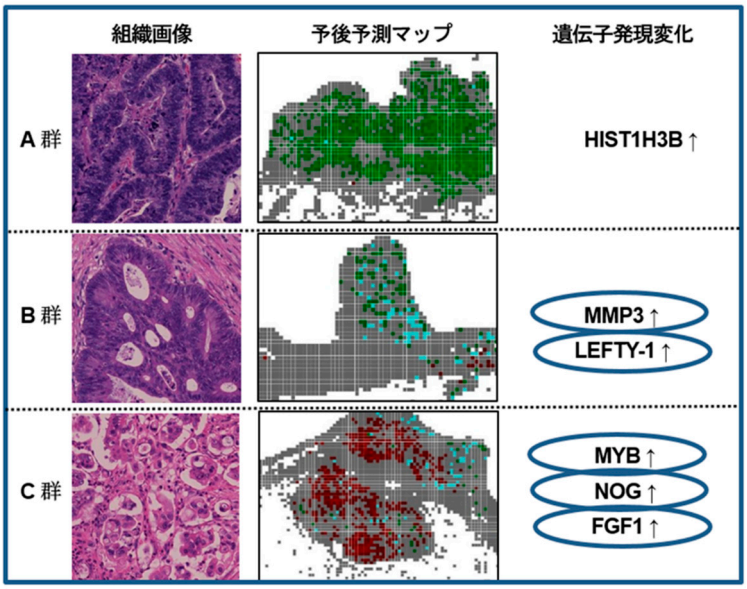
201　AIによる大腸癌予後予測：病理組織とゲノムの統合解析	高松　学

【目的】進行大腸癌の病理組織画像（HE 染色）を人工知能（AI）により解析し、予後に関連する病理組織形態を示す腫瘍成分の遺伝子発現解析を組み合わせることで、腫瘍内不均一性を考慮した予後予測モデルの開発を行う。

【方法】予後予測モデルを構築する症例群 1（モデル構築症例）は、2007 年～2009 年にがん研有明病院で手術された進行大腸癌 355 症例を対象とし、各症例の最大割面を含む組織スライドガラスをデジタル化（Whole-slide image：以下 WSI）した。症例は、転移の無い予後良好群（A、n＝182）、転移が有り 5 年間生存した群（B、n＝123）、転移があり 5 年以内に死亡した群（C、n＝25）の 3 群にわけ、それぞれの群の WSI から 299 μm 四方のタイル画像を切り出し、癌成分を含むタイル画像を選別するための組織型分類 AI モデルを作製した。得られたモデルにより癌画像を選択的に抽出し、それらを対象として A、B、C の各群を教師ラベルとする機械学習を行った。得られた予後分類 AI モデルを用いて、独立した症例群 2（2020 年 1 月～6 月の連続、151 症例）の予後予測マッピングを行い、A、B、C 各群に属すると予測されるタイル画像が、それぞれ集簇する症例を発現解析症例として選抜した。それぞれの群について、FFPE 切片において集簇するタイルに一致する範囲を選択的マイクロダイセクションにより回収し、RNA を抽出した。核酸デジタルカウント技術（nCounter）を用いて、各群の mRNA 発現量をパネル定量し、各群を特徴付ける発現変化のみられる遺伝子の特定を行った。

【結果】症例群 1 のうち、A 群は 234,252 枚、B 群は 158,583 枚、C 群は 33,866 枚の癌タイル画像が得られた。予後分類 AI による症例群 2 の分類では、A、B、C 各群に属すると推定される癌タイル画像の組織形態学的な特徴が、症例群 1 の分類結果と類似性を示した。A、C 群と予測するタイルは集簇する傾向がみられたが、B 群と予測するタイルは散在する傾向がみられた。発現解析のための選択的組織ダイセクションに適する症例は、A、B、C の各群と AI が予測するタイルが集簇する、それぞれ 12 症例、6 症例、12 症例の計 30 症例となった。遺伝子発現の階層クラスタリングでは、A 群と B および C 群との間で遺伝子発現パターンに差がみられ、特にドライバー遺伝子関連では比較的明瞭に区別された。特に発現差の大きかった遺伝子は、*NOG*、*CACNA2D4*、*MYB*、*FGF1*、*FGF10* 等であり、既知の予後関連遺伝子が含まれていた。B 群と C 群の比較では、A 群との比較ほど差がみられなかったが、一部の遺伝子（*MMP3*、*LEFTY-1* 等）で有意な発現差がみられた。これらの結果により、AI の予測する組織形態は遺伝子発現パターンと相関し、大腸癌の予後を規定し得る因子であることが確認された。

