



Title	肝外胆管癌におけるEpithelial Mesenchymal Transitionの臨床病理学的検討
Author(s)	新田, 健雄
Description	配架番号 : 2126
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11602号
Issue Date	2014-12-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11602
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/57763
Type	doctoral thesis
File Information	Takeo_Nitta.pdf



肝外胆管癌における Epithelial Mesenchymal Transition の
臨床病理学的検討
(The clinicopathological study of Epithelial-Mesenchymal Transition
(EMT) in Extrahepatic Bile Duct Carcinoma)

2014 年 12 月

北 海 道 大 学

新田 健雄

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	4 頁
実験方法	5 頁
実験結果	12 頁
考察	23 頁
総括および結論	27 頁
謝辞	28 頁
引用文献	29 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文として受理された。

Takeo Nitta, Tomoko Mitsuhashi, Yutaka Hatanaka, Masaki Miyamoto, Koji Oba, Takahiro Tsuchikawa, Yuta Suzuki, Kanako C. Hatanaka, Satoshi Hirano, and Yoshihiro Matsuno

Prognostic significance of epithelial-mesenchymal transition-related markers in extrahepatic cholangiocarcinoma : comprehensive immunohistochemical study using the tissue microarray method

British Journal of Cancer (2014), 1-10, doi : 10.1038/bjc.2014.415

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Takeo Nitta, Tomoko Mitsuhashi, Yutaka Hatanaka, Satoshi Hirano, and Yoshihiro Matsuno

The Significance of Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) in Extrahepatic Bile Duct Carcinoma : A Clinicopathologic Study of 122 Cases.

2013 United States & Canadian Academy of Pathology Annual Meeting
March 2-8, 2013, Baltimore Convention Center, Baltimore, MD

2. 新田健雄, 三橋智子, 畑中豊, 大庭幸治, 鈴木雄太, 畑中佳奈子, 平野聡, 松野吉宏

肝外胆管癌における上皮間葉移行(EMT)の臨床病理学的検討
第102回日本病理学会総会, 2013年6月4-6日, 札幌

緒言

胆管癌は胆管上皮を発生母地とする上皮性悪性腫瘍であり、病変の主座によって肝内胆管癌と肝外胆管癌の二つに大別される¹。肝外胆管癌は外科治療のみが唯一治癒の望める治療であり、近年、その治療成績は向上しつつあるものの、他癌腫に比べると依然として予後不良であり、術後の5年生存率は20-40%と報告されている¹⁻³。よって化学療法や分子標的治療薬などの術後補助療法の発展が期待されており、そのために発癌・進展メカニズムの解明や予後規定因子の探索が求められている。

上皮間葉移行 (Epithelial-mesenchymal transition: 以下, EMT と略記) は、一定の細胞形態 (細胞極性) を持って基底膜上に規則正しく配列した上皮系の細胞がその細胞極性を失い、間葉系細胞に変化することを指す³⁻²⁴。EMT は初期胚の発生や形態形成において必須の過程であるが、近年、癌の浸潤・転移の過程が EMT に基づく現象であると考えられるようになった³⁻²⁴。癌における EMT は発生段階とは異なり、生理的なレベルを超えた成長因子・サイトカインの刺激や細胞内シグナルの亢進のために細胞機能の変化が反復して誘導され、周囲臓器への浸潤や遠隔臓器への転移につながると考えられている³⁻²⁴。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、そしてサイトカインや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

^{11, 14, 22}。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 形質獲得に伴いその発現が抑制されることから EMT の代表的な上皮系マーカーとして数多くの報告がある³⁻²⁴。また、間葉系マーカーとしては、EMT に際して、間葉系カドヘリンである N-cadherin や細胞骨格タンパク質である Vimentin、細胞外マトリックス分子の Fibronectin などの発現増加が認められる³⁻²⁴。特に細胞接着分子カドヘリンにおいて、EMT に伴い上皮系カドヘリンである

E-cadherin の発現が低下し、間葉系カドヘリンである N-cadherin の発現が増強する現象はカドヘリンスイッチと呼ばれ、癌細胞の浸潤・進展にとって重要な役割を果たしているとされる^{3, 6, 10, 13}。また EMT 誘導に関わる転写因子としては、Zn フィンガー型転写因子である Snail、Slug、Zeb1 や Zeb2、そして bHLH (basic helix-loop-helix) 型転写因子である Twist などが、上皮系マーカーの遺伝子発現を抑制するとともに、間葉系遺伝子群の発現を活性化するとされる

^{4, 5, 7-12, 14-23}。

近年、これらの EMT 関連分子の発現が、その浸潤・転移能、および予後を含めた臨床病理学的因子と関係することが多くのがんにおいて報告されている一方³⁻²⁴、肝外胆管癌においても、その進展・浸潤に EMT が関連することが注目さ

れ始めている。しかし、報告例は極めて少なく、検討された EMT 関連分子も少数であり、その臨床病理学的意義についてはいまだ不明な点が多い^{3, 14, 25}。

本研究の目的は、肝外胆管癌における多数の EMT 関連分子を対象とした免疫組織化学染色を網羅的に行い、その腫瘍組織における EMT の発現状況と予後を含む臨床病理学的意義を明らかにすることである。

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。

CI	Confidence interval
CK	Cytokeratin
DNA	Deoxyribonucleic acid
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EGF	Epidermal Growth Factor
EMT	Epithelial-mesenchymal transition
FFPE	Formalin-fixed, paraffin-embedded
FGF	Fibroblast growth factor
HE	Hematoxylin and eosin
HR	Hazard ratio
HRP	Horseradish peroxidase
PCR	Polymerase chain reaction
PBS	Phosphate buffered saline
RNA	Ribonucleic acid
ROC	Receiver operating characteristic
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute-1640
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
TMA	Tissue microarray
UICC	Unio Internationalis Contra Cancrum
WHO	World Health Organization

実験方法

1) 細胞株

本研究に使用した細胞株は、膵癌細胞株として Panc-1 と AsPc-1、肺癌細胞株として H1299 と H1650、乳癌細胞株として MDA-MB231、MCF7、および T47D の計 7 種類である。これらの細胞株はいずれも過去の論文において EMT 関連タンパク質の発現が確認された細胞株である^{8, 15, 18, 23}。細胞培地としては Panc-1、H1299、MDA-MB231、および MCF7 は D-MEM (Gibco BRL, GrandIsland, NY, USA) を使用し、AsPc-1、H1650、および T47D は RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan) を使用した。また、D-MEM と RPMI-1640 はいずれもウシ胎児血清 (Fetal bovine serum; FBS) とペニシリン/ストレプトマイシンの抗生剤を添加し、それぞれ終濃度 10%、1%とした。MCF7 については上記 2 種類に加えて、非必須アミノ酸 (終濃度 1%) も添加して使用した。いずれの細胞株も 5%CO₂ 下で 37 度の温度のもとインキュベーター内で培養を行った。

免疫組織化学的検討用のセルブロックは、細胞株を 1 ml チューブに回収し、リン酸緩衝生理食塩水 (以下 PBS) で洗浄後、遠心し、上清を除去後、10 %緩衝ホルマリンを入れ固定した。その後パラフィン包埋し、免疫組織化学的検討用ブロックを作製した。

2) 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応

TRIzol Reagent 法 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて細胞株より total RNA の抽出を行い、その後 Transcript First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Indianapolis, IN, USA) を用いて逆転写反応により cDNA を作製した。逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription polymerase chain reaction ; RT-PCR) に使用したプライマー配列を表 1 にまとめた^{8, 26}。

表 1 プライマー配列

	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')
Snail	CAGACCCACTCAGATGTCAA	CATAGTTAGTCACACCTCGT
Slug	TGCGATGCCCAGTCTAGAAA	TTCTCCCCCGTGTGAGTTC
Twist	GTCCGCAGTCTTACGAGGAG	TGGAGGACCTGGTAGAGGAA
Zeb1	CCTGTCCATATTGTGATAGAGGC	ACCCAGACTGCGTCACATGT
Zeb2	AGGGACAGATCAGCACCAAA	GTGCGAACTGTAGGAACCAG
GAPDH	ATCAAGTGGGGCGATGCTG	ACCCATGACGAACATGGGG

