

令和 6 年 6 月 16 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07969

研究課題名（和文）膵癌生検組織を用いた次世代診断技術開発：人工知能病理診断と包括的1細胞遺伝子解析

研究課題名（英文）Development of next generation diagnostic technologies using biopsy tissues of pancreatic carcinoma: pathological diagnosis with artificial intelligence and single cell gene expression analysis

研究代表者

北野 雅之 (Kitano, Masayuki)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：50314571

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、EUS-FNA検体を用いた膵腫瘍性病変の次世代診断技術を開発した。まず、人工知能（AI）を用いた迅速細胞診（AI-ROSE）の開発を行った。開発したAI-ROSEを用いた外的検証では、悪性度を3群に分けた場合および2群に分けた場合の正診率は89.8%および95.1%と良好な結果が得られた。また、AI-ROSEの膵腫瘍に対する正診率（93.3%）は、内視鏡医の正診率（68.3%）を有意に上回っていることが判明した。また、膵癌のEUS-FNA24検体において、網羅的な遺伝子解析を行ったところ、全例において次世代シーケンサーを用いたRNA遺伝子発現が定量できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

画像診断あるいは病理診断におけるAI技術およびその有用性は報告されているが、ROSEに応用することが本研究の独創的な点である。開発されたAI-ROSEで信頼性の高い診断精度が得られたため、病理医が内視鏡検査検査に立ち会う必要がなくなり、不足している病理医数を補完する技術になりうることを期待される。また、膵癌のEUS-FNA検体において、新規遺伝子解析により腫瘍組織を構成するRNA遺伝子を同定できることが判明したため、膵癌組織内の転移や耐性関連遺伝子を同定すること、腫瘍を取り巻く微小環境の細胞群・分子群のネットワークを解明することに発展することが期待される。

研究成果の概要（英文）：The aim of the present study was to develop new diagnostic technologies to diagnosis pancreatic tumors with endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration (EUS-FNA). First, we developed an artificial intelligence-assisted rapid on-site cytologic evaluation AI-ROSE). In the test cohort, the accuracies of AI for three-category (class 1/2, class 3, class 4/5) and two-category (class 1/2/3, class 4/5) were 89.8% and 95.1%, respectively. In the comparison cohort of AI-ROSE vs. human endosonographers, the accuracy of AI-ROSE for three-category was 76.6%, which was higher than that of all endosonographers (68.3%). Comprehensive genetic analysis was also performed in 24 EUS-FNA samples of pancreatic cancer, and RNA gene expression could be quantified in all cases using next-generation sequencers.

研究分野：消化器病学

キーワード：超音波内視鏡 膵癌 膵腫瘍 穿刺生検 人工知能 遺伝子発現

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

- (1) 膵癌は 5 年相対生存率が 8.5%と極めて予後不良の癌であるが、罹患率は年々増加しており、現在悪性疾患における死亡原因の第 4 位である。膵癌の病理学的診断のためには超音波内視鏡下穿刺吸引生検(EUS-FNA)が不可欠であるが、得られる検体量に限界があるが課題となっている。検体量が不十分のために診断に至らない例があることや遺伝子異常診断への応用への障害となっている。

その診断能向上のため、EUS-FNA と同時に行う迅速細胞診(Rapid On-site Evaluation; ROSE)が推奨されている。しかしながら、ROSE を行うための病理医や細胞診技師が不足しており、ROSE が行えない施設が多いのが現状である。また診断するものの経験によって診断が大きく変わることもしばしばみられるため、統一した診断方法が必要であると考えられている。深層学習(Deep learning)とは機械が自動的に脳内の神経回路網を模倣し、データから特徴を抽出してくれる学習能力のある人工知能(AI)技術であり、医療用画像や病理診断支援の実用化が進められている。そこで、Deep learning を用いた細胞診の診断能が高ければ、補助診断ツールとしての AI-ROSE を開発することにより、これらの問題を大きく解決することが期待される。

- (2) また、膵癌に対する化学療法の治療選択肢が増え、EUS-FNA から得られる組織の遺伝子解析による個別化医療が求められている。次世代シーケンサー(NGS)を用いることにより少量の検体でも網羅的遺伝子解析が行えるようになり、膵癌の EUS-FNA 検体においても応用されるようになった。しかしながら、現時点では、得られた EUS-FNA 検体全体を用いて評価しているため、膵癌組織内の各細胞の遺伝子異常あるいは腫瘍を取り巻く微小環境を解明するステージには至っていない。腫瘍組織を構成する細胞群・分子群の同定に、RNA シーケンシング技術による網羅的な細胞集団解析(バルク解析)が行われているが、腫瘍組織内の不均質性を深く理解することは難しかった。一方、腫瘍組織に存在する腫瘍細胞や非腫瘍細胞(免疫細胞、間葉系細胞、血管内皮細胞など)の一つ一つの遺伝子発現パターンを明らかにする包括的 1 細胞遺伝子解析は、腫瘍を取り巻く微小環境の細胞群・分子群のネットワークを解明することや転移や耐性関連遺伝子を発現する細胞を同定することを可能とし、膵癌組織においても応用が期待されている。

