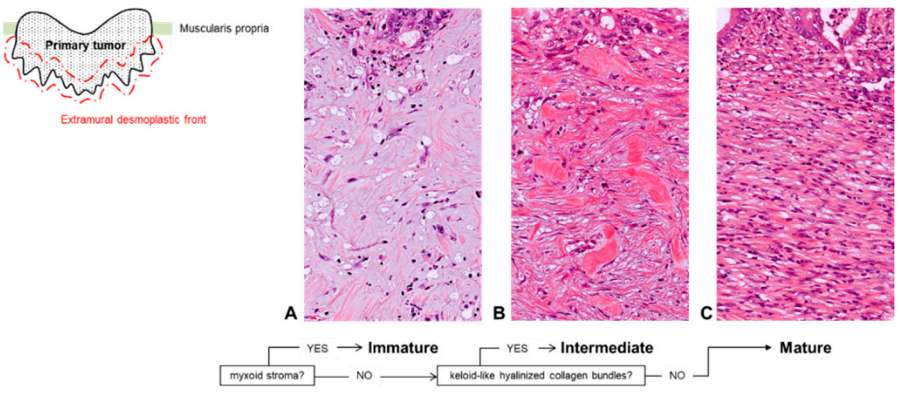
77　大腸癌のDR分類のAI診断と分子生物学的背景の解明	上野　秀樹

【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眼し、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



77. 大腸癌の DR 分類の AI 診断と分子生物学的背景の解明

上野　秀樹

防衛医科大学校 外科学講座

Key words：Desmoplastic reaction 分類，AI 診断，癌関連線維芽細胞，癌微小環境，
ADAM（a disintegrin and metalloproteinase）

緒　言

癌浸潤先進部の微小環境では腫瘍表層とは異なる分子変化が起こり、これが個々の癌の生物学的態度を決定している。我々は癌浸潤先進部に特異的に出現する線維性間質反応（desmoplastic reaction：DR）に着目し、この組織学的分類を提唱してきた［1～3］。DR 分類は、対物 40 倍視野に相当する myxoid 間質が存在する immature 型、keloid-like collagen が存在する intermediate 型、いずれも存在しない mature 型に分類される［4］。大腸癌症例の予後は mature 症例で最も良好で、immature で不良となり、DR 分類の予後分別能は既存の予後因子を凌駕することが前方視的研究でも示され［5］、日本臨床腫瘍研究グループ（JCOG）の無作為ランダム化比較試験（JCOG1805）は DR 分類を Stage Ⅱ大腸癌の予後不良因子として症例選択基準に採用している［4］。このように、DR 分類は大腸癌の治療指針になることが期待されているが、判定再現性に関わる問題の解決は形態学的指標に共通する喫緊の課題である。本研究では、まず人工知能（AI：Artificial Intelligence）を活用した DR 評価法を確立し、判定精度を高めることを第一の目的とした。

近年、癌間質は癌細胞の生存や増殖を育む微小環境として認識され、癌の悪性進展に重要であるとの概念が定着している。癌間質の中心的な構成細胞である癌関連線維芽細胞（CAF）は様々な種類の前駆細胞から起源し、腫瘍増殖を促進するサイトカイン、ケモカインを産生・分泌し、癌の進展に関与している。癌間質での細胞外基質（ECM）の再編成に重要な役割を果たす ADAM（a disintegrin and metalloproteinase）分子は癌細胞の接着・運動・増殖にも関与している［6］。CAF を主体とした ECM 再編成時の分子制御機構の差が DR の形態学的多様性に反映されている可能性が考えられることから、本研究では、ADAM 分子を主軸に、DR の形態的特徴の背後にある分子生物学的因子を解明することを第二の目的とした。

方　法

1. AI 技術を用いた DR 分類の診断と意義

StageⅡ、Ⅲ大腸癌症例 528 例を対象とし、75%（396 例）を training cohort、25%（132 例）を test cohort とした［7］。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。無作為に 41 例の myxoid stroma を含む症例を選出し、HALO® softwar を用いて DenseNet neural network に myxoid stroma を学習させ、myxoid stroma を同定する deep learning classifier を作製した。この精度を Dice Coefficient を用いて評価した。

腫瘍先進部より外側方向に 500 mm、1,000 mm の幅の領域を自動選択させ（以下、各々を Margin 1、Margin 2 と表現）、この領域の myxoid stroma を classifier にて同定し、総 myxoid 面積、平均 myxoid 面積、最大 myxoid 面積の 3 項目を算出した。予後解析については、まず予後データを基にした閾値を training set にて決定し、この意義を training set にて検証した。