PCR の反応条件としては、アニーリング温度を 55 度に設定し、計 30 サイクルで PCR を行った。

3) 症例

1995 年から 2006 年の 12 年間に、北海道大学病院消化器外科Ⅱで切除された肝外胆管癌（浸潤癌）117 症例の手術切除標本を用いた。症例の内訳は、男性 92 例、女性 25 例であり、年齢の中央値は 71 歳（範囲：44-87 歳）であった。観察期間中央値は 26 ヶ月（範囲：0-151 ヶ月）であり、89 例（76.1%）が観察期間中に死亡している。いずれの症例も術前に補助療法は受けていない。病理組織診断は主として UICC による TNM 分類（第 7 版）²⁷ に準拠して検討を行った。腫瘍量が最も多い部位を病変の主座とした^{1,28}。腫瘍部位別には肝門部を病変の主座とするものが 74 例であり、遠位部を主座とするものは 43 例であった。腫瘍の肉眼分類としては、乳頭型が 18 例、結節型が 79 例、平坦型が 20 例であった。胆管癌の肉眼分類では予後の観点から結節型および平坦型を非乳頭型として一括し、前二者と比較して予後の良い乳頭型と分けて扱う分類法が報告されている²⁹。本研究では後の統計解析の都合上、肉眼分類はこの乳頭型/非乳頭型を採用することにした。組織型としては乳頭腺癌が 7 例、高分化型管状腺癌が 30 例、中分化型が 56 例、低分化型腺癌およびその他（腺扁平上皮癌、小細胞癌）が 24 例であった。また、胆管癌に特有の腫瘍進展形式として表層拡大進展がある³⁰。表層拡大進展は主病巣部より上皮置換性に 2cm 以上の距離をもって水平方向に進展していく in situ 病変と定義されており、その有無が患者予後に影響を与えるとの報告がある³⁰。本検討では 117 例中 20 例で表層拡大進展が確認できた。脈管浸潤因子としては、リンパ管侵襲を有するものが 77 例（無：40 例）、静脈侵襲を有するものが 65 例（無：52 例）、神経浸潤を有するものが 102 例（無：15 例）であった。所属リンパ節に転移の所見を認めたものは 54 例であり、転移を認めなかった症例は 63 例であった。TNM 分類による Staging では、Stage I / II / III / IV でそれぞれ 32 / 34 / 31 / 20 例の結果となった。

4) 組織マイクロアレイ（TMA）の作製

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、組織マイクロアレイ（TMA）の作製を行った。TMA 標本作製の理由として、免疫染色の労力・経費削減に加え、同一個体の腫瘍組織と非腫瘍組織を並べて観察できる点、そして多数の標本を同時に染色することで切片ごとの染色条件の差異が小さくなる点が挙げられる。一方で、TMA の欠点として、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

heterogeniety を反映しているとは限らない点が挙げられる。そのため、本研究では TMA 作製にあたって、腫瘍の複数の部位から組織を採取した。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。Tsuji ら³¹によるマウスを用いた実験により、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た。本研究ではこの先行研究を参考とし、EMT 発現細胞の heterogeniety を反映させるため、TMA 作製にあたっては腫瘍先進部（腫瘍と正常間質の境界部）と腫瘍内部（腫瘍先進部から少なくとも 100 細胞以上離れた腫瘍部）の 2 カ所から腫瘍組織を、正常対照群として同一検体の正常胆管上皮から 1 カ所の、計 3 カ所から組織採取を行う方針とした。

具体的な手法としては、まず HE 染色標本にて、腫瘍組織 2 カ所と正常胆管上皮 1 カ所を特定し印をつけた。この際に胆膵領域を専門とする病理専門医（三橋智子准教授）にも HE 染色標本を再検してもらい、固定の良悪、腫瘍の大きさなど本研究にて使用可能か否かの判断を併せて行った。同部に相当するパラフィンブロックの部位を、2.0 mm の針をセットしたアレイヤー（Sakura Finetek Japan）で円柱状にくりぬき（コア）、あらかじめ円柱状に穴をあけた別のパラフィンブロックに埋めるという方法で、TMA ブロックを作製した。同一個体の腫瘍組織と非腫瘍組織は並べて作製した。各 TMA ブロックは 37- 42 個のコアからなった。

3) 免疫組織化学染色

FFPE ブロック、TMA ブロック、および細胞株のセルブロックは、5 μ m 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°C 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、EMT 関連マーカーの各抗体（表 2）と下記の濃度で 30 分室温で反応させ、ポリマー法（En vision flex system for mouse monoclonal antibody and rabbit polyclonal antibody ; Dako, and simple stain system for goat polyclonal antibody; Nichirei, Tokyo, Japan）にて検出した。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。

EMT 関連マーカー抗体としては、EMT 誘導転写因子として Snail、Slug、Twist、Zeb1、Zeb2 の 5 種類、上皮系マーカーとして E-cadherin と Cytokeratin 19 の 2 種類、そして間葉系マーカーとして Vimentin、N-cadherin、S100A4、 α -SMA、Fibronectin の 5 種類を選択し、また、癌間質線維芽細胞（cancer associated

fibroblasts;CAFs) のマーカーとしてPodoplaninを、腫瘍細胞増殖マーカーとしてKi67を使用することとし、計14種類の抗体で検討を行った。

表 2 抗原の発現検索に用いた抗体

Marker	Sorce	Type	Dilution	Antigen retrieval
Snail	Abcam	PAb (goat)	1:500	Tris-EDTA
Slug	Abcam	PAb (rabbit)	1:100	Tris-EDTA
Twist	Abcam	Twist2C1a	1:20	Tris-EDTA
Zeb1	Genway	416A7H10	1:20	Tris-EDTA
Zeb2	Novus biological	PAb (rabbit)	1:400	Tris-EDTA
E-cadherin	Invitrogen	4A2C7	RTU	Tris-EDTA
Cytokeratin 19	Novocastra	B170	1:100	Tris-EDTA
Vimentin	Ventana	V9	RTU	Tris-EDTA
N-cadherin	Dako	6G11	1:50	Tris-EDTA
S100A4	Abcam	PAb (rabbit)	1:200	Prot K
α -SMA	Dako	1A4	1:50	Tris-EDTA
Fibronectin	Dako	PAb (rabbit)	1:2000	Prot K
Podoplanin	Dako	D2-40	RTU	Tris-EDTA
Ki67	Dako	MIB-1	1:200	Tris-EDTA

PAb ; Polyclonal antibody

Tris-EDTA ; Tris- ethylenediaminetetraacetic acid -based solution

Prot K ; Proteinase K

また、N-cadherin と E-cadherin の二重染色としては、HRP/DAB および ALP/Permanent red detection systems をそれぞれ使用した。

4) 免疫組織化学染色評価法

免疫組織化学染色は FFPE ブロックより作製した whole section および TMA の両者で行った。Whole section の対象症例として、肝外胆管癌 117 症例の中より、固定条件が良く、腫瘍量が豊富な 9 例を抽出し、代表的な EMT 関連マーカー (E-cadherin, S100A4, Zeb1, Zeb2) を対象とした免疫組織化学染色を施行した。鏡検は病理専門医 (三橋智子准教授) とともにを行い、鏡検の際には患者臨床情報を伏せた。

TMA の免疫組織化学染色の評価は、染色強度と染色された腫瘍細胞の割合の両者を反映させた方法で行った。判定は whole section と同様に 2 名で、臨床情報を伏せて行った。

まず、各抗体について染色強度を陽性 (Positive) と陰性 (Negative) の2段階で評価した。上皮系マーカーについては、コントロールにおいた正常胆管上皮と同様の染色強度を示す場合を陽性とした (代表的組織像：図 1a)。間葉系マーカー (代表的組織像：図 1b) および転写因子マーカー (代表的組織像：図 1c) については、非腫瘍性胆管上皮と比較して染色強度の上昇を認める場合を陽性とした。

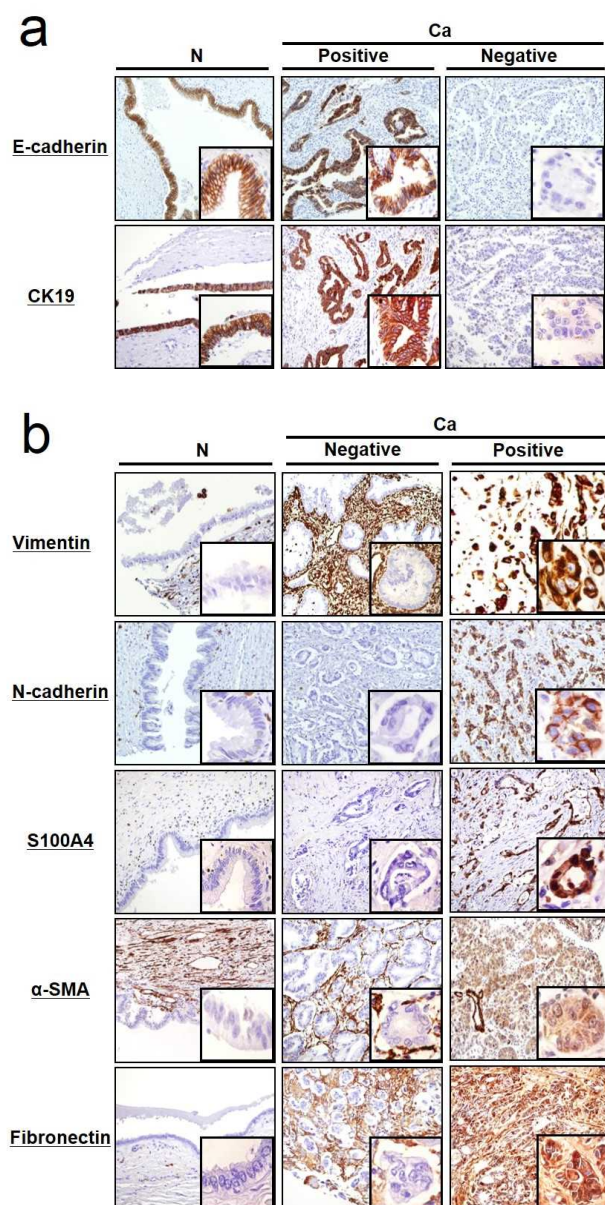


図 1 (a, b) 上皮系 (a) および間葉系 (b) マーカーの代表的な免疫組織化学染色像

N : Nonneoplastic epithelia, Ca : Carcinoma lesion

上皮系マーカーでは、非腫瘍性胆管上皮にて細胞膜が染まり、腫瘍細胞にて染色性が低下ないしは消失（陰性化）した。間葉系マーカーでは、非腫瘍性胆管上皮では染色されず（陰性）、腫瘍細胞ではその細胞質が染色された。S100A4 は核陽性所見を陽性所見とした。

