

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08230

研究課題名（和文）放射線治療による腫瘍免疫活性化の予測法の開発

研究課題名（英文）Development of a method for predicting tumor immune activation by radiotherapy

研究代表者

長谷川 智一（HASEGAWA, TOMOKAZU）

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：80631168

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：機械学習法を用いて、精度の高い臨床応用が容易な放射線治療による腫瘍免疫活性化の予測モデルを作成することであるが、前段階として生検標本を使用した免疫組織染色による放射線治療効果予測モデルを作成した。前立腺がん、下咽頭がんともに、従来法と比較してのANNを用いた解析では予測精度の向上を実現した。

さらに子宮頸癌のサンプルを用いて、免疫組織染色の判定にQuPathソフトウェアを用いて分類して定量化を行い、手動計数の結果と比較して有意な差がないことを検証した。今後、中咽頭癌のサンプルでも同様の解析を行い、免疫組織染色の判定方法の客観的評価と自動化を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在は、放射線治療が施行される場合、腫瘍の大きさや組織型が同じであれば画一的な線量が照射されているが、治療成績にばらつきがあり、癌組織の放射線感受性に応じた、個別化した放射線治療が求められている。放射線治療と免疫チェックポイント阻害剤の併用は行われ始めているが、最適な併用法や増感メカニズムなど未解明な点が多く、精度の高い臨床応用が容易な放射線治療による腫瘍免疫活性化の予測モデルの作成を目指す。

研究成果の概要（英文）：The objective is to create a prediction model of tumor immune activation by radiotherapy using machine learning methods with high accuracy and easy clinical application. As a preliminary step, a radiotherapy effect prediction model was created by immunohistochemistry using biopsy specimens. Both prostate and hypopharyngeal cancers showed improved prediction accuracy in the analysis using ANN compared to the conventional method.

In addition, using samples of cervical cancer, we used QuPath software to classify and quantify the immunohistochemistry staining decisions, and verified that there was no significant difference compared to the results of manual counting. In the future, we will perform the same analysis on samples of mesopharyngeal carcinoma, aiming for objective evaluation and automation of the determination method of immunohistochemical staining.

研究分野：放射線治療

キーワード：ニューラルネットワーク 腫瘍免疫

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在は、放射線治療が施行される場合、腫瘍の大きさや組織型が同じであれば画一的な線量が照射されているが、治療成績にばらつきがあり、癌組織の放射線感受性に応じた、個別化した放射線治療が求められている。最近、放射線治療により免疫応答を惹起して、腫瘍細胞を細胞死に至らせる免疫原性細胞死(Immunogenic cell death)の誘導の有無が放射線治療成績に影響を与えて可能性が指摘されている。

臨床的には抗 PD-1 抗体や、その他の免疫チェックポイント阻害剤が新規開発され、様々な癌に臨床応用されているが奏功する症例は限られており、どのような患者に対して薬剤を使用するかが世界的な研究のメインテーマになっており、PD-L1 発現や腫瘍遺伝子総量(Tumor Mutation Burden)、遺伝子発現プロファイルなど様々なバイオマーカーの模索がなされている。一方、放射線治療と免疫チェックポイント阻害剤の併用は行われ始めているが、最適な併用法や増感メカニズムなど未解明な点が多い。患者個々で、放射線治療による免疫原性腫瘍死の有無や程度が予測できれば、免疫チェックポイント阻害剤との個別化した、効果的な併用法の開発に寄与することが期待できる。

### 2. 研究の目的

我々の研究室では、子宮頸癌に対する術前化学放射線療法が行われた扁平上皮癌(SCC)104 例を解析し、以下の結果を得た(Tsuchiya, Strahlenther Onkol. 2020)。放射線治療前と比較して、腫瘍細胞の programmed death 1 ligand 1 (PD-L1) 発現は、放射線治療後に増加する。放射線治療後に腫瘍細胞の PD-L1 発現が陽性の症例は、陰性症例と比較して、全生存率が良好であった。放射線治療後の腫瘍細胞の PD-L1 が高発現例では、照射野外再発、つまり遠隔転移も有意に少なかった。