2. DR 分類の分子生物学的背景

原発巣切除を施行した pT3 以深の大腸癌症例 61 例を対象とした。手術検体から癌部および非癌部の漿膜下層組織をそれぞれ採取し、CAF と非癌部線維芽細胞（NFs）を培養した。3 回以上継代し、純度の高い CAF あるいは NFs を

抽出し、それぞれ 3〜7 継代したものを実験に使用した [6]。RNA、蛋白発現の評価にはリアルタイム定量的 RT-PCR、イムノブロット法を用いた。

手術標本の摘出直後に切り出された組織を用い、レーザーマイクロダイセクションを用いて DR 分類別に腫瘍先進部を選択的に採取し DR 分類ごとに評価した。摘出直後の手術標本から採取した癌組織よりオルガノイドを培養した [6]。CAF の培養上清を用いた大腸癌株化細胞の細胞増殖アッセイについては、CAF の培養上清と共培養したそれぞれの大腸癌株化細胞の増殖能を、Bromodeoxyuridine（BrdU）による Cell Proliferation ELISA 法を用いて測定した。細胞増殖に対する ADAM9 発現抑制の影響を評価するために、short hairpin RNA により ADAM9 のノックダウンを行った CAF の培養上清と大腸癌株化細胞を共培養した。腫瘍異種移植による腫瘍増殖能および転移能の評価に関して、大腸癌株化細胞（HCT-116 または HT-29）および DR 分類別に採取した CAF を、BALB/cSlc-nu/nu マウスの背部皮下、盲腸漿膜下層に注入し腫瘍増殖能と転移を評価した。

結　果

1. AI 技術を用いた DR 分類の診断と意義

1）Classifier の精度評価

作製した classifier の精度を classifier の作製に用いなかった 40 症例において検証した結果、Dice score は 0.87 であった［7］。手動でのアノテーション部と classifier により自動判定された myxoid 領域の比較例を図 1 に示す。

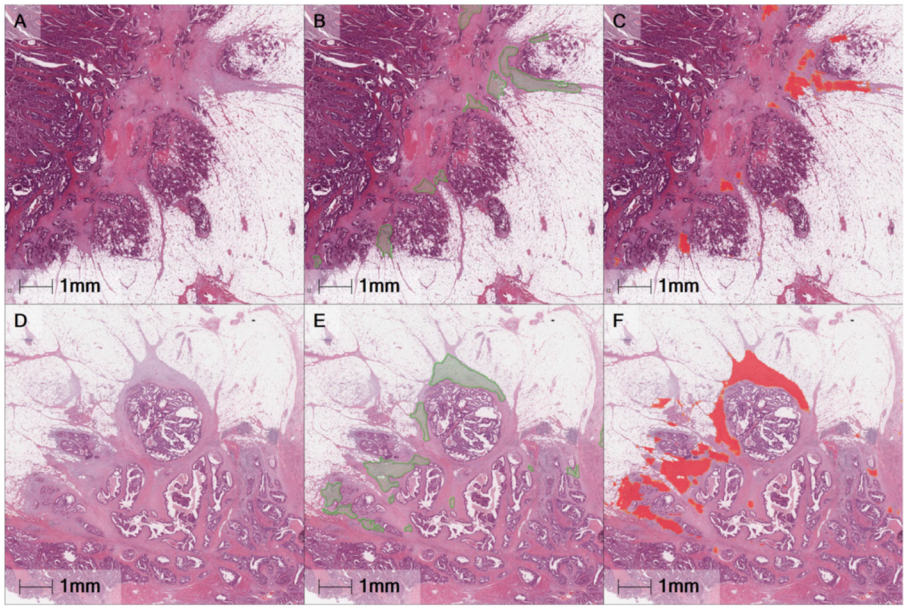


図 1. Myxoid stroma の AI 自動判定の例

A、D）Myxoid stroma が存在する HE 標本。

B、E）手動で同定した Myxoid stroma（緑）。

C、F）AI 自動判定により同定された Myxoid stroma（赤）。

スケールバー：1 mm。

2）Myxoid stroma の自動判定

Classifier により同定された myxoid stroma 領域を 528 例の training set において解析した（図 2）。Margin 1 を評価した場合の最大 myxoid stroma の面積、Margin 2 を評価した場合の総 myxoid stroma 領域は良好な予後因子であった。多変量解析の結果、Margin 2 を評価した場合の総 myxoid stroma 領域が最も強い予後因子であり（$p<0.001$）、次いで N stage であった（$p=0.021$）。