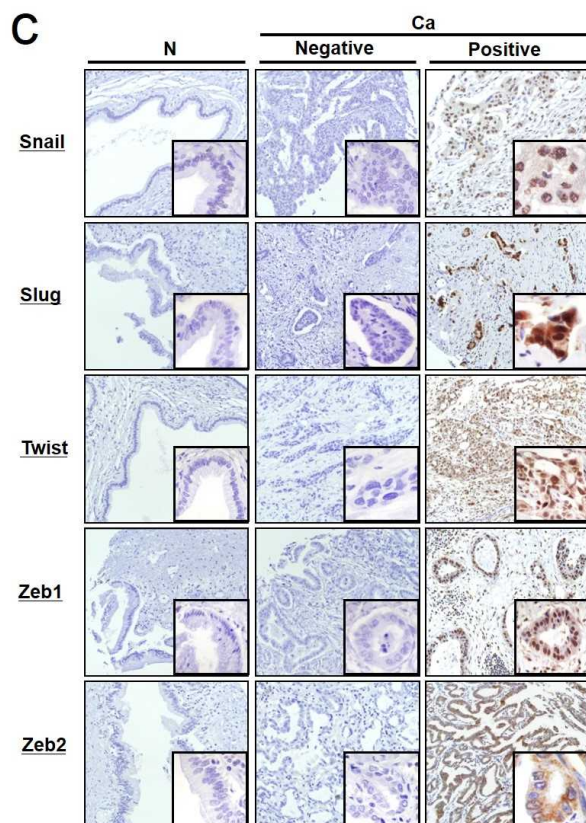


図 1 (c) 転写因子マーカーの代表的な免疫組織化学染色像

N : Nonneoplastic epithelia, Ca : Carcinoma lesion

EMT 誘導転写因子マーカーは、Zeb2 以外は全て核が陽性に染まり、Zeb2 では細胞質が陽性に染まった。以上の染色の局在は細胞株セルブロックの染色結果と一致していた。

次に、染色強度から陽性/陰性とされた腫瘍細胞について、おのこの症例につき TMA コアの腫瘍内における陽性/陰性腫瘍細胞の占める割合（間葉系・転写因子マーカーは陽性率、上皮系マーカーは陰性率を算出；％）を腫瘍先進部コアと腫瘍内部コアのそれぞれで算出し、両者の平均値をもってその症例の陽性/陰性率として記録した。Podoplanin (PDPN) に関しては、過去の報告³²を参照し、腫瘍細胞周囲間質で染色された線維芽細胞の割合が 30%を超える場合を陽性とした。また、Ki67 は、核が染色された腫瘍細胞の数が最も密に分布している

領域 (hot spot) で染色陽性腫瘍細胞数をカウントし、Ki67 index を算出した。
 α -SMA については、本研究では EMT 関連の間葉系マーカー、および CAFs のマーカーとして評価を行った。CAFs マーカーとしては、過去の報告³³を参照し、腫瘍間質内の線維芽細胞の α -SMA の染色について定量的に grade0 から+1、+2、そして+3 の 4 段階で評価・分類し、0 および+1 を染色陰性、+2 と+3 を染色陽性とした。

5) 統計学的解析

免疫組織化学染色評価のカットオフ値算出についてのアルゴリズムを図 2 に示す (間葉系・転写因子マーカーを例として)。統計解析ソフトは JMP 10.0 (SAS Institute, Inc, Cary, NC) の Windows 版を使用した。免疫組織化学染色のカットオフ値の設定には受信者動作特性 (Receiver operating characteristic ; ROC) 曲線を用いた。ROC 解析のデータとして、連続変数としては 4) で挙げた各抗体の「陽性率」、名義変数としては生存期間中央値の時点における「生存/死亡」を使用し、JMP にて最適カットオフ値を算出した (図 2)。この ROC 解析による各抗体のカットオフ値は、表 3 に示した。最適カットオフ値以上の高い陽性率をとったものを、その抗体における High expression 群とし、カットオフ値未満のものは Low expression 群とした。

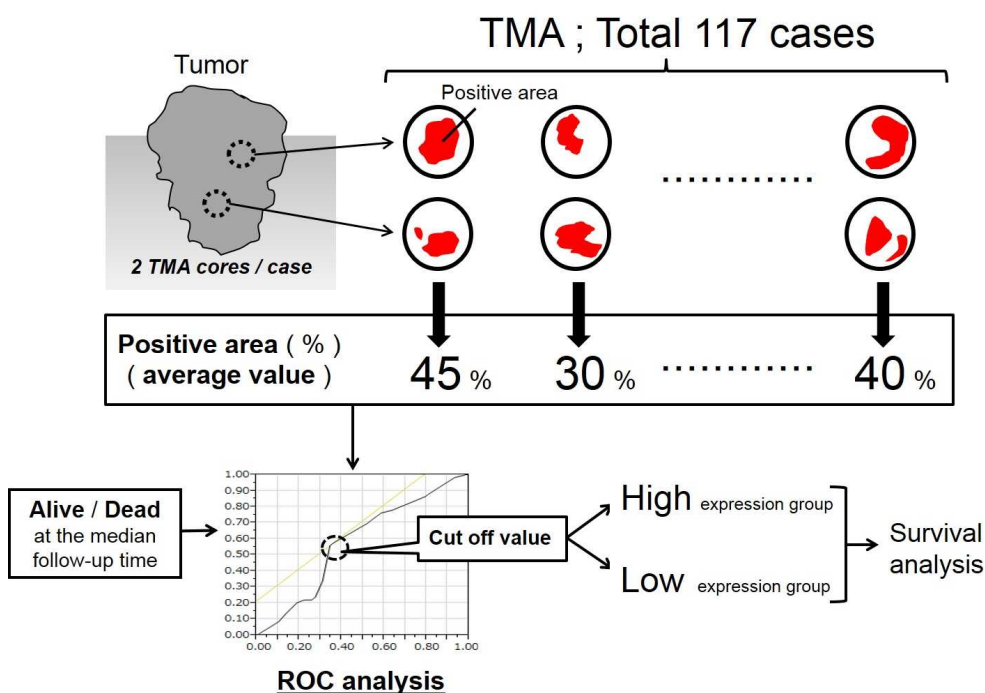


図 2 免疫染色カットオフ値算出アルゴリズム (間葉系・転写因子マーカー)

免疫組織化学染色のカットオフ値の設定には ROC 解析を用いた。連続変数としては各抗体

の「陽性率」、名義変数としては生存期間中央値の時点における「生存/死亡」を使用した。カットオフ値以上の高い陽性率をとったものを、その抗体における High expression 群とし、カットオフ値未満のものは Low expression 群とした。

表 3 各 EMT 関連マーカー抗体の免疫染色最適カットオフ値

Marker	最適カットオフ値 (%)
Snail	60
Slug	33
Twist	15
Zeb1	50
Zeb2	63
E-cadherin	43
Cytokeratin 19	20
Vimentin	43
N-cadherin	35
S100A4	50
α -SMA	5
Fibronectin	8

免疫組織化学染色の統計解析には χ^2 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。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 検定により行った。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、患者因子として年齢と性別、腫瘍因子として、腫瘍径、腫瘍占拠部位、肉眼型分類、深達度、肝動脈浸潤の有無、門脈浸潤の有無、リンパ管浸潤の有無、静脈浸潤の有無、神経浸潤の有無、表層拡大進展病変の有無、組織型、TNM 分類における T 因子、N 因子、Stage、そして腫瘍遺残度 (Residual tumor ; R) の計 17 項目である。p 値は 0.05 未満をもって有意とした。

実 験 結 果

抗体のバリデーション

肝外胆管癌 TMA ; 117 例の検討に先立ち、今回免疫組織化学染色に使用する抗

体のうち、EMT 誘導転写因子マーカー抗体 5 種類 (Snail, Slug, Twist, Zeb1, Zeb2) については、汎用化されていない抗体であり、標準的な染色法が確立していないため、まず初めに抗体のバリデーションを行った。Panc-1、AsPc-1、H1299、H1650、MDA-MB231、MCF7、および T47D の計 7 種類の細胞株から total RNA を抽出して、各転写因子のプライマーを使用した RT-PCR を行い特異性の確認 (図 3a) を行い、RT-PCR の結果に対応する細胞株の FFPE セルブロック標本で、免疫組織化学染色で使用可能か否かの判定と特異性の両者を確認した (図 3b)。