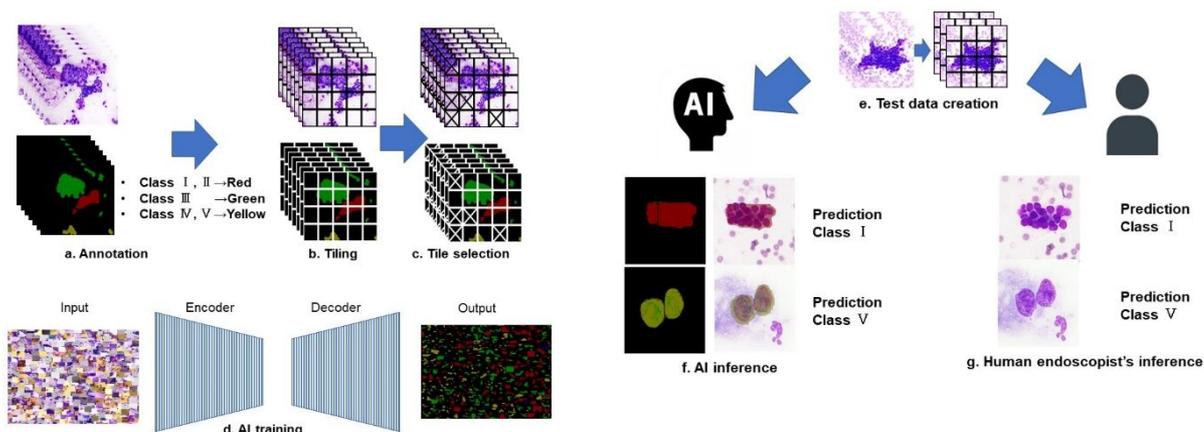
### 2. 研究の目的

- (1) 膵腫瘍性病変の EUS-FNA 検体で ROSE をリアルタイムで自動判断する人工知能(AI)を用いた病理診断法を開発し、その精度を評価した。  
充実性腫瘍性病変に対する EUS-FNA 時に採取したの ROSE 画像を集積する。ローカルワークステーションを用いてプログラミングした AI アルゴリズムに、その ROSE 画像を学習させ、AI-ROSE 診断システムを構築する。  
完成させた AI アルゴリズムを用いて外的検証データの結果を予測させ、その診断能を算出する。
- (2) 膵癌の EUS-FNA 検体における包括的 1 細胞遺伝子解析法を開発することを目的とした。初めに膵癌の EUS-FNA の検体を用いて、網羅的な細胞集団解析(Bulk 解析)および包括的 1 細胞遺伝子解析が実施できるかどうかを検討した。

### 3. 研究の方法

- (1) 膵腫瘍性病変の EUS-FNA 検体における人工知能(AI)を用いた病理診断法の開発。  
2019 年から 2021 年の間に和歌山県立医科大学にて EUS-FNA を施行した 137 例を対象にして、迅速細胞診(ROSE)で使用したプレパラートを用いて AI における深層学習用の細胞診画像の集積を行った。1) 病理画像集積: 本研究対象症例に ROSE を実施し、ROSE スライドから全ての細胞塊を撮影し、細胞診画像を集積した。2) 各症例の患者背景・病変所見の収集: 本研究で集積した情報を使用した。3) 病理診断およびアノテーション作業: 収集した画像に対して最終アノテーションを 1 名の病理専門医が各細胞塊に対してラベル(class1-5)を付与した。4) 細胞塊画像を 288\*288pixel の画像に分割して約 100 万枚の画像を作成した。5) AI アルゴリズムの作成: 収集できた症例数に応じ症例データを学習用データと外的検証用データにランダムに振り分けた。AI の学習: Training 用として、semantic segmentation アルゴリズムの一つである Mix-vision transformer-b5 を、スーパーコンピュータを用いて学習させた。内的検証として hold-

out 法を用いて精度を評価した。AI が完成するまで上記過程を繰り返し、細胞塊検出・診断 AI (class1/2 or class3 or class 4/5) を作成した。Test 用として外的検証 42 スライドから抽出した細胞塊 2,521 画像を用い AI の診断能を評価した。評価指標としては IoU を用いた。さらに、AI と内視鏡医との比較試験として 120 の画像を抽出し、AI および内視鏡医による診断能・診断に要した時間を比較した。

