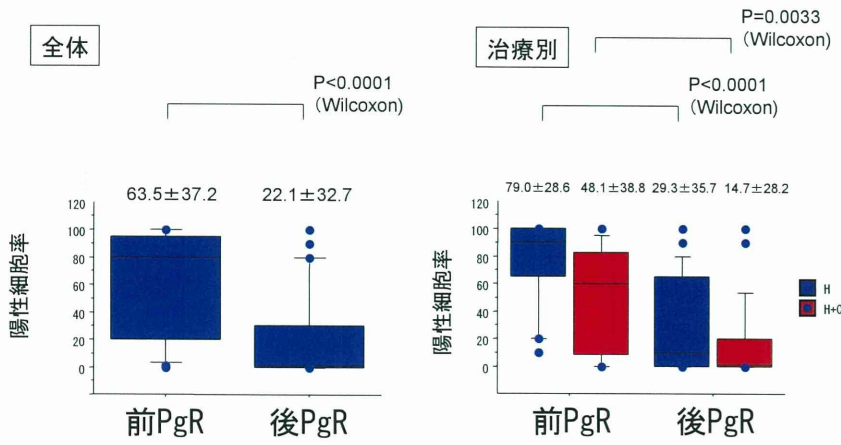


図4 治療前後のバイオマーカーの変化 ki-67 labeling index

## バイオマーカーの変化 Ki-67 labeling index

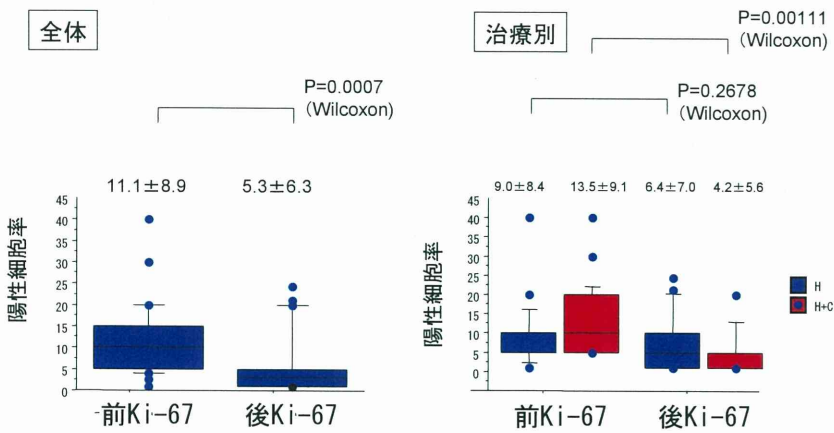


表5 組織学的治療効果とバイオマーカー

	全症例	H	H+C
ER			
前 ER	0.3678	0.9392	0.3728
後 ER	0.9582	0.4151	0.6952
ER 増減	0.9561	0.3173	0.6582
PgR			
前 PgR	0.4002	0.5298	0.4901
後 PgR	<b>0.0205</b>	0.1334	0.1949
PgR 増減	0.2874	0.0765	0.9065
Ki-67 陽性率			
前 Ki-67	0.3096	0.0975	0.0566
後 Ki-67	<b>0.0274</b>	0.0580	0.4163
ki-67 増減	0.0941	0.8513	0.2370
ki-67 低下率	<b>0.0036</b>	0.4238	<b>0.0250</b>
組織 Grade			
前組織 Grade	0.1141	0.3394	0.8092
後組織 Grade	0.3225	0.7395	0.7337
MR volumetry			
Volumetry 低下率	<b>0.0015</b>	0.1367	<b>0.0050</b>

参考文献

Goldhirsch A, et al. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. Ann Oncol, 2011. 22(8): p. 1736-47.

NCCN ホームページ: <http://www.nccn.org/index.asp>

日本乳癌学会編: 乳がん診療ガイドライン 1. 薬物療法. 金原出版. 東京.

Toi, M., et al., Phase II study of preoperative sequential FEC and docetaxel predicts of pathological response and disease free survival. Breast Cancer Res Treat, 2008. 110(3): p. 531-9.

Ellis, M.J., et al., Outcome prediction for estrogen receptor-positive breast cancer based on postneoadjuvant endocrine therapy tumor characteristics. J Natl Cancer Inst, 2008. 100(19): p. 1380-8.

Rozados VR, et al. Metronomic therapy with cyclophosphamide induces rat lymphoma and sarcoma regression, and is devoid of toxicity. Ann Oncol. 2004 Oct;15(10):1543-50.