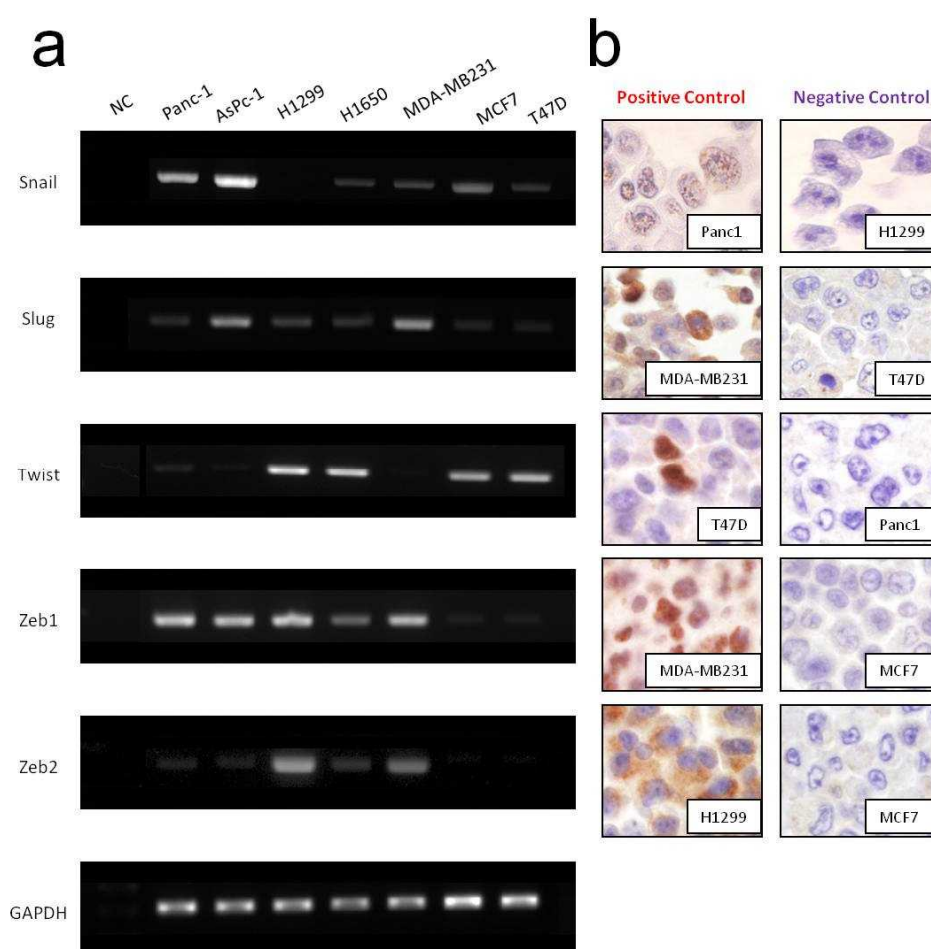


図 3 他癌腫細胞株を用いた EMT 誘導転写因子マーカー抗体のバリデーション

a : RT-PCR

b : 他癌腫細胞株セルブロックを使用した免疫組織化学染色

過去の論文において EMT 関連タンパク質の発現が確認された細胞株 (計 7 種類) から total RNA を抽出して、各転写因子のプライマーを使用した RT-PCR、および、その結果に対応するセルブロック標本の免疫組織化学染色を行い、抗体の特異性を確認した。

RT-PCR とセルブロットの免疫組織化学染色の結果はおおむね一致しており、抗 Snail 抗体については Panc-1 が陽性対照（染色の局在；核）で H1299 が陰性対照、抗 Slug 抗体については MDA-MB231 が陽性対照（染色の局在；核）で T47D が陰性対照、抗 Twist 抗体は T47D が陽性対照（染色の局在；核）で Panc-1 が陰性対照、抗 Zeb1 抗体については MDA-MB231 が陽性対照（染色の局在；核）で MCF7 が陰性対照、抗 Zeb2 抗体は H1299 が陽性対照（染色の局在；細胞質）で MCF7 が陰性対照となることがわかった。以上の染色の局在は過去の報告の他癌腫における検討と一致した。以上より本研究に使用する EMT 誘導転写因子マーカー抗体について RT-PCR、免疫組織化学染色いずれにおいても抗体の特異性が確認された。

肝外胆管癌手術検体（Whole section）を用いた EMT 関連マーカーを対象とする免疫組織化学染色

Pilot study として肝外胆管癌手術材料 9 例（代表的症例）の FFPE ブロックより作製した whole section を用いて、代表的な EMT 関連マーカー（E-cadherin, S100A4, Zeb1, Zeb2）を対象とする免疫組織化学染色を施行した（図 4）。Whole section による免疫組織化学染色では、腫瘍内部と腫瘍先進部で染色性に明らかな差異（EMT 関連タンパク質発現の heterogeneity）を見出すことはなく、本研究の免疫染色の評価は TMA を用いた検討にて充分に行い得るものであると判断した。

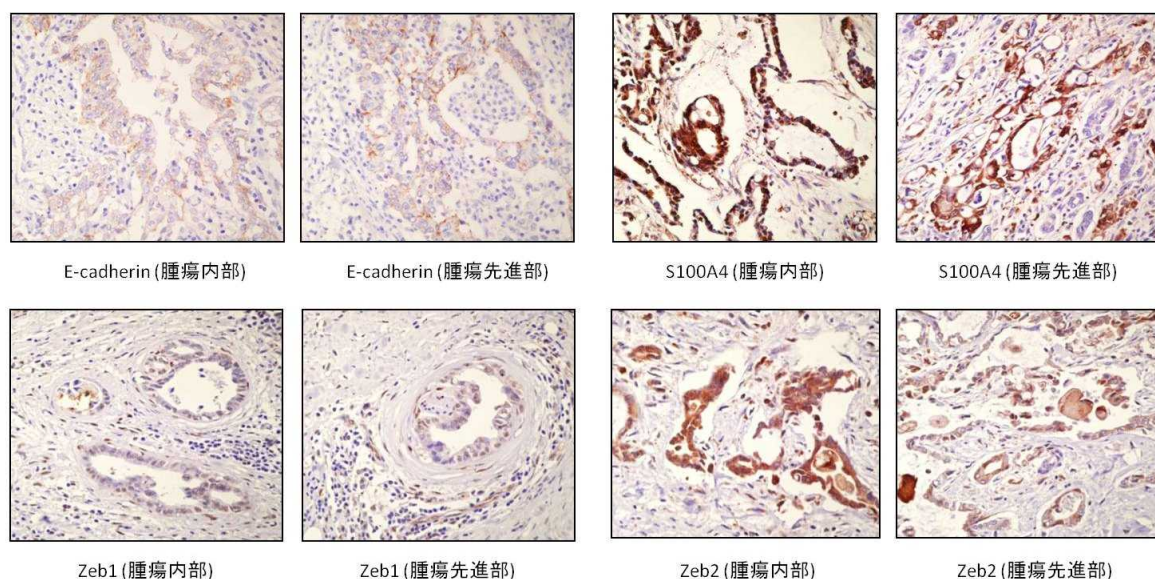


図 4 Whole section の免疫組織化学染色（Pilot study）

肝外胆管癌手術材料の代表的症例（計 9 例）の whole section を用いて、代表的な EMT 関

連マーカー (E-cadherin, S100A4, Zeb1, Zeb2) を対象とする免疫組織化学染色を施行した。Whole section による免疫組織化学染色では、腫瘍内部と腫瘍先進部で染色性に明らかな差異を見出すことはなかった。

肝外胆管癌 TMA を用いた EMT 関連マーカーを対象とする免疫組織化学染色

肝外胆管癌手術材料 117 例から作製した TMA を用いて、計 12 種類の EMT 関連マーカーを対象とする免疫組織化学染色を行った。代表的な免疫染色組織像は前掲の図 1 に示したとおりである (図 1 a ; 上皮系マーカー, b ; 間葉系マーカー, c ; 転写因子マーカー)。

7 種類の EMT 関連 (上皮/間葉系) マーカーの染色性は既報³⁻²⁴ の他癌腫における検討と一致した (表 4)。

表 4 EMT 関連 (上皮/間葉系) マーカーの免疫組織化学染色のまとめ

Antibody	Type	Normal mucosa	Altered expression in cancer
E-cadherin	Epithelial marker	細胞膜	染色度低下 or 陰性
Cytokeratin 19	Epithelial marker	細胞質	染色度低下 or 陰性
Vimentin	Mesenchymal marker	陰性	細胞質
N-cadherin	Mesenchymal marker	陰性	細胞膜 or 細胞質
S100A4	Mesenchymal marker	陰性	核
α -SMA	Mesenchymal marker	陰性	細胞質
Fibronectin	Mesenchymal marker	陰性	細胞質

E-cadherin と CK19 は上皮系マーカーであり、非腫瘍性胆管上皮では細胞膜が染まり、腫瘍細胞においてはその染色性が低下ないしは消失 (陰性化) した。Vimentin、 α -SMA、および Fibronectin は間葉系マーカーとして非腫瘍性胆管上皮では染色されず (陰性)、腫瘍細胞ではその細胞質が染色された。N-cadherin は間葉系マーカーとして非腫瘍性胆管上皮では陰性であり、腫瘍細胞では細胞質ないしは細胞質に染色を認めた。S100A4 も同様に間葉系マーカーであり、非腫瘍性胆管上皮では陰性となるが、腫瘍細胞では細胞質と核のどちらか一方ないしは両者が染色された。ただし、S100A4 は胆管炎などの反応性胆管上皮病変にて細胞質が染色されることが報告されており²⁵、本研究では S100A4 は核陽性所見を陽性所見とした。