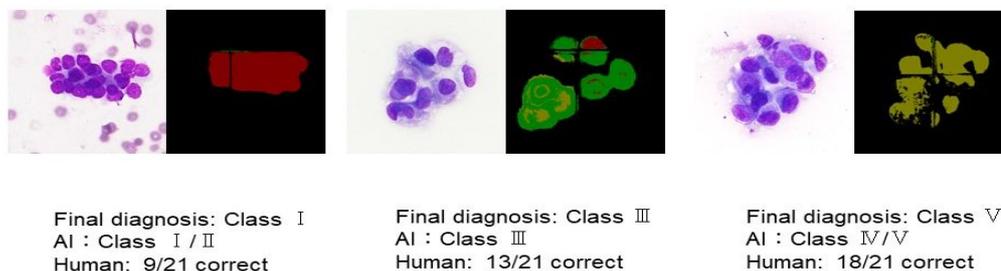


(2) 切除不能膵癌の EUS-FNA の余剰検体を対象として、検体の網羅的な細胞集団解析 (Bulk 解析) が可能かどうかを検討した。EUS-FNA の Bulk 検体から RNA を抽出し、TruSeq RNA sequencing キットおよび NextSeq550 を用いてシーケンスを実施した。発現変動解析には専用ソフトウェアを用いて、網羅的に遺伝子発現を解析できるかどうかを検討した。また、化学療法 (Gemcitabine plus Nab-paclitaxel) の薬剤耐性に寄与する遺伝子を探索した。

#### 4. 研究成果

(1) 膵腫瘍性病変の EUS-FNA 検体における人工知能 (AI) を用いた病理診断法の開発。

全症例をランダムに開発群 111 例、外的検証用テスト群 26 例に分類し、その後開発群を学習群 96 例/内的検証群 15 例にランダム分割した。学習/内的検証/外的検証群の最終診断は膵癌(94/14/17)、その他(2/1/9)であった。外的検証群における AI の細胞検出精度 (median IoU) は 0.61 で、98.4% の画像 (2483/2521) で細胞塊を検出した。細胞診クラス 3 群の正診率は 0.898 で class1/2 を class4/5 と誤診した例は 0.4% (6/1402)、class4/5 を class1/2 に誤診した例は 0.2% (2/884) であった。細胞診クラス 2 群 (class1/2/3 or class4/5) の感度/特異度/正診率は 0.893/0.981/0.951 で、スライド毎の診断では全スライドを正確に診断することが可能であった。



120 個の細胞クラスターに対する内視鏡医と AI との比較では、21 名の内視鏡医診断能が 68.3% に対し AI は 93.3% と有意に高かった。また 120 個のクラスターの評価時間に関しては、AI は 8.4 秒であり、すべての内視鏡医の評価時間 (範囲: 480 ~ 6000 秒)

よりも有意に短かった。

	Endosonographers			AI	P-Value*
	Expert(n=8)	Non-Expert(n=13)	Total(n=21)		
<b>Times (s)</b>	1,830 (720-2,700)	1,800 (480-6,000)	1,800 (480-6,000)	6.04 (6.01-6.42)	<0.001
<b>3-classification</b>					
Accuracy (%)	51.7(35.8-70.8)	47.5(35.8-60.0)	48.3(35.8-70.8)	76.6	<0.001
<b>2-classification</b>					
Sensitivity (%)	67.5 (46.7-100)	67.5 (42.5-100)	67.5 (42.5-100)	90.0	<0.001
Specificity (%)	70.7 (21.2-92.5)	72.5 (18.8-97.5)	72.5 (18.8-97.5)	95.0	<0.001
Accuracy (%)	71.7 (47.5-86.7)	68.3 (45.8-79.2)	68.3 (45.8-86.7)	93.3	<0.001

