

**【目的】**我々はこれまでに大腸癌の癌浸潤先進部の特異的な形態学的変化に着目し、先進部に特徴的な線維性癌間質の新たな評価・分類法 (DR 分類) を提唱してきた (図)。DR 分類の予後分別能は極めて高いことが複数の多施設研究で示されている。本研究では、1. 画像解析と deep learning 手法、いわゆる AI (Artificial Intelligence) 技術を用い、再現性の高い DR 分類の診断を確立しその意義を探索すること、2. DR 分類の分子生物学的背景を解明することの二つを目標とした。

**【方法】**1. 528 例の大腸癌症例を対象として単一の最深部を含む HE 染色標本を選択し、デジタルスライドを作製した。75% の 396 例を training cohort、25% の 132 例を test cohort とした。41 例の myxoid stroma を含む症例を無作為に選出し、HALO® software を用いて同領域の annotation を行い、DenseNet neural network に myxoid stroma を学習させ、これを同定する classifier を作製した。作製した classifier の精度は Dice Coefficient を用いて評価し、training cohort と test cohort において予後解析を施行した。2. ①大腸癌手術切除検体から DR 分類別に採取した CAF の増殖能を評価すると共に、大腸癌細胞株とを混合してヌードマウスの背部皮下または盲腸漿膜下層に移植し、腫瘍の増大を経時的に観察した。②大腸癌手術切除検体から DR 分類別に採取した CAF で発現する ADAM 分子について DR 分類別に比較検討した。③手術標本から新鮮凍結標本を採取し、レーザーマイクロダイセクションを用いて癌浸潤先進部の間質を DR 分類別に採取し、ADAM 分子の mRNA 発現と DR 分類との関連を評価した。④免疫組織化学染色にて ADAM 分子のタンパク質発現の局在について検討した。⑤DR 分類別に CAF の培養上清を採取し、大腸癌細胞株と共培養後に細胞増殖アッセイを行った。

**【結果】**1. AI 技術を用いた DR 分類の診断と意義：作製した classifier の精度を検証した結果、Dice score は 0.87 であった。classifier により同定された myxoid stroma 領域を 528 例の training set において Multivariate Cox regression 法を用いて解析した結果、AI 診断された総 myxoid stroma 領域面積は最も強い予後因子であり、予後分別能は N stage を凌ぐものであった。AI を用いた myxoid stroma の分類法は従来の方法による DR 分類よりも術後生存率を良く分別する結果であった。2. DR 分類の分子生物学的背景：mature 症例と比較し immature 症例から採取した CAF と大腸癌細胞株とを混合しマウスに移植した場合、皮下ならびに盲腸漿膜下層での増殖が亢進した。大腸癌切除検体から CAF を培養し、CAF で発現する ADAM 分子を網羅的に解析した結果、ADAM9 は mature 症例に比べて immature 症例から採取した CAF において有意に高発現していた。新鮮凍結標本よりレーザーマイクロダイセクションを用いて癌先進部間質を DR 分類別に採取し、real-time qPCR 法で定量すると、ADAM9 の発現は immature に最も高く、次いで intermediate、mature の順であった。mature 症例と比較し immature 症例から採取した CAF の培養上清と共培養した大腸癌細胞株 (HCT-116、HT-29) は増殖が有意に促進され、shRNA を用いた ADAM9 の発現抑制によりその増殖は抑制された。

Desmoplastic Reaction (DR) 分類の診断フローチャート

