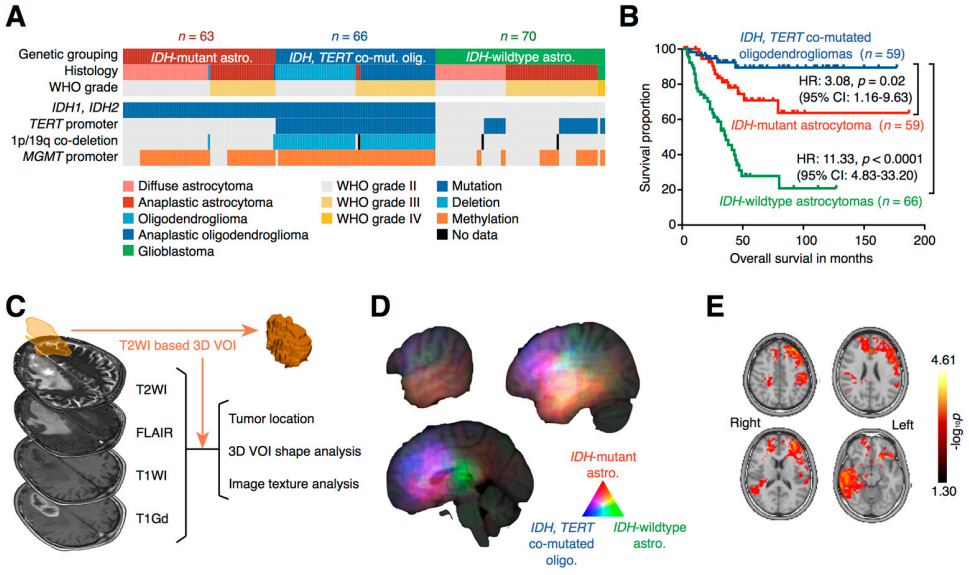
73　Radiogenomicsによる脳腫瘍の画像分子診断技術の開発	木下　学

【目的】神経膠腫は中枢神経系に発生する希少がんで、手術・放射線治療・化学療法を組み合わせた集学的治療が実施されているが、低悪性度のものの 5 年生存率は 75%、高悪性度ものに至っては 10%未満と予後不良な疾患である。神経膠腫の発生起源や再発・増悪に関する病態の解明は十分に進んでいないものの、ここ数年に得られた新たな知見から、神経膠腫は分子生物学的には数種類の異なった機序で発症していることが明らかになってきており、分子生物学的手法を用いた新たな病態理解・診断・治療のアプローチが求められている。腫瘍の分子情報の取得には腫瘍組織の採取が必須であり、脳腫瘍の場合には開頭術という侵襲的な手技を経由する必要がある。このような侵襲的な手技を回避すべく、放射線画像という非侵襲的な診断技術で腫瘍の分子情報の取得を試みようとするのが本研究の主たる目的である。

【方法】199 例の WHO grade II/III 神経膠腫を収集し、初発時 MRI から T1 強調画像、T2 強調画像、FLAIR 画像、造影 T1 強調画像を Radiomic 解析した。Radiomic 解析では腫瘍局在解析、ヒストグラム解析、テキスチャー解析が行われた。全ての解析が施行できたものを「フル解析」と定義した。169 例でフル解析が可能であり、199 例で腫瘍局在解析が行われた。フル解析により 109 画像特徴量を取得することができた。フル解析できた 169 例を 111 例の探索コホートと 58 例の検証コホートにランダムに振り分け、探索コホートを用いて、109 画像特徴量から *IDH* 遺伝子変異有無の予測モデルを LASSO regression により構築した。構築されたモデルの予測精度を検証コホートにより検証した。さらに、同様の解析を *IDH* 遺伝子変異と *TERT* プロモーター変異を組み合わせた、神経膠腫の分子 3 分類に対しても行った。

【結果】199 例の WHO grade II/III 神経膠腫の分子分類を腫瘍標本の DNA シーケンスから行い、astrocytoma, *IDH*-mutant ; oligodendroglioma, *IDH*-mutant, *TERTp*-mutant ; astrocytoma, *IDH*-wildtype に分類された。それぞれの腫瘍は特徴的な腫瘍存在局在を示した。Radiomc 解析から IDH 変異は 87%の精度で診断可能であり、3 群分類は 56%の診断精度を達成した。