乳癌のリンパ節転移と術前化学療法の効果予測システムの開発

研究分担者 内藤泰宏 慶應義塾大学環境情報学部 准教授  
研究分担者 杉本 昌弘 京都大学大学院医学研究科 講師  
研究協力者 高田 正泰 京都大学大学院医学研究科外科学講座乳腺外科 大学院生

本研究の目的は、乳癌治療の効果予測の数理モデルを作り、医療経済負担低減につながる診療アルゴリズムの構築や、乳がん診療における複雑な意思決定の可視化や定量的で客観的な評価基準を作成することである。術前化学療法の効果予測、治療前のリンパ節転移の有無の予測モデルの構築と評価を行うとともに、データを入力すれば予測結果を表示するWebシステムも構築した。同時にデータの蓄積と予測結果の評価も行えるシステムとし、前向き試験を実施できるシステムを完成させた。本報告書では、開発したモデル化の方法論とシステムの詳細を報告する。

A. 研究目的

乳癌はわが国では年間約4万人の発生と約1万人の死亡がみられ、女性における罹患率が最多の癌である。原発性乳癌の治療は、手術療法・薬物療法・放射線療法による集学的治療が主体である。特に薬物療法については、ホルモン療法に対するホルモン受容体(ER, PgR)あるいは抗HER2療法に対するHER2/new発現など、治療効果予測因子を用いた治療の個別化が進められている。一方で、殺細胞性抗癌薬の治療効果を単一で予測する因子は、いまだ確立されたものは存在しない。

原発性乳癌を対象とした術前化学療法は、ダウンスレージングによる手術縮小化、治療反応性の確認による治療の個別化など目的に、現在では広く行われるようになった。術前療法にて病理学的完全奏効(Pathological complete response: pCR)の得られた症例は得られなかった症例に比較して予後が良好であることが示されており、pCRは術前化学療法のエンドポイントの一つと考えられている<sup>1</sup>。

治療開始前に潜在的に殺細胞性抗癌薬に対する反応性の低い症例を選別することは、無用な治療を回避する事につながり、患者のQuality of life(QOL)改善、治療の適正化につながると考えられる。

また、術前化学療法とともに原発性乳がんの診療において意思決定の重要な要素としては、腋窩リンパ節(LN)の転移の有無があげられる。LN転移は予後の予測に重要な因子であり、術前・術後の全身療法の選択や腋窩リンパ節郭清(ALND)の意思決定に大きな影響を及ぼす。リンパ節転移を評価するために用いられているセンチネルリンパ節(SLN)生検は、腋窩リンパ節郭清に比べて低侵襲ではあるものの侵襲性がゼロではなく、高齢患者には合併症の危険性を増大させる問題などもある。また、実際にSLN生検の結果、LN転移を認める症例の割合は約20-30%ほどである。このため、LN転移の予測ができれば、SLN生検の省略可能な症例の選別ができる可能性がある。

これまで術前化学療法による pCR を予測する数理モデル<sup>2,3</sup>、また、LN 転移を予測する数理モデル<sup>4</sup>が開発されてきた。例えば、いくつかの臨床情報からロジスティック回帰モデルを用いて pCR の可能性を予測するモデルを作成し、nomogram により算出するものが報告されている。Nomogram により複数の因子を組み合わせる事で単一の因子よりも高精度の予測が可能となる事が証明されて来たが、ロジスティック回帰モデルには、様々な制約がある<sup>5</sup>。例えば、

- 1) モデルを構築するときに使ったデータ（学習データ）だけに特化しすぎて新たなデータ（評価データ）に対して予測精度を落としてしまう過学習を防ぐために、独立した少数の変数しか扱うことができない。
- 2) レトロスペクティブに収集した臨床データに多い、欠損値を取り扱うことができず、モデルを構築するデータから、欠損値の多い変数の削除する、あるいは欠損値を含む症例を削除する、などの対処が必要となり、データを十分活用することができない。
- 3) 学習データにおける予測対象（アウトカム）の割合に強く依存した方法であるため、評価データにおけるアウトカムの割合が異なる場合、モデルの予測値に誤差が生じる。
- 4) お互いの変数が依存する複雑なデータである可能性があるにも関わらず、特定の変数の値が大きく(小さく)なれば、アウトカムの確立が単調に大きく(小さく)なるといった線形の関係性を仮定したモデルとなっている。