Training set において有意な因子であった Margin 1 を評価した場合の最大 myxoid stroma の面積、Margin 2 を評価した場合の総 myxoid stroma 領域、手動の DR 分類を test set において検証したところ、Cox regression 単変量解析ではいずれの因子も有意な因子であったが（それぞれ p＜0.001、p＝0.036、p＝0.033）、AI 自動判定の予後分別能は手動分類を凌ぐことが示された。

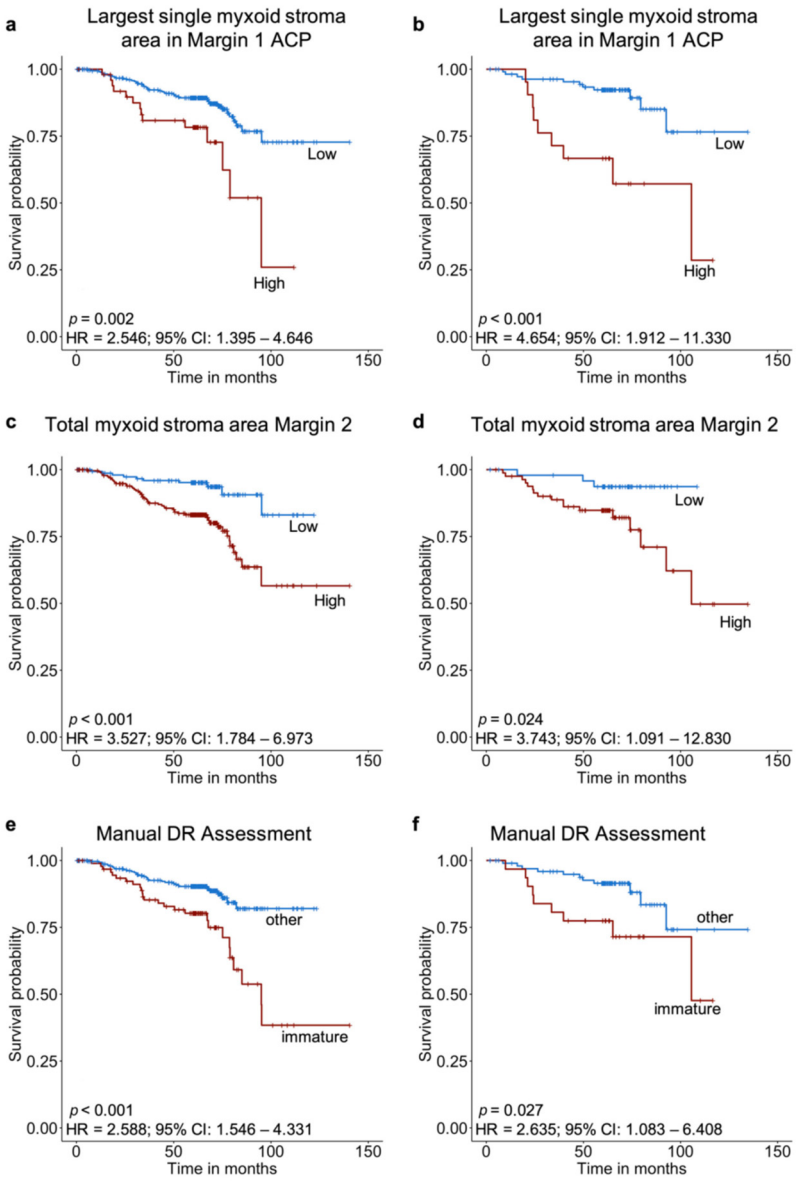


図 2. AI 自動判定と手動判定による Myxoid stroma 分類と予後

a) Margin 1 の最大 myxoid stroma 面積（training set）。

b) Margin 1 の最大 myxoid stroma 面積（test set）。

c) Margin 2 の総 myxoid stroma 領域面積（training set）。

d) Margin 2 の総 myxoid stroma 領域面積（test set）。

e) 手動判定による immature stroma（対物 40 倍視野領域以上の myxoid stroma）（training set）。

f) 手動判定による immature stroma（対物 40 倍視野領域以上の myxoid stroma）（test set）。

2. DR 分類の分子生物学的背景

1）DR 分類別の CAF が腫瘍増殖に及ぼす影響の評価

大腸癌株化細胞と DR 分類別に採取した CAF の培養上清とを共培養したところ、immature DR 症例から採取された CAF 培養上清は mature DR 症例から採取した CAF 培養上清と比較して、共培養した大腸癌株化細胞の細胞増殖を有意に促進した（図 3A）。

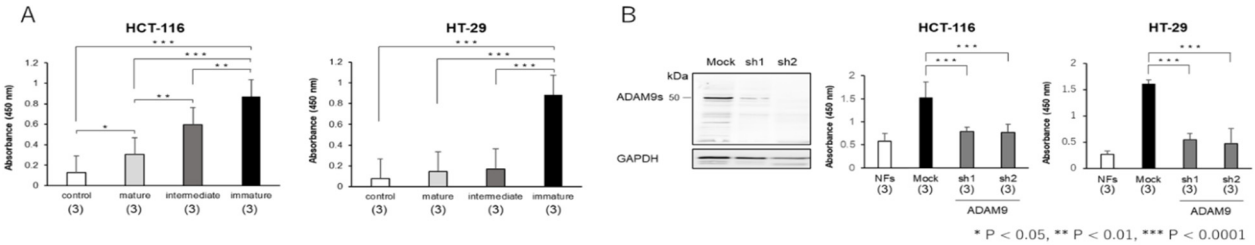


図 3. CAF の培養上清を用いた大腸癌株化細胞増殖アッセイ

A） DR 分類別の CAF 培養上清と共培養した大腸癌株化細胞の増殖度。immature DR 症例由来の CAF の培養上清は癌細胞の増殖を有意に促進させた。BrdU の取り込み法による細胞増殖アッセイキットで解析。

B） ADAM9 をノックダウンした CAF の培養上清による大腸癌株化細胞の増殖能の変化。ADAM9 を shRNA でノックダウンした CAF の培養上清と共培養した大腸癌株化細胞は増殖が有意に抑制された。BrdU の取り込み法による細胞増殖アッセイキットで解析。

*P＜0.05、**P＜0.01、***P＜0.0001（Student's t test）。

DR 分類別に採取した CAF を 2 種類の大腸癌株化細胞にそれぞれ混合したものを BALB/cSlc-nu/nu マウスに皮下注射し、平均腫瘍体積を経時的に測定したところ、いずれの大腸癌株化細胞においても immature DR 症例由来の CAF と混合した群で増殖が促進された。同様に、DR 分類別に採取した CAF を蛍光標識した 2 種類の大腸癌株化細胞へそれぞれ混合したものをマウスの盲腸漿膜下層に注入したところ、mature DR 症例と比較して immature DR 症例から採取した CAF を混合した群で高い増殖能を示し、mature DR 群に比較して immature DR 群では腹膜播種の形成が高度であった（図 4）。

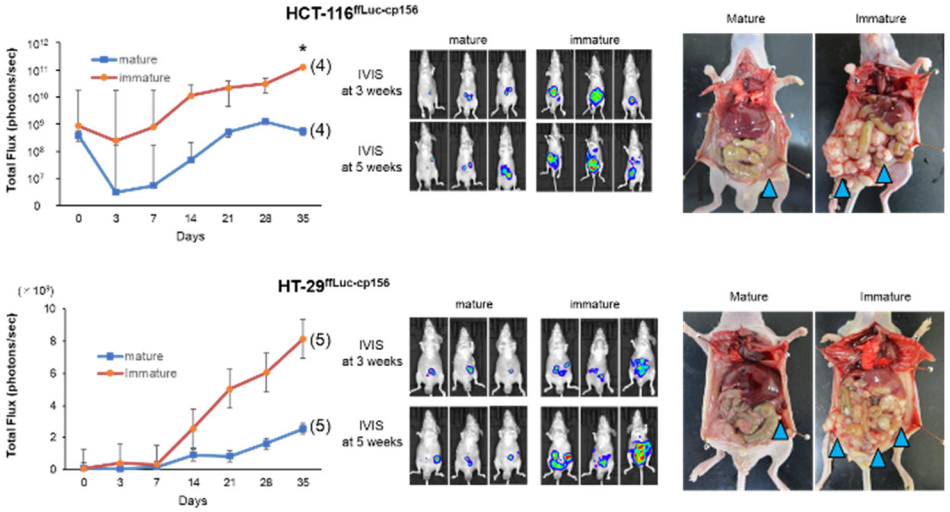


図 4. マウス盲腸漿膜下層移植モデルにおける DR 分類別の CAF と混合した大腸癌株化細胞の増殖

immature DR 症例由来の CAF は大腸癌株化細胞の移植片を有意に増大させ、腹膜播種を高度に形成させた。IVIS™ 100 camera system を用いた発光イメージングによる解析。HCT-116$^{ffluc\text{-}cp156}$：P＜0.05 および HT-29$^{ffLuc\text{-}cp156}$：P＝0.076（Wilcoxon signed-rank test）。

2）DR 分類と CAF における ADAM9 の発現の関連

RT-PCR 法を用いてヒト大腸癌の CAF における ADAM の mRNA 発現を検討したところ、ADAM9、ADAM10、ADAM12 および ADAM17 が 50%以上の CAF において発現していた。ADAM9 の発現は、mature DR 症例から採取した CAF に比較して immature DR 症例から採取した CAF において高度であった。イムノブロット法にて、ADAM9 は mature DR 症例から採取した CAF では発現がごく僅かまたは認められず、immature DR 症例から採取した CAF では 50 kDa の活性型（ADAM9s）として発現していることを確認した。免疫組織化学染色にて ADAM9 が癌間質に発現していることを確認した。

手術で摘出された大腸癌の新鮮凍結検体の検討にて、ADAM9 の mRNA は、mature DR 症例の癌間質と比較して intermediate DR 症例および immature DR 症例の癌間質で有意に上昇していた。

3）CAF の ADAM9 の発現が癌悪性度に及ぼす影響の評価

細胞増殖における ADAM9 の直接的な関与の有無を検討するため、3 種類の CAF に ADAM9 shRNA（sh1 および sh2）を核酸導入した。ADAM9 の発現をノックダウンさせた CAFsh-1 および CAFsh-2 の培養上清（各 n＝3）と共培養した大腸癌株化細胞では、mock 群と比較して有意に BrdU の取り込みが低下し、細胞増殖が抑制された（sh1：P＜0.0001 および sh2：P＜0.0001（HCT-116）、sh1：P＜0.0001 および sh2：P＜0.0001（HT-29）、BrdU の取り込み法による細胞増殖アッセイキットで解析）（図 3B）。

次いで大腸癌患者の摘出標本から作製した 5 症例のオルガノイドを使用し実験を行った。イムノブロット法により、immature DR 症例から採取した CAF の培養上清は、mature DR 症例から採取した CAF の培養上清に比較して、オルガノイドにおける PCNA の発現を増加させた（図 5）。また、CAFsh-1 および CAFsh-2 の培養上清と共培養したオルガノイドでは mock 群と比較して PCNA の発現が抑制された。

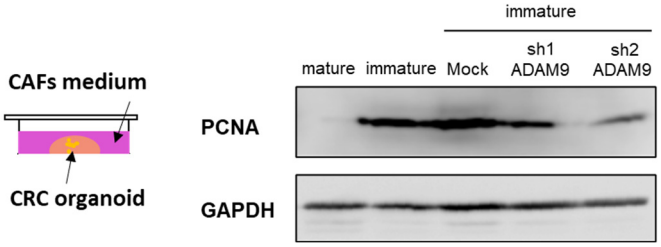


図 5. DR 分類別の CAF 培養上清を用いたオルガノイド増殖アッセイ

immature DR 症例由来の CAF 培養上清はオルガノイドにおける PCNA タンパク質の発現を有意に増強させた。また、shRNA により ADAM9 をノックダウンした CAF の培養上清では PCNA タンパク質の発現が抑制された。

考　察

大腸癌の現在の治療指針の柱は病期であり、個々の癌の悪性度をその要素に取り入れる手段は乏しい。我々は、大腸癌の浸潤先進部に特異的な癌の脱分化や間質の形態学的変化の研究に基づき、癌悪性度を的確に把握する DR 分類を提唱し、国内ではこれらを inclusion criteria に用いて治療法を検証するランダム化比較試験も開始された [4]。一方、DR 分類を規定する分子生物学的特性は明らかでなかった。本研究は形態学的多様性を基軸に、癌悪性度と治療耐性に関わる分子を同定する研究の一環として、以下の新しい知見を明らかとした。

