

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16363

研究課題名（和文）婦人科がん幹細胞を標的とした新規免疫療法の確立

研究課題名（英文）Establishment of novel immunotherapies targeting gynecological cancer stem cells

研究代表者

真里谷 奨（Mariya, Tasuku）

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：50836757

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）：婦人科がん、とくに子宮内膜がんの免疫学的プロファイルは他の固形がんとは大きく異なっているため、免疫チェックポイント阻害剤を用いた網羅的な免疫療法の選択に際しては留意が必要である可能性が示された。また、免疫プロファイルの新規スクリーニング手法としてAI（人工知能）を用いた深層学習によるモデル構築が一部有用であることを示した。本開発アルゴリズムは、今後のがん個別化医療への対応に際しての一助となるとののではと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昨今はがん免疫療法の適応可否のみならず、あらゆる標的治療が網羅的ゲノム解析により臨床現場でも選択される枠組みが整いつつある。がん治療はより個別化したものへ推移していることとなるが、我々は一見同一プロファイルを示す腫瘍であっても、そのがん種ごとの免疫学的性質により局所反応は異なる可能性を示した。単一マーカーをサロゲートマーカーとして用いることには限界があり、より繊細ながんプロファイル解析が日常的に求められる時代は近いと考えられ、我々の提示するAI判定モデルが一端を担う可能性を考え、引き続き解析・研究を進めていきたい。

研究成果の概要（英文）：The immunological profile of gynecological cancers, especially endometrial cancer, differs significantly from that of other solid tumours, indicating that treatment may need to be taken when selecting comprehensive immunotherapy with immune checkpoint inhibitors. Our study also showed that model building by deep learning using artificial intelligence (AI) is partially useful as a novel screening method for immunological profiles. We believe that the developed algorithm may help in the future when dealing with personalised cancer care.

研究分野：がん免疫療法・人工知能・ゲノム解析

キーワード：がん免疫療法 ミスマッチ修復タンパク欠損 人工知能 深層学習

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の免疫チェックポイント阻害剤などの成功により、免疫療法はがんに対する有効な第4の治療法として確立しつつある。免疫療法において抗腫瘍効果を発揮するのは細胞障害性T細胞(CTL)である。CTLはMHCクラス1分子に提示される抗原ペプチドを認識する。免疫チェックポイント阻害剤において、主に変異遺伝子にコードされる変異抗原(ネオアンチゲン)がCTLに標的とされるのだが、抗PD-1抗体・抗PD-L1抗体等の免疫チェックポイント阻害剤はこれらの抗原に対する免疫応答を網羅的に促進することにより、その抗腫瘍効果を得るが、その恩恵が得られるがんは現状では限られている。

現在固形がん全般において、マイクロサテライト不安定性(Microsatellite instability)を呈するがん(以後MSI-Highがん、とする)を遺伝子解析によりチェックすることで、MSI-Highがんに対し免疫チェックポイント阻害剤による免疫療法を行うことが可能となっている。これは、MSI-Highがんは遺伝子修復機構であるミスマッチ修復機構が壊れている結果として、がん化の能力を得ている一方でネオアンチゲンを多く産生してしまうため、免疫療法の標的となりやすいためである。また、免疫チェックポイント阻害剤の新たな対象として、がんゲノム検査において検出可能なTMB(Tumor mutation burden)値の高い固形がん(以後TMB-Highがん、とする)が2022年春から保険適応となった。TMB-Highはがんにおける遺伝子変異頻度が通常のがんより高いことを示しており、MSI-Highがんと同様に多くのネオアンチゲンを呈するためがん免疫療法の標的として有効とされている。

当初、我々は本研究において、婦人科がん幹細胞に共通して発現する特異抗原を標的とする免疫療法を開発する事により、個別化治療を探索することを目的としていた。しかし、上述のようにある種『網羅的な標的治療』が免疫療法において主力化する中で、前段階として免疫療法の奏効に関する微小環境・サロゲートマーカーの探索に主眼を置くこととした。

2. 研究の目的

(1) がん免疫反応のがん種間の違いの比較

がんの種類を問わず用いられる免疫療法であるが、実は免疫に対するがんの応答はがんの種類によって異なっている。例えば大腸がんにおいてはMSI-Highがんの予後は明らかに良好であり、また人体の自然免疫に対する防御反応の結果として、むしろ免疫逃避機構が発達していることが示されている。一方で、子宮内膜がんにおいては、MHCクラス1分子やMSI状態によるがんの予後との関連性はほとんど指摘されていない。第一の目的として、まずは自施設腫瘍検体を用いたがん種間の免疫応答の差について解析・考察を行うこととした。