5 種類の EMT 誘導転写因子マーカーについては、染色の局在は細胞株セルブロットの染色結果と一致していた。

EMT 関連マーカー発現と患者予後との関係

12 種類の EMT 関連マーカーの発現による患者全生存率の Kaplan-Meier 曲線を図 5 に示す。E-cadherin、Vimentin、N-cadherin、S100A4、および Fibronectin の 5 種類の EMT 関連マーカーにおいて、患者の予後に統計学的有意差が認められた。5 種類の EMT 誘導転写因子については、いずれも患者予後に統計学的有意差を認めなかった。

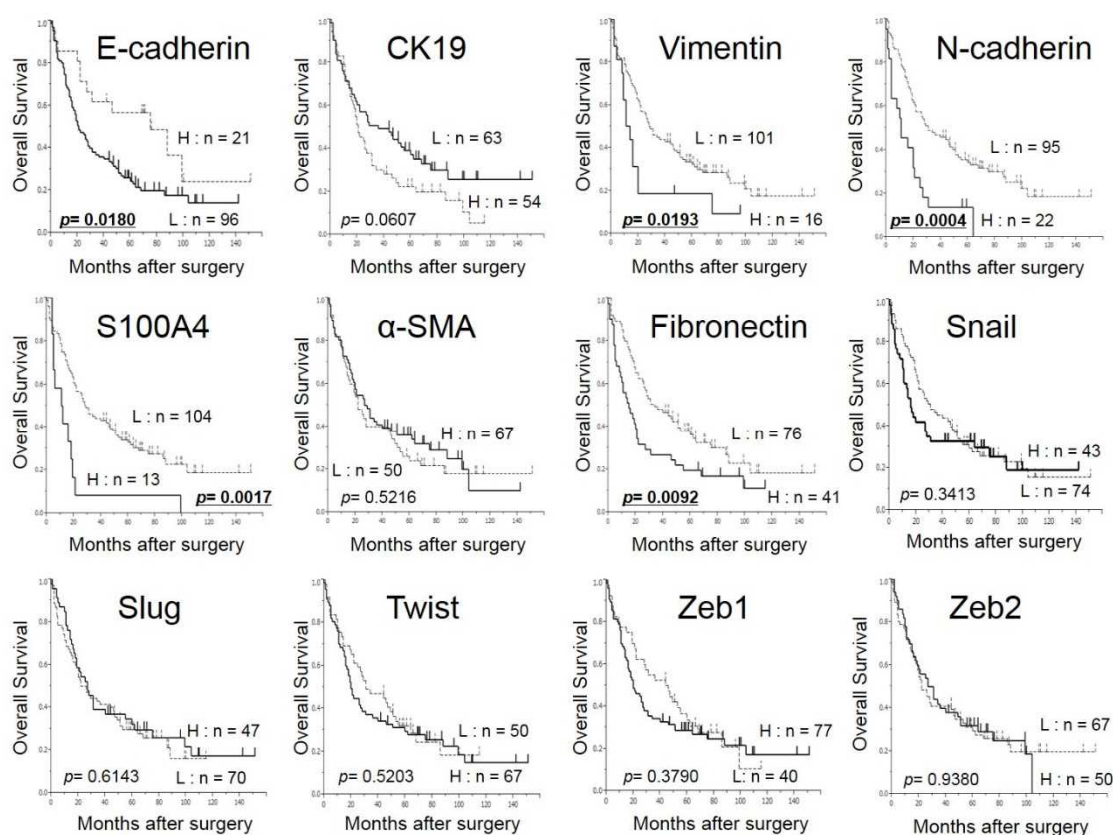


図 5 EMT 関連マーカーの患者予後（全生存率）の関係

(Kaplan-Meier 法/Log-rank 検定)

H:High expression group, L:Low expression group

12 種類の EMT 関連マーカー発現による患者全生存率の Kaplan-Meier 曲線。E-cadherin、Vimentin、N-cadherin、S100A4、および Fibronectin の 5 種類の EMT 関連マーカーにおいて、患者の予後に統計学的有意差が認められた。5 種類の EMT 誘導転写因子については、いずれも患者予後に統計学的有意差を認めなかった。

EMT 関連マーカーの発現と臨床病理学的因子の単変量・多変量解析

Log-rank 検定を用いた単変量解析の結果では、17 項目の臨床病理学的因子のうち静脈侵襲 ($p = 0.0020$)、組織型 ($p = 0.0291$)、TNM 分類 T 因子 ($p = 0.0357$)、N 因子であるリンパ節転移 ($p = 0.0010$)、腫瘍遺残度 ($p = 0.0471$) の 5 項目で統計学的有意差を認めた。次に、これら 5 項目の臨床病理学的因子と E-cadherin、Vimentin、N-cadherin、S100A4、および Fibronectin の 5 種類の EMT 関連マーカーについて、Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析を行った。その結果、E-cadherin (hazard ratio (HR), 2.09; $p = 0.0208$)、N-cadherin (HR, 2.53; $p = 0.0038$)、および S100A4 (HR, 2.51; $p = 0.0157$) の 3 種類の EMT 関連マーカーと、リンパ節転移 (HR, 1.60; $p = 0.0420$) が独立した予後規定因子として検出された (表 5)。

表 5 臨床病理学的因子を含めた単変量・多変量解析

Variable		n	Survival (%)		Univariate <i>p</i> -value	Multivariate	
			3-year	5-year		Relative Risk (95% CI)	<i>p</i> -value
Gender ;	Male	92	41.7	32.1	0.4798		
	Female	25	36.0	24.0			
Age ;	< 71	56	40.0	29.1	0.4722		
	≥ 71	61	40.9	33.5			
Tumor size;	< 3 cm	89	41.5	31.6	0.2027		
	≥ 3 cm	28	37.2	26.0			
Location ;	Distal	43	33.3	30.7	0.4266		
	Perihilar	74	44.5	30.0			
Macroscopic type ;	Papillary	18	50.0	37.5	0.5582		
	Non-papillary	99	38.7	29.0			
Depth of tumor invasion ;	Within fm	8	75.0	37.5	0.1633		
	Beyond fm	109	37.9	29.9			
Invasion to the hepatic artery ;	Negative	112	40.5	30.8	0.9620		
	Positive	5	40.0	20.0			
Invasion to the portal vein ;	Negative	91	43.3	35.0	0.1554		
	Positive	26	30.7	15.3			
Lymphatic vessel invasion ;	Negative	40	55.0	39.1	0.1322		
	Positive	77	32.9	25.4			
Venous invasion ;	Negative	52	57.6	45.4	0.0020	1.00	0.2002
	Positive	65	26.5	18.2		1.37 (0.85-2.22)	
Perineural invasion ;	Negative	15	46.6	33.3	0.5534		
	Positive	102	39.6	29.9			
Superficial spread ;	Negative	97	40.6	29.8	0.9510		
	Positive	20	40.0	33.3			

表 5 臨床病理学的因子を含めた単変量・多変量解析（つづき）

Variable	n	Survival (%)		Univariate <i>p</i> -value	Multivariate	
		3-year	5-year		Relative Risk (95% CI)	<i>p</i> -value
Histopathological classification; Well + Pap	37	59.4	45.1	<u>0.0291</u>	1.00	0.3528
Mod + Poor + Others	80	31.6	23.5		1.29 (0.75-2.26)	
pT ;				<u>0.0357</u>	1.00	0.4162
1+2	62	48.3	39.8		1.22 (0.76-1.96)	
3+4	55	31.5	19.8			
pN ;				<u>0.0010</u>	1.00	<u>0.0420</u>
0	63	52.3	42.4		1.60 (1.02-2.54)	
1	54	26.4	16.0			
pStage ;				0.0607		
I+II	66	47.6	39.4			
III+IV	51	31.3	19.0			
R ;				<u>0.0471</u>	1.00	0.4475
0	95	44.7	33.5		1.27 (0.67-2.29)	
1	22	22.7	17.1			
E-cadherin ;				<u>0.0180</u>	1.00	<u>0.0208</u>
Non-EMT expression	21	61.9	56.7		2.09 (1.11-4.27)	
EMT expression	96	35.8	24.4			
Vimentin ;				<u>0.0193</u>	1.00	0.5662
Non-EMT expression	101	44.0	32.3		1.21 (0.61-2.25)	
EMT expression	16	18.7	18.7			
N-cadherin ;				<u>0.0004</u>	1.00	<u>0.0038</u>
Non-EMT expression	95	46.8	34.2		2.53 (1.36-4.54)	
EMT expression	22	13.6	13.6			
S100A4 ;				<u>0.0017</u>	1.00	<u>0.0157</u>
Non-EMT expression	104	44.2	32.8		2.51 (1.20-4.96)	
EMT expression	13	8.3	8.3			
Fibronectin ;				<u>0.0092</u>	1.00	0.9093
Non-EMT expression	76	48.0	36.2		1.08 (0.64-1.79)	
EMT expression	41	26.8	19.5			