神経膠腫の Radiomic 解析



73. Radiogenomics による脳腫瘍の画像分子診断技術の開発

木下　学

*大阪府立成人病センター 脳神経外科

Key words：神経膠腫，MRI，分子分類，Radiomics

緒　言

神経膠腫は中枢神経系に発生する希少がんで、手術・放射線治療・化学療法を組み合わせた集学的治療が実施されているが、低悪性度のものの 5 年生存率は 75%、高悪性度ものに至っては 10%未満と予後不良な疾患である。神経膠腫の発生起源や再発・増悪に関する病態の解明は十分に進んでいないものの、ここ数年に得られた新たな知見から、神経膠腫は分子生物学的には数種類の異なった機序で発症していることが明らかになってきており、分子生物学的手法を用いた新たな病態理解・診断・治療のアプローチが求められている。より具体的には低悪性度神経膠腫（WHO 分類でいうところのグレード 2 ないし 3 の神経膠腫）は *IDH1/2* ならびに *TERT* プロモーター領域の変異の有無により化学放射線治療に対する治療反応性や患者予後が大きく異なることが分かってきており、これらの分子情報は神経膠腫治療において必須の情報となりつつある。これはちょうど、肺がんにおける *EGFR* 変異や乳がんにおけるブロゲステロン受容体、エストロゲン受容体、*HER2* 受容体の過剰発現といった分子情報が分子標的薬の選択に必須の情報になっていることに類似される。こういった腫瘍の分子情報の取得には腫瘍組織の採取が必須であり、脳腫瘍の場合には開頭術という侵襲的な手技を経由する必要がある。このような侵襲的な手技を回避すべく、放射線画像という非侵襲的な診断技術で腫瘍の分子情報の取得を試みようとするのが本研究の主たる目的である。

分子生物学的情報と神経放射線学的データを統合解析する新規病態解析手法（Radiogenomics）は、従来は解析困難であった遺伝学的データ（genomics）と MRI などの医用画像（radiology）を統合的にリンクして網羅的に解析するもので、医用画像を用いた先端的な研究手法である。本研究手法は大規模臨床試験など臨床医学における大規模データを網羅的に解析し、従来型の解析では明らかにすることが出来なかった「画像」と腫瘍の「分子生物学」の関係性を明らかにできる。ビッグデータの活用、解析が推進されている昨今、本研究テーマは脳腫瘍に限らず、全身疾病の「画像」と「分子情報」の統合解析を推し進めるきっかけともなることが期待される。

199 例の WHO grade II/III 神経膠腫を収集し、初発時 MRI から T1 強調画像、T2 強調画像、FLAIR 画像、造影 T1 強調画像を Radiomic 解析した。Radiomic 解析では腫瘍局在解析、ヒストグラム解析、テキスチャー解析が行われた。全ての解析が施行できたものを「フル解析」と定義した。169 例でフル解析が可能であり、199 例で腫瘍局在解析が行われた。フル解析により 109 画像特徴量を取得することができた。フル解析できた 169 例を 111 例の探索コホートと 58 例の検証コホートにランダムに振り分け、探索コホートを用いて、109 画像特徴量から *IDH* 遺伝子変異有無の予測モデルを LASSO regression により構築した。構築されたモデルの予測精度を検証コホートにより検証した。さらに、同様の解析を *IDH* 遺伝子変異と *TERT* プロモーター変異を組み合わせた、神経膠腫の分子 3 分類に対しても行った。199 例の WHO grade II/III 神経膠腫の分子分類を腫瘍標本の DNA シーケンスから行い、astrocytoma, *IDH*-mutant ; oligodendroglioma, *IDH*-mutant, *TERTp*-mutant ; astrocytoma, *IDH*-wildtype に分類された。それぞれの腫瘍は特徴的な腫瘍存在局在を示した。Radiomc 解析から *IDH* 変異は 87%の精度で診断可能であり、3 群分類は 56%の診断精度を達成した。

*現在の所属：大阪国際がんセンター 脳神経外科

方　法

1. 対象

DNA シーケンス用の凍結標本と初発時 MR 画像が入手可能な 199 例の WHO grade II/III 神経膠腫を対象とした。対象症例に対しては文書による研究同意を取得し、研究計画は施設内倫理委員会で承認を得た。

