

# 情報論を切り口とした晩期再発乳がんの バイオマーカーの探索

東京理科大学 薬学部 助教 た もり 多森 しょうま 翔馬  
生命創薬科学科

東京理科大学 薬学研究科 博士課程 お なが 翁長 ちようたろう 朝太郎  
薬科学専攻 東京理科大学 薬学部 教授 あきもと 秋本 かずのり 和憲  
生命創薬科学科

## はじめに

近年、がん医療では遺伝子情報に基づく精密医療が始まっています。精密医療では、がんの種類だけではなく、遺伝子変異などががんの特徴を調べることで、ひとりひとりの患者に適した治療法の選択を行うことができるようになってきています。一方で、科学技術の発展から、遺伝子情報以外にも、エピゲノム状態、遺伝子発現、タンパク質発現などの様々な網羅的情報が得られるようになってきています。我々は患者のがんから得られているこれらの情報を利活用し、精密医療に還元することを見据えて研究を進めています。本稿では、この中でも乳がんについて行ってきた我々の最近の研究について紹介します。

## 乳がんのサブタイプ分類と臨床上的問題点

乳がんは世界的に女性で最も罹患率が高いがんです。乳がんは薬物治療を決定する際の層別化が進んでいるがん種で、2つの分類法が存在します。1つ目は免疫組織化学分類です。免疫組織化学における受容体発現パターンによる分類では、ホルモン受容体（エストロゲンレセプター；ER and/or プロゲステロンレセプター；PgR）陽性型、HER2 陽性型およびこれらいずれも発現しないトリプルネガティブ型に分類されます。2つ目は遺伝子発現パターンによる分類です。この分類法では遺伝子発現パターンに基づいて少なくとも6種類（Luminal A, Luminal B, HER2-enriched, Normal-like, Claudin-low, Basal-like）のサブタイプに分類されます。このうち免疫組織化学分類におけるホルモン受容体陽性乳がんはLuminal A型とLuminal B型に相当し、乳がん全体の70～80%を占めるサブタイプです。このサブタイプの乳がんに対する薬物治療はホルモン療法が確立されており、比較的予後が良好であることが知られています。一方で、このサブタイプの乳がん

あっても、ホルモン療法が効かない難治性の乳がんが存在することや、治療期間中は一見するとホルモン療法の効果があっても、治療を終了した5年後、10年後に再発が起きてしまうことが問題点として挙げられます。特に、他のサブタイプの乳がんや乳がんに限らず多くの乳がんが5年以内の比較的早期に再発するのに対して、ホルモン受容体陽性乳がんは診断時から10年後、20年後といったとても長い年月を経た後に再発を起こすことも多いことから、このような“晩期再発”は臨床上的大きな問題となっています。この乳がんの晩期再発の予測指標は診断時のリンパ節転移数や腫瘍の大きさが知られている程度であり、遺伝子レベルでのバイオマーカーは未だに不明です。このことから、乳がんの晩期再発が起こる仕組みを調べる手は乏しく、その基礎研究はほとんどなされていませんでした。

## 情報理論的アプローチによる 予後予測分子の探索

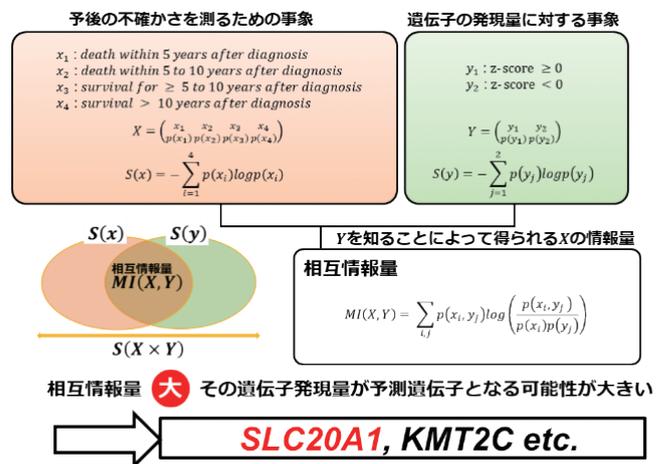
我々の研究室では網羅的遺伝子発現データから乳がん患者の予後を予測する分子の探索を行ってきました。その際の切り口として、情報理論的なアプローチを用いています。