カドヘリンスイッチと予後解析

E-cadherin ならびに N-cadherin の上皮・間葉系両者のカドヘリンマーカーがそれぞれ肝外胆管癌の予後を予測する独立した指標であることが示されたことから、肝外胆管癌におけるカドヘリンスイッチの発現について予後解析を含む臨床病理学的検討を行った。まず、肝外胆管癌 117 症例を免疫組織化学染色による E-cadherin と N-cadherin の発現パターンから、カドヘリンスイッチの発現を以下の 3 つのグループに群分けした。

A : E-cadherin の発現が保持 (High expression 群) され、かつ、N-cadherin の発現を認めない (Low expression 群)。

B : E-cadherin の発現の低下 (Low expression 群)、ないしは、N-cadherin の発現増強 (High expression 群) のいずれかを認める。

C : E-cadherin の発現低下 (Low expression 群)、かつ、N-cadherin の発現増強 (High expression 群) の両者を認める。

このうち、過去の報告を参考に、C 群をカドヘリンスイッチに相当するものと定義した^{3, 6, 10, 13}。A、B、C 群の E-cadherin と N-cadherin の二重染色の結果を図 6a に示す。

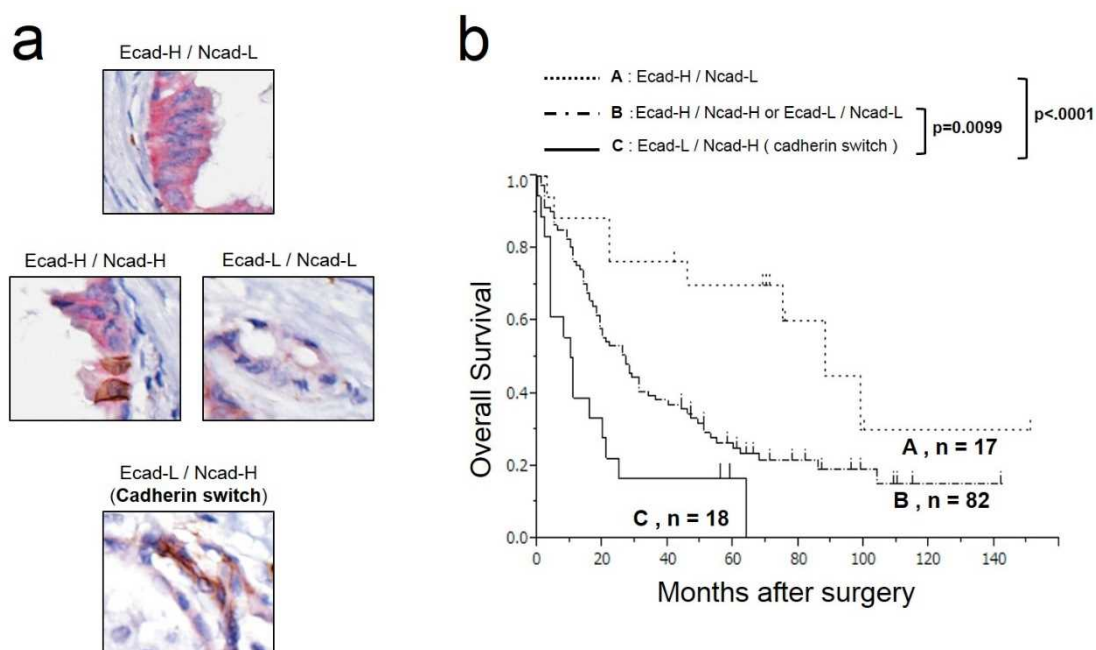


図 6 カドヘリンスイッチと予後解析

a : E-cadherin と N-cadherin の二重染色 (赤 : E-cadherin, 茶 : N-cadherin)

b : E-cadherin と N-cadherin の発現パターンと患者予後 (全生存率) の関係 (Kaplan-Meier 法/Log-rank 検定)

Ecad-H : High expression group of E-cadherin

Ecad-L : Low expression group of E-cadherin

Ncad-H : High expression group of N-cadherin

Ncad-L : Low expression group of N-cadherin

カドヘリンマーカーによる組み合わせ (A, B, C 群) による予後解析では、C 群が A 群 ($p < .0001$)、B 群 ($p = 0.0099$) と比較して統計学的有意に予後が不良であることが示された。

カドヘリンスイッチの腫瘍学的悪性度について、腫瘍先進部と腫瘍内部でカドヘリンスイッチ発現の有無と Ki67 index の関係性について検討を行ったところ、図 7 に示すように、腫瘍先進部および腫瘍内部のいずれにおいても、カドヘリンスイッチの発現の有無と Ki67 index との関係性には有意差を認めなかった。

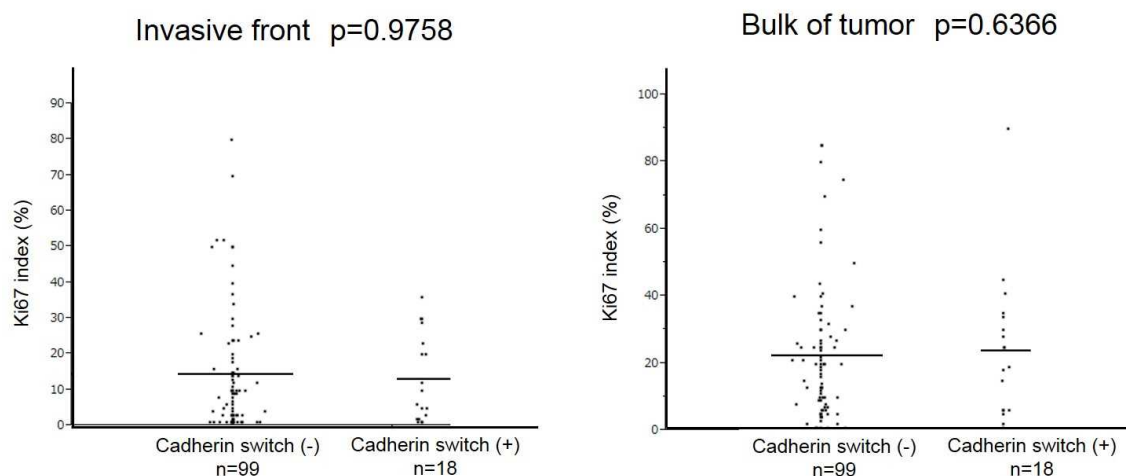


図 7 カドヘリンスイッチ発現の有無と Ki67 index (%) との関係性

Invasive front : 腫瘍先進部

Bulk of tumor : 腫瘍内部

腫瘍先進部（腫瘍と正常間質の境界部）および腫瘍内部（腫瘍先進部から少なくとも 100 細胞以上離れた腫瘍部）のいずれにおいても、カドヘリンスイッチの発現の有無と Ki67 index との関係性には有意差を認めなかった。

次に、カドヘリンスイッチ発現の有無とその周囲の癌間質線維芽細胞（CAFs）の反応性について、腫瘍先進部と腫瘍内部それぞれで CAFs の代表的なマーカーである α -SMA と PDPN を用いた免疫組織化学的検討を行った。その結果（表 6）、カドヘリンスイッチ発現の有無と CAFs の反応性については、腫瘍先進部および腫瘍内部のいずれにおいても統計学的に有意な関係性は認められなかった。

表 6 腫瘍先進部と腫瘍内部それぞれにおけるカドヘリンスイッチ発現の有無とその周囲の癌間質線維芽細胞（CAFs）の反応性

Variable	Cadherin switch		
	Positive	Negative	<i>p</i> -value
α-SMA expression of CAFs			
Invasive front			0.4197
Positive	15	89	
Negative	3	10	
Bulk of tumor			1.0000
Positive	17	89	
Negative	1	10	
PDPN expression of CAFs			
Invasive front			0.7523
Positive	10	51	
Negative	8	48	
Bulk of tumor			0.1617
Positive	11	76	
Negative	7	23	

CAFs : Cancer associated fibroblasts、PDPN : Podoplanin

次に、カドヘリンマーカーによる組み合わせ（A, B, C 群）で予後解析を行ったところ、図 6b に示すように、C 群が A 群（ $p < .0001$ ）、B 群（ $p = 0.0099$ ）と比較して統計学的有意に予後が不良であることが示された。この結果を受けて、カドヘリンスイッチと単変量解析にて有意差の認められた 5 項目の臨床病理学的因子、および Vimentin、S100A、Fibronectin の 3 種類の EMT 関連マーカーについて、Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析を行った。結果としては、リンパ節転移（HR, 1.65; $p = 0.0316$ ）、S100A4（HR, 2.29; $p = 0.0263$ ）と共に、カドヘリンスイッチ（HR, 2.34; $p = 0.0143$ ）が独立した予後規定因子として検出された（表 7）。