(2) AI・機械学習による婦人科がん免疫微小環境の判定

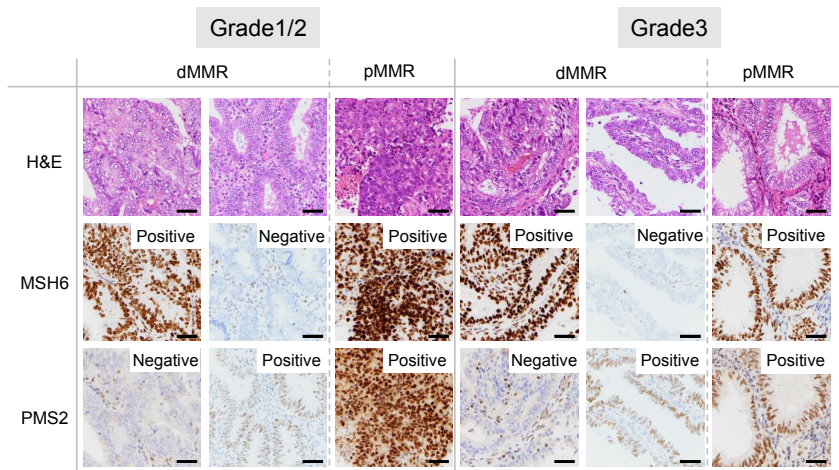
ただし、現状ではがんのMSI検査やTMB検査は、前者はがん組織を用いた遺伝子検査、後者は次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子検査となるため保険診療であっても高額になってしまう。さらに加えてHLAクラスI分子やPD-L1分子の発現状況など、非保険検査を用いて複合的な免疫プロファイルを全症例において確認することは、費用やマンパワー・時間的制約の問題から現状では困難である。近年、人工知能(AI)を用いた機械学習の中でも、特に深層学習の分野において、人間には直接判定困難な因子についても特徴を学習し、がんの分子プロファイルの推定を可能とする報告が散見される。本研究においては、人工知能を用いることにより、病理組織像等から臓器横断的ながんプロファイルを推定しうるかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 大腸がん・子宮内膜がん検体を用いた免疫環境の比較について

当院で手術加療を行った子宮内膜がん127例および大腸がん135例について検討を行った。ミスマッチ修復タンパクであるPMS2並びにMSH6に対し免疫染色を行い、いずれかの発現が欠損しているものをミスマッチ修復タンパク欠損(dMMR)と判定した。(右図)dMMRはMSI-Highがんと類似の状態を指すため、近年免疫チェックポイント阻害剤適応に関する臨床検査としては同立に扱われている。HLA Class I分子の発現については、EMR8-5抗体(HLA-A, B, C抗体)を用いた免疫染色を行った。細胞表面が濃染する領域、細胞質が薄く染まる領域および完全な不染領域の3領域へ分類を行い、各々の割合を確認した。また、濃染する領域が50%以下であるものを