情報理論は情報の伝達とコミュニケーションに関するシャノンの研究<sup>1)</sup>にルーツがあり、コミュニケーションだけでなく、統計、機械学習、計算機科学などの分野に適用されています。これらの分野だけでなく生物学の分野においても、生物学的システムの分析など多くの例で情報理論は適用されています。シャノンの情報理論とその情報の定義を適用することで、情報処理のメカニズムを定量的に解析することが可能になっています。このように、情報理論的なアプローチは様々な場面で有用なことが示されています。一方、がん患者の予後予測については、2017年に佐藤・秋本

によって、がん患者の予後予測に情報理論を適用することで新規予後予測分子の同定に成功しています<sup>2)</sup>。具体的には、がん患者の予後情報からなる事象系と遺伝子発現量からなる事象系から相互情報量を算出し、ホルモン受容体陽性乳がんにおける予後予測因子として複数の遺伝子を同定しました【図1】。この研究は、相互情報量が網羅的遺伝子発現データからがん患者の予後予測分子を同定する際に有用であることを示した最初の例です。我々はこの研究から同定された複数遺伝子の中から特に、哺乳類細胞の細胞膜に存在するリン酸/ナトリウム共輸送体 SLC20A1 について継続的な研究を進め、その後もがんとの関わりについて様々なことを明らかにしています。

### 予後不良分子としてのSLC20A1

我々の研究では主に、公共のがんゲノミクスデータベース cBioportal を利用して、がんゲノミクスデータと臨床データを統合するかたちで解析をしています。前述のように同定した SLC20A1 についてはこの遺伝子を同定した The Cancer Genome Atlas (TCGA) のデータセット以外でも予後予測に関わるか、他の乳がんサブタイプではどうかという観点から解析にとりかかりました。cBioportal からダウンロードした乳がん患者ゲノミクスデータ (METABRIC, Nature 2012 & Nature Commun. 2016, 1904 検体) を用いて遺伝子サブタイプごとに全生存率 (OS) とがん特異的死亡率 (DSS) をアウトカムとして SLC20A1 発現と患者の予後との関係を Kaplan-Meier 法により調べました。その結果、ホルモン受容体陽性型である Luminal A 型・Luminal B 型だけでなく Claudin-low 型・Basal-like 型においても SLC20A1 高発現患者群は SLC20A1 低発現患者群よりも予後不良であることがわかりました。このことから、SLC20A1 高発現が Luminal A 型・Luminal B 型に加えて、Claudin-low 型・Basal-like 型乳がんの予後予測因子となり得ることが示唆されました。この Claudin-low 型・Basal-like 型乳がんは免疫組織化学分類ではトリプルネガティブ型に該当し、有効な治療薬が存在しない予後不良なサブタイプです。そこで、これらの患者に有用な治療法について考えるために、化学療法の有無と放射線療法の有無により患者を分けて同様の解析を行いました。その結果、化学療法無しで治療された SLC20A1 高発現患者群は SLC20A1 低発現患者群よりも予後不良であることがわかりました。対照的に、化学療法有りて治療された SLC20A1 高発



【図1】相互情報量による予後予測因子の同定

現患者群は SLC20A1 低発現患者群と比較して予後に顕著な差は見られませんでした。一方で、放射線療法については放射線療法の有無にかかわらず、SLC20A1 高発現患者群は SLC20A1 低発現患者群よりも有意に予後不良でした。このことから、Claudin-low 型・Basal-like 型乳がんの SLC20A1 高発現患者に対しては放射線療法よりも化学療法が有効である可能性が示されました。