予後に関連する病理組織画像と AI による予後予測マップおよびそれに関連する遺伝子発現の変化



201. AIによる大腸癌予後予測：病理組織とゲノムの統合解析

高松　学

がん研究会 がん研究所 病理部

Key words：人工知能，大腸癌，予後予測，mRNA，病理組織画像

緒　言

癌治療の進歩により、複数の治療の組み合わせから患者に合ったものを提供するプレシジョン医療の概念が浸透してきている。このプレシジョン医療の基盤の一つである腫瘍のゲノム情報は、治療標的となる癌の特性を表す点で極めて重要であるが、多くの場合、癌の一部の特性を把握するに過ぎず、腫瘍内不均一性を前提とした状況では、治療抵抗性などの理由により、その効果が不十分となる恐れがある。不均一な腫瘍集団を効率的に評価するためには、ある程度広範囲な腫瘍特性の把握が必要となり、病理組織標本のように腫瘍一面を対象とするのが適当と考えられるが、人間が行う従来の組織分類・評価法では定量性に限界があり、かつ再現性の保たれた評価が難しい。人工知能（AI）の活用は、この問題を解決する鍵となる。

近年、医療におけるAIの応用は急速に広まりつつある。特に、深層学習を始めとするコンピュータ技術の革新は、医用画像の研究領域に大きな変化をもたらし始めている。病理組織画像もその一つであり、すでに数多くの研究成果が公表されている。ここ数年で、HE染色と特定の遺伝子変異情報をAIに学習させ、肺癌や大腸癌における遺伝子変異確率を組織画像から予測するモデルが公表されている［1，2］。これらの研究は、病理組織画像と既知因子を用いた、AIによる教師あり学習により、患者の予後や腫瘍の特定の遺伝子変異を予測することで、効率的な医療を実践しようとする大変有益な試みである。ただ、上述のように遺伝子変異解析では腫瘍内不均一性の評価は難しく、遺伝子発現解析を行う方が、より病理組織画像との精密な関連を解析できると考えられる。

本研究では、進行大腸癌の病理組織画像と患者予後情報から、それらに関連する形態学的特徴を有する腫瘍細胞集団をAIによって特定し、それらの癌成分の遺伝子発現をパネル解析することにより、新たな視点から進行大腸癌の予後を予測するモデルの確立を試みた。

方法および結果

1．研究対象症例の選定と大腸癌病理組織スライドのデジタル化

1）研究対象症例

予後予測AIモデル構築を行う症例（以下、モデル構築症例）は、がん研有明病院で2007年から2009年に治療された進行大腸癌症例（pT2およびpT3）を対象とした。術前化学療法、内視鏡切除後、多重癌、他院借用検体は除外対象とした。pT2症例とpT3症例の同一期間における症例数の差が大きいため、pT2は2007年～2009年、pT3は2008年～2009年のそれぞれ連続症例とし、前者は151症例、後者は204症例となった（症例群1）。遺伝子発現解析の対象症例（以下、発現解析症例）は、RNAの質担保のため比較的検体の新しい2020年1月から6月末までの連続症例151症例（症例群2）とした。

2）症例群分け

モデル構築症例については、A：予後良好群（転移無・5年無再発生存）、B：化療後生存群（転移有・化学療法実施後5年生存）、C：化療後死亡群（転移有・化学療法実施後5年以内に死亡）の3群とした。予後調査の結果、症例群1から除外した症例は、A群20症例（5年予後追跡不可）、B群3例（化学療法なし、または5年予後追跡不可）、C群

2 例（化学療法なし）であり、最終的な解析対象は pT2 大腸癌 134 症例と pT3 大腸癌 196 症例となった。

3）大腸癌組織スライドガラスのデジタル化

いずれの症例群も、病変の最大径を含む 1～数枚の切片を画像解析対象とし、それらのスライドガラスをデジタルスライドスキャナ（浜松ホトニクス、NanoZoomer）でデジタル化（Whole-slide image：以下 WSI）した。WSI ファイル数（スライドガラス枚数）は、モデル構築症例で計 521 個、発現解析症例で 210 個となった。以降の解析は、WSI から 299 pixel 四方のタイル画像を切り出して行った。