HLA Class I 発現低下群とした。dMMR と HLA Class I 分子の発現状況および臨床・病理所見と

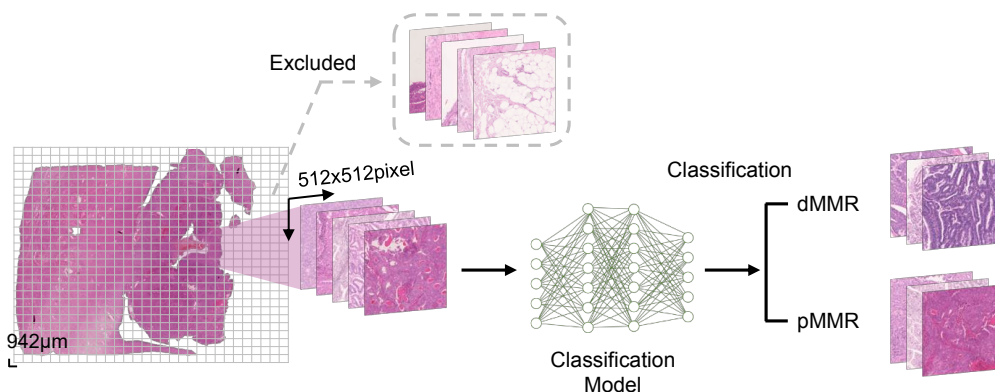


の関連性について、統計学的な検討を行った。

(2) ミスマッチ修復タンパク欠損の判定アルゴリズムの構築について

① 病理組織画像の収集ならびにデジタルデータとしての調整

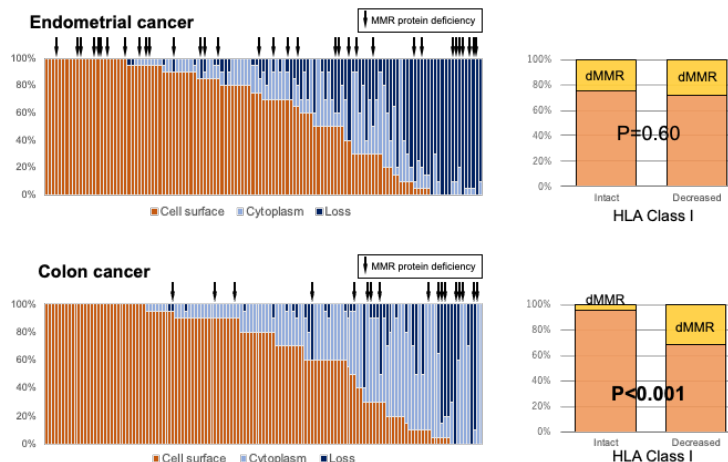
(1) で用いた子宮内膜がん 127 例の HE 染色検体について Nanozoomer スキャナ (浜松フォトニクス) を用いて Whole slide imaging によるデジタルデータ化を行った。画像データを 512×512pixel のブロックに処理を行い、腫瘍含有率 75%以上のタイルを抽出した。類内膜癌(G1-3)を教師データとして使用し、各画像へ MMR status についてアノテーションを付与した。dMMR 1,484 枚、および pMMR 3,913 枚を基本の学習データとして使用し、各種深層学習ネットワークを用いて判定モデルの構築ならびに精度評価を実施した。



4. 研究成果

(1) がん免疫応答は大腸がん・子宮内膜がんの間で異なっている

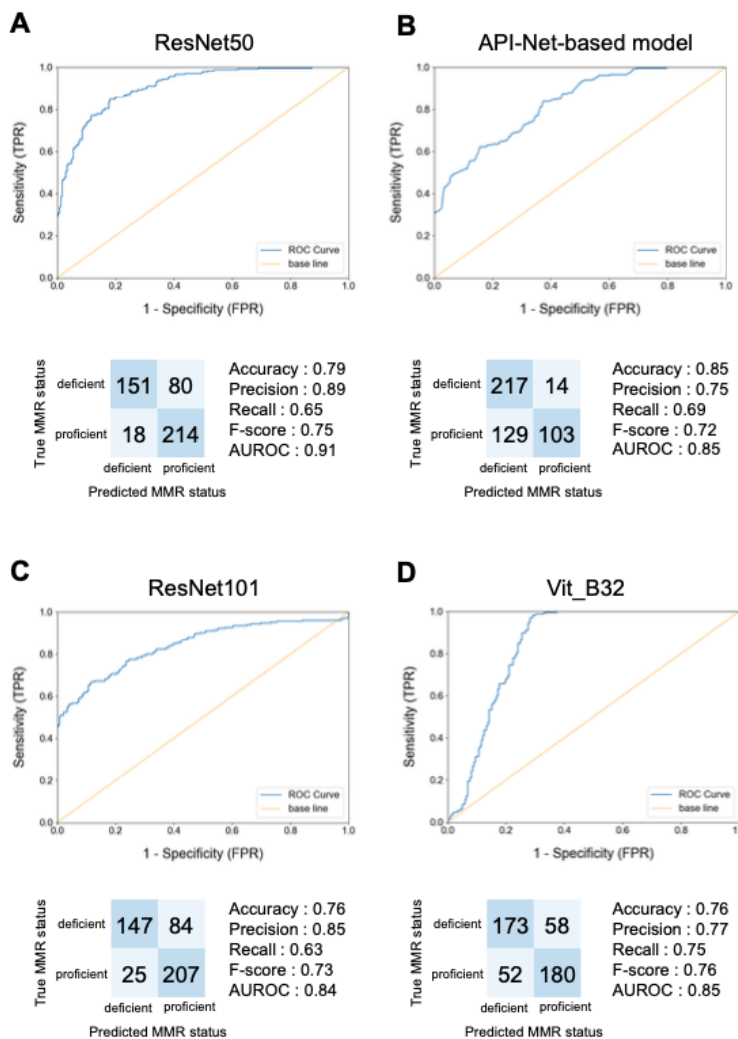
dMMR は大腸癌において 17 例 (12.6%)、子宮体癌では 33 例 (26.0%) に認められ有意に子宮体癌に多い結果であった ($p=0.006$)。HLA Class I 発現低下は大腸癌において 41 例 (32.3%)、子宮体癌では 49 例 (38.6%) に認められ、癌種間での発現低下に有意差は無かった ($p=0.16$)。また、HLA Class I の発現低下率をマッピングすると、両癌種は極めて類似した低下パターンを示していた。(右図) しかし、dMMR は大腸癌において有意に HLA Class I 発現低下群に多く認められた一方で (4.3% vs 31.7%; $p<0.001$)、子