これらの解析に加えて我々は、生物学的実験手法により、SLC20A1 のがん細胞における役割を調べました。がん細胞における SLC20A1 高発現とがん患者の予後への関与の因果関係を生物学的観点から明らかにする試みです。ゲノミクスデータ解析の結果から SLC20A1 高発現患者が SLC20A1 低発現患者よりも予後不良を示した Luminal A 型、Claudin-low 型および Basal-like 型の各がん細胞株を用いて SLC20A1 の役割について調べました。その結果、これらの細胞株において SLC20A1 の遺伝子発現を抑制すると細胞増殖および生存率が低下しました。さらに、乳がんの幹細胞モデルである ALDH1 陽性がん幹細胞の SLC20A1 遺伝子発現を抑制すると、*in vitro* における腫瘍形成能が抑制されることを明らかにしました。これらの結果は、これらのサブタイプの乳がん細胞において高発現した SLC20A1 はがん細胞ひいてはがん幹細胞の生存・増殖能を促進することでがんの進展に関与し、がん患者の予後不良を導くことを示唆しています<sup>3)</sup>。

### 晩期再発予測遺伝子としてのSLC20A1

一方で、ホルモン受容体陽性乳がんである Luminal A 型および Luminal B 型乳がんでは外科手術を中心に放射線療法と合わせてホルモン療法が行われます。しかしながら、ホルモン療法を行ってもホルモン療法が効かない難治性の患者が存在することや治療後から長

い期間を経て晩期再発が起こることがこのタイプの乳がんでは問題です。そこで、この Luminal A 型および Luminal B 型乳がんにおいて SLC20A1 は早期発見・治療のマーカーとなるか、SLC20A1 高発現患者に適切な治療は何か、SLC20A1 高発現はホルモン受容体陽性乳がんの晩期再発に関わるかの3つの観点から解析を行いました。まず初めに早期発見・治療のマーカーとなるかについて、Luminal A 型、Luminal B 型の患者をがんの進行段階を示すステージ別に分け、SLC20A1 高発現患者と低発現患者の予後解析を行いました。予後の指標には疾患特異的生存期間 DSS と無再発期間 RFS を用いました。その結果、Luminal A 型においてはステージ I, II において SLC20A1 高発現患者は低発現患者よりも予後不良でした。一方、luminal B 型ではすべてのステージにおいて SLC20A1 高発現患者と低発現患者の予後に有意な差はありませんでした。以上の結果から SLC20A1 は特に早期ステージの Luminal A 型乳がん患者において有効な予後予測マーカーとなりうることが示唆されました。

次に適切な治療の選択について解析するため、ホルモン療法の有無で患者群を分けて同様の解析を行いました。その結果、ホルモン療法を行った患者群のうち、Luminal A 型は DSS、Luminal B 型は DSS と RFS いずれの指標でも SLC20A1 高発現患者が低発現患者よりも予後不良でした。これらのことから、SLC20A1 高発現患者へのホルモン療法は予後を改善するには効果が十分でないことが示唆されました。

次に、人数は少ないのですが、化学療法の有無で患者群を分けて同様の解析を行いました。その結果、Luminal A 型、Luminal B 型ともに化学療法を行った患者群では SLC20A1 高発現患者と低発現患者の予後に有意な差はみられませんでした。このことから、Luminal A 型および Luminal B 型の SLC20A1 高発現患者にはいずれも化学療法が有効であることが示唆されました<sup>4)</sup>。

さらに、放射線療法の有無によって患者群を分けて解析を行いました。その結果、放射線療法を受けた Luminal A 型、Luminal B 型乳がんともに SLC20A1 高発現患者群は低発現患者群よりも予後不良でした。この中でも、放射線療法を受けたステージ I の Luminal A 型乳がんにおいて SLC20A1 発現患者群は低発現患者群よりも予後不良でした。これらの結果は、SLC20A1 高発現患者群は Luminal A 型と Luminal B 型乳がんにおいて、特にステージ I の Luminal A 型乳がん患者に対する放射線療法が不十分であることを示