2. 遺伝子解析

凍結標本 DNA からダイレクトシーケンス法により、*IDH1*/2 遺伝子変異、*TERT* プロモーター変異を同定した。また、MLPA 法により、1p19q 共欠失の有無を同定した。これらの遺伝子解析は神経膠腫の WHO 分子分類に則って行った。さらに腫瘍の MGMT 遺伝子プロモーター領域のメチル化状態を qPCR もしくはパイロシーケンス法で測定した。

3. Radiomics

Radiomics は独自に開発した Matlab ベースの画像解析パイプラインを用いて行った。Radiomics は以下の各ステップを経て解析が実行される。

（1）画像の Normalization

Radiomics では定性画像を定量化するため、解析の第一段階として画像の normalization が必要である。図 1 に normalization 前後の画像とヒストグラムを提示する。上位 0.1%の高輝度信号は MRI 撮像時に混入するノイズ信号である事が多く、これらのノイズを拾うことで適切に画像階調が達成されないため、我々は元画像の上位 0.1%の高輝度信号をフィルタリングし、その後残りの 99.9%の信号を 256 階調へ振り分けている。このような処理をすることで、脳実質の信号が 256 階調のほぼ中央に分布し、もともとは定性画像であった MR 画像を半定量的に取り扱うことが可能となる。

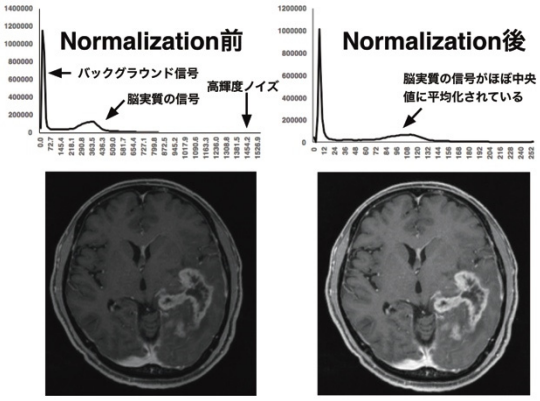


図 1. 画像の Normalization

元画像の上位 0.1%の高輝度信号をフィルタリングし、その後残りの 99.9%の信号を 256 階調へ振り分ける。この処理を実行することで、脳実質の信号が 256 階調のほぼ中央に分布する。

（2）画像の Registration

T1 強調画像、造影 T1 強調画像（T1Gd）、T2 強調画像を同一座標系で評価するために、各シリーズ間の registration が必要となる。我々の開発したソフトウェアではオックスフォード大学が配布している MRI 解析ツールである FSL に装備されている FLIRT という機能を採用した。FLIRT（FMRIB's Linear Image Registration Tool）は線形変換（物体の並行移動、拡大縮小、回転）による画像レジストレーションアルゴリズムであり、FSL 内で提供されている。画像間でねじれや物体の大幅な変形が生じていない限り、2 つの物体（本研究では異なった画像から得られた脳や頭蓋）は線形変換で空間的位置をレジストレーションできる。この方法は多くの学術論文でその正確性が検証されてきており［1］、本研究目的には最適であると判断した。我々のソフトウェアは基本構造を行列計算、ベクトル演算、グラフ化や 3 次元表示などの豊富なライブラリを持った、コンピュータ言語である Matlab で構成しているが、registration 機能は直接 FSL を呼び出し、FLIRT を実行している。この過程はユーザーから隠され、バックグラウンドで実行される

ようにしており、可能な限り解析操作を簡素なものにするように配慮した。

（3）標準脳での lesion mapping

脳腫瘍の脳内での解剖学的な発生部位の特徴は、腫瘍性病変の生物学的特徴を捉える上で極めて重要な情報であり、と考えている。これは以前より WHO grade II，III グリオーマは脳表近くに発生し、前頭葉に局在しやすいことやその一方で膠芽腫は深部白質に発生しやすいなどといった、疾患の空間的特徴が指摘されてきたからである。筆者らはこれまでにも各症例の脳の個体差を無くし、標準脳座標系に病変を投影することで、腫瘍性病変の空間的な特徴を明らかにしてきた［2，3］。今回開発した radiomics 解析ソフトウェアもこの機能は継承している。