などの問題がある。特に 1) に関する制限が厳しく、ごく限られた変数しか取り扱えないため、使える場面が限られている。

予測モデルの方法論としては、少数の変数を一定の重み付けで足し合わせるスコアリングの方法や、決定木、決定木と重回帰分析を組み合わせた CART(classification and regression tree)モデルなどがあるが、ロジスティックと同じ問題点 1)~4)を持つ。そこで、我々はこれらの問題を軽減して、多くの変数を取り込み、高い精度と汎化能力を保持するモデル化方法の開発を行ってきた。本方法を乳がんの診療において重要な 2 点、1)治療前のリンパ節の転移の有無、2)術前化学療法の病理組織的治療効果、に関してそれぞれモデルを開発・評価を行い、データの予測と蓄積を行う Web サイトの構築を行った。

## B. 研究方法

### B. 1. 術前化学療法の反応性の予測

対象は、アンストラサイクリン系抗癌剤およびタキサン系抗癌剤の逐次併用レジメンを術前化学療法として施行された症例とした。国内 3 施設から学習用データとして 150 例のデータを収集し、決定木の一種である Alternating decision tree (ADTree)を用いて予測モデルを開発した。さら、術前化学療法に関する臨床試験 (OOTR-N003 試験)から評価用に 173 例のデータをランダムに収集し、作成した予測モデルをあてはめた。対象症例は、いずれも同様のプロトコルで治療が行われている。予測アウトカムは、術前化学療法終了時における腋窩リンパ節転移を伴わない乳房内の浸潤癌の消失 (ypT0/isN0)とした。

### B. 2. リンパ節転移の有無の予測

学習データとして、都立駒込病院の 148 症例 (2005 年-2006 年)と京都大学医学部附属病院の 143 症例 (2008 年-2009 年)を用いた。

また、評価データとして、大韓民国ソウル大学病院の 174 症例 (2010 年 1 月-4 月)を用いた。

適応症例の条件は、1)針生検で浸潤性乳癌であることが確認されている女性患者、2)前治療なしに SNL 生検あるいはALNDが行われている、3)腫瘍径が4cm以下、を選択した。数理モデルの入力変数として用いる臨床情報は年齢、BMI、閉経の有無、身体所見、画像所見(超音波、マンモグラフィ)、針生検の病理組織所見(組織型、nuclear grade、ER、PgR、Her2)から 25 変数を用いた。予測する変数としては、LN 転移の有無(転移巣の最大径 $\geq 0.2$ mm)を用いた。

なお、本研究は京都大学大学院医学研究科・医学部及び医学部附属病院 医の倫理委員会の承認番号：E-652「原発性乳癌の腋窩リンパ節転移予測モデルおよび術前化学療法による治療効果予測モデルの評価に関する研究」にて承認を受けており、臨床試験データベース(UMIN 登録番号:UMIN000002107)に登録している。

### B. 3. 数理モデルの構築方法

数理モデルには Alternating decision tree (ADTree)<sup>6,7</sup>を用いた。これは、一般的な決定木と同様に、ノードに割り当てられた変数の値によってたどる枝を選択するが、全ての到達可能なノードのスコアを足し合わせて合計した値から特定の事象を予測する確率を算出するものである。予測精度を向上させるため、このADTreeを複製性させ、複数のADtreeの予測結果を平均化して最終的な予測とする ensemble 手法<sup>8</sup>を採用した。

### C. 研究結果

#### C. 1. 術前化学療法の反応性の予測結果

ADTree アルゴリズムにより、28 の臨床病理学的因子から 15 の因子が自動的に選択された。

作成されたモデルは、学習用データで受信者動作特性(ROC)曲線以下の面積 AUC (Area under ROC)=0.766 [95%信頼区間 (CI): 0.671–0.861,  $P < 0.0001$ ], 評価用データで 0.787(95% CI: 0.716–0.858,  $P < 0.0001$ )と高い予測精度と汎化能力を示した。モデルによる予測確率20%以下をpCRの可能性が低い群と仮定した場合、偽陰性率は 7.7%、陰性的中率は 95.9%であった。また、モデル作成手法の比較として、同一のデータから多変量ロジスティック回帰を用いて別の予測モデルを開発したが、予測精度は AUC=0.754 と ADTree を用いたモデルのほうが高精度であった。なお、モデルの中に取り込まれた変数の重要度を調べる感度解析や、アウトカムの比率の影響を考慮した解析など、様々なモデルの評価方法に関して、次項のリンパ節転移の予測モデルと同様の解析を実施し、類似した結果を得た。詳細は、リンパ節のモデルを例にとり報告する。