2. 大腸癌組織画像の抽出と教師あり機械学習

1）大腸癌組織画像の抽出

モデル構築症例からランダム抽出した 100 症例について、組織型をラベル付けしたタイル画像（計 248,762 枚、うち癌画像は 48,503 枚）を用いて、教師あり学習（ベースモデル：MobileNetV2）を行い、癌部を抽出する組織分類 AI を作製した。この AI モデルを用いて、モデル構築症例全体から癌画像を抽出し、癌判定の確率が 0.8 以上となるタイル画像を以降の解析対象とした。モデル構築症例のうち、A 群は 234,252 枚、B 群は 158,583 枚、C 群は 33,866 枚の癌部タイル画像が得られた。代表的なタイル画像を図 1 左に示す。

2）教師あり機械学習と予後予測モデル構築

2-1）で得られたタイル画像群に対し、ABC 各群の教師ラベルを付与し、教師あり学習による AI モデル構築を行った。AI モデル精度を向上させるため、学習回数（iteration）と学習強度（learning-rate）を調整した。3 群分類であるため、分類精度の最低値は 0.333 となるが、最終的にモデルの精度は 0.510（損失関数：0.985）となった。この AI モデルにより発現解析症例（151 症例、WSI 210 枚）の癌タイル画像を分類した代表的な画像を図 1 右に示す。

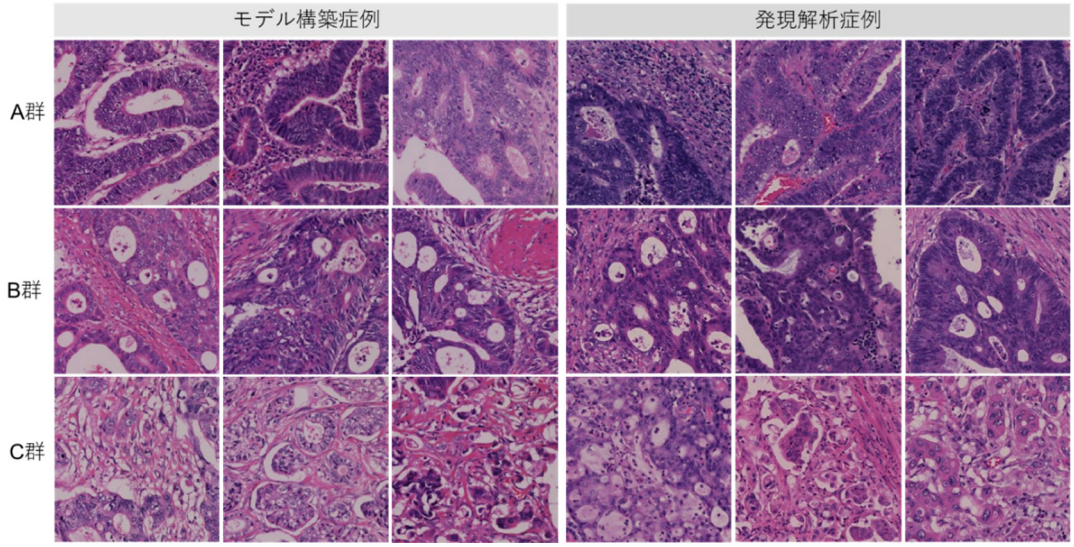


図 1. モデル構築症例と発現解析症例における ABC 各群の代表的な組織像
発現解析症例については AI による各群予測値の高いタイルを表示している。左半分と右半分は全く別のコホートであるが、AI が ABC 各群と推定した画像は類似の組織学的特徴を有していることが確認できる。なお、いずれのタイル画像もそれぞれ別の症例から選抜した。タイル画像 1 片＝300μm。

3. 発現解析症例の予後予測マップ作製と各群の RNA 抽出

1）予後予測マップの作製

2-2）で得られた AI モデルを用いて、発現解析症例 151 症例を対象としたタイル画像ベースの予後予測マップを作製した。各群の代表的なマップを図 2 に示す。ABC の各群で出現頻度が高いと予測される同一種類のタイルが集簇しクラスタを形成する症例（以下、A／B／C 群予測症例）を、それぞれの群のタイル数の上位から選抜した。A 群