表 7 カドヘリンスイッチを含めた多変量解析

Characteristics	HR	95% CI of relative risk	p-value
Venous invasion (negative vs positive)	1.54	0.97 - 2.50	0.0681
Histological classification (Well+Pap vs Mod+Poor+Others)	1.14	0.67 - 1.98	0.6218
T classification (1+2 vs T3+4)	1.28	0.80 - 2.03	0.3024
N classification (negative vs positive)	1.65	1.05 - 2.62	0.0316
Residual tumor (R0 vs R1/R2)	1.21	0.65 - 2.16	0.5348
Vimentin (Low- vs High-expression)	1.34	0.68 - 2.47	0.3819
S100A4 (Low- vs High-expression)	2.29	1.11 - 4.45	0.0263
Fibronectin (Low- vs High-expression)	1.06	0.64 - 1.74	0.8194
Cadherin switch (negative vs positive)	2.34	1.19 - 4.35	0.0143

考 察

これまでも、肝外胆管癌における 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^{3, 14, 25}、解析された EMT 関連タンパク質や検体数は限られた数に留まっていた。本研究では 117 症例という多数例の肝外胆管癌を用いて、複数の転写因子を含む多数の 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た。本研究で得られた主な知見としては、1) Log-rank 検定を用いた単変量解析にて、静脈侵襲、組織型、TNM 分類 T 因子、リンパ節転移、腫瘍遺残度といった臨床病理学的因子 5 項目に加えて、E-cadherin、N-cadherin、S100A4、vimentin、および fibronectin の 5 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こと、2) Cox 比

例ハザードモデルを用いた多変量解析では、リンパ節転移に加えて、E-cadherin、N-cadherin、S100A4 の 3 つの EMT 関連タンパク質が独立した予後規定因子として検出されたこと、3) E-cadherin と N-cadherin の発現パターンを組み合わせた、いわゆるカドヘリンスイッチが E-cadherin と N-cadherin 単独群よりも予後不良因子となり、かつ多変量解析にて独立した予後規定因子として検出されたこと、そして、4) 5 つの EMT 誘導転写因子はいずれも予後規定因子とはならなかったこと、以上の 4 点である。

カドヘリンは並列する双方の細胞から突出する細胞膜貫通型の膜タンパク質であり、細胞内では細胞骨格アクチンを巻き込んで接着装置を構成している^{6, 10, 13}。上皮系細胞は、典型的には epithelial cadherin (E-cadherin) を発現し、間葉系細胞は neural cadherin (N-cadherin) など様々な種類のカドヘリン分子を発現している³⁻²⁴。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³⁻²⁴。また、N-cadherin 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^{3, 6, 10, 13}。癌細胞において E-cadherin の消失（発現低下）と N-cadherin の発現増強の両方を認める現象は、カドヘリンスイッチと呼ばれており、癌細胞の浸潤・進展にとって重要な役割を果たしていると考えられる^{3, 6, 10, 13}。肝外胆管癌における E-cadherin と N-cadherin の発現、およびカドヘリンスイッチと予後との関係については、手術検体 38 例を対象とした免疫組織化学的検討が Araki らにより報告されているのみである³。その単変量解析の結果からは、E-cadherin の消失（発現低下）が肝外胆管癌術後患者にとって予後不良因子とされている³。ただし、この検討で E-cadherin は多変量解析にて統計学的有意性を認められておらず、E-cadherin は独立した予後規定因子とはならないことが示されている³。また、N-cadherin については、単独では単変量解析にて統計学的に有意に予後の指標とはならず、E-cadherin の発現との組み合わせ、すなわちカドヘリンスイッチとしてのみ単変量解析にて予後規定因子となりうるとの結果を示している³。肝外胆管癌 117 症例で検討した本研究では、Araki らの結果とは若干の相違を認めるものの、E-cadherin、N-cadherin、カドヘリンスイッチの発現の有無が肝外胆管癌術後患者の予後を予測する重要な指標となりうるとの結論については一致していた。本研究から得られた新たな知見としては、カドヘリンスイッチ陽性群が E-cadherin、N-cadherin の単独群と比較して統計学的有意性をもって予後不良であり、カドヘリンスイッチが肝外胆管癌術後患者の独立した予後規定因子となる点が挙げられる。しかし、カドヘリンスイッチ陽性群が、E-cadherin、N-cadherin 単独群よりも悪性度の高い因子となる腫瘍学的機序は明確にはわか

ってはいない。本研究では腫瘍学的悪性度の指標として Ki67 index を用いてカドヘリンスイッチ陽性群・陰性群と細胞増殖活性の関係を検討したが、結果としては両方で有意差は認められなかった。

近年、癌細胞と間質の相互作用により作り出される癌微小環境は、癌細胞の浸潤・転移そして治療抵抗性などの幅広い領域において、癌生物像を規定する重要な役割を果たしていることが知られている³²⁻³⁷。癌間質組織内に存在する線維芽細胞は、cancer associated fibroblasts (CAFs) と呼ばれており、細胞外マトリックスの再構成を誘導し、癌細胞の増殖・浸潤に決定的な影響を与えている可能性が指摘されてきている³²⁻³⁷。本研究ではカドヘリンスイッチの腫瘍学的悪性度の原因として、CAFs の可能性を想定し、CAFs の代表的マーカーとして α -SMA と PDPN の 2 つの抗体を用いた免疫組織化学的検討を行ったが、いずれのマーカーもカドヘリンスイッチ発現とは有意な関連を認めなかった。他にカドヘリンスイッチ陽性群が腫瘍学的悪性度の高い因子となる理由として想定されるのは、カドヘリンと EGF、FGF などの増殖因子受容体シグナル経路との関係性である¹⁰。E-cadherin はこれらの各種増殖因子受容体と作用して受容体を介したシグナル経路を抑制しているとされる¹⁰。一方で、N-cadherin は自身の細胞外ドメインによって増殖因子受容体と反応してシグナルを増強し、腫瘍細胞の増殖や浸潤能を亢進させるとされる¹⁰。よって、E-cadherin の発現が低下し、N-cadherin の発現が増強するカドヘリンスイッチでは、増殖因子受容体シグナル経路の相乗的な亢進が起り、結果として、E-cadherin、N-cadherin 単独発現群よりもカドヘリンスイッチ陽性群の方が腫瘍の悪性度が高くなることが考えられた¹⁰。

S100 タンパク質は、2 個の EF-hand を持つカルシウム結合性タンパク質であり、現在までに 20 種類のサブファミリーが確認されている^{25, 38, 39}。細胞内におけるシグナル伝達だけでなく、細胞外に分泌され機能することも知られている^{25, 38, 39}。S100A4 は S100 タンパク質ファミリーのひとつであり、間葉系細胞とある種の上皮系腫瘍細胞の両方で発現している^{25, 38, 39}。S100A4 は細胞運動性、分化、線維化および EMT などの幅広い生物学的活性の調節に関わっており、その発現の有無が患者予後にも影響を与えることから予後規定因子としても注目されている^{25, 38, 39}。Fabris ら²⁵は、腫瘍細胞核における S100A4 発現が胆道癌（肝外胆管癌：31 例，肝内胆管癌：55 例）において独立した予後規定因子となると報告している。肝外胆管癌 117 例という多数症例を用いた本研究においても、腫瘍細胞核における S100A4 発現は独立した予後規定因子となることが示された。

多くの癌腫において、EMT を制御する転写因子、いわゆる EMT 誘導転写因子の発現が予後の指標となると報告されている^{4, 5, 7-12, 14-23}。肝外胆管癌では、Sato ら

¹⁴による 37 例の免疫組織化学染色による検討で、Snail 陽性群が陰性群と比較して予後不良となるとの報告がある。しかし、本研究では代表的な EMT 誘導転写因子である Snail、Slug、Twist、Zeb1、Zeb2 のいずれも予後解析で有意差を認めなかった。近年、EMT の key molecule であり E-cadherin を制御する転写因子として、Kruppel-like factor 8 (KLF8)、Goosecoid、そして FoxC2 といった新規の分子が注目されている^{7,11}。肝外胆管癌においても、これら新規の転写因子が EMT の誘導に関与し、患者予後に影響を与える可能性が考えられる。また、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カットオフ値の設定法などの条件の相違も、既報告との結果の差異に影響を与えている可能性が考えられる。

本研究において、われわれは E-cadherin、N-cadherin、S100A4 の 3 つの EMT マーカー、そしてカドヘリンスイッチが肝外胆管癌術後患者の予後を予測する独立した指標となることを明らかにした。これらの結果は、肝外胆管癌術後患者において、術後補助療法の適否や術後サーベイランスの観点から有益な情報となりうる。また、肝外胆管癌の個別化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

肝外胆管癌における外科的治療は、長期生存を期待しうる唯一の治療法であり、近年、その治療成績は向上してきてはいるものの、他癌種に比べると依然として予後は不良である。そのために、発癌・進展メカニズムの解明や予後規定因子の探索が求められている。

EMT は、上皮系細胞がその細胞形質を喪失すると同時に、間葉系細胞へと移行する現象であり、近年、癌の浸潤・転移の過程に重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。肝外胆管癌においても、その進展・浸潤機序に EMT が関係することが注目されつつあるが、報告例は極めて少なく、検討された EMT 関連分子も少数であり、その臨床病理学的意義についてはいまだ多くは明らかとなっていない。