（4）Radiomics

作成された各種病変の voxels-of-interest（VOI）を用いて radiomics を実行した。Radiomics はヒストグラム解析を主とする 1st order texture analysis と画像の繰り返しパターンを解析する 2nd order texture analysis の 2 段階で行われるようにしている。ヒストグラム解析は VOI 内の最小値、最大値、平均値、中央値の他、エントロピー（データの乱雑さに関する統計的尺度）やカートシス（正規分布と比べた時のデータ分布の尖度）など非正規分布上でのデータの統計的値を算出するようにした。ヒストグラム解析が VOI 内のデータの位置関係を無視して解析するのに対して、2nd order texture analysis では隣り合わせのボクセル（ピクセル）のピクセル値の関係や、同じような数値のならびの繰り返し頻度などを計測する。元画像から gray-level co-occurrence matrix ならびに gray-level run-length matrix を求め、この 2 つの matrix から contrast, correlations, energy やこれらの算出値の 2 次的な統計量を算出した［4，5］。

4. 遺伝子変異予測モデルの確立

Radiomics 解析で得られた 109 画像特徴量から遺伝子変異を予測するモデルを LASSO regression によって構築した。R で実行できる glmnet パッケージにより解析した。169 症例をランダムに 111 例の探索コホートと 58 例の検証コホートへ振り分け、最適な λ 値をもとめ、モデル構築を行った。

結果および考察

1. 収集コホートの検証

図 2A に示すように、199 例はほぼ均等に 3 群の分子分類に振り分けることができた。各群の頻度はこれまでの報告のそれと近いものであった。また予後解析（図 2B）でも oligodendroglioma，*IDH*-mutant，*TERTp*-mutant；astrocytoma，*IDH*-mutant；astrocytoma，*IDH*-wildtype の順に予後良好であり、この結果もこれまでの同様のコホートを解析した過去報告と相同であった。これらの結果から、解析対象とした収集コホートの妥当性が担保された。

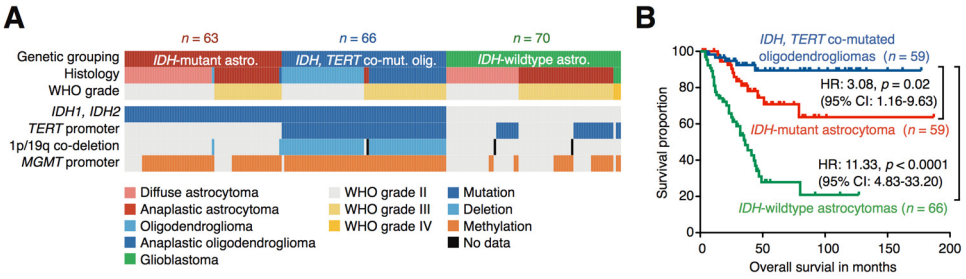


図 2. 収集コホートの検証

A にコホートの分子分類上の各種遺伝子変異、染色体欠失状態をしめす。

B に分子分類に基づいた予後データを供覧する。

2. 腫瘍局在解析

図 3 に示すように、oligodendroglioma，*IDH*-mutant，*TERTp*-mutant；astrocytoma，*IDH*-mutant；astrocytoma，*IDH*-wildtype のそれぞれは特徴的な空間分布を示した。具体的には oligodendroglioma，*IDH*-mutant，*TERTp*-mutant は前頭葉に好発し、astrocytoma，*IDH*-mutant は前頭葉から側頭葉に後発し、astrocytoma，*IDH*-wildtype は頭頂葉から深部白質に後発した。

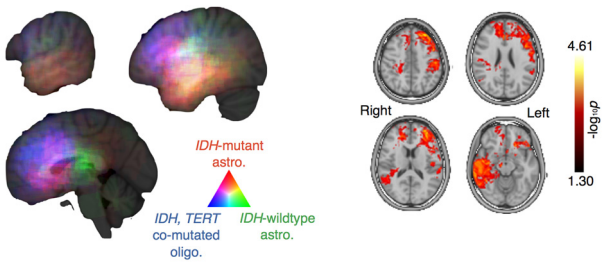


図 3. 腫瘍局在解析

腫瘍局在を MNI152 標準脳画像（座標）上に重畳している。左図では 3 種類の分子分類上の神経膠腫の好発部位がカラーマップで示されている。右図では random permutation analysis により、有意に分子分類上腫瘍局在に偏りがあった部位がハイライトされている。