宮体癌においては全く関連性が認められなかった (24.4% vs 28.6%; $p=0.60$)。子宮体癌における HLA Class I 発現低下の独立リスク因子は Type2 癌 (OR 5.59; 95% CI, 1.59-19.61; $p < 0.007$) であった。大腸癌と子宮体癌は共に MSI を呈する固形腫瘍であるが、その免疫学的プロファイルは著明に異なっていた。がん免疫についてはがん種や単一検査で判断すべきではなく、理想的には多角的な検査結果から個々のプロファイルを確認し、オーダーメイド的に対応を検討すべきであると考えられる。(Mariya T et al. Med Mol Morphol. 2021)

(2) 子宮内膜がんのミスマッチ修復タンパク欠損は深層学習により高精度に推定可能である

MMR status の判定アルゴリズムの構築については dMMR/pMMR の 2 値分類を原則とし、判定モデルを構築した。深層学習に用いたモデルは現存する画像判定モデルに対し同一手法で広くスクリーニングを行った上で選別を行い、更に選別されたアルゴリズムに対しより詳細なパラメータ調整を実施することで最終モデルを構築した。古典的な深層学習による手法である畳み込みニューラルネットワークを用いた手法では、ResNet50 ならびに ResNet101 が最も優秀な判定精度を示した (右図 A, C)。また、近年着目されている注視モデル (Attention-based model) を用いた手法でも、同様に高精度の判定が可能であることが示されたが、判定精度は畳み込みニューラルネットワークには及ばない結果であった (右図 B, D)。ただし、注視モデルは本来ブラックボックスである AI の着目領域の可視化が容易である点で、説明可能性において優れている。使用した内部のモデルの差異によりパフォーマンスの多少の差異はあるが、Accuracy 0.79-0.85、AUROC 0.85-0.91 と好成績を収めることが出来ており、このことからある程度の教師データ量は必要であるものの、内部アルゴリズムを工夫することにより、深層学習による MMR 分類タスクに関しては一定の精度を達成することが可能であると考えられた。(Umemoto M, Mariya T et al. Cancers. 2024)



(3) 考察ならびに今後の展望

本研究により、ミスマッチ修復タンパクの欠失状況についてはがん種間で大きく異なること、また HE 染色像から dMMR の判定が AI により容易に可能であることが示された。本結果により、免疫チェックポイント阻害剤のコンパニオン診断を行うにあたり、がん種を問わない極めてローコストな予備検討を行うことが可能なシステムを構築できる可能性が示された。現在、顕微鏡撮影装置と組み合わせたソフトウェア・インターフェース作成を行っており、病理写真を顕微鏡で撮影すると同時に MMR status が判定可能となるシステム構築を想定して臨床実装を目指している。

上記で示したように、深層学習ネットワーク間での結果の差異は大きくは認められず、また使用モデルの新旧による優位性も明らかではなかった。最も重要であるのは高品質な教師データの収集ならびに調整の工夫であるようだ。今回は MMR status のみの検討であったが、今後は TCGA (The Cancer Genome Atlas) から提唱されている分子遺伝学的サブタイプの分類についても、一部免疫染色を利用した分類法 ProMisE を利用する形で検証していく予定であり、現在は同じく免疫染色により検討可能な p53 について検証を進めている。ただし、一定の精度による判定系構築が得られているものの、dMMR ほどのクリアカットな判別性能が得られていない。バイオマ

