

# 計算機予測モデルを用いた膵癌予後・悪性度予測法の構築

鹿児島大学大学院 医歯学域医学系腫瘍学講座 病理学分野

横山 勢也

## I 要 旨

膵臓癌 (PDAC) は、高度な診断技術にもかかわらず、死亡率の高い疾患となっている。ムチン (MUC) 1 および MUC4 の発現は、予後不良に関連し、MUC2 は腫瘍抑制因子であることを報告されている。この研究では、これらムチン遺伝子のメチル化状態を用いた手術後の予後予測バイオマーカーの構築を行った。

Methylation Specific Electrophoresis (MSE) 法を使用して、さまざまな膵臓病変を有する 191 人の患者の膵臓組織サンプルにおける MUC1、MUC2、および MUC4 プロモーター領域のメチル化状態を評価した。次に、これらの結果と臨床病理学的特徴を統合して、Support Vector Machine (SVM)、Neural Network (NNET)、および多項ベース (MU) の手法を使用した機械学習による予後分類器を構築した。クロスバリデーション試験において、テスト陽性群および陰性群間で 5 年全生存 (OS) の有意差が確認された。単変量・多変量解析により、これらの予後分類は腫瘍性組織だけでなく非腫瘍性組織でも独立した予後因子であることを明らかにした。

これらの予後分類器は、腫瘍サイズ、リンパ節転移、遠隔転移、および年齢よりも OS の予測精度が高く、TNM 病期分類システムの予後的価値を補完する可能性が示唆される。

## II 背 景

近年 65 歳以上人口の総人口に対する割合が、

28.1%となり、超高齢社会が急速に現れた。加えて、本邦における癌死は年間 37 万人を超えており、死因の第 1 位である。まさに超高齢化がん多死社会の到来である。なかでも膵癌は最新の画像検査機器を用いても、治癒を望める段階での早期診断は不可能であることが多く、手遅れになる可能性が最も高い。がんの生存率が多くの部位で上昇傾向にあるにもかかわらず、膵癌は生存率が非常に低く、難治性癌の代表となっている (国立がん研究センター試算)。持続可能な “well-being” な観点からも、膵がんの「早期診断法」あるいは「悪性度を規定する方法」の確立が切望されている。近年、膵癌を含む種々の癌において、糖タンパク質であるムチン分子ファミリーの異常発現が確認され、増殖・浸潤転移・抗癌剤耐性・免疫機構回避など癌進展の各プロセスにおいて、癌の悪性度に関与することが報告されている。当研究室では、早くからムチンに注目して研究を進め、様々な組織におけるムチン発現と悪性度との関係や、その発現機構を世界に先駆けて明らかにしてきた。

## III 目 的

膵胆管系の癌は、PET-CT 等の最新の機器を用いても、いまだに早期発見どころか、治癒を望める段階での診断は不可能であることが多い。そのため手遅れになる可能性が高く、最も難治性の癌の代表となっている。このような現状を打破するために、膵胆管系腫瘍の「早期診断法の確立」あるいは「悪性度を規定する分子

標的の同定」が望まれている。そこで、これまでの研究成果をもとに、本研究では、多数の臨床検体における各がん遺伝子のメチル化度を新規メチル化解析法および次世代シーケンサーを用いて解析し、膵癌の進行に至る過程や悪性度を計算機科学により予測することを目的としている。SVM、ランダムフォレストなどの機械学習を用いた、膵がんの機械的悪性度予測システムの構築により、現行法では手のつけようのない膵癌克服に向けた最大の焦点である悪性度を含めた早期診断スキームの構築を目指す。

#### IV 研究内容

##### 1 mRNA 発現と予後

###### ＜方法および結果＞

膵臓組織検体（腫瘍性および非腫瘍性領域を含む）におけるムチン遺伝子発現データを用いて教師なし階層的クラスター分析を実施した（図 1A）。サンプルは、クラスタリング結果に従って2つのクラスターに分割されました。クラスター1は、クラスター2と比較して、*MUC1*、*MUC2*、および *MUC4* の有意に高い発現レベルを示した（すべて  $p < 0.001$ ; 図 1B）。くわえて、クラスター1は、クラスター2よりも著しく悪い予後を示した（HR = 0.52,  $p < 0.001$ ; 図 1C）。こ