3. Radiomics による WHO grade II/III 神経膠腫の画像特徴

図 4 に本研究で解析対象となった WHO grade II/III 神経膠腫の radiomics 解析によって得られた画像特徴量のヒートマップならびに、各 3 群で有意差を見出した画像特徴量を示す。11 種類の画像特徴量は $p < 0.001$ という検定値をして有意差をみとめるものであった。それら 11 種類のうち、3 種類は腫瘍局在に関連するもの、4 種類は T2 強調画像に関連するもの、一つは VOI 形状に関連するものであった。

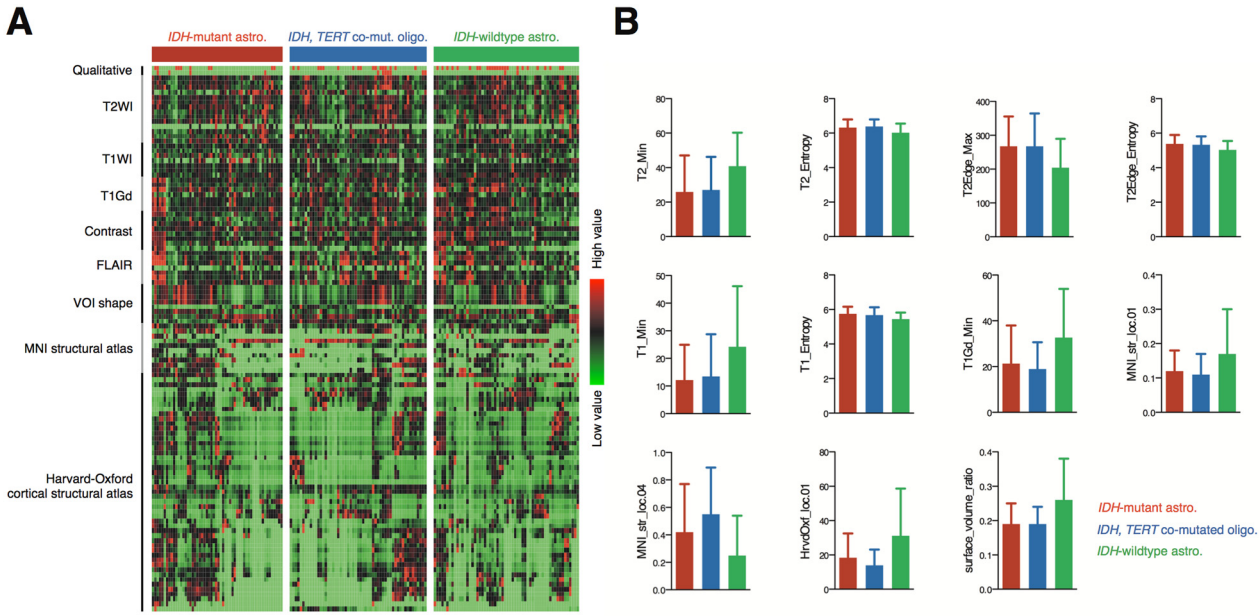


図 4. Radiomics 画像特徴量

A に radiomics 画像特徴量のヒートマップを示し、B に 3 群間で $p < 0.001$（Two way ANOVA）と大きな有意差を認めた 11 種類の画像特徴量の実測値をしめす。

4. Radiomics による *IDH* 遺伝子変異の予測モデル確立

LASSO regression 解析により radiomics で得られた画像特徴量から IDH 遺伝子変異予測モデル確立をおこなった。図 5A にあるように探索コホートならびに検証コホートにおいて、80%を超える精度で IDH 遺伝子変異の予測が可能であった。図 4B にあるように、モデル構成要素は各種パラメーターより成り立っていたが、造影効果や腫瘍局在がモデル構成に大きく寄与していることが明らかとなった。3 群弁別精度は 56%程度であった。