唆しています<sup>5)</sup>。

最後に、SLC20A1 が晩期再発に関わるか解析を行いました。その結果、ホルモン療法を行った Luminal A 型では診断時から 15 年以上において SLC20A1 高発現患者の再発率が低発現患者よりも高い傾向にあることがわかりました。また、ホルモン療法を行った Luminal B 型では 10-15 年で SLC20A1 高発現患者の再発率が低発現患者よりも高いことがわかりました。これらのことから、SLC20A1 は晩期再発の予測マーカーとなりうることを示唆されました<sup>4)</sup>。

以上のことから、SLC20A1 は Luminal A 型および Luminal B 型乳がんに対するホルモン療法、化学療法、放射線療法の有効性を予測するためのマーカーとして使用できると期待しています。Luminal A 型、Luminal B 型乳がん SLC20A1 が高発現するとなぜホルモン療法や放射線療法の効果が十分に得られなくなるのか、晩期再発リスクがあがるのかというこれらの研究から新たに生じてきた課題に対しては、生物学的な観点から SLC20A1 の機能を調べています。具体的には、ホルモン療法耐性や放射線耐性に関わる SLC20A1 の機能および、晩期再発ということから、がん幹細胞のようながんの種となる細胞が SLC20A1 を高発現すると長期間患者の体内に潜むのではないかという仮説のもと研究を進めています。また、バイオインフォマティクス手法により、SLC20A1 高発現患者と SLC20A1 低発現患者のがんでどのような遺伝子発現パターンの違いが生じているのかを比較することを手掛かりにこれらの耐性・晩期再発機構を明らかにしようとする研究も行っています。

ここまでで紹介したように、我々の研究室では情報理論的アプローチから見出した SLC20A1 について遺伝子発現量による層別化と治療効果の検証を行ってきました。加えて我々の得意とする細胞実験により、単なるデータ解析にとどまらず、因果関係の解明を行ってきました **【図 2】**。この中でも特に、現在我々はホルモン受容体陽性乳がん SLC20A1 の発現が高い患者が晩期再発しやすいという結果に注目しています。最初の診断時に晩期再発の予測が出来れば、リスクを軽減させるような対応を準備することが可能となるためです。また、この結果は SLC20A1 を切り口に晩期再発の仕組みを調べるきっかけにもなります。

