

博士論文（要約）

胃癌深達度予測の為に AI システムの開発並びに
粘膜下層浸潤に着目した網羅的遺伝子発現解析による検討

永尾 清香

胃癌は主要な癌の一つであり、世界での全癌死亡数のうち第2位とされている。胃癌の予後の改善は、解決すべき課題であるが、早期胃癌に対して治療を行う事で良好な予後が得られることがわかってきている。近年では内視鏡的粘膜下層剥離術（ESD）の発達により、潰瘍瘢痕の有無や病変の大きさに関わらず多くの早期胃癌が内視鏡的に一括切除可能になり、かつ外科治療と遜色ない良好な長期予後が報告されている。ESD根治度判定の基準として、組織型・病変長径・脈管侵襲の有無・潰瘍瘢痕の有無と並んで、深達度診断が重要な因子とされる。多くの粘膜内癌（M癌）および粘膜筋板から500 μm未満の粘膜下層浸潤癌（SM1癌）の場合、ESD後経過観察が許容され、粘膜筋板から500 μm以上の粘膜下層浸潤癌（SM2癌）およびそれ以深の癌では追加外科切除の適応となる。よって胃癌深達度診断において、M・SM1癌か、SM2以深の癌かの診断が重要であるが、これまでに確立された客観的な診断法がないのが現状である。臨床では主に内視鏡的肉眼所見から術前深達度予測が行われているため、主観的評価となり内視鏡医により診断が異なるという問題があり、解決すべき課題である。

本研究では、胃癌深達度診断に対する、Artificial intelligence（AI）の有用性の検討と網羅的遺伝子発現解析による深達度マーカーの探索を行った。内視鏡の分野でもAI診断システムの開発が進み、胃癌の存在診断、大腸ポリープの存在・鑑別診断、*Helicobacter pylori*感染の診断、小腸カプセル内視鏡における病変の存在診断などの研究が行われ、AIの有用性が報告されている。一方で胃癌深達度に関するAI診断の有効性の報告はこれまでわずかしかなかった。また、近年網羅的遺伝子発現解析が消化管分野においても用いられるようになってきているが、胃癌深達度診断に有用なマーカーは確立していない。そこで本研究では、胃癌深達度診断の客観的指標の確立を目的に、AIシステムの構築と有用性の検討、網羅的遺伝子発現解析によるマーカーの探索を行った。

まず、AIによる胃癌深達度診断システムの構築と有用性の検証、通常光画像（WLI）・非拡大狭帯域光画像（NBI）・インジゴカルミン散布画像（Indigo）での比較を行った。本研究において、当院で2013年1月～2019年6月までの間に内視鏡治療または外科手術を施行され、最終病理診断で胃腺癌と診断された症例かつ、術前の内視鏡が当院で行われている症例を対象とした。最終病理診断が胃底腺型胃癌であった病変、何らかの前治療歴がある病変、ハレーションなどにより観察不良である画像、同一画像内に複数病変が写っている画像は除外とした。この研究において1084症例、16556枚が対象となった。対象病変画像をAIシステムの教育用とテスト用に4:1でランダム割付を行い、さらに教育用データの中でTrainingとValidationにランダムに、4:1で分けた。Convolutional Neural NetworkであるResNet50を用いて、それぞれWLI・NBI・Indigoを使用した3つの独立したAIシステムを開発した。構築されたAIシステムはその画像がSM2以深かどうかを予想し、probability scoreを画像毎に算出した。また、probability scoreが高ければ、SM2以深と予想するものとし、最適カットオフを設定することとした。病変毎の正解は、その病変で過半数以上の画像で正解していた場合とした。WLIを使用したAIシステムをAIシステム（WLI）、NBIを使用したものをAIシステム（NBI）、Indigoを使用したものをAIシステム（Indigo）と定義した。AIシステム（WLI）のreceiver operating

characteristic (ROC) 曲線を SM2 以深を陽性として描くと、area under the curve (AUC) は 0.96 であった。Youden index によると probability score の最適カットオフは 0.54 であり、AI システム (WLI) の正解判断は 0.54 をカットオフとして用いた。AI システム (WLI) の感度・特異度・正診率・陽性的中率・陰性的中率はそれぞれ、画像毎で 89.2%・98.7%・94.4%・98.3%・91.7%で、病変毎で 84.4%・99.4%・94.5%・98.5%・92.9%であった。病変毎の正診率は AI システム (WLI)・(NBI)・(Indigo) でそれぞれ、94.5%・94.3%・95.5%で有意差は認めなかった ($p = 0.93$)。