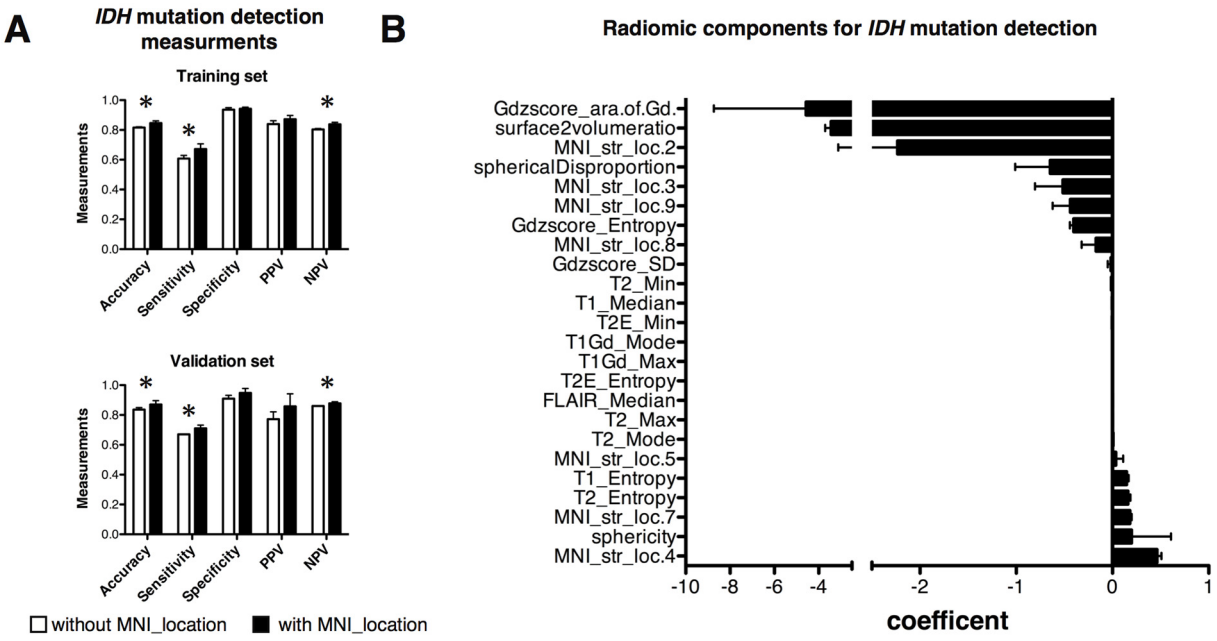


図 5. Radiomics 画像特徴量による *IDH* 遺伝子変異予測

A に radiomics 画像特徴量による *IDH* 遺伝子変異予測精度結果を示す。

* $p < 0.05$（paired t-test）B にはモデル構成要素を示す。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、国立がん研究センター中央病院脳脊髄腫瘍科・成田善孝と大阪医療センター臨床研究センター・金村米博、ならびに大阪大学大学院医学研究科脳神経外科・有田英之である。サンプル収集には関西中枢神経系腫瘍分子診断ネットワーク各位の多大なる協力を得た。

文　献

1) Jenkinson M, Smith S. A global optimisation method for robust affine registration of brain images. Med Image Anal. 2001;5:143–56. PMID:11516708.

2) Hirayama R, Kinoshita M, Arita H, Kagawa N, Kishima H, Hashimoto N, et al. Voxel-based lesion mapping of meningioma: a comprehensive lesion location mapping of 260 lesions. J. Neurosurg. 2017;:1–6. DOI: 10.3171/2017.3.JNS17619.

3) Kinoshita M, Sasayama T, Narita Y, Yamashita F, Kawaguchi A, Chiba Y, et al. Different spatial distribution between germinal center B and non-germinal center B primary central nervous system lymphoma revealed by magnetic resonance group analysis. Neuro-Oncology. 2014;16:728–34.

4) Haralick RM, Shanmugam K. Textural features for image classification. IEEE Transactions on systems. 1973.

5) Kickingereder P, Burth S, Wick A, Götz M, Eidel O, Schlemmer H-P, et al. Radiomic Profiling of Glioblastoma: Identifying an Imaging Predictor of Patient Survival with Improved Performance over Established Clinical and Radiologic Risk Models. Radiology. 2016;:160845.