#### C. 2. リンパ節転移の有無の予測結果

図 1 に構築した数理モデルが算出したリンパ節転移の有無に関する、を示す。駒込病院のデータでは AUC=0.917 [95%信頼区間 (CI): 0.871–0.964,  $P < 0.0001$ ]、京大病院のデータでは、0.770 (95% CI: 0.689–0.850,  $P < 0.0001$ )、ソウル大病院のデータでは 0.772 (95% CI: 0.689–0.856,  $P < 0.0001$ )の結果であった。

各データセットの中でアウトカム(リンパ節の転移の有無)の症例を変動させた場合、どの程度予測値が変動するかを調べた。それぞれのデータセットにおいて、0.916 (95% CI: 0.913–0.919), 0.766 (95% CI: 0.760–0.772), 0.768 (95% CI: 0.763–0.774)と大きな変動はない結果となった。



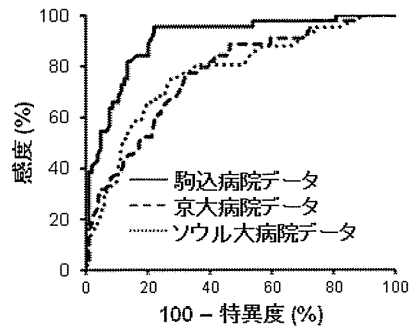


図1 構築したモデルの予測精度を示すROC曲線

欠損値の値をランダム京大病院のデータでは、0.884 (95% CI: 0.882–0.887)ソウル大病院のデータでは 0.688 (95% CI: 0.684–0.692)となった。これら AUC 値がもともと AUC 値から大きくずれるのは欠損値の症例が少ないことが原因だと考えられる。着目すべきは 95%CI 値の差が小さいことで、欠損値のところに別の値を入れても AUC 値が大きく振れることがないことである。これはモデルが欠損値に対して感度が悪い(=耐性がある)特徴の一つを表している。

モデルに含まれる各変数がどの程度予測に貢献しているかの度合を評価するために、1つの変数の値をランダムに変化させて、予測精度がどの程度変動するかを調べた。図2に各変数と予測

精度の変動幅の図を示す、超音波での halo、LN サイズ、腫瘍サイズは、値をランダムに変化させると、予測精度の劣化が他の変数より激しいため、これらの変数がモデルの中で高い重要度を持っていることがわかる。

モデルに含まれる各変数がどの程度予測に貢献しているかの度合を評価するために、1つの変数の値をランダムに変化させて、予測精度がどの程度変動するかを調べた。図2に各変数と予測精度の変動幅の図を示す、超音波での halo、LN サイズ、腫瘍サイズは、値をランダムに変化させると、予測精度の劣化が他の変数より激しいため、これらの変数がモデルの中で高い重要度を持っていることがわかる。

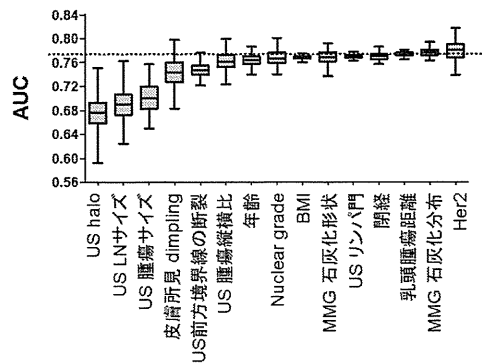


図2 構築したモデルに含まれる変数をランダムに変化させたときの AUC の変化。変数ごとに 200 回の施行を行った。箱ひげ図は、AUC 値の最大値、75%、50%、25%、最小値を示す。