本研究では高精度の胃癌深達度診断 AI システムを構築した。今回構築した AI システムは画像毎の胃癌深達度診断においても 94.4%の正診率であり、感度 89.2%・特異度 98.7%と有用性が示唆された。今回使用した画像枚数がこれまでの既報に比べて多く、様々な角度・距離の画像を使用していることが、AI システムの精度向上につながった可能性が考えられた。本研究では WLI・NBI・Indigo それぞれの画像を使用した AI システムの性能を比較したが、病変毎の正診率において、これらの 3 つの AI システムに有意差は認めなかった。しかし、今回 WLI に比べ NBI・Indigo では使用画像枚数が少なく、NBI・Indigo の画像枚数が増えればさらに精度が向上する可能性も考えられる。また、本検討は単施設後ろ向き研究であり、バイアスが存在する可能性が排除できず、今後内視鏡医との前向き多施設比較研究が望まれる。

次に、胃 M 癌と SM2 癌の術前生検検体を集積し、生検検体を用いた網羅的遺伝子発現解析を行い、M 癌と SM2 癌で有意に発現の異なる遺伝子を同定することを目標とした。この同定された遺伝子のうち、代表的な遺伝子についてそのコードする蛋白質を、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織を用いて免疫組織学的検証を行い、有用性を検討することとした。胃癌の治療前に腫瘍部・背景部から生検検体を採取し、術後病理診断において分化型腺癌優位であったもののうち、M 癌 8 症例 SM2 癌 8 症例およびその背景部、計 32 検体より RNA を抽出した。これらに対して Platform: SurePrint G3 Human Gene Expression 8x60K v3 (Agilent, Inc., Santa Clara, CA, USA) で網羅的遺伝子発現解析を行った。M 癌と SM2 癌の腫瘍部と背景部の差について mRNA 発現量を比較し、SM2 癌が M 癌に比べ平均値で 2 倍以上大きいものは 1871 probe、その反対のものは 1766 probe であった。M 癌と SM2 癌で変動の大きかった forkhead box I1 (FOXI1)・carbonic anhydrase 4 (CA4)・MAGE family member A6 (MAGEA6)・defensin alpha 5 (DEFA5) を候補とし免疫組織化学染色を行った。当院で過去に内視鏡治療を施行された FFPE 組織のうち、2015 年～2018 年までの間の分化型優位で病変長径 10 mm 以上の SM2 癌 50 症例を対象とした。また、M 癌は 2015 年～2018 年までの間の、分化型優位で病変長径 10 mm 以上の症例を 50 症例ランダムに選定した。FOXI1・CA4・MAGEA6 に関しては背景部・M 癌腫瘍部・SM2 癌腫瘍部ともに染色され、明らかな差を認めなかった。DEFA5 については 400 倍で腫瘍部をランダムに 10 視野顕鏡し評価を行ったところ、DEFA5 の平均陽性細胞数は、M 癌で 3.84 ± 8.35 、SM2 癌で 0.37 ± 1.42 であり、有意差を認めた ($p < 0.001$)。DEFA5 の ROC 曲線を SM2 以深を陽性として描くと、AUC は 0.71 であった。Youden index によると最適カットオフは 0.00 であった。DEFA5 が陰性の場合を SM2 癌、陽性の場合を M 癌とし、DEFA5 によ

る SM2 癌の診断能を評価した。感度・特異度・正診率・陽性的中率・陰性的中率はそれぞれ、78.0%・58.0%・68.0%・65.0%・72.5%であった。DEFA5 は胃 SM2 癌において M 癌に比べ有意に陽性細胞数が低下しており、有用な深達度診断マーカーとなる可能性が示唆された。

DEFA5 は小腸のパネート細胞に発現することが知られているため、粘液形質によって DEFA5 の発現様式が異なるかを評価した。腸型胃癌の 72.0%で DEFA5 陽性であった一方で、胃型胃癌のうち 26.9%で DEFA5 陽性であり、粘液形質と DEFA5 の相関を認めた ($p < 0.001$)。マイクロアレイデータにおいても DEFA5 の発現と相関の高い遺伝子には、腸管に特異的な遺伝子が多く含まれていることを見出した。本研究の網羅的遺伝子発癌解析を施行した症例が少なく、今後更なる症例集積が望まれる。また、DEFA5 は胃癌抑制的に働くと想定されるが詳しい機序はわかっておらず、検討が必要である。

本研究の最大の意義として以下の 2 点が挙げられる。今回構築した胃癌深達度診断 AI システムは通常光画像・非拡大狭帯域光画像・インジゴカルミン散布画像いずれにおいても高い正診率であり、有用性が示された。さらに網羅的遺伝子発現解析および免疫組織学的検証により、DEFA5 の胃癌深達度診断マーカーとしての有用性が示唆された。

今後は胃癌深達度診断 AI システムの他施設データでの有用性の検証や、網羅的発現解析のためのさらなる症例集積が望まれる。