予測タイルと C 群予測タイルは集簇する症例が多くみられたが、B 群予測タイルは概して散在する傾向があり、選択的組織ダイセクションでゲノムを収集しうる症例が少なかった。結果として、ダイセクションの対象症例は、A 群予測症例は 12 症例、B 群予測症例は 6 症例、C 群予測症例は 12 症例となった。

2）RNA 抽出

3-1）で選抜した計 30 症例について、AI による予後予測マップを参照しつつ、各群に予測する成分のみを FFPE 切片（各症例につき 10 μm 厚切片 5 枚）から選択的組織ダイセクションで回収した。同様に、背景粘膜部分もコントロールサンプルとして 8 サンプル分回収した。そして、それぞれの FFPE サンプルから全 RNA を抽出した（RNeasy for FFPE kit、Qiagen 社）。RNA の断片化度合を測定するクオリティチェックは TapeStation（Agilent Technologies 社）で行い、mRNA 収量を見積もるため、300 nt 以上の長さをもつ RNA の比率を算出した。結果として、300 nt 以上の RNA が 40%未満であったコントロールサンプル 2 検体分を除外し、36 検体を対象に以降の発現解析を行った。

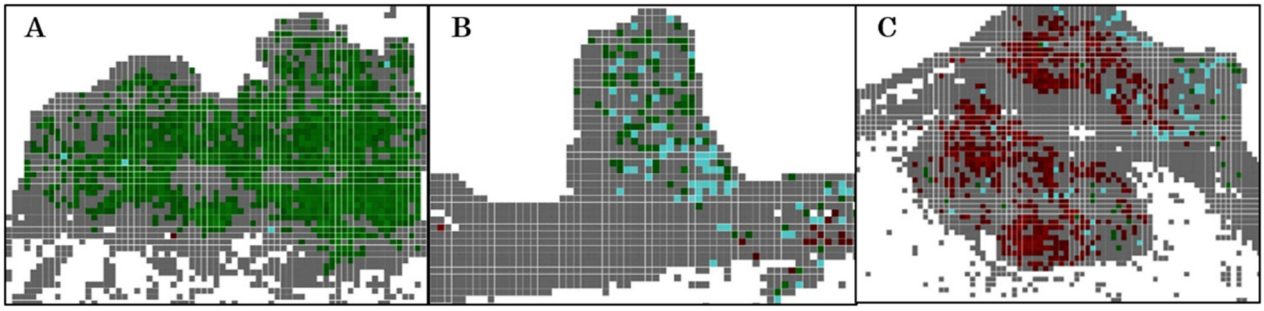


図 2. 発現解析症例の予後予測マップ

緑色タイル : A 群予測、水色タイル : B 群予測、赤色タイル : C 群予測、灰色タイル : 癌以外の組織型。各色のタイルが密に集簇している部分を選択的にダイセクションした。A は A 群予測タイルでほぼ占められており、転移再発しないと予測される症例、B は B 群予測タイルが優勢であるが、A または C 群と予測されたタイルが混在する症例、C は C 群予測タイルで占められる症例で、予後不良と推測される症例。各タイル画像の 1 片が 299 ピクセル（約 300 μm 相当）。

4. nCounter パネルによる mRNA 定量

3 で抽出した全 RNA について、300 nt 以上の RNA が 40%以上を占める検体は 150 ng、同 40%未満の検体は 300 ng の RNA 量となるよう濃度調整し、nCounter を用いて PanCancerPanel の 770 遺伝子について mRNA のデジタルカウントを行った。解析のクオリティは専用解析アプリケーションである nSolver 4.0 で行った。一部症例で mRNA とプローブのハイブリダイゼーションしたシグナル密度（binding density）が異常高値となる現象（RNA の断片化が一因）が観察されたため、該当サンプルの再検を行った。結果として、RNA 断片化による誤計測の影響を低減すべく、B 群予測症例 1 例、C 群予測症例 4 例、背景粘膜 1 例を以降の解析から除外した。