C. 3. 各モデルのシステム化  
術前化学療法による pCR を予測するモデルとリンパ節転移の有無を予測するモデルに関して、Web から必要な変数を入力すれば、予測結果が表示されるシステムを開発した(図3~5)。

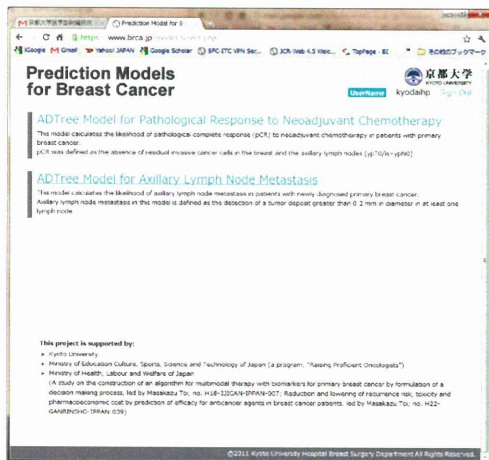


図3 構築したモデルの Web サイト。アカウントを用いてログイン後、本画面から各モデルの個別画面へ移動する。

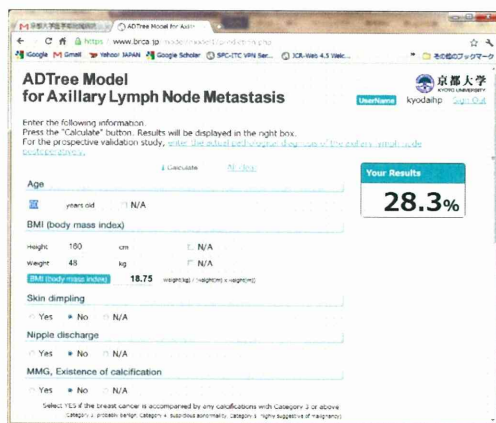


図4 リンパ節転移を予測する画面。画面中央部に疾患ごとの変数(上から順に、年齢、BMI、dimpling など)を入力し、下部にある予測ボタンを押すと、画面右に予測結果が表示される。さらに画面を下にスクロールさせると、過去に入力したデータの履歴と、実際の転移の有無を入力できるテーブルが表示されている。

これらの Web サイトは単に予測結果を表示するだけでなく、入力した変数、アウトカムの予測結果を保存するデータベースにもなっている。また、実際のアウトカムも入力できるようになっている。現在は、アカウントとパスワードでアクセス制限をかけている。またデータ通信に関しては暗号化したプロトコルを利用している。

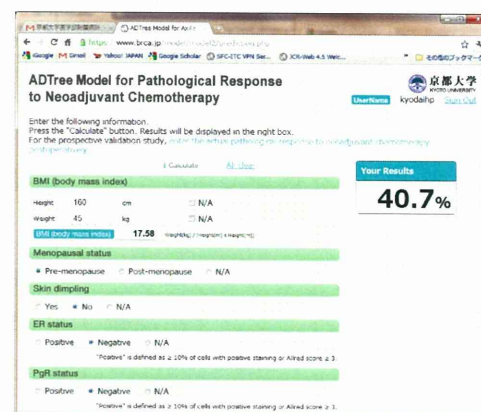


図5 リンパ節転移を予測する画面。画面中央部に疾患ごとの変数(BMI、閉経状態など)を入力し、下部にある予測ボタンを押すと、画面右に予測結果が表示される。さらに画面を下にスクロールさせると、過去に入力したデータの履歴と、実際に化学療法後に pCR であったかどうかを入力できるテーブルが表示されている。

## D. 考察

本研究において、ロジスティック回帰モデルの最大の問題点である多くの変数を扱うと、汎化能力が落ちるという問題を低減するため、ADTree を用いたモデル化方法を開発した。しかし ADTree を用いた場合でもロジスティック回帰モデルと同様、変数を多くすると過学習を起こす可能性はある。リンパ節転移の有無の予測モデルにおいては、京大病院とソウル大病院の予測精度がほぼ同等(AUC=0.770 と 0.772)であるが、駒込病院のデータでは AUC=0.917 と高いため、学習データへの過学習がある可能性が考えられる。

しかし、今回モデルのパラメータ（ツリーのサイズや Ensemble での ADTree の数）に関しては、京大病院データを用いて決定を行った。従って、学習データの中で内部評価を行った京大病院データと、独立評価データであるソウル大病院のデータで同等の精度であることは、AUC=0.77 前後の値が、新規データを入力したときの予測精度だと推測される。化学療法の反応性に関しては、学習データ（AUC=0.766）と評価データ（AUC=0.787）でほぼ同等の AUC 値を出せているため、過学習を防ぎ、より最適なモデル（＝汎化能力を最大化するモデル）を構築できたと考えられる。

ADTree は、ニューラルネットワークなどの他のモデルに比べてシンプルな構造で高精度な予測ができる利点がある。このシンプルな構造は、学習したモデルを解釈して、モデルの中で各変数がどのような依存関係にあるのかなどの知見を得る利点があるが、本研究ではより高精度の予測や、欠損値への耐性などを獲得するために、Ensemble 学習により複数の ADTree を内包するモデルを採用した。これは、モデルのシンプル性の利点を捨てることになり、変数の解釈が難しくなるという新たな問題を生み出す。ここでは、各変数の感度解析により、各変数の予測精度への影響度を解析することはできたが、より詳細な解釈ができる解析方法を開発し、モデルの妥当性を検証できるようにすることが今後の課題である。