一カーによっては分子遺伝学的プロファイルによる形態学的な変化が dMMR と比較し特徴量として抽出しづらい可能性を考えられ、深層学習アルゴリズムが全てのがん分子遺伝学的プロファイルの判別に適している訳ではないことを想定している。HE 染色では判定困難な特徴の抽出においては、検証データ種別の追加、すなわちマルチモーダル画像や腫瘍マーカー等の臨床データをメタデータとして用いたアルゴリズムを考慮することで、高精度の推定可能となる可能性を考え検証を進めている。

今後も引き続き婦人科がんの免疫プロファイルの解析および免疫療法のサロゲートマーカーの探索を行うとともに、AI・機械学習を用いた簡便な判定支援システムの構築を目指していく。具体的なステップとしては、ProMisE プロトコル判定アルゴリズムを完成を目指した POLE 遺伝子をはじめとしたパネルシーケンスを予定しており、多様なゲノムプロファイル・アノテーションについて検証を行うことが可能であるように研究系を構築している。したがって、今後のシステム構築に際しては広域ながんプロファイルの推定アルゴリズムが構築可能と考えており、がん遺伝子パネルにも匹敵する免疫療法・個別化適合治療の AI による提案システムの提供が、我々の今後の到達目標と考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shikanai S, Mariya T et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 BenignMulticystic Peritoneal Mesothelioma Complicating Fertility Preservation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gynecol Minim Invasive Ther.	6. 最初と最後の頁 137-138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4103/GMIT.GMIT_43_21.	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 -
1. 著者名 Tsuyoshi Saito, Mariya T et al.	4. 巻 7
2. 論文標題 Radical Vaginal Trachelectomy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Surgery Journal	6. 最初と最後の頁 S103-107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/s-0041-1739120.	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 Yuta Nambu, Mariya T et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 A screening assistance system for cervical cytology of squamous cell atypia based on a two-step combined CNN algorithm with label smoothing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 520-529
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cam4.4460.	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 Abe S, Iwasaki M, Habata S, Mariya T, Tamate M, Matsuura M, Satohisa S, Saito T.	4. 巻 21
2. 論文標題 ER increases endometrial cancer cell resistance to cisplatin via upregulation of BAG3.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letter	6. 最初と最後の頁 ePub
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2020.12281.	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 該当する

1. 著者名 Mariya T, Kubo T, Hirohashi Y, Yanagawa J, Tabuchi Y, Matsuo K, Furumura K, Morita R, Nakatsugawa M, Kanaseki T, Tsukahara T, Hasegawa T, Saito T, Torigoe T.	4. 巻 54
2. 論文標題 Less correlation between mismatch repair proteins deficiency and decreased expression of HLA class I molecules in endometrial carcinoma: a different propensity from colorectal cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 14-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00795-020-00254-6.	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 該当する

1. 著者名 Mina Umemoto, Tasuku Mariya, Yuta Nambu, Mai Nagata, Toshihiro Horimai, Shintaro Sugita, Takayuki Kanaseki, Yuka Takenaka, Shota Shinkai, Motoki Matsuura, Masahiro Iwasaki, Yoshihiko Hirohashi, Tadashi Hasegawa, Toshihiko Torigoe, Yuichi Fujino, Tsuyoshi Saito	4. 巻 16
2. 論文標題 Prediction of Mismatch Repair Status in Endometrial Cancer from Histological Slide Images Using Various Deep Learning-Based Algorithms.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 ePub
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers16101810	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 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 真里谷 奨
2. 発表標題 子宮頸部扁平上皮病変進展様式に適合した学習アルゴリズムの診断支援システムへの適用
3. 学会等名 第54回日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 梅本美菜, 真里谷 奨 他
2. 発表標題 Label Smoothingを併用した2段階CNNによる子宮頸部細胞診断支援アルゴリズムについて
3. 学会等名 第64回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 真里谷 奨
2. 発表標題 Deep Learning (YOLOv3) を用いたリアルタイム婦人科細胞診断支援システム設計の試み
3. 学会等名 第62回日本婦人科腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tasuku Mariya
2. 発表標題 Deep Learning based algorithm for assistance of cervical cytoscreening by artificial intelligence
3. 学会等名 第73回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 真里谷 奨
2. 発表標題 子宮体癌と大腸癌におけるミスマッチ修復タンパク欠損と免疫逃避機構の差異に関する検討
3. 学会等名 第63回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2021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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------