5. 遺伝子発現の群間比較

計測対象となったすべての遺伝子を対象に階層クラスタリング法により発現解析症例の分類を行った。結果として、A 群と予測した癌成分（n=12）と、B（n=5）または C 群（n=8）と予測した癌成分との間には明瞭な遺伝子発現の差がみられた。特にドライバー遺伝子関連に絞ってクラスタリングを行うと、A、B、C 各群それぞれの遺伝子発現パターンに特徴がみられた（図 3）。コントロールとした背景粘膜は独立したクラスタを形成した。表に各群間で発現に有意差（$p<0.01$）のみられた代表的な遺伝子を表に示す。

B または C 群に属すると AI が予測した癌成分は、同 A 群の成分に比して *NOG* の発現が有意に高かった（表左上および右下）。他には *FGF* や *WNT* 関連遺伝子が、同様の群比較で発現量に有意差を示した。C 群を特徴づける発現変化は、*NOG* および *FGF1* の高発現と、*MYB* の低発現であった（表 1 右上）。一方、B 群予測成分と C 群予測成分の間では有意差を示す成分は少なく、*MMP3* が最も発現差がみられた（表 1 左下）。

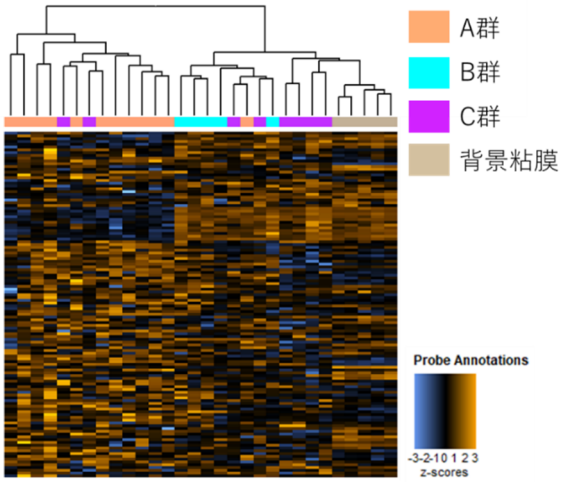


図 3. ドライバー遺伝子の階層クラスタリング

AI が A 群と予測した癌成分と、B または C 群と予測した癌成分とは、明瞭な遺伝子発現パターンの違いがある。また B 群あるいは C 群と予測した癌成分の間にも異なる発現パターンを示す遺伝子群がある。

表 1. 各群間で発現に有意差のみられた代表的な遺伝子群

A 群 vs B 群

遺伝子名	Log2 fold change (B/A)	p 値*
NOG	3.51	<0.00001
PTCRA	3.90	<0.00001
CACNA2D4	4.19	<0.00001
FGF10	2.82	<0.00001
RASGRF2	2.09	<0.00001

A 群 vs C 群

遺伝子名	Log2 fold change (C/A)	p 値*
MYB	-1.45	<0.000001
NOG	3.13	<0.00001
FGF1	2.32	<0.00001
HIST1H3B	-1.81	<0.00001
WNT16	3.90	<0.00001

C 群 vs B 群

遺伝子名	Log2 fold change (B/C)	p 値*
MMP3	2.93	<0.001
LEFTY-1	2.82	<0.01
PCK1	2.44	<0.01
MYB	1.25	<0.001

A 群 vs B & C 群

遺伝子名	Log2 fold change (BC/A)	p 値*
NOG	3.30	<0.0000001
CACNA2D4	3.79	<0.000001
RASGRF2	1.89	<0.000001
HIST1H3B	-1.80	<0.000001
WNT16	3.96	<0.000001

* Student *t*-test.

考　察

この研究では、不均一な細胞集団である進行大腸癌から、予後情報を教師データとする病理組織画像の機械学習で樹立した予後予測 AI によって、類似した形態学的特徴をもつ細胞集団を抽出し、予後に関連するそれらの病理組織画像に対応する遺伝子発現の特徴を統合的に解析した。既報にあるように、病理組織画像から遺伝子変異や融合遺伝子を推定する AI では、一定の腫瘍集団を選別し、分子標的治療など特定の治療法に結び付ける重要な方法であるが、遺伝子異常のみの評価では腫瘍内不均一性を克服するのは難しいと考えられ、腫瘍内に存在する各成分の発現解析をする方が不均一性をより正確に反映すると考えられる。本研究では、転移再発なし（A）、あり（B、C）群という 2 群間比較に