#### E. 結論

本研究では、術前化学療法の反応性と治療前のリンパ節転移の有無を予測する数理モデルを開発した。

類似する研究例で最も頻繁に使われているロジスティック回帰モデルの問題点を低減するため、ADTree と Ensemble 学習を組み合わせた方法にて、多数の変数を取り入れて精度が高く、かつ汎化能力の高い予測モデルの開発ができた。これにより、Nomogram でも取り込まれている ER などのマーカーだけでなく、画像所見なども取り込むことに成功した。また、それぞれのモデルを Web から使えるシステムも開発した。このシステムは単に予測結果を表示するだけでなく、症例ごとのデータ（予測因子）の集積とともに、実際のアウトカム（データ）も入力することができる。本システムを用いて今後は前向き試験を実施し、これらのモデルの予測精度の評価・検証を行う予定である。また、今後はセンチネルリンパ節生検の結果が陽性の症例で非センチネルリンパ節生検の転移の有無や、術前ホルモン療法の効果予測など、適応範囲を広げていくことも同時に行う。

#### 参考文献

1. Mauri D, Pavlidis N, Ioannidis JP. Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:188-94.
2. Rouzier R, Puzstai L, Delaloge S, et al. Nomograms to predict pathologic complete response and metastasis-free survival after preoperative chemotherapy for breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:8331-9.
3. Rouzier R, Puzstai L, Garbay JR, 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;107:1459-66.

4. Bevilacqua JL, Kattan MW, Fey JV, Cody HS, 3rd, Borgen PI, Van Zee KJ. Doctor, what are my chances of having a positive sentinel node? A validated nomogram for risk estimation. J Clin Oncol 2007;25:3670-9.

5. Tighe P, Laduzenski S, Edwards D, Ellis N, Boezaart AP, Aygtug H. Use of machine learning theory to predict the need for femoral nerve block following ACL repair. Pain Med 2011;12:1566-75.

6. Horiguchi K, Toi M, Horiguchi S, et al. Predictive value of CD24 and CD44 for neoadjuvant chemotherapy response and prognosis in primary breast cancer patients. J Med Dent Sci 2010;57:165-75.

7. Freund Y, Mason L. The Alternating Decision Tree Learning Algorithm. Proceedings of the Sixteenth International Conference on Machine Learning 1999:124 - 33

8. Che D, Liu Q, Rasheed K, Tao X. Decision tree and ensemble learning algorithms with their applications in bioinformatics. Adv Exp Med Biol 2011;696:191-9.

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし（2本投稿済）

##### 2. 学会発表

M. Takada, M. Sugimoto, Y. Naito, H. Moon, W. Han, D. Noh, M. Kondo, K. Kuroi, H. Sasano, T. Inamoto, M. Tomita, M. Toi. Utility of a prediction model for axillary lymph node metastasis in patients with primary breast cancer using a decision-tree algorithm. Society of Surgical Oncology, 65th Annual Cancer Symposium, Orland, Florida, 2012/3/21-24.

M. Toi, M. Takada, M. Sugimoto. Y. Naito, H. Bando, H. Iwata, K. Kuroi, N. Masuda, S. Ohno, N. Sato, M. Kondo, H. Sasano, T. Inamoto, M. Tomita. Development of a Prediction Model for Treatment Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Primary Breast Cancer Using a Decision-tree Algorithm. Society of Surgical Oncology, 65th Annual Cancer Symposium, Orland, Florida, 2012/3/21-24.

M. Takada, M. Sugimoto, Y. Naito, H. Moon, W. Han, D. Noh, M. Kondo, K. Kuroi, H. Sasano, T. Inamoto, M. Tomita, M. Toi. Development of a clinical prediction model for axillary lymph node metastasis in primary breast cancer patients: a validation study and a literature review. Global Breast Cancer Conference 2011. Seoul, Korea, 2011/10/7.

Masahiro Takada, Masahiro Sugimoto, Katsumasa Kuro, Yasuhiro Naito, Masaru Tomita, Masakazu Toi. Development of a novel prediction model to predict axillary lymph node metastasis in patients with primary breast cancer. Kyoto Breast Cancer Consensus Conference, International Convention 2011. Kyoto, Japan. 2011/4/14.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

特願 2010-099327 予測装置及びその学習装置並びにそれらのコンピュータプログラム(出願済み)

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし