HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	肝内胆管癌における上皮間葉転換に関する分子の発現と臨床病理学的研究
Author(s)	寺下, 勝巳
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第11678号
Issue Date	2015-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k11678
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/60962
Type	theses (doctoral)
Note	配架番号：2160
File Information	Katsumi_Terashita.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

肝内胆管癌における上皮間葉転換に関する分子の発現と臨床病理学的研究

(Studies on EMT-related molecules in intrahepatic cholangiocarcinoma.)

2015 年 3 月

北　海　道　大　学

寺下　勝巳

学　位　論　文

肝内胆管癌における上皮間葉転換に関する分子の発現と臨床病理学的研究

(Studies on EMT-related molecules in intrahepatic cholangiocarcinoma.)

2015 年 3 月

北　海　道　大　学

寺下　勝巳

目次

発表論文の目録および学会発表目録 1

緒言 2

略語表 5

対象と方法 6

結果 11

考察 19

総括および結論 24

謝辞 26

利益相反開示 26

引用文献 27

発表論文の目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に投稿した。

1. Katsumi Terashita, Makoto Chuma, Kanako C. Hatanaka, Yutaka Hatanaka, Tomoko Mitsuhashi, Hideki Yokoo, Takumi Ohmura, Hiroyuki Ishizu, Syunji Muraoka, Atsushi Nagasaka, Takahiro Tsuji, Yoshiya Yamamoto, Nobuaki Kurauchi, Norihiko Shimoyama, Hidenori Toyoda, Takashi Kumada, Yuji Kaneoka, Atsuyuki Maeda, Koji Ogawa, Mitsuteru Natsuizaka, Tatsuhiko Kakisaka, Toshiya Kamiyama, Akinobu Taketomi, Yoshihiro Matsuno, Naoya Sakamoto. ZEB1 expression is a potential prognostic indicator in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Journal of Gastroenterology and hepatology.* 2014

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Katsumi Terashita, Makoto Chuma, Kanako Hatanaka, Yutaka Hatanaka, Tomoko Mitsuhashi, Hideki Yokoo, Takumi Ohmura, Atsushi Nagasaka, Koji Ogawa, Hidenori Toyoda, Takashi Kumada, Goki Suda, Mitsuteru Natsuizaka, Toshiya Kamiyama, Akinobu Taketomi, Naoya Sakamoto, ZEB1 Expression is a Significant Prognostic Marker in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. The Asian Pacific Association for the Study of the Liver(APASL), 2014.3.12-15, Brisbane

2. 寺下勝巳,畑中佳奈子, 畑中豊, 三橋智子, 横尾英樹, 大村卓味, 石津寛之, 永坂敦, 山本義也, 小川浩司, 倉内宣明, 豊田秀徳, 熊田　卓, 金岡祐次, 堀本啓大, 荘拓也, 夏井坂光輝, 神山俊哉, 武冨紹信, 坂本直哉 肝内胆管癌における ZEB1 と EMT 関連分子の臨床病理学的検討 第 50 回肝臓総会. 2014 年 5 月 30 日　東京.

緒言

肝内胆管癌（Intrahepatic cholangiocarcinoma :ICC）は胆管の二次分枝及びその末梢の胆管上皮から発生する悪性腫瘍と定義されている。肝原発癌の中で肝細胞癌に次いで二番目に多く、本邦では約 10%程度と比較的稀であるが、国際的にも肝内胆管癌の発症は増加を辿っている [1-3]。有効的な治療は外科的切除であるが、手術根治後も高頻度に再発転移を来し、極めて予後不良な癌腫の一つである（手術根治後/手術以外の 5 年生存率;41%/ 26%）[3]。肝内またはリンパ節、他臓器へ高頻度に転移再発し、これらが予後規定因子となる場合が多いにも関わらず、その分子機構は不明な点が多く残されている [4]。更に切除不能例の肝内胆管癌症例に対して有効な化学療法は確立されていない [4,5] 。肝内胆管癌の転移再発、癌の進展に関与する分子機構を解明することは、いまだ予後不良な肝内胆管癌における有効的な治療の開発や新たな biomarker の同定に導く重要な課題である。

Epithelial-Mesenchymal Transition（EMT;上皮間葉転換）は上皮細胞が間葉系様細胞に形態変化する現象であり、初期胚発生、器官形成過程で必須の現象であると考えられている [7]。 一方、EMT の獲得が細胞運動性の亢進や細胞外基質の変化をもたらすことから、癌細胞の浸潤、転移に関する重要な機序として近年注目されている [8]。EMT の誘導と維持には、各種転写因子と細胞表面に存在する接着分子、細胞外マトリックスを含む細胞外微小環境が重要な役割を果たしている。EMT の過程において、上皮細胞間の構造接着に欠かすことのできない E-cadherin を始めとした上皮系 marker は消失し、Vimentin 等の間葉系 marker は誘導される [6-8]。E-cadherin の欠如は細胞接着因子を分解し、近接した上皮細胞の結合を欠失、組織の構造を破壊し、細胞の運動能の亢進、転移浸潤能の亢進に関与すると考えられている [6-8]（図 1)。近年 EMT を誘導するいくつかの転写因子が同定され、snail superfamily, basic helix-loop-helix（bHLH）family, ZEB family（ZEB1, ZEB2）等が報告されている [9-12]。

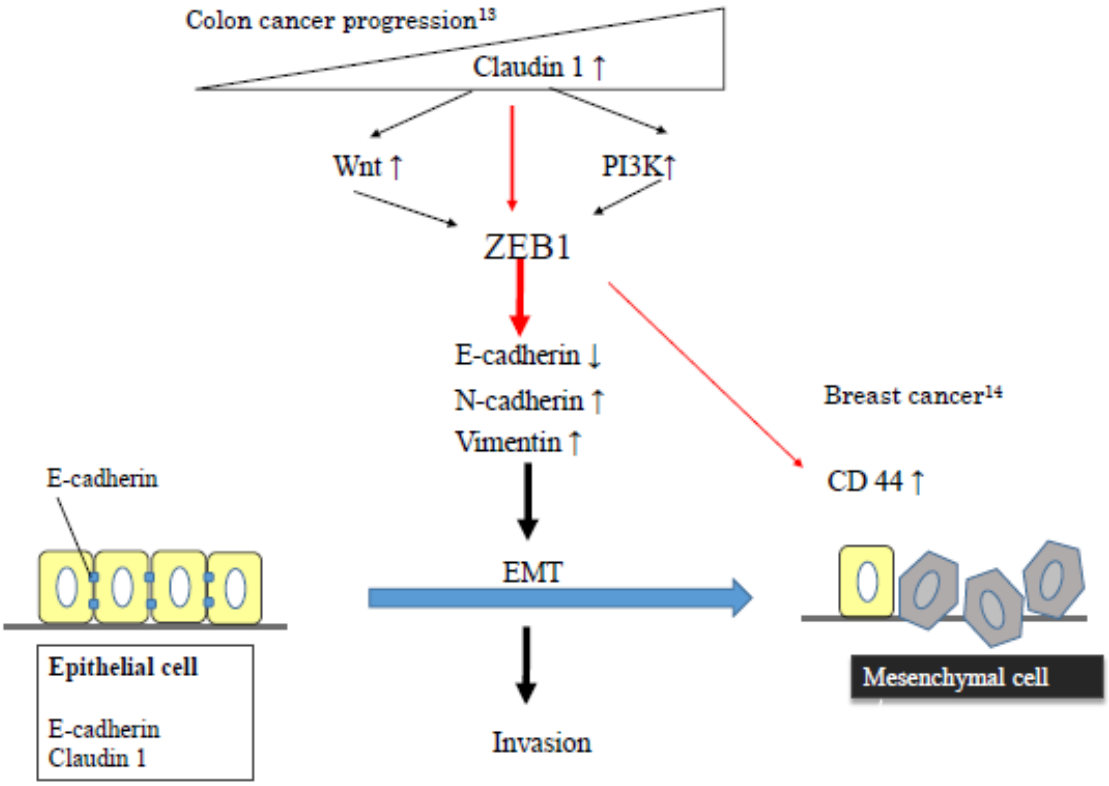
ZEB family 遺伝子は複数の機能ドメインを持ち、遺伝子の両端に 2 ヶ所の Zing finger モチーフがある（図 2)。Zing finger モチーフは真核生物において最も頻度の高い DNA 結合モチーフであるため、ZEB family は Zing finger モチーフを介して様々な遺伝子のプロモーター領域に結合し、遺伝子の発現を制御する主要な転写因子である。ZEB1 の重要な特徴として E-cadherin の喪失があり、ZEB1 は近年 EMT の master molecule として注目されている。更に ZEB1 に制御される EMT 関連分子として、N-cadherin、Vimentin [13], zonula occludens-1(ZO1)、Notch 3、MMP family、がん幹細胞マーカーCD44[14]、ZEB1 を制御する EMT 関連分子として Claudin-1[15] が報告されており、ZEB1 は様々

な経路で EMT に関わる key molecule と考えられている。CD44 は、様々な細胞外マトリックスと結合する接着分子であり、細胞-細胞間及び細胞-基質間の接着、細胞運動、癌細胞の増殖、転移などに深く関与している分子である[16]。CD44 の EMT における関与として、EMT 後の CD44 の発現の高い間葉系癌細胞が Cancer stem cell であることや[29]、ZEB1 により CD44 の発現が制御される事が報告されている[14](図 1)。Claudin-1 は Tight junction（細胞間接着装置）形成に必須の 4 回膜貫通蛋白質であり[31]、EMT 獲得に際し、Claudin-1 の発現変化が知られている（図 1)。

EMT 関連分子の発現が、多臓器癌の予後、浸潤、転移能に関する臨床病理学的因子と相関することが多数報告されており、更に最近肝内胆管癌においても、EMT 関連分子の高発現が予後と相関することが報告されている[16 17 18]。しかし EMT 関連分子の肝内胆管癌における症例数は少なく、その臨床病理学的意義についてはいまだ不明であり、EMT の master molecule である ZEB1 についての報告はない。

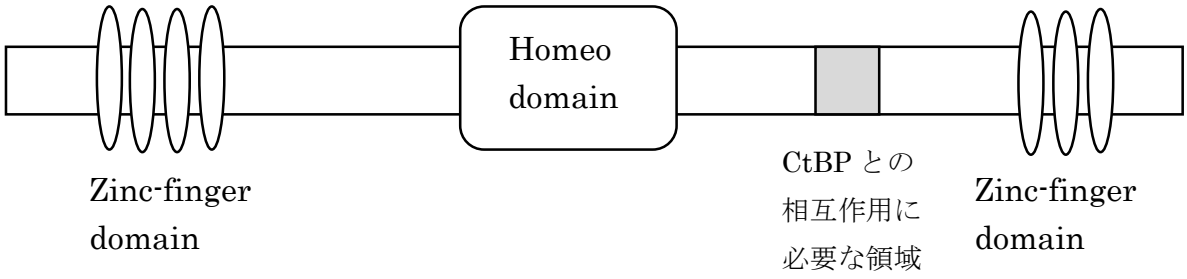
本研究は、肝内胆管癌の悪性度進展、転移再発の機構として EMT に注目し、肝内胆管癌におけるにおける ZEB1 を始めとした EMT 関連分子（E-cadherin, Vimentin, Claudin-1, CD44）について網羅的に免疫組織学的染色を行い、肝内胆管癌におけるにおける EMT の臨床病理学的意義を明らかにする事を目的とした。

図 1 上皮間葉転換(EMT)における ZEB1 と EMT 関連分子の関連



＊[15]: GASTROENTEROLOGY 2011;141:2140–2153 ＊[14]: Cell. 2013; 154: 61–74

図 2 ZEB1 の構造



E-cadherin のプロモーター領域に結合し、更に co-suppressor である C 末端結合タンパク質(CtBP)を引き寄せることにより、E-cadherin の suppressor として働く

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

CH	chronic hepatitis
CT	computed tomography
EMT	epithelial-mesenchymal transition
ICC	intrahepatic cholangiocarcinoma
IG	intraductal　growth type
LC	liver cirrhosis
MF	mass forming type
MRI	magnetic resonance imaging
OS	overall survival
PI	periductal-infiltrating type
TNM	tumor node metastasis
US	ultrasonography
ZEB1	Zinc finger E-box-binding homeobox factor 1
ZEB2	Zinc finger E-box-binding homeobox factor 2
ZO1	zonula occludens-1

対象と方法

1996 年から 2012 年に北海道大学病院（以下当院)、札幌厚生病院、市立札幌病院、市立函館病院、大垣市民病院において切除されホルマリン固定パラフィン包埋され保管されている肝内胆管癌 102 症例を材料とする。今回の研究とプロトコールについてはヘルシンキ宣言に準じて北海道大学病院及びそれぞれの共同研究施設の倫理審査委員会で承認をうけた。生存されている症例については文書による informed consent を取得した。死亡された症例については informed consent を取得せず認可を頂いた。

適格基準

適格基準は病理学的に典型的に肝内胆管細胞癌で腺癌と診断された症例で、臨床病理学的に術後経過を確認された症例を検討材料とした。除外基準は、術前に抗癌剤や放射線治療を施行した症例は除外とした。病理診断は WHO 基準に準じて診断した。

患者背景

患者の内訳について以下の通りに示す。（表 1）

男女比は 61.8 / 38.2%、年齢の中央値は 64 歳であり、背景肝組織は正常肝、慢性肝炎、肝硬変、58.8%, 36.2%, 4.9%であった。肝予備能の評価である Child-Pugh 分類は、grade A/B; 99.0/1.0%であった。B 型肝炎、C 型肝炎の感染陽性例は、14.7%, 18.6%であった。全症例の腫瘍形態型は腫瘤形成型、胆管浸潤型、胆管内発育型の他にそれぞれが混在した type が存在し、もっとも多い type は 73.5%を占める腫瘤形成型であった。分化度について高分化型は 20 (19.6%)例、中分化型は 58 (56.9%)例、低分化型 24 (23.5%)例であった。腫瘍径の中央値は 5.0cm で、TNM 分類による Staging では I/II/III/IVA/IVB でそれぞれ 5(4.9%)/ 25(24.5%)/ 29(28.4%)/ 38(37.2%)/ 5(4.9%)の結果となった。門脈腫瘍栓を有する症例は 43(42.2%)例、肝静脈内への腫瘍栓を症例は 23(22.5%)例、胆管内への腫瘍栓を有する症例は 43(42.2%)例、所属リンパ節に転移の所見を認めたものは 32(31.4%)例、肝内転移陽性は 24(23.5%)例であった。

表 1．患者背景

性別（n (%))男/女	63/39 (61.8/38.2)
年齢中央値（範囲）	64 (36-85)
Child-Pugh A/B/C 分類（n (%))	101/1/0 (99.0/1.0/0)
背景肝（n (%))正常肝/慢性肝炎/肝硬変	60/37/5 (58.8/36.2/4.9)
感染症（n (%)） NBNC/B/C	68/15/19 (66.7/14.7/18.6)
腫瘍形態（n (%)) MF/MF + PI/PI/IG/MF+IG	75/15/7/1/2(73.5/14.7/6.9/1.0/2.0)
分化度: 高/中/低（n (%))	20/58/24 (19.6/56.9/23.5)
腫瘍径 中央値（範囲）	5.0 (1.0-19.0)
TNM 分類（n (%)) I/II/III/IVa/IVb	5/25/29/38/5 (4.9/24.5/28.4/37.24.9)
門脈腫瘍栓（陽性率(%)) 0/1	59/43 (42.2)
静脈腫瘍栓（陽性率(%)） 0/1	79/23 (22.5)
胆管腫瘍栓（陽性率(%)) 0/1	59/43 (42.2)
リンパ節転移（陽性率(%)) 0/1	70/32 (31.4)
肝内転移（陽性率(%))0/1	78/24 (23.5)

(MF:腫瘤形成型 PI:胆管浸潤型 IG:胆管内発育型)

経過観察中は臨床学的評価を 1～3 か月毎、CT, MRI, US による画像評価を 2~3 か月毎に行い、観察期間の中央値は 35 か月(3-170 か月)であった。

免疫組織染色方法

手術検体のブロックを 5μm に薄切した．パラフィン切片を脱パラフィンし，水洗後，pH 9.0 の溶液中で，抗原賦活化処理装置（PT Link, DAKO）により 95℃で 20 分間加熱し，抗原を賦活化した．その後，Dako peroxidase blocking solution を用いてブロッキングを行い，各抗体（表 2）を一定の濃度、30 分間室温下で浸し，ポリマー法（En vision flex system for mouse monoclonal antibody and rabbit polyclonalantibody ; Dako, and simple stain system for goat polyclonal antibody; Nichirei, Tokyo, Japan）で検出した。免疫組織化学染色には，自動免疫染色装置（Autostainer plus, Dako）を使用した。 この方法は発色酵素の多数ついた高分子ポリマーを抗体に結合させることで、抗原抗体反応の発色感度を著しくあげる点である。従来の APAAP, LSAB, SABC 法と比較すると、約 2~5 倍の感度上昇があり、一次抗体の反応を overnight で行っていた抗体については、反応時間の短縮が可能となった。この方法の欠点として、

高分子ポリマーの分子量が大きいため、組織・細胞内への浸透性が若干低下する可能性が予想される。

EMT関連マーカー抗体としては，EMT誘導転写因子としてZEB1，Claudin-1の2種類、上皮系マーカーとしてE-cadherin，そして間葉系マーカーとしてVimentin、幹細胞マーカーとしてCD44、計5種類の抗体で検討を行った。それぞれの分子抗体の販売メーカー、染色部位、希釈濃度については以下の通りに示す。

表 2．抗体の染色設定

Antibody	Source	Second Antibody	The region of Aberrant expression in cancer	Dilution
ZEB1	Genway Biotech.inc	Mouse	Nuclear	1:20
E-cadherin	Invitrogen	Mouse	Membranous	1:2
Claudin-1	Invitrogen	Rabbit	Membranous	1:100
Vimentin	DAKO	Rabbit	Cytoplasm	1:1000
CD44	Themo Scientific	Mouse	Membranous	1:50

免疫組織化学的評価

免疫組織化学染色はFFPE ブロックより作製したwhole sectionの対象とした。Whole sectionの選択については病変部の辺縁で非病変部を共に含むもので、免疫組織化学染色を施行した．鏡検は患者臨床情報を確認せず、病理専門医2名と共に評価した。

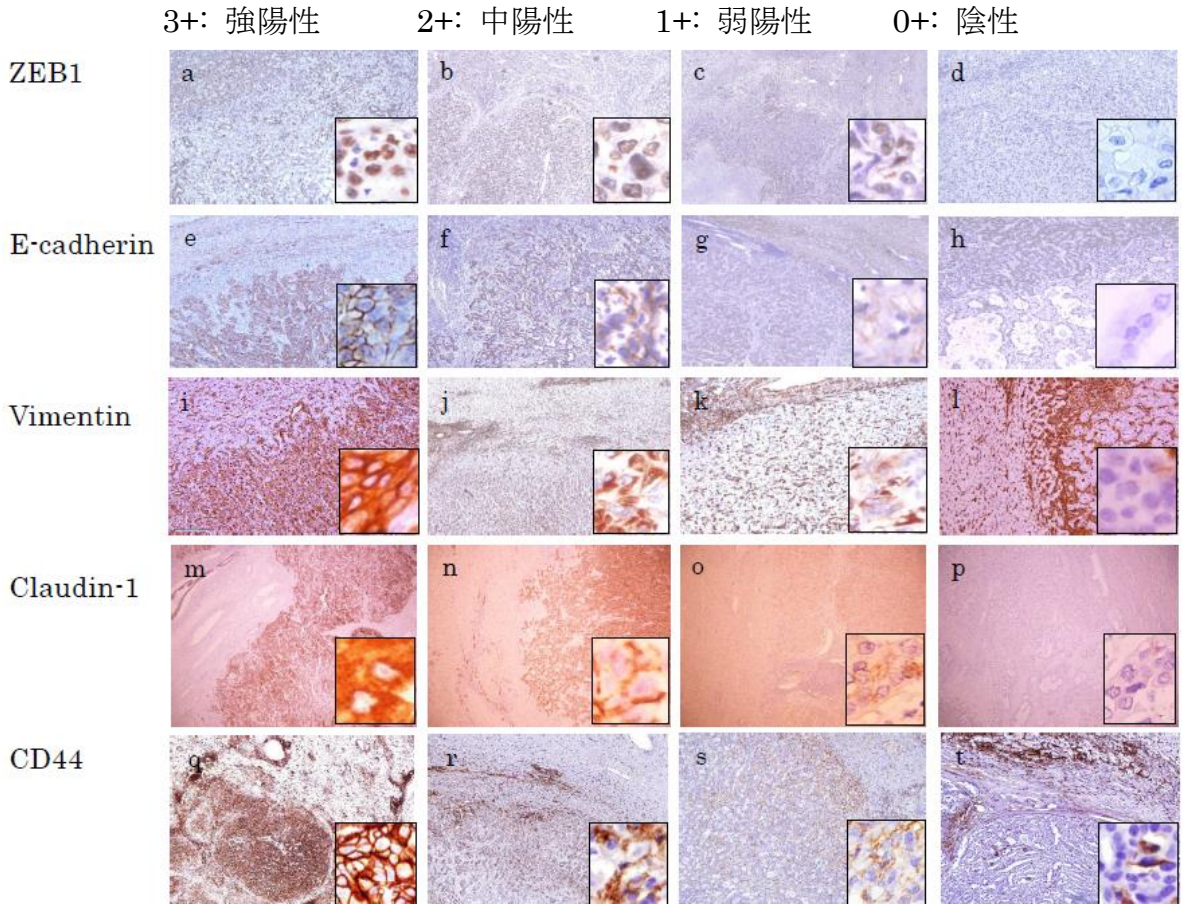
腫瘍細胞の免疫組織染色については強度と比率を評価した。免疫組織染色の強度は 4 つのスケール(0: 陰性，　1+: 弱陽性，2+: 中陽性, 3+: 強陽性）で分類し、各々の強度が切片内の病変部においてどれくらいの割合を占めるか、p_0, p_1, p_2, p_3 （p_x: 強度 X の病変部の比率(%)　$p_0+p_1+p_2+p_3=100$ ，　$0 \leqq p_0, p_1, p_2, p_3 \leqq 100$）を評価する。Total score は次の計算式で

$$t = p_0 \times 0 + p_1 \times 1 + p_2 \times 2 + p_3 \times 3$$

で、計算する。例えば、p_0= 100%の場合は total score t = 0 であり、p_3= 100%の場合は total score t = 300 である。それ故に total score は 0～300 の範囲内であり、この評価方法はほかの研究にも使用されている[19,20]。

今回の分子の免疫組織染色のそれぞれの強度について 4 つのスケール(0: 陰性，1+: 弱陽性，2+: 中陽性, 3+: 強陽性）で分類する。

図.3 各分子の染色強度の分類



今回の評価の基準となるコントロールについて、ZEB1 の免疫組織染色は間葉系成分である血管内皮細胞の核膜には中等度から強度の陽性像を示すことは報告されている。ZEB1 の免疫組織染色について非癌部の血管内皮細胞を internal control として基準とした[21]。同様に E-cadherin は internal control を非癌部の肝細胞の細胞膜、Vimentin については非癌部の肝細胞の細胞質とした。同様に Claudin-1 は非癌部胆管上皮、CD44 は繊維芽細胞とした。

上皮間葉転換の heterogeneity について、EMT 関連タンパク質を対象とする免疫組織化学染色による検討を行うにあたり，注意点するべき点として採取した腫瘍部が必ずしも腫瘍全体の組織型やタンパク質発現などの腫瘍内 heterogeneity を反映しているとは限らない点が挙げられる。近年，EMT 発現が腫瘍内で一定の分布傾向を認めることが報告されている[22]。 Tsuji らによるマウスを用いた実験から，EMT の発現を強く示す腫瘍細胞は主に腫瘍の先進部に分布する傾向があり，腫瘍内部には EMT 発現が比較的弱い細胞が占めるという仮説を提唱していた[22]。本研究ではこの先行研究として，EMT 発現細胞の heterogeneity を確認するため，無作為に 10 例の症例で腫瘍先進部（腫瘍と正

常間質の境界部）と腫瘍内部を病理専門医にも ZEB1、E-cadherin, vimentin の染色標本を用い評価した。染色の強度、癌部内における割合についていずれも大きな相違がないことを確認した。

統計解析

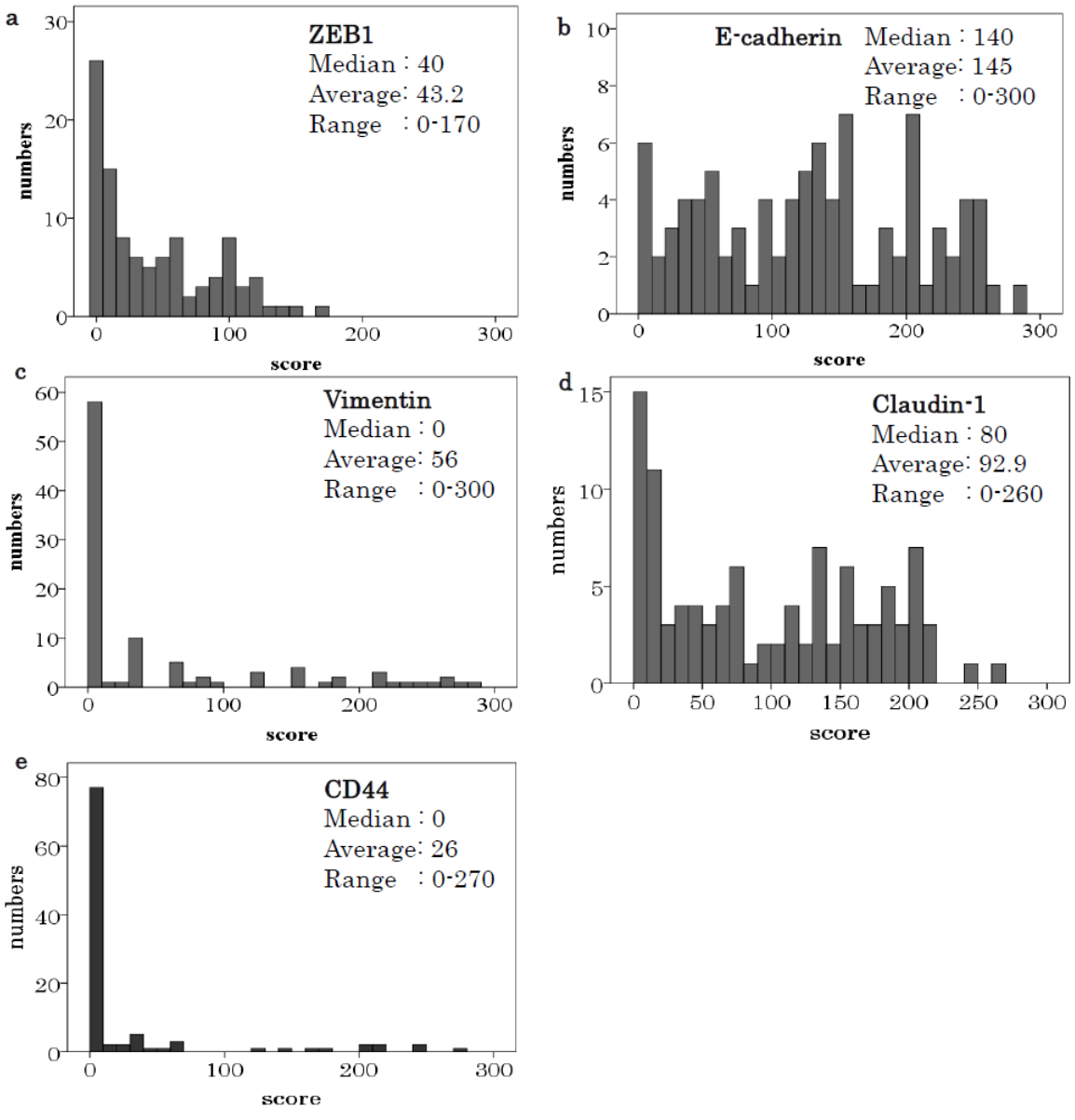
免疫組織化学染色の統計解析には χ^2 検定，Spearman's 検定を使用した．患者予後は，全生存率（Overall survival ; OS）にて検討を行った．単変量解析は Kaplan-Meier 法を用いた Log-rank 検定により行い、多変量解析は Cox の比例ハザードモデルにて検討した。検討する臨床病理学的因子としては，患者因子として性別、年齢、感染症、背景肝、腫瘍因子として腫瘍径、腫瘍個数、遠隔転移の有無、TNM 分類、分化度、リンパ管浸潤の有無、門脈浸潤の有無の計 11 項目である．χ2 検定，フィッシャーの正確検定，および Mann-Whitney の U 検定を使用した．p 値は 0.05 未満をもって有意とした．統計解析は SPSS version 20 を使用して行った。

結果

1. 肝内胆管癌における EMT 関連分子の発現

肝内胆管癌の腫瘍部における ZEB1, E-cadherin, Vimentin, Claudin-1, CD44 の発現は、症例全体の 46.1%, 43.1%, 44.1%, 75.5%, 14.7%に認めた。ZEB1, CD44 における正常肝細胞の発現はすべて陰性であった。肝内胆管癌症例における EMT 関連分子の免疫組織染色化学評価を示す(図 4)。

図.4 肝内胆管癌における各々の分子の免疫組織染色のスコア



ZEB1 の score 中央値は 40 (0-170)であり、E-cadherin の score の中央値は 140 (0-300)、Claudin-1 は 80 (0-260)、Vimentin は 0(0-300)、CD44 は 0(0-270)であった。この中央値を cut-off として、それぞれの EMT 分子の発現の差異により、全症例を高発現群(high group)、低発現群(low group)の 2 群に群別した。

2. 肝内胆管癌における ZEB1 と EMT 関連分子の発現による相関について

肝内胆管癌における ZEB1 と EMT 関連分子の発現の相関性について、表 3 に示す。

表 3 肝内胆管癌における各分子間の発現の関連性

		Case	ZEB1		*P*
			low	high	—
		102	55	47	
E-cadherin	:low	55	27	28	0.004*
	:high	47	28	19	
Vimentin	:low	58	37	21	0.022*
	:high	44	18	26	
Claudin-1	:low	44	23	21	0.771
	:high	58	32	26	
CD44	:low	78	44	34	0.363
	:high	24	11	13	

ZEB1, Zinc finger E-box-binding homeobox factor 1 *Significant *P* value. †

ZEB1 の発現は E-cadherin と逆相関(p=0.004)、Vimentin と同相関(p=0.022)を示した。Claudin-1 と CD44 の発現に有意な相関を認めなかった。

3. 肝内胆管癌における EMT 関連分子の発現と臨床病理学的因子の関連

表4-1. 分子間と臨床病理学的検討

	n	ZEB 1		*P*	E-cadherin		*P*	Vimentin		*P*
		low	high		low	high		low	high	
	102	55	47		45	57		58	44	
Sex Men	63	29	34	0.042*	31	32	0.188	33	30	0.245
Women	39	26	13		14	25		25	14	
Age (years)										
≦64	51	20	31	0.003*	24	27	0.550	28	23	0.689
> 64	51	35	16		21	30		30	21	
Viral infection †										
Present	68	40	28	0.160	31	37	0.672	43	25	0.066
Absent	34	15	19		14	20		15	19	
Background liver										
Normal	60	34	26	0.506	22	38	0.070	36	24	0.444
CH+LC	42	21	21		23	19		22	20	
Tumor size (cm)										
≦4.0	55	32	23	0.350	27	28	0.274	38	17	0.007*
> 4.0	47	23	24		18	29		20	27	
Nunber of tumors										
Single	83	45	38	0.900	37	46	0.845	49	34	0.354
Multiple	19	10	9		8	11		9	10	
Intrahepatic metastasis										
Absent	79	45	34	0.254	33	46	0.377	47	32	0.320
Present	23	10	13		12	11		11	12	
Extrahepatic										
metastasis Absent	97	54	43	0.178	42	55	0.463	55	42	0.885
Present	5	1	4		3	2		3	2	
TNM stage										
I+II+III	59	37	22	0.037*	23	36	0.221	34	25	0.855
IV	43	18	25		22	21		24	19	
Differentiation										
Well	20	16	4	0.017*	6	14	0.271	13	7	0.406
Moderately	58	30	28		26	32		34	24	
Poorly	24	9	15		13	11		11	13	
Lymph node metastasis										
Absent	70	43	27	0.024*	28	42	0.215	39	31	0.729
Present	32	12	20		17	15		19	13	
Portal vein invasion										
Absent	59	37	22	0.037*	22	37	0.104	39	20	0.027*
Present	43	18	25		23	20		19	24	
liver vein invasion										
Absent	79	42	37	0.776	48	31	0.141	36	43	0.584
Present	23	13	10		10	13		9	14	

表4-2

	n	CD44		*P*	Claudin-1		*P*
		low	high		low	high	
	102	78	24		44	58	
Sex Men	63	47	16	0.572	18	21	0.628
Women	39	31	8		26	37	
Age (years)							
≦64	51	41	10	0.350	22	29	1.000
> 64	51	37	14		22	29	
Viral infection †							
Present	68	52	16	1.000	33	35	0.120
Absent	34	26	8		11	23	
Background liver							
Normal	60	44	16	0.372	31	29	0.038*
CH+LC	42	34	8		13	29	
Tumor size (cm)							
≦4.0	55	44	11	0.363	25	30	0.609
> 4.0	47	34	13		19	28	
Number of tumors							
Single	83	65	18	0.359	34	49	0.354
Multiple	19	13	6		10	9	
Extrahepatic metastasis							
Absent	97	73	24	0.203	42	55	1.000
Present	5	5	0		2	3	
Intrahepatic metastasis							
Absent	79	64	15	0.045*	30	49	0.051
Present	23	14	9		14	9	
TNM stage							
I+II+III	59	47	12	0.374	20	39	0.027*
IV	43	31	12		24	19	
Differentiation							
Well	20	15	5	0.702	10	10	0.476
Moderately	58	46	12		22	36	
Poorly	24	17	7		12	12	
Lymph node metastasis							
Absent	70	55	15	0.459	25	45	0.025*
Present	32	23	9		19	13	
Portal vein invasion							
Absent	59	49	10	0.066	24	35	0.557
Present	43	29	14		20	23	
liver vein invasion							
Absent	79	64	15	0.045*	35	44	0.659
Present	23	14	9		9	14	

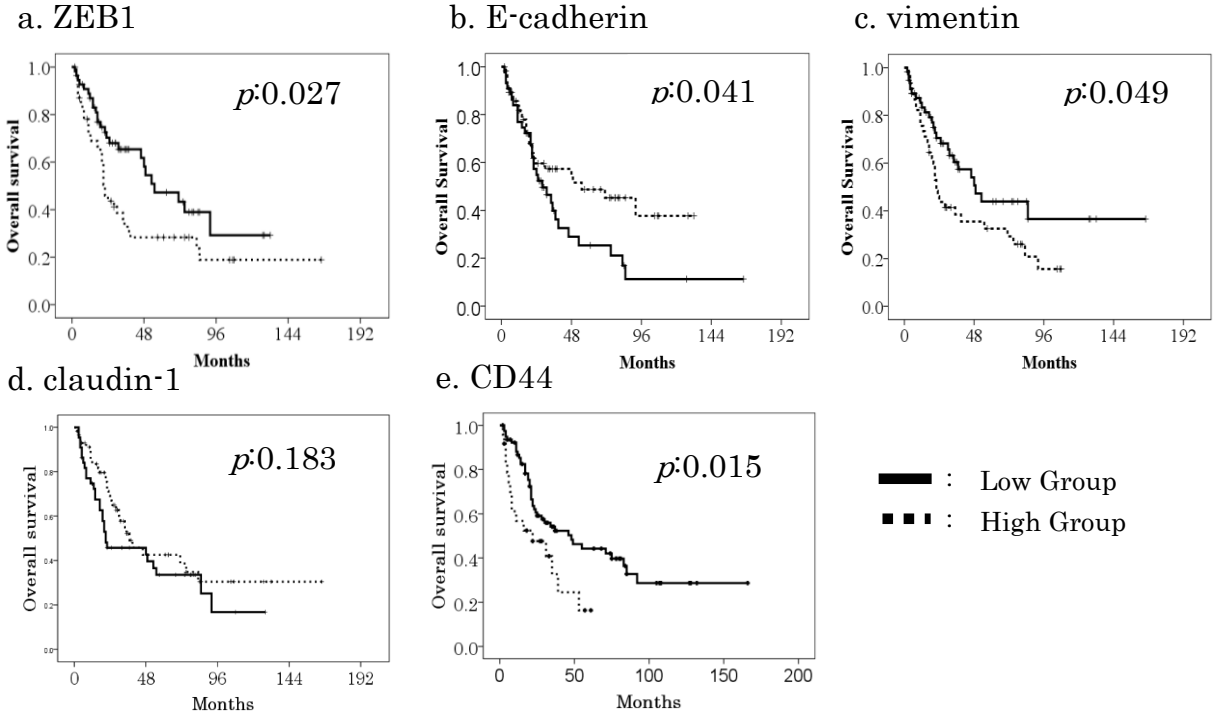
CH, chronic hepatitis; LC, liver cirrhosis; TNM, tumor node metastasis.
*Significant *P* value. † Hepatitis B virus or hepatitis C virus.

臨床病理学的因子11 項目とそれぞれの分子との関連性について表4に示す。χ2検定，フィッシャーの正確検定，および Mann-WhitneyのU検定では、ZEB1の高発現は、腫瘍の悪性度を反映する、TNM分類の進行癌Stage IV

(p=0.037)、低分化型腺癌（p=0.017)、リンパ節転移（p=0.024)、門脈浸潤(p=0.037)のある症例で多く認めた。E-cadherinと病理学的因子との相関は認めなかったが、Vimentinの高発現症例では腫瘍径が大きく(p=0.007)、門脈腫浸潤を有する傾向(p=0.027)を認めた。CD44の高発現は肝内転移(p=0.045)、肝静脈浸潤（p=0.045)を有する症例で多く認めた。Claudin-1の高発現はTNM分類の進行癌Stage IV (p=0.027)、リンパ節転移（p=0.025)の症例で多く認めた。

4. EMT 関連分子の発現と肝内胆管癌の生存期間について

図 5. EMT 関連分子の術後生存曲線



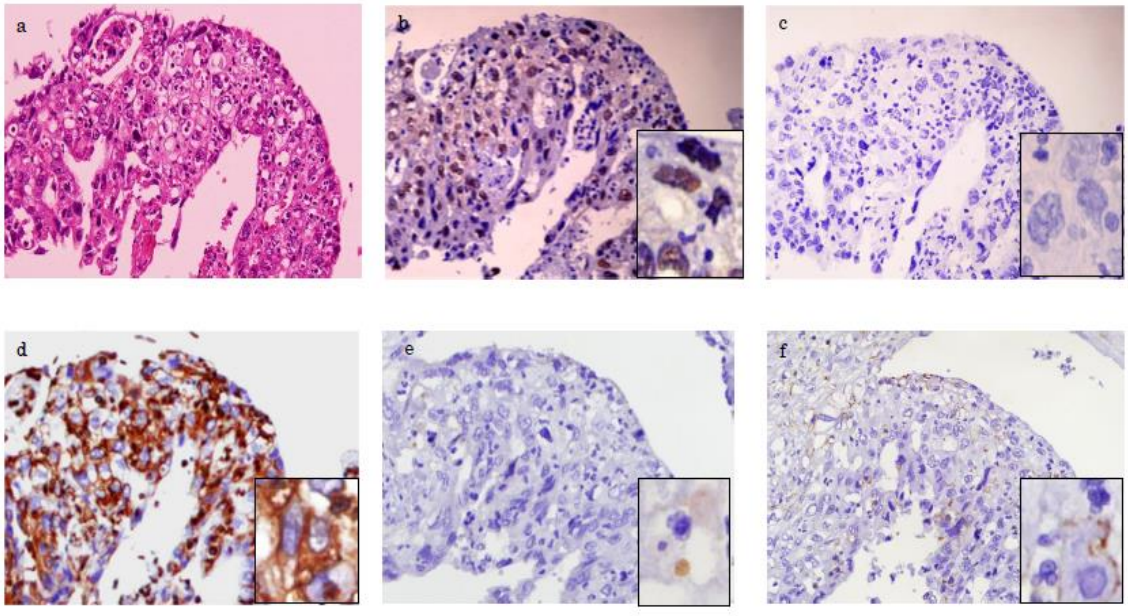
a. ZEB1			b. E-cadherin			c. vimentin		
Survival rate(%)	1 (y)	3 (y)		1 (y)	3 (y)		1 (y)	3 (y)
Low group	86.7	64.9		65.0	39.1		81.8	57.3
High group	71.2	33.5		92.6	58.8		76.9	39.8
d. claudin-1			e. CD44			(y):years		
Survival rate(%)	1 (y)	3 (y)		1 (y)	3 (y)			
Low group	81.8	57.3		74.7	45.8			
High group	76.9	39.8		83.5	52.2			

EMT 関連分子の発現の差異に基づいた肝内胆管癌患者の術後生存期間について Kaplan-Meier 法にて検討した。ZEB1 高発現群、低発現群の術後 3 年生存率はそれぞれ 33.5%、64.9%であり、ZEB1 の高発現群は有意に予後不良であった(p=0.027)。E-cadherin 高発現群は予後が良好であり(p=0.041)、高発現群、低発現群の術後 3 年生存率はそれぞれ 58.8%、39.1%であった。Vimentin 高発現群は予後不良で(p=0.049)、高発現群、低発現群の術後 3 年生存率はそれぞれ 39.8%、57.3%であった。Claudin-1 については、有意差はつかないものの高発現群は比較的予後良好であった。CD44 について高発現群は予後不良で(p=0.015)、高発現群、低発現群の術後 3 年生存率はそれぞれ 32.7%、54.2%であった。

5. EMT 関連分子の発現による肝内胆管癌症例の経過について—症例提示

症例 1 は 75 歳男性で、肝右葉を占拠する巨大腫瘍に対して、肝内胆管癌と診断し、肝右葉切除術を施行した。術後病理学的診断では低分化型腺癌、末梢門脈への浸潤を認めていた(vp1)。術後 8 か月後に肺転移を認め、術後 11 か月後に癌死された。手術検体の免疫組織染色では ZEB1、vimentin、CD44 は高発現を示し、E-cadherin、Claudin-1 は低発現を示した。

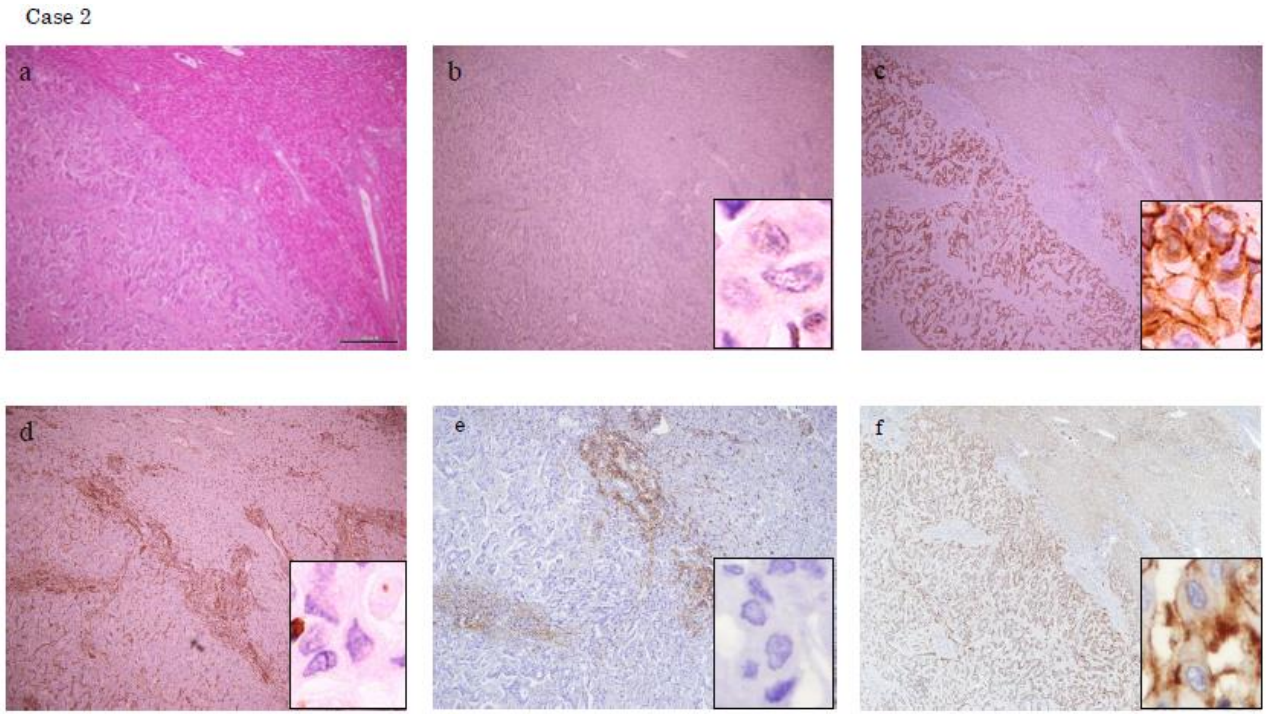
図 6-1



Antibody(score)		
H.E	ZEB1: 110	E-cadherin : 0
Vimentin: 210	CD44: 40	Claudin-1: 10

症例 2 は 74 歳女性で、肝右葉を占拠する巨大腫瘍に対して、肝内胆管癌と診断し、術後病理学的診断では中分化型腺癌で明らかな脈管への浸潤を認めなかった。術後 85 か月を経過するが、明らかな再発なく経過良好である。手術検体の免疫組織染色では ZEB1、vimentin、CD44 は低発現を示し、E-cadherin、Claudin-1 は高発現を示した。

図 6-2



Antibody(score)		
H.E	ZEB1: 20	E-cadherin : 230
Vimentin: 0	CD44: 0	Claudin-1: 300

6. 肝内胆管癌における重要な予後規定因子について

肝内胆管癌における重要な予後因子について単変量、多変量解析を用いて検討した。(表.5)

表 5 術後生存期間における規定因子に対する多変量解析

	Univariate analysis [a]	Multivariate analysis [b]	Hazard ratio (95% CI)
Sex (men)	0.041*	0.037*	2.046 (1.045-4.007)
Age (> 64 years)	0.885		
Number of tumors (multiple)	0.001>*	0.347	
Tumor size (≧4.0cm)	0.016*	0.616	
Differentiation (poorly)	0.001>*	0.017*	2.063 (1.139-3.737)
Lymph node metastasis (present)	0.001>*	0.023*	2.056 (1.105-3.827)
Portal vein invasion (present)	0.007*	0.397	
Intrahepatic metastasis(present)	0.001>*	0.023*	2.813 (1.157-6.838)
ZEB1 expression (high)	0.027*	0.852	
E-cadherin expression (low)	0.041*	0.318	
Vimentin expression (high)	0.049*	0.986	
Claudin-1 expression (low)	0.183		
CD44 expression (high)	0.027*	0.024*	2.241 (1.112-4.516)

95% CI, 95% confidence interval: [a] Log rank test [b] Cox proportional hazards *Significant *P* value.

臨床病理学的因子からログランク検定で解析したところ、性別、年齢、腫瘍個数、腫瘍径、分化度、リンパ節転移症例、門脈浸潤陽性症例、肝内転移症例、肝静脈浸潤陽性症例と共に今回検討した分子、ZEB1 高発現症例、CD44 高発現症例、E-cadherin 低発現症例、vimentin 高発現症例について比較的予後不良の因子として抽出された。

抽出された因子から多変量解析は Cox の比例ハザードモデルにて検討した。性別(Hazard ratio 2.046, 95% CI; 1.045-4.007 *P*=0.037)、分化度(Hazard ratio 2.063, 95% CI; 1.139-3.737 *P*=0.017)、リンパ節転移(Hazard ratio 2.056, 95% CI; 1.105-3.827 *P*=0.023)、肝内転移(Hazard ratio 2.813, 95% CI; 1.157-6.838 *P*=0.023) が術後生存期間に寄与する因子として抽出された。また、検討した分子の発現では ZEB1 は寄与する因子として抽出されなかったが、CD44 高発現(Hazard ratio 2.241, 95% CI; 1.112-4.1516 *P*=0.024)は抽出された。

考察

近年肝内胆管癌における EMT 関連タンパク質の発現と予後との関係について検討されているが[16 17 18]、EMT における重要な転写因子である ZEB1 についての報告はなく、解析された EMT 関連タンパク質と臨床病理学的因子の相関については不明な点が多い。本研究では 102 例という多数の肝内胆管癌症例を用いて、複数の EMT 関連タンパク質の発現を、免疫組織化学染色の手法を用いて網羅的に検討し、それら EMT 関連分子と EMT の master 制御因子である ZEB1 との関連について検討した。

本研究で得られた主な知見としては，1) EMT 関連蛋白の発現と病理学的因子との関連について①ZEB1 高発現と男性、高齢、TNM stage、腫瘍の組織学的分化度(低分化)、リンパ節転移、門脈浸潤　②Vimentin 高発現と腫瘍径、門脈浸潤 ③CD44 高発現と肝静脈浸潤､肝内転移 ④Claudin-1 低発現と背景肝組織､TNM stage、リンパ節転移 ⑤E-cadherin と明らかな病理組織学的因子の相関を認めない。2) Spearman's 検定を用いた ZEB1 と EMT 関連蛋白の発現の相関では、Vimentin と同相関、E-cadherin と逆相関を認める。3) Kaplan-Meier 法を用いた予後解析では、ZEB1 高発現、Vimentin 高発現、E-cadherin 低発現、CD44 高発現で有意に予後不良である。4) Log-rank 検定を用いた単変量解析にて、性別(男性)、腫瘍個数(2 個以上)、腫瘍径(4cm 以上)、腫瘍の分化度(低分化)、リンパ節転移､門脈浸潤､肝静脈浸潤､肝内転移といった臨床病理学的因子に加えて、ZEB1 高発現、CD44 高発現、E-cadherin 低発現、Vimentin 高発現の 4 つの EMT 関連タンパク質の発現が統計学的に有意に予後に影響を与える。5) Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析では、男性、低分化、リンパ節転移、肝内転移、CD44 高発現が独立した予後規定因子として検出される。

以上の 5 点である。この結果より肝内胆管癌における ZEB1 を主体とした以下の点について考察した。

(1) ヒト他臓器癌組織における ZEB1 の発現について

今までに各種臓器癌､悪性腫瘍における ZEB1 の過剰発現について報告があり、特に肝細胞癌[23]、胃癌[24]、結腸癌[15]、膵癌[21]で ZEB1 の高発現例は予後不良と考えられている。臨床病理学的因子として、ZEB1 の高発現と、肝細胞癌では TNM stage、腫瘍径、肝内転移、門脈浸潤、早期再発[23]、胃癌では低分化、リンパ節転移、TNM stage、漿膜浸潤[24]、結腸癌では肝転移[15]、頭頸部癌ではリンパ節転移、stage[25]、骨肉腫では肺転移、stage[26]が相関すると報告されている。すなわち、臓器、腫瘍組織が異なっても、ZEB1 は、腫瘍の悪性度に伴い、特に

組織学的に低分化である程、発現が高値である事が示されており、細胞生物、生化学的な知見のみならず、ヒト組織でも ZEB1 が腫瘍の悪性度、予後を反映している。
本研究では、肝内胆管癌において ZEB1 の高発現と TNM stage、低分化、リンパ節転移、門脈浸潤が相関していた。これら臨床病理学的因子は、肝内胆管癌の予後規定因子として報告されており、ZEB1 の臨床病理学的因子との相関は予後を反映する根拠になると考えられる。

(2) 肝内胆管癌における ZEB1 の高発現部位と EMT に関して
肝内胆管癌組織において EMT を呈している病巣に ZEB1 が高発現しているか否かは本研究から厳密に言及することはできない。細胞レベルでも、EMT によりしばしば上皮細胞が、紡錘系の間葉細胞に転換することがあるが、肝内胆管癌組織で紡錘形の形態を呈している病巣は非常に少なく、組織学的に EMT の部位を明瞭に判別することは困難と思われた。病変部位；すなわち腫瘍の先進部に EMT を起こしている部位が存在すると考えられているが、限られた範囲で顕鏡した結果として、腫瘍の先進部と内部で ZEB1 の発現の差異はみられなかった。その理由として、1) 実際に EMT を呈している部位と呈してない部位で ZEB1 の発現の差がない、2) 先進部、腫瘍内部ともに EMT を呈している頻度としては同様である事が推察される。上皮細胞の間葉細胞への転換として、上皮細胞の接着が低下消失することを主としており、細胞の接着低下は、腫瘍内部より先進部に多く、その先進部から細胞の離脱、転移浸潤へ至ると考えられている。今回顕鏡した範囲では、肝内胆管癌では、腫瘍内部と先進部で組織学的に分化度の差異は大きく認められなかった。今後は実際に肝内胆管癌の腫瘍先進部で EMT を呈している事が多いか、顕鏡下で紡錘細胞の占める割合を正確に調べる事、腫瘍内部と先進部をマイクロダイセクションで取り分け、ZEB1 の発現の差異を検討することが必要である。

(3) 肝内胆管癌における E-cadherin、Vimentin の発現について
E-cadherin は、基底側面膜の接着結合（adherence junction）に存在する接着因子である。adherence junction は上皮細胞の接着における主要要素であり、上皮構造を維持している。上皮系細胞は、典型的には E-cadherin を発現し，間葉系細胞は vimentin を発現している。E-cadherin は上皮細胞の接着結合を構成する代表的な接着分子であり、EMT 獲得に伴いその発現が抑制されることから EMT の指標として頻繁に用いられている。また vimentin はある種の癌細胞で EMT に伴って異常発現し，腫瘍細胞の遊走能や浸潤能に関係しているとされる[6-8]。E-cadherin の低発現と臨床病理学的因子の関係について、Xing は、リンパ節転移、TNM stage 進行、腫瘍組織学の低分化との相関、E-cadherin の低発現で予後不良と報告している[27]。Gu は TNM stage の相関、Han は、E-cadherin の発現と臨床病理学的因子は何れも相関しないとしている。予後につ

いては、E-cadherin の発現のみでは、言及していない [28] 。本研究では、E-cadherin の発現と臨床病理学的因子は何れも相関しなかったが、E-cadherin 低発現で予後不良であった。E-cadherin の発現と臨床病理学的因子の関係について既報と同様または異なる理由として、症例数、患者因子、検体の固定条件、および免疫組織化学染色の cut-off 値の設定法などの条件の相違も影響を与えている可能性が考えられる。本研究で E-cadherin の発現が予後について差異を認めた事は、様々な病理学的因子が統計学的に有意差なくとも、腫瘍径、リンパ節転移、stage、門脈浸潤が P=0.1-0.3 と低値であったため、それぞれの因子を総合して予後に影響していた可能性があると思われるが、実際に症例数を増やして更に検討する必要がある。Vimentin の高発現と臨床病理学的因子の関係について、TNM stage との相関を Xing、Gu が述べ、予後については Xing が Vimentin の高発現で予後不良と報告し、他 2 者は Vimentin のみでは言及していない [27,28]。本検討では、Vimentin の高発現と腫瘍径と門脈浸潤が相関し、予後不良であった。TNM stage の因子として腫瘍径が含まれているため、本研究と既報では、臨床病理学的因子は腫瘍の悪性度を反映する因子と相関する事、予後を予測する marker である事は、一致していた。

(4) ZEB1 の発現と E-cadherin、Vimentin との相関、EMT に関して
ZEB1 の発現と E-cadherin、Vimentin との相関は、ヒト腫瘍組織における発現での報告は、Yan らは肝細胞癌において、ZEB1 と E-cadherin の有意な逆相関を示したが、Vimentin との相関については検討されなかった。[23] 大石らの報告では肝内胆管癌の細胞株において ZEB1 の発現を上昇または抑制させる事により Vimentin の発現の上昇、低下する結果(E-cadherin の低下、上昇)を得ており、本研究でも同様の結果を得られた [9]。今回のヒト組織肝内胆管癌における ZEB1 と Vimentin の同相関、E-cadherin の逆相関は細胞レベルでの内容を実際のヒト検体で実証し、臨床への足掛かりとして有意義であると考える。更に ZEB1 の EMT 部位における発現の上昇は実証できていないが、E-cadherin, Vimentin との相関より肝内胆管癌における ZEB1 の発現は EMT に関連した発現の動向を呈し、肝内胆管癌における ZEB1 の EMT master 制御因子としての可能性を示した。

(5) 肝内胆管癌における CD44 の発現及び ZEB1 との関連について
CD44 は、様々な細胞外マトリックスと結合する接着分子であり、癌細胞の増殖、転移などに深く関与している分子である [29]。CD44 の EMT における関与として、EMT 後の CD44 の発現の高い間葉系癌細胞が Cancer stem cell であることや [29 30]、ZEB1 により CD44 の発現が制御される事が報告されている [14]。CD44

は直接的な EMT 関連分子ではないものの、EMT 後のより悪性度の高い Cancer stem cell のマーカーとして ZEB1 との関与を病理組織学的に検討した。本研究では、肝内胆管癌組織検体において CD44 は肝内転移、肝静脈浸潤といった転移、浸潤に関与する病理学的結果を示し、CD44 の高発現は予後不良であった。Gu らは肝内胆管癌における CD44 の高発現が低分化、脈管浸潤と相関する事を報告しており [31]、CD44 は肝内胆管癌の転移浸潤に関与する分子である事がヒト組織でも明らかとなった。本研究でも CD44 は間葉系マーカーの Vimentin と同相関し P=0.008)、EMT と関連性を示したものの、ZEB1 との発現の相関については、ヒト肝内胆管癌組織では有意な相関を認めなかった。

(6) 肝内胆管癌における Claudin-1 の発現及び ZEB1 との関連について

Claudin-1 は Tight junction 形成に必須の分子であり [32]、EMT 獲得に際し、Claudin-1 の発現変化が知られている。腎淡明細胞癌において Claudin-1 の発現低下は細胞間接着の低下、EMT の獲得と考えられている一方で [33] 結腸癌細胞、肝細胞癌細胞において Claudin-1 が ZEB1 の発現を増加させ EMT 獲得に関与しているという報告がある [15,34](図 1)。そのため Claudin-1 は癌において発現が上昇または低下しているという報告両者があり、一定の見解が得られていない。細胞接着因子、EMT、ZEB1 との関与から肝内胆管癌組織における Claudin-1 の発現を検討した。本研究では Claudin-1 の発現と明らかな臨床病理学的因子の相関も認めず、ZEB1 との相関も見られなかった。統計学的に有意差はないものの、若干 Claudin-1 発現低下で予後不良であった事を考えると肝内胆管癌においては、Claudin-1 は発現の低下が腫瘍の進展に関わるかもしれないと推察されたが、本研究の結果のみでは不十分であり、今後 Tight junction における Claudin-1 の精密な発現を検討する必要があると考える。

(7) 肝内胆管癌の生命予後に寄与する因子について

肝内胆管癌の生命予後に関して、単変量解析では E-cadherin 低発現、Vimentin 高発現、ZEB1 高発現、CD44 高発現が有意となったが、多変量解析では、男性、低分化、リンパ節転移、肝内転移の臨床病理学的因子と、CD44 高発現が独立した予後規定因子として検出された。肝内胆管癌の予後因子として、リンパ節転移、低分化は大規模な症例数での報告があり [3]、また CD44 高発現が肝内胆管癌の予後不良因子であることを近年 Gu らが報告しており [31]、既報に一致する結果である。今回 EMT の master molecule である ZEB1 を中心に検討を行ったが、生命予後に関する多変量解析では抽出されなかった。この点に関してはさらに症例数を増やしての検討と、2)で述べた EMT としての詳細な局在での検討が必要であると思われる。また EMT 後の CD44 発現高値である間葉系細胞が、

Cancer stem cell であると考えられていることから、単変量解析で各種 EMT 分子が予後に関与する因子として挙げられ、多変量で CD44 が生命予後に寄与した結果の推察として、EMT を引き起こした肝内胆管癌の一部で CD44 の発現が上昇し、予後に寄与することが考えられるが、この点に関しても症例数を増やしての臨床病理学的な検討と肝内胆管癌における CD44 と EMT 関連分子の基礎的な研究が必要であると考えられた。

最後に本研究において、肝内胆管癌における ZEB1 の発現が EMT 関連分子である Vimentin の発現と同相関、E-cadherin の発現と逆相関を呈し、腫瘍の悪性度を示す臨床病理組織学的因子と相関し、肝内胆管癌における重要なマーカーである事を示した。また、EMT に関連した癌幹細胞マーカーである CD44 高発現が肝内胆管癌における予後規定因子であることを示した。今回の結果は、肝内胆管癌の新たな分子標的治療の開発や症例層別化の発展 にも寄与する可能性を秘めており、今後さらなる検討が必要と考えられた。

総括および結論

肝内胆管癌は手術根治後も高頻度に再発転移を来し、極めて予後不良な癌腫の一つである。肝内またはリンパ節、他臓器へ高頻度に転移再発し、これらが予後規定因子となる場合が多いにも関わらず、その分子機構は不明な点が多い。更に切除不能例の肝内胆管癌症例に対して有効な化学療法、分子標的薬は確立されていない。肝内胆管癌の浸潤、転移、癌の進展に関与する分子機構を基礎的研究により明らかにすることのみならず、臨床病理学的に明らかにすることは、いまだ予後不良な肝内胆管癌における有効的な治療の開発に導く重要な課題である。

癌細胞は多段階のステップを経て浸潤、転移することが知られており、この癌浸潤過程に EMT が重要な役割を来すことが明らかになってきている。EMT に関する master 制御因子として ZEB1 という分子が同定され、各種の臓器癌で注目されつつある。肝内胆管癌においても、その転移、浸潤機序 に EMT の関与が報告されつつあるが、報告例で検討された EMT 関連分子と臨床病理学的意義については、多くは明らかではなく、ZEB1 の報告はない。

本研究では 102 症例という多数例の肝内胆管癌手術検体を用いて、ZEB1 を始めとした EMT 関連分子、EMT に関したがん幹細胞マーカーである CD44 を対象とした免疫組織化学染色を網羅的に行うことで、肝内胆管癌腫瘍組織における EMT の発現状況を解析し、その臨床病理学的意義の検討を行った.
その結果、以下の知見を得た。

- EMT 関連蛋白の発現と病理学的因子との関連について、ZEB1 高発現と男性、高齢、TNM stage、腫瘍分化度、リンパ節転移、門脈浸潤に相関を認める。
- ZEB1 と EMT 関連蛋白の発現の相関では、Vimentin と同相関、E-cadherin と逆相関を認める。
- Log-rank 検定を用いた単変量解析にて、男性、腫瘍個数、腫瘍径、低分化、リンパ節転移、門脈浸潤、肝静脈浸潤、肝内転移といった臨床病理学的因子に加えて、E-cadherin 低発現、Vimentin 高発現、ZEB1 高発現、CD44 高発現といった EMT 関連タンパク質の発現が予後に影響を与える。
- Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析では、男性、低分化、リンパ節転移、肝内転移、CD44 高発現が独立した予後規定因子として検出される。

臨床的にも比較的稀な肝内胆管癌を、本研究では 102 例という大規模な症例において、網羅的に EMT 関連分子の免疫組織化学染色を行なった。その結果に

より、各種の臓器癌でも報告されているように、肝内胆管癌でも ZEB1 を始めとした EMT 関連分子、EMT に関したがん幹細胞マーカーである CD44 が、臨床病理学的な癌の転移、浸潤において重要な役割を担っており、予後に関与する事が明らかになった。本研究が予後不良な肝内胆管癌における有効的な治療の開発に導く可能性があると考え、今後更に大規模な症例において本知見の臨床的有用性を検証する必要があると思われる。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究にご参加いただいた患者様およびそのご家族の方々に感謝いたします。本研究は計 5 施設（北海道大学病院、札幌厚生病院、市立札幌病院、市立函館病院、大垣市民病院）のご協力のもとで行われました。厚く御礼申し上げます。

本研究の機会を与えてくださり、ご高閲を賜りました北海道大学大学院医学研究科内科学講座消化器内科学分野　坂本直哉教授、北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野 I　武冨 紹信教授、神山　俊哉准教授、北海道大学病院病理診断科　松野吉宏教授に深く感謝申し上げます。終始懇切なるご指導を賜りました北海道大学大学院医学研究科内科学講座消化器内科学分野　中馬　誠客員臨床准教授、北海道大学病院コンパニオン診断学　畑中豊特任講師、北海道大学病院病理診断科　畑中佳奈子助教に心より感謝申し上げます。最後に、本研究にあたり様々な面でご協力いただいた教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

利益相反開示

本研究に関連し、開示すべき利益相反関係にある企業などはありません。

引用文献

1 Jemal, A. *et al.* Global cancer statistics. CA Cancer J Clin. **61**, 69-90 (2011).

2 Rizvi, S. & Gores, G. J. Pathogenesis, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma. Gastroenterology **145**, 1215-1229 (2013).

3 第 18 回全国原発性肝癌追跡調査

4 Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. & Nieto, M. A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. Cell **139**, 871-890 (2009).

5 Maithel, S. K. *et al.* Multidisciplinary approaches to intrahepatic cholangiocarcinoma. Cancer **119**, 3929-3942 (2013).

6 Iwatsuki, M. *et al.* The clinical significance of vimentin-expressing gastric cancer cells in bone marrow. Ann. surg. oncol. **17**, 2526-2533 (2010).

7 Wendt, M. K., Allington, T. M. & Schiemann, W. P. Mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition by TGF-beta. Future Oncol. **5**, 1145-1168 (2009).

8 Kalluri, R. & Weinberg, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. J. clin. invest. **119**, 1420-1428 (2009).

9 Oishi, N. *et al.* Transcriptomic profiling reveals hepatic stem-like gene signatures and interplay of miR-200c and epithelial-mesenchymal transition in intrahepatic cholangiocarcinoma. Hepatology **56**, 1792-1803 (2012).

10 Wellner, U. *et al.* The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. Nat. cell biol. **11**, 1487-1495 (2009).

11 Yang, Y. *et al.* ZEB1 sensitizes lung adenocarcinoma to metastasis suppression by PI3K antagonism. J. clin. invest. **124**, 2696-2708 (2014).

12 Schmalhofer, O., Brabletz, S. & Brabletz, T. E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. Cancer metastasis rev. **28**, 151-166 (2009).

13 Liu, Y., El-Naggar, S., Darling, D. S., Higashi, Y. & Dean, D. C. Zeb1 links epithelial-mesenchymal transition and cellular senescence. Development **135**, 579-588 (2008).

14 Chaffer, C. L. *et al.* Poised chromatin at the ZEB1 promoter enables breast cancer cell plasticity and enhances tumorigenicity. Cell **154**, 61-74 (2013).

15 Singh, A. B. *et al.* Claudin-1 up-regulates the repressor ZEB-1 to inhibit E-cadherin expression in colon cancer cells. Gastroenterology **141**, 2140-2153 (2011).

16 Gu, M. J. & Choi, J. H. Epithelial-mesenchymal transition phenotypes are associated with patient survival in intrahepatic cholangiocarcinoma. J. CLin. Pathol. **67**, 229-234 (2014).

17 Ryu, H. S. *et al.* Overexpression of epithelial-mesenchymal transition-related markers according to cell dedifferentiation: clinical implications as an independent predictor of poor prognosis in cholangiocarcinoma. Hum. pathol. **43**, 2360-2370 (2012).

18 Yao, X. *et al.* Clinicopathological and prognostic significance of epithelial mesenchymal transition-related protein expression in intrahepatic cholangiocarcinoma. Onco. Targets Ther. **5**, 255-261 (2012).

19 Behrens, C. *et al.* Immunohistochemical expression of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptors 1 and 2 in the pathogenesis of lung cancer. Clin. Cancer Res. **14**, 6014-6022 (2008).

20 Yonemori, K. *et al.* Contrasting prognostic implications of platelet-derived growth factor receptor-beta and vascular endothelial growth factor receptor-2 in patients with angiosarcoma. Ann. Surg. Oncol. **18**, 2841-2850 (2011).

21 Bronsert, P. *et al.* Prognostic significance of Zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1) expression in cancer cells and cancer-associated fibroblasts in pancreatic head cancer. Surgery **156**, 97-108 (2014).

22 Tsuji, T., Ibaragi, S. & Hu, G. F. Epithelial-mesenchymal transition and cell cooperativity in metastasis. Cancer Res. **69**, 7135-7139 (2009)..

23 Zhou, Y. M. *et al.* Clinicopathological significance of ZEB1 protein in patients with hepatocellular carcinoma. Ann. Surg. Oncol. **19**, 1700-1706 (2012).

24 Jia, B., Liu, H., Kong, Q. & Li, B. Overexpression of ZEB1 associated with metastasis and invasion in patients with gastric carcinoma. Mol. Cell Biochem. **366**, 223-229 (2012).

25 Chen, Z. *et al.* The nuclear protein expression levels of SNAI1 and ZEB1 are involved in the progression and lymph node metastasis of cervical cancer via the epithelial-mesenchymal transition pathway. Hum. pathol. **44**, 2097-2105 (2013).

26 Shen, A., Zhang, Y., Yang, H., Xu, R. & Huang, G. Overexpression of ZEB1 relates to metastasis and invasion in osteosarcoma. J. Surg. Oncol. **105**, 830-834 (2012).

27 Xing, X. *et al.* The prognostic value of E-cadherin in gastric cancer: a meta-analysis. Int. J. Cancer **132**, 2589-2596 (2013).

28 Han, X. *et al.* Silencing SOX2 induced mesenchymal-epithelial transition and its expression predicts liver and lymph node metastasis of CRC patients. PLoS One **7**, e41335 (2012).

29 Tanabe KK, Ellis LM, Saya H. Expression of CD44R1 adhesion molecule in colon carcinomas and metastases. Lancet 341, 725-726 (1993).

30 Mani, S. A. *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. Cell **133**, 704-715 (2008).

31 Gu, M. J. & Jang, B. I. Clinicopathologic significance of Sox2, CD44 and CD44v6 expression in intrahepatic cholangiocarcinoma. Pathol. oncol. Res. *: POR* **20**, 655-660 (2014).

32 Furuse, M. *et al.* Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. J. Cell Biol. **156**, 1099-1111 (2002).

33 Harten, S. K. *et al.* Regulation of renal epithelial tight junctions by the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene involves occludin and claudin 1 and is independent of E-cadherin. Mol. Biol. Cell **20**, 1089-1101 (2009).

34 Suh, Y. *et al.* Claudin-1 induces epithelial-mesenchymal transition through activation of the c-Abl-ERK signaling pathway in human liver cells. Oncogene **32**, 4873-4882 (2013).