のクラスター分析では、腫瘍組織のみでなく非腫瘍組織でも同じ結果が示された ( $p < 0.001$ )。

###### ＜考察＞

*MUC1*、*MUC2*、および *MUC4* mRNA の発現レベルが予後不良とデータを区別できるかどうかを判断するために、リアルタイム PCR データを使用して教師なし階層クラスタリング分析を実行した。最近の組織学的研究では、ムチン遺伝子の発現、特に *MUC4* は、PDAC の予後不良の独立した指標であると報告されている。 *MUC2* は腫瘍抑制遺伝子として報告されており、*MUC2* の喪失は結腸での膵臓腫瘍の進行を促進する。しかし、別の研究では、膵臓の分化した腺癌の *MUC2* 発現の予後値が低い可能性があることが示されている。3つのムチン mRNA の高発現と予後不良との関係は、これらの最近の病理学的研究を支持している。腫瘍組織での解析データでは、選択したクラスターは他のクラスターよりも予後不良を示した。興味深いことに、非腫瘍組織での解析データでも、選択されたクラスターは他のクラスターよりも予後不良を示した。これらの結果は、非腫瘍性および腫瘍性組織の混合物であったとしても、機械学習判別モデルが予後不良群を特定できることを示唆した。

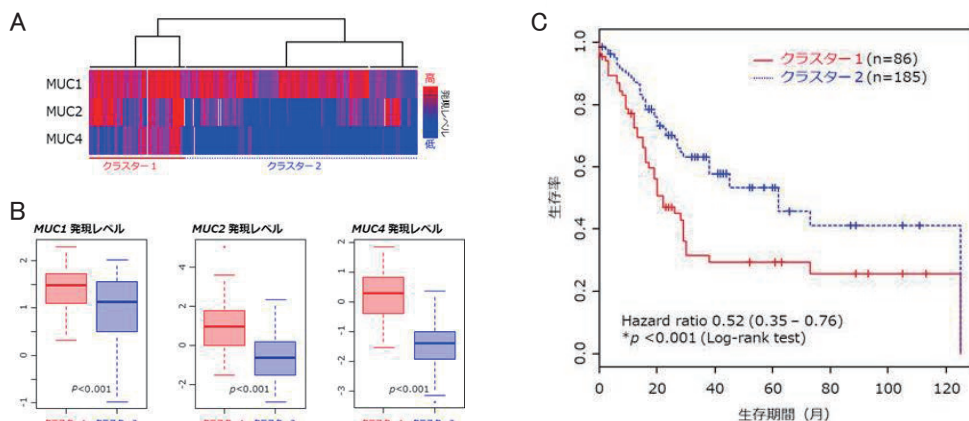


図 1

## 2 DNA メチル化と予後

### <方法および結果>

膵臓組織検体（腫瘍性および非腫瘍性領域を含む）におけるムチン遺伝子メチル化データセットを用いて教師なし階層的クラスタリング分析を実行した。クラスタリング結果によると、サンプルは4つのクラスターに分割された。クラスター1は、*MUC1* および *MUC4* 遺伝子のメチル化状態が他のクラスターよりも有意に低いことを示した（それぞれ  $p = 0.003$  および  $p < 0.001$ ）。クラスター1は、他のクラスターよりも *MUC1*、*MUC2*、および *MUC4* の有意に高い発現レベルも示した（それぞれ  $p = 0.004$ 、 $p = 0.002$ 、 $p = 0.015$ ）。さらに、クラスター1は、他のクラスターよりも著しく悪い予後を示した（HR = 0.33、 $p = 0.012$ 、図2）。非腫瘍組織において、クラスター1の予後は他のクラスターよりも著しく不良であり、（HR = 0.49、 $p =$

0.010）腫瘍組織においても、クラスター1は他のクラスターよりも著しく悪い予後を示した（HR = 0.48、 $p = 0.014$ ）。

### <考察>

3つのムチン遺伝子メチル化状態による予後不良群のスクリーニングが可能性検討のため、MSE分析データを使用して教師なし階層クラスタリング分析を実行した。クラスタリングにより選択されたクラスターは、他のクラスターと比較した場合、有意に予後不良を示しました。興味深いことに、非腫瘍組織での解析データにおいても、このクラスターは他のクラスターよりも予後不良を示しました。これらの結果は、機械学習判別モデルが、ムチン遺伝子のメチル化の組み合わせデータを使用して予後不良を特定するモデルを提供できることを示唆している。