腫瘍に浸潤する細胞傷害性 T 細胞は、インターフェロン (IFN) などのサイトカインを分泌するが、腫瘍細胞は周囲の IFN を感知すると PDL1 をさらに多く発現するので、PD-L1 の発現は、細胞傷害性 T 細胞の活動性の指標である。

以上のように、我々は、腫瘍細胞の PD-L1 の免疫組織染色にて、放射線治療により誘導された腫瘍免疫の評価の可能性を示唆する結果を得た。しかし、実臨床で使用するには、以下の問題点がある。癌組織内での PD-L1 発現は heterogeneity が存在し、それを適切に評価する方法が確立されていない。腫瘍細胞の PD-L1 発現は、免疫微小環境の変化に従い、経時的に変化する。上記により、PD-L1 発現の客観的で再現性がある判定法の開発が困難であり、その解決が必要である。また、腫瘍免疫の指標は、腫瘍免疫の複雑さを反映して、腫瘍細胞や T リンパ細胞、樹状細胞などの腫瘍免疫担当細胞の PD-L1、PD-1、HLA I 発現、CD8 細胞数、CD4 細胞数、FoxP3 細胞数など多数ある。照射による腫瘍免疫の誘導の予測のためには、これらに、臨床因子や放射線治療の因子(照射の線量(1回、総線量)、タイミング、照射野(予防照射を含むか、involved field か))など、多因子が関与する複雑系に対する適切な解析手法が必要である。

### 3. 研究の方法

機械学習のアルゴリズムはニューラルネットワーク、サポートベクターマシン、決定木、単純ベイズなどから最適なものを選択する。機械学習のアルゴリズムのひとつである人工ニューラルネットワークでは、コンピュータ上に神経細胞組織を模した構造を作成し擬似的に神経活動を行わせることによって、線形分離し難い情報処理を行うことが可能で、問題となる入力信号と、その答えとなる出力信号を与え、学習させることにより、未知のデータに対しても正しい答えを出力することが可能となる。生検サンプル(放射線治療前)における腫瘍細胞や腫瘍免疫担当細胞の腫瘍免疫に関与する多種の蛋白の発現強度、放射線治療の因子を入力信号として、照射による腫瘍免疫活性化の指標である手術サンプルにおける PD-L1 の発現上昇を出力信号として、学習させることで予測モデルを作成する。

### 4. 研究成果

過去の研究結果である前立腺癌と下咽頭癌の症例をもとに、入力因子として Ku70 の免疫組織化学染色と臨床因子を用いて、放射線治療の結果を予測するための人工ニューラルネットワーク(ANN)モデルの適用を検討した。前立腺癌では、2007年8月~2010年10月の間に強度変調放射線治療(IMRT)を受けた58人と、2001年8月~2007年5月までの間に3次元コンフォーマル放射線療法(3D-CRT)を受けた21名を分析した。下咽頭癌では、2002年3月から2009年12月の間に放射線治療を受けた扁平上皮癌患者46例を分析した。標準フィードフォワード、バックプロパゲーションニューラルネットワークにより訓練された ANN モデルを使用して、放射線療法の治療結果を予測した。前立腺癌の解析において、年齢、グリソンスコア、生検陽性率、治療前 PSA 値、リスク分類、前立腺体積を臨床因子として使用した。同様に、下咽頭癌においては、年齢、性別、Performance status、臨床的 T ステージ分類、亜部位を臨床因子として使用した。

予測結果に基づいたROC曲線のArea under the curve (AUC)は、IMRT + ホルモン療法 (ADT) で治療した患者群で 0.939、IMRT 単独群で 0.803、3D-CRT 単独群で 0.960 であった。感度と特異度は、IMRT + ADT 群では 85.7%と 90.4%、IMRT 単独群では 75.0%と 88.5%、3D-CRT 単独群では 92.3%と 100%であった。下咽頭癌では、AUC は 0.901、感度と特異度はそれぞれ 66.7%と 88.2%であった (表 1)。