おいては、形態学的にも、遺伝子発現解析の結果からも、適切に分類できていると考えられる。発現に差のみられたいくつかの遺伝子は浸潤や転移に関連するものであり、予後不良因子となりうるものであった。例えば、A 群に比し B 群で高発現を示す *FGF10* は、大腸癌ではより進行した癌で発現が高いという報告がある［3］。また、A 群に比し C 群で高発現を示す *FGF1* は浸潤転移に関連するという報告がある［4］。これらの知見は、転移再発の有無という予後を教師データとした場合に、AI が病理組織画像全体から選別した B または C 群に特徴的な癌成分が、転移や浸潤に関連していることを示すものであり、AI による予後予測がそれらの遺伝子発現とも関連することを示すものである。単なる病理組織画像の統計的な出現頻度のみならず、遺伝子学的な背景からも予後予測モデルの根拠を説明しうるという点で、この事実は非常に重要である。また、A 群に比して B、C 両群で上昇の見られた *Noggin (NOG)* は、bone morphogenetic protein（BMP）のアンタゴニストであり、前立腺癌の骨転移との関連が示唆されているが［5］、大腸癌については判明していない点が多く、予後に影響を与えうる因子として重要かもしれない。一方で、B 群と C 群の分類については、形態的には差異がみられたものの、遺伝子発現解析においては、A 群との比較ほど明確な発現差がみられなかった。これは、C 群の機械学習用症例数が比較的少数であった（n＝25）ことも影響していると考えられるが、加えて、手術時に転移がなくその後転移再発した症例と、手術時既に転移があった症例が混在していることもあり、5 年以内死亡の有無というエンドポイントでは十分明確に特徴を選別できていなかった可能性がある。それでも、遺伝子発現有意差がみられるものが幾つかみられ、*MMP3* は大腸癌において癌の進展に関連する因子として報告されており、予後不良因子として重要なものである可能性がある［6］。

本研究で得られた知見は病理組織形態と予後、遺伝子発現変化を結びつけるもので、今後他臓器への研究発展により、不均一性を前提とした上皮性腫瘍の特性解析に重要な役割を果たすと考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究にあたり、標本薄切、遺伝子発現解析等において、技術的な支援をいただいた、がん研究所病理部の岩越元吉技師、長野裕子技師、馬場郷子技師、朝賀礼美技師に深謝申し上げる。

文　献

1） Coudray N, Ocampo PS, Sakellaropoulos T, et al. Classification and mutation prediction from non–small cell lung cancer histopathology images using deep learning. Nat Med. 2018 Oct;24(10):1559-1567. PMID: 30224757 DOI: 10.1038/s41591-018-0177-5.

2） Kather JN, PearsonvAT, Halama N, et al. Deep learning can predict microsatellite instability directly from histology in gastrointestinal cancer. Nat Med . 2019 Jul;25(7):1054-1056. PMID: 31160815 DOI: 10.1038/s41591-019-0462-y.

3） Qazvini FF, Samadi N, Saffari M, et al. Fibroblast growth factor-10 and epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer. EXCLI J 2019 Jul 17;18:530-539. PMID: 31611737 DOI: 10.17179/excli2018-1784.

4） Henriksson, ML, Edin, S, Dahlin, AM, et al. Colorectal cancer cells activate adjacent fibroblasts resulting in FGF1/FGFR3 signaling and increased invasion. Am J Pathol 2011 Mar;178(3):1387-94. PMID: 21356388 DOI: 10.1016/j.ajpath.2010.12.008.

5） AlShaibi HF, Ahmed F, Buckle C, et al. The BMP antagonist Noggin is produced by osteoblasts in response to the presence of prostate cancer cells. Biotechnol Appl Biochem 2018 May;65(3):407-418. PMID: 28981962 DOI: 10.1002/bab.1619.

6） Sipos F, Germann TM, Wichmann B, et al. MMP3 and CXCL1 are potent stromal protein markers of dysplasia-carcinoma transition in sporadic colorectal cancer. Eur J Cancer Prev. 2014 Sep;23(5):336-43. PMID: 24999605 DOI: 10.1097/CEJ.0000000000000058.