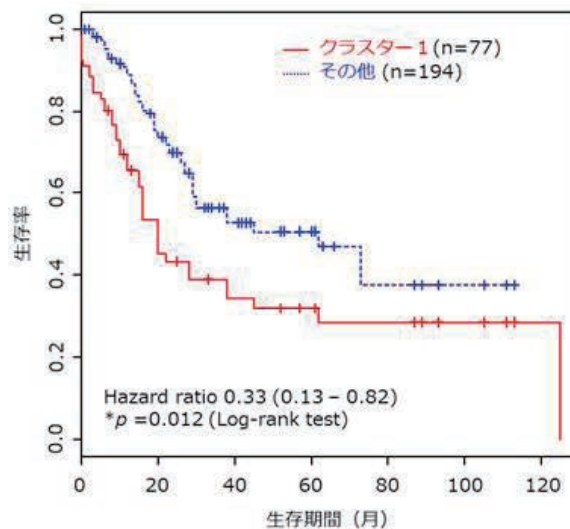


図2

### 3 予測モデルの構築と評価

#### <方法および結果>

テストデータセットを使用して構築された予測モデルが他のトレーニングデータセットのリスクの高いグループを検出できるかどうかを評価するために、合計データセットをトレーニングとテストデータセットの2つのグループに分割した。これら2つのグループは、生物学的分析結果と臨床病理学的特徴においてほぼ同様の分布を示した。SVM および NNET 分類子は、腫瘍組織だけでなく非腫瘍組織における解析結果でも有意に手術後予後について不良群のスクリーニングが可能であった (図3)。単変量・多変量解析により、機械学習による予測結果は TNM スコアや年齢、併存疾患、ASA スコアなどの予後因子から独立していることが示された。

#### <考察>

モデルの分散が大きく、バイアスが低い場合 (トレーニングデータセットに対して最適化が多すぎるなど)、予測モデルの学習パフォーマンスは低くなります。トレーニングデータセットから構築された予測モデルが他のデータセットのリスクの高いグループを検出できるかどうかを評価するために、生化学的解析データと臨床病理学的特徴がほぼ同様の分布を持つテストグループを用いて評価した。SVM および NNET 分類器は、学習されたことのないテ

ストグループでは予後が悪い高リスクグループを有意に判別可能であった。単変量。多変量解析により、SVM および NNET 判別モデルによる高リスクの予測は、TNM スコア、ASA スコア、術前化学療法、および併存疾患から有意に独立した予後因子であることが示された。これらの結果は、SVM および NNET 判別モデルの分散が低く、予後不良を区別する高い能力があることを示唆している。さらに結果を検証するには、前向きではるかに大規模な多施設無作為化試験が必要だが、SVM または NNET ベースの予測モデルは、*MUC1*、*MUC2*、および *MUC4* を使用した手術後の予後を予測する判別モデルを提供が可能であると考えられる。

## V 結 語

本研究は、SVM と NNET に基づく機械学習予測モデルが、実質的に異なる OS を持つ膵臓癌患者を正確に区別できることを実証した。したがって、SVM または NNET に基づくこれらの判別モデルは、患者カウンセリング、個別療法に関する意思決定、およびフォローアップスケジュールリングを促進する可能性がある。しかしながら、他のバイオマーカーが判別モデルの精度と予測値を拡張する可能性がある。したがって、追加のマーカーを含めることにより、SVM および NNET 判別モデルの改善が可能であると考えられる。

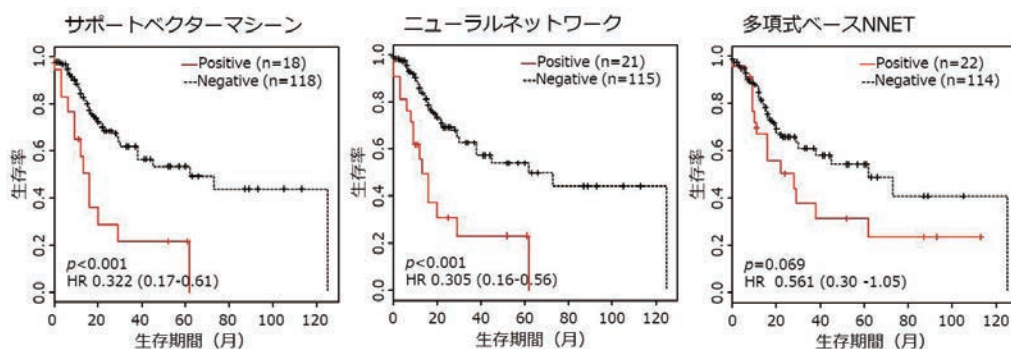


図 3