(表 1)

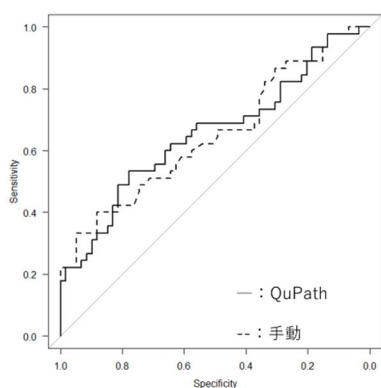
	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	Accuracy (%)	AUC
Discovery (n=28)						
ANN model	85.7	90.4	75.0	95.0	89.3	0.939
MLR model	71.4	85.7	62.5	90.0	82.1	0.884
Validation 1 (n=30)						
ANN model	75.0	88.5	50.0	95.8	86.7	0.803
MLR model	0.0	88.5	0.0	85.2	76.7	0.572
Validation 2 (n=21)						
ANN model	92.3	100.0	100.0	88.9	95.2	0.960
MLR model	69.2	100.0	100.0	66.7	81.0	0.885

さらに子宮頸癌のサンプルを用いて、免疫組織染色の判定に QuPath ソフトウェアを用いて分類して定量化を行い、手動計数の結果と比較して有意な差がないことを検証した。

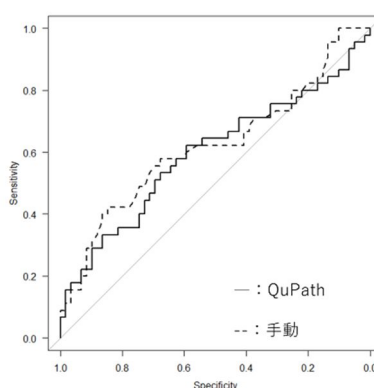
対象は、2000 年 1 月から 2011 年 12 月までに当院で術前放射線治療または化学放射線治療と手術を受けた子宮頸部扁平上皮癌患者 104 例である。放射線治療、化学放射線治療後の腫瘍細胞 (PD-L1 TC、HLA-1)、免疫細胞 (PD-L1 IC、CD8、FoxP3) による腫瘍免疫関連タンパク質の発現の変化を検討した。PD-L1 を評価するために、スライド全体の腫瘍と間質を分析した。CD8、FoxP3、については、腫瘍と連続する腫瘍周囲の間質の代表的な 3 視野を選び、高倍率表示 (X400) で陽性細胞を手作業で数えた。放射線治療、化学放射線治療後の腫瘍免疫関連タンパク質の発現は、PD-L1 TC、CD8、FoxP3 が有意に増加した。

同様の視野に関して QuPath ソフトウェアを用いて陽性細胞数をカウントした。染色レベルとそれに対応する予後に基づいて ROC 曲線を作成し、AUC 値で評価した。CD8 は手動でのカウントと QuPath のカウントの AUC 値はそれぞれ 0.649、0.655 (p=0.888) (図 2)、FOXP3 はそれぞれ 0.621、0.596 (p=0.593) (図 3) であり、それぞれ有意差は認めなかった。

(図 2)



(図 3)



今後、中咽頭癌のサンプルでも同様の解析を行い、免疫組織染色の判定方法の客観的評価と自動化を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 TOMOKAZU HASEGAWA, MASANORI SOMEYA, MASAKAZU HORI, TAKAAKI TSUCHIYA, YUUKI FUKUSHIMA, YOSHIHISA MATSUMOTO, KOH-ICHI SAKATA	4. 巻 34
2. 論文標題 Prediction of Results of Radiotherapy With Ku70 Expression and an Artificial Neural Network	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 in vivo	6. 最初と最後の頁 2865-2872
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/invivo.12114	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小塚 陽  (Kozuka Yoh)  (50808160)	札幌医科大学・医学部・研究員    (20101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関