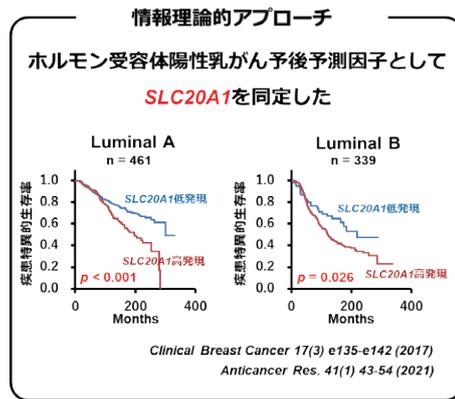
## 晩期再発乳がんのバイオマーカーの探索

これらの手法を発展させるべく、現在我々は新たな

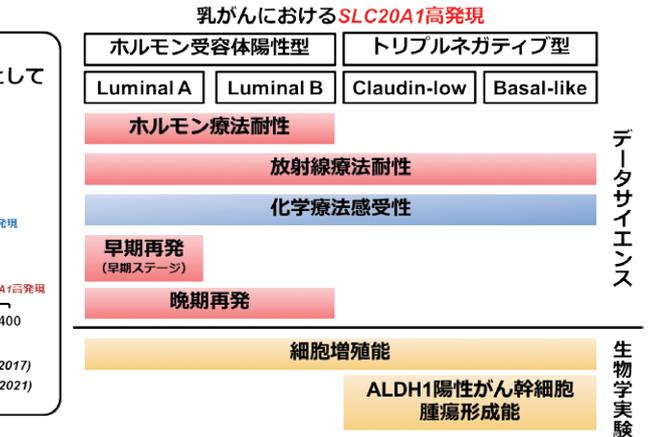
研究にも取り組んでいます。これまで紹介したSLC20A1はホルモン受容体陽性乳がんの晩期再発を予測する遺伝子として期待できますが、あくまで単一遺伝子であることから、より精度の高い晩期再発の予測に特化した新規バイオマーカー遺伝子群の探索を進めています。まず、相互情報量によるアプローチによりホルモン受容体陽性乳がんの晩期再発と関わる遺伝子群を抽出しました。次に、これまでの臨床統計の知識をフル活用することで、ホルモン受容体陽性乳がんの晩期再発予測の候補遺伝子群の絞り込みに成功しています。これらの遺伝子群については、バイオインフォマティクス手法を駆使した解析を進めています。がん細胞における生物学的機能、遺伝子間の発現ネットワーク構造、タンパク質間相互作用などを調べることで網羅的に抽出してきた遺伝子群の意外な未知の関係性が浮き彫りになってきたところです。今後はこのように抽出してきた遺伝子の生物学的機能と遺伝子間のネットワーク構造を切り口として、ホルモン受容体陽性乳がんの晩期再発が起こる仕組みを実験的に明らかにしたいと考えています【図3】。

## さいごに

このような情報理論と統計解析によるアプローチによる網羅的な解析結果を起点とした研究手法はがん研究の分野では他に類をみない独自性の高いアプローチです。さらに、がんの晩期再発について研究することは、本来異常な増殖性を示すががなぜ何もしないまま患者の体内にとどまるのか、そして治療終了からかなりの期間を経てなぜ増殖を再開するのかといった、がんの生物学においても新たな謎に迫るものです。この分野は依然として開拓の余地を秘めており、晩期再発予測指標としての活用や晩期再発リスクを低減させるような対応を準備することが可能になると期待しています。一方で、具体的な治療として実用化するためには更なる基礎研究を進めることで理論基盤を構築していく必要性を感じています。特に、臨床的ながん医療の知識や統計数理的な知識は必要不可欠であり、がんセンターのような医療機関や本学のデータサイエン



【図2】 SLC20A1に関する秋本研究室の成果



【図3】 晩期再発機構解明への取り組み

スの専門家の方々との連携を強めていくことでこの謎に迫りたいと考えています。実際、既にデータサイエンス医療研究部門の先生方や学生たちと連携し、様々な手法を用いることで、他のがん種のゲノムクスデータや我々がこれまで用いていた乳がんのゲノムクスデータからも新たな知見が得られてきています。我々においてはがんの生物学の視点から、晩期再発の仕組みを抽出した遺伝子群を手掛かりとして明らかにすべく研究を進めています。本研究の推進により、将来的には新たなデータ駆動型のがん精密医療が実現できる可能性があり、社会的にも意義があると考えています。

## 【参考文献】

- 1) Shannon C.E. A mathematical theory of communication. *Bell Syst. Tech. J.*, 27, 379-423 (1948).
- 2) K. Sato, K. Akimoto. Expression Levels of KMT2C and SLC20A1 Identified by Information-theoretical Analysis Are Powerful Prognostic Biomarkers in Estrogen Receptor-positive Breast Cancer, *Clinical Breast Cancer*, 17, e135-e142 (2017).
- 3) C. Onaga, S. Tamori *et al.*, High SLC20A1 Expression Is Associated With Poor Prognoses in Claudin-low and Basal-like Breast Cancers, *Anticancer Research*, 41, 43-54 (2021).
- 4) C. Onaga, S. Tamori *et al.*, High expression of SLC20A1 is less effective for endocrine therapy and predicts late recurrence in ER-positive breast cancer, *PlosOne*, 17, e0268799 (2022).
- 5) C. Onaga, S. Tamori *et al.*, High SLC20A1 Expression Is Associated With Poor Prognosis for Radiotherapy of Estrogen Receptor-positive Breast Cancer, *Cancer Diagn Progn*, 2, 429-442 (2022).