\*Comparison between human endosonographer (total) vs AI

**Definition**

3-classification: class I, II/III/IV/V

2-classification: class I, II, III/IV/V

Expert: >10 years experience of EUS-FNA

- (2) 次世代シーケンサーを用いて網羅的な遺伝子解析を行った。膵癌の確定診断目的に行った EUS-FNA 検体の余剰検体を用いて、23 症例 24 検体に対して RNA シークエンスを行った。24 検体すべてで RNA シークエンスは可能であった。24 症例で化学療法 (Gemcitabine plus Nab-paclitaxel) が奏功した群と奏功しなかった群に分け、既存の Gemcitabine の耐性に関する RNA 遺伝子である PVT1、HIF1A-AS1、SH3BP5-AS1 遺伝子の発現量と化学療法の奏功には大きな差が認められなかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ashida Reiko, Kitano Masayuki	4. 巻 33
2. 論文標題 Advances in the evaluation of sample adequacy during endoscopic ultrasound guided tissue acquisition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Digestive Endoscopy	6. 最初と最後の頁 927 ~ 928
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/den.14093	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Itonaga Masahiro, Ashida Reiko, Murata Shin-Ichi, Yamashita Yasunobu, Hatamaru Keiichi, Tamura Takashi, Kawaji Yuki, Kayama Yuudai, Emori Tomoya, Kawai Manabu, Yamaue Hiroki, Matsuzaki Ibu, Nagai Hirokazu, Kinoshita Yuichi, Wan Ke, Shimokawa Toshio, Kitano Masayuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Kras Gene Analysis Using Liquid-Based Cytology Specimens Predicts Therapeutic Responses and Prognosis in Patients with Pancreatic Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 551 ~ 551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14030551	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ashida Reiko, Kitano Masayuki	4. 巻 34
2. 論文標題 Endoscopic ultrasound guided tissue acquisition for pancreatic ductal adenocarcinoma in the era of precision medicine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Digestive Endoscopy	6. 最初と最後の頁 1329 ~ 1339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/den.14344	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Itonaga Masahiro, Ashida Reiko, Kitano Masayuki	4. 巻 9
2. 論文標題 The usefulness of liquid-based cytology for endoscopic ultrasound-guided tissue acquisition of solid pancreatic masses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Medicine	6. 最初と最後の頁 943792 ~ 943792
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmed.2022.943792	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ashida Reiko, Kitano Masayuki	4. 巻 35
2. 論文標題 Is endoscopic ultrasound guided tissue acquisition suitable for comprehensive genetic profiling?	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Digestive Endoscopy	6. 最初と最後の頁 134 ~ 135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/den.14470	査読の有無 有
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6件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Takamichi Kuwahara, Reiko Ashida, Koshikawa Takashi, Kenji Yamao, Kazuo Hara, Masayuki Kitano
2. 発表標題 Novel treatment using combination of newly developed microbubbles and ultrasound to increase vascular permeability of anti-cancer drug
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Reiko Ashida, Takamichi Kuwahara, Takashi Koshikawa, Kenji Yamao, Kazuo Hara, Masayuki Kitano
2. 発表標題 Diagnostic value of artificial intelligence-based rapid on-site cytologic evaluation during EUS-FNA for pancreatic tumor
3. 学会等名 Asian Pacific Digestive Disease Week 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北野雅之
2. 発表標題 超音波内視鏡を用いた膵疾患の診断 (教育講演)
3. 学会等名 第105回日本消化器内視鏡学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北野 雅之 山下泰伸 蘆田玲子
2. 発表標題 「超音波内視鏡を用いた診断法」の 歴史的総括
3. 学会等名 日本超音波医学会 第95回学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masayuki Kitano
2. 発表標題 Early US diagnosis of pancreatic cancer
3. 学会等名 Asian Federation of Societes for Ultrasound in Medicine and Biology 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masayuki Kitano
2. 発表標題 Contrast-enhanced Endoscopic Ultrasonography
3. 学会等名 World Federation of Societies for Ultrasound in Medicine and Biology 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔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	橋本 真一  (Hashimoto Shinichi)  (00313099)	和歌山県立医科大学・先端医学研究所・教授   (24701)	

6. 研究組織（つづき）

	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	村田 晋一  (Murata Shin-ichi)  (20229991)	和歌山県立医科大学・医学部・教授    (24701)	
研究分担者	蘆田 玲子  (Ashida Reiko)  (90570581)	和歌山県立医科大学・医学部・准教授    (24701)	
研究分担者	桑原 崇通  (Kuwahara Takamichi)  (10816408)	愛知県がんセンター（研究所）・がん予防研究分野・研究員    (83901)	
研究分担者	原 和生  (Hara Kazuo)  (80740258)	愛知県がんセンター（研究所）・がん予防研究分野・研究員    (83901)	
研究分担者	越川 卓  (Koshikawa Takashi)  (80153526)	修文大学・医療科学部・教授    (33942)	

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