1．AI 技術を用いた Myxoid stroma の診断精度を評価し、予後予測能に優れていることを明らかにした

本研究の結果から、deep learning に基づく immature stroma の自動判定は、従来法の判定と一致度が高いことが示されると共に、より精緻な予後予測を可能とすることが示唆された [7]。従来の DR 分類における immature stroma の判定は顕微鏡下に DR 分類を評価することを前提としており、対物 40 倍基準は判定の再現性を高め、簡易性に優れ

たものである。一方、myxoid 間質は必ずしも定形ではなく、一般的に不整形である。今回の検討は、その不整形の myxoid 間質の面積の評価が、予後判定の精度を高めることを示したものでもある。AI 技術により再現性の高い先進部病理診断を可能とすることができれば、本分類の臨床導入が加速されることが期待される。実臨床で作製される HE 染色標本を用いた診断方法は費用対効果に優れていることから、医療財政の観点からも利益が大きい。

本研究の limitation として、比較的小数例での検証にとどまっていることが挙げられ、今後多施設研究が望まれる。また、現在のところ keloid-like collagen の自動判定法が確立し得ていない。この判定方法が確立した場合には予後良好症例の抽出が可能となり、術後補助化学療法が不必要な症例の選別に寄与することが期待されよう。

2. DR 分類の背景に CAF の多様性が存在することを明らかとし、CAF に発現される ADAM9 の意義を同定した

CAF は癌微小環境を構築する主たる細胞であり、癌細胞やその他の間質細胞とシグナル伝達を行って腫瘍動態を制御している。しかしながら、CAF の生物学的機能は不均一で、CAF の種類が異なればその機能も異なると考えられており、近年では腫瘍進展を促進する CAF のみならず、抑制的に作用する CAF の報告も散見される。DR 分類は腫瘍の発育先進部を評価する分類法であり、その分類要素である myxoid stroma や keloid-like collagen の形成には CAF が中心的な役割を担っていると考えられることから、先進部における CAF が heterogenous な集団であることが示唆される［8］。本研究において immature 由来の CAF において旺盛な腫瘍増殖や腹膜播種が観察されたが、immature 型の DR 反応を示す腫瘍を有する症例において転移が多く、予後が不良である臨床的転機を再現しているものであり、DR 分類の臨床的意義の中心に CAF の多様性があることを示唆する結果である。

myxoid stroma と keloid-like collagen は浸潤先進部に特異的に観察される。また先進部全体に観察されるとは限らず、先進部の一部の領域に限定して認められることが多い。腫瘍の中央部は mature DR で構成される。このため myxoid stroma と keloid-like collagen は、腫瘍の発育過程における一過性の表現型と考えられ、宿主の防御を回避して腫瘍の浸潤傾向が強い部分でこれらの表現型が形成され、腫瘍と宿主による攻撃と防御のせめぎ合いが終結することで mature DR へと変化していくという過程が推察される。すなわち、腫瘍増殖に抑制的な CAF が mature DR を形成し、促進的な CAF が myxoid stroma と keloid-like collagen を形成するという仮説が考えられる。

本検討で、DR 分類別の CAF における ADAM の網羅的解析より、ADAM9 の発現に有意差を認め、さらにこれが癌細胞の増殖能に影響を及ぼしている可能性が示唆された。ADAM は膜貫通型タンパク質であり、細胞表面に存在するタンパク質の分解を媒介し、細胞間および細胞－ECM 間の相互作用を調節している。ADAM の生物学的機能は多様であり、細胞接着、融合、遊走、膜タンパク質のシェディング、ECM 分解などに関与している［6］。その中でも、主要な作用は膜タンパク質の細胞外ドメインを切断・遊離するシェディングにあると考えられており、TNF-α のみならず TGF-α や EGF、HB-EGF などの膜型増殖因子を遊離させ、インテグリンとの結合を介した細胞内シグナルの調節を行うことで細胞の増殖や分化に関与している。

今回、DR 分類別に CAF を培養し ADAM の発現を検討したところ、より immature な DR 由来の CAF で ADAM9 の発現が増強していたことから、ADAM9 が myxoid stroma や keloid-like collage といった特異的な形態を示す DR の形成に関与している可能性が窺われた。また、ADAM9 が癌細胞の増殖に関与し、ADAM9 をノックダウンすることで CAF 混合時の大腸癌株化細胞やオルガノイドの増殖が抑制されたことから、ADAM9 が大腸癌患者における治療標的となる可能性が示唆された。近年、ADAM9 を標的とした抗体薬物複合体が開発され、非小細胞肺癌、胃癌および大腸癌モデルのマウスにおいて抗腫瘍効果を示すことが報告されている。今後、ヒトに対する ADAM9 を標的とした治療薬の開発により、大腸癌領域においては immature DR を有する予後不良な症例群への治療効果が期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、防衛医科大学校外科学講座の望月早月学内講師、阿尾理一医師、梶原由規講師、St Andrews 大学の Ines Nearchou 研究員である。研究にご協力いただきました順天堂大学大学院医学研究科運動器・腫瘍性疾患病態学講座の岡田保典先生、金沢大学がん進展制御研究所腫瘍遺伝学研究分野の大島正伸先生、大島浩子先生、中山瑞穂先生、慶応義塾大学医学部病理学教室の下田将之先生、上野万里先生に感謝いたします。最後に、本研究は

上原記念生命科学財団よりご支援いただき上記の成果を得ることができました。ここに厚く御礼申し上げます。

文　献

1) Ueno H, Jones AM, Wilkinson KH, Jass JR, Talbot IC. Histological categorisation of fibrotic cancer stroma in advanced rectal cancer. Gut. 2004 Apr;53(4):581-6. doi: 10.1136/gut.2003.028365. PMID: 15016755
2) Ueno H, Kanemitsu Y, Sekine S, Ishiguro M, Ito E, Hashiguchi Y, Kondo F, Shimazaki H, Kajiwara Y, Okamoto K, Mochizuki S, Tsujimoto H, Shinto E. A multicenter study of the prognostic value of desmoplastic reaction categorization in stage II colorectal cancer. Am J Surg Pathol. 2019 Aug;43(8):1015-1022. doi: 10.1097/PAS.0000000000001272. PMID: 31094924
3) Nearchou IP, Kajiwara Y, Mochizuki S, Harrison DJ, Caie PD, Ueno H. Novel internationally verified method reports desmoplastic reaction as the most significant prognostic feature for disease-specific survival in stage II colorectal cancer. Am J Surg Pathol. 2019 Sep;43(9):1239-1248. doi: 10.1097/PAS.0000000000001304. PMID: 31206364
4) Ueno H, Kajiwara Y, Ajioka Y, Sugai T, Sekine S, Ishiguro M, Takashima A, Kanemitsu Y. Histopathological atlas of desmoplastic reaction characterization in colorectal cancer. Jpn J Clin Oncol. 2021 Apr 14:hyab040. doi: 10.1093/jjco/hyab040. Online ahead of print. PMID: 33855369
5) Ueno H, Ishiguro M, Nakatani E, Ishikawa T, Uetake H, Murotani K, Matsui S, Teramukai S, Sugai T, Ajioka Y, Maruo H, Kotaka M, Tsujie M, Munemoto Y, Yamaguchi T, Kuroda H, Fukunaga M, Tomita N, Sugihara K. Prognostic value of desmoplastic reaction characterization in stage II colon cancer: prospective validation in a phase III study (SACURA Trial). Br J Cancer. 2021 Mar;124(6):1088-1097. doi: 10.1038/s41416-020-01222-8. Epub 2021 Jan 7. PMID: 33414540
6) Mochizuki S, Ao T, Sugiura T, Yonemura K, Shiraishi T, Kajiwara Y, Okamoto K, Shinto E, Okada Y, Ueno H. Expression and function of a disintegrin and metalloproteinases in cancer-associated fibroblasts of colorectal cancer. Digestion. 2020;101(1):18-24. doi: 10.1159/000504087. Epub 2019 Nov 13. PMID: 31722362
7) Nearchou IP, Ueno H, Kajiwara Y, Lillard K, Mochizuki S, Takeuchi K, Harrison DJ, Caie PD. Automated Detection and Classification of Desmoplastic Reaction at the Colorectal Tumour Front Using Deep Learning. Cancers (Basel). 2021 Mar 31;13(7):1615. doi: 10.3390/cancers13071615. PMID: 33807394
8) Sueyama T, Kajiwara Y, Mochizuki S, Shimazaki H, Shinto E, Hase K, Ueno H. Periostin as a key molecule defining desmoplastic environment in colorectal cancer. Virchows Arch. 2020 Nov 19. doi: 10.1007/s00428-020-02965-8. Online ahead of print. PMID: 33215229