本研究では、117 症例という多数例の肝外胆管癌手術検体を用いて、EMT 関連分子を対象とした免疫組織化学染色を網羅的に行うことで、肝外胆管癌の腫瘍組織における 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、以下のような新知見が得られた。

- Log-rank 検定を用いた単変量解析にて、静脈浸潤、組織型、TNM 分類 T 因子、リンパ節転移、腫瘍遺残度といった臨床病理学的因子 5 項目に加えて、E-cadherin、N-cadherin、S100A4、vimentin、および fibronectin の 5 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ことが示された。
- Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析では、リンパ節転移に加えて、E-cadherin、N-cadherin、S100A4 の 3 つの EMT 関連タンパク質が、肝外胆管癌術後患者の独立した予後規定因子として検出された。
- E-cadherin と N-cadherin の発現パターンを組み合わせた、いわゆるカドヘリンスイッチが E-cadherin と N-cadherin 単独群よりも予後不良因子となり、かつ多変量解析にて肝外胆管癌術後患者の独立した予後規定因子であることが示された。

これらの結果は、肝外胆管癌術後患者において、術後補助療法の適否や術後サーベイランスの観点から有益な情報となりうる。また、肝外胆管癌の個別化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。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂いた、北海道大学大学院医学研究科分子診断病理学分野 松野吉宏 教授、並びに北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野Ⅱ 平野 聡 教授に深く感謝致します。

研究において、直接ご指導頂いた北海道大学病院病理部 三橋智子 准教授、ならびに畑中 豊 特任講師、北海道大学医学研究科消化器外科学分野Ⅱ 宮本正樹 助教、ならびに土川貴裕 助教、統計解析においてご指導頂きました北海道大学病院高度先進医療センター 大庭幸治 助教、研究の協力をしてくださった北海道大学大学院医学研究科分子診断病理学分野 鈴木雄太 院生に心から感謝致します。最後に、本研究を支えてくださった、分子診断病理学分野、消化器外科学分野Ⅱの全ての皆様に心よりお礼申し上げます。

引用文献

1. DeOliveira, M. L. *et al.* Cholangiocarcinoma: thirty-one-year experience with 564 patients at a single institution. *Ann. Surg.* **245**, 755–762(2007).
2. van der Gaag, N. A. *et al.* Survival analysis and prognostic nomogram for patients undergoing resection of extrahepatic cholangiocarcinoma. *Ann. Oncol.* **23**, 2642–2649(2012).
3. Araki, K. *et al.* E/N-cadherin switch mediates cancer progression via TGF-beta-induced epithelial-to-mesenchymal transition in extrahepatic cholangiocarcinoma. *Br. J. Cancer* **105**, 1885–1893(2011).
4. Uchikado, Y. *et al.* Slug Expression in the E-cadherin preserved tumors is related to prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **11**, 1174–1180 (2005).
5. Shioiri, M. *et al.* Slug expression is an independent prognostic parameter for poor survival in colorectal carcinoma patients. *Br. J. Cancer* **94**, 1816–1822(2006).
6. Gravdal, K., Halvorsen, O. J., Haukaas, S. A. & Akslen, L. A. A switch from E-cadherin to N-cadherin expression indicates epithelial to mesenchymal transition and is of strong and independent importance for the progress of prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **13**, 7003–7011(2007).
7. Wang, X. *et al.* Kruppel-like factor 8 induces epithelial to mesenchymal transition and epithelial cell invasion. *Cancer Res.* **67**, 7184–7193(2007).
8. Hotz, B. *et al.* Epithelial to mesenchymal transition: expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* **13**, 4769–4776(2007).
9. Usami, Y. *et al.* Snail-associated epithelial-mesenchymal transition promotes oesophageal squamous cell carcinoma motility and progression. *J. Pathol.* **215**, 330–339(2008).
10. Wheelock, M. J., Shintani, Y., Maeda, M., Fukumoto, Y. & Johnson, K. R. Cadherin switching. *J. Cell Sci.* **121**, 727–735(2008).
11. Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. & Nieto, M. A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **139**, 871–890(2009).
12. Kim, M. A. *et al.* Prognostic importance of epithelial-mesenchymal transition-related protein expression in gastric carcinoma.

- Histopathology* **54**, 442-451(2009).
13. Jager, T. *et al.* The prognostic value of cadherin switch in bladder cancer. *Oncol. Rep.* **23**, 1125-1132 (2010).
 14. Sato, Y. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition induced by transforming growth factor- β 1/Snail activation aggravates invasive growth of cholangiocarcinoma. *Am. J. Pathol.* **177**, 141-152(2010).
 15. Taube, J. H. *et al.* Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **107**, 15449-15454(2010).
 16. Sung, C. O., Park, C. K. & Kim, S. H. Classification of epithelial-mesenchymal transition phenotypes in esophageal squamous cell carcinoma is strongly associated with patient prognosis. *Mod. Pathol.* **24**, 1060-1068(2011).
 17. Ru, G. Q., Wang, H. J., Xu, W. J. & Zhao, Z. S. Upregulation of Twist in gastric carcinoma associated with tumor invasion and poor prognosis. *Pathol. Oncol. Res.* **17**, 341-347(2011).
 18. Gemmill, R. M. *et al.* ZEB1-responsive genes in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* **300**, 66-78(2011).
 19. Kahlert, C. *et al.* Overexpression of ZEB2 at the invasion front of colorectal cancer is an independent prognostic marker and regulates tumor invasion in vitro. *Clin. Cancer Res.* **17**, 7654-7663(2011).
 20. Ryu, H. S., Park do, J., Kim, H. H., Kim, W. H. & Lee, H. S. Combination of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell-like phenotypes has independent prognostic value in gastric cancer. *Hum. Pathol.* **43**, 520-528(2012).
 21. Dai, Y. H. *et al.* ZEB2 promotes the metastasis of gastric cancer and modulates epithelial mesenchymal transition of gastric cancer cells. *Dig. Dis. Sci.* **57**, 1253-1260(2012).
 22. Kurahara, H. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition and mesenchymal-epithelial transition via regulation of ZEB-1 and ZEB-2 expression in pancreatic cancer. *J. Surg. Oncol.* **105**, 655-661(2012).
 23. Devarajan, E., Song, Y. H., Krishnappa, S. & Alt, E. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer lines is mediated

- through PDGF-D released by tissue-resident stem cells. *Int. J. Cancer* **131**, 1023-1031 (2012).
24. Saadatmand, S. *et al.* Expression of cell adhesion molecules and prognosis in breast cancer. *Br. J. Surg.* **100**, 252-260 (2013).
 25. Fabris, L. *et al.* Nuclear expression of S100A4 calcium-binding protein increases cholangiocarcinoma invasiveness and metastasization. *Hepatology* **54**, 890-899 (2011).
 26. Lindley, L. E. & Briegel, K. J. Molecular characterization of TGFbeta-induced epithelial-mesenchymal transition in normal finite lifespan human mammary epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **399**, 659-664 (2010).
 27. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind Ch, editors. TNM Classification of Malignant Tumours, 7th edn. Wiley-Blackwell: Oxford, 2009, pp 122-128.
 28. Ebata, T. *et al.* The concept of perihilar cholangiocarcinoma is valid. *Br. J. Surg.* **96**, 926-934 (2009).
 29. Jarnagin, W. R. *et al.* Papillary phenotype confers improved survival after resection of hilar cholangiocarcinoma. *Ann. Surg.* **241**, 703-712 (2005).
 30. Nakanishi, Y. *et al.* Extrahepatic bile duct carcinoma with extensive intraepithelial spread: a clinicopathological study of 21 cases. *Mod. Pathol.* **21**, 807-816 (2008).
 31. Tsuji, T., Ibaragi, S. & Hu, G. F. Epithelial-mesenchymal transition and cell cooperativity in metastasis. *Cancer Res.* **69**, 7135-7139 (2009).
 32. Shindo, K. *et al.* Podoplanin expression in cancer-associated fibroblasts enhances tumor progression of invasive ductal carcinoma of the pancreas. *Mol. Cancer* **12**, 168 (2013).
 33. Chuaysri, C. *et al.* Alpha-smooth muscle actin-positive fibroblasts promote biliary cell proliferation and correlate with poor survival in cholangiocarcinoma. *Oncol. Rep.* **21**, 957-969 (2009).
 34. Vered, M. *et al.* Cancer-associated fibroblasts and epithelial-mesenchymal transition in metastatic oral tongue squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer* **127**, 1356-1362 (2010).
 35. Pula, B. *et al.* Podoplanin expression by cancer-associated fibroblasts predicts poor outcome in invasive ductal breast carcinoma.

- Histopathology* **59**, 1249–1260 (2011).
36. Neri, S. *et al.* Recruitment of podoplanin positive cancer-associated fibroblasts in metastatic lymph nodes predicts poor prognosis in pathological N2 stage III lung adenocarcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* **19**, 3953–3962 (2012).
37. Herrera, M. *et al.* Cancer-associated fibroblast and M2 macrophage markers together predict outcome in colorectal cancer patients. *Cancer Sci.* **104**, 437–444 (2013).
38. Schneider, M., Hansen, J. L. & Sheikh, S. P. S100A4: a common mediator of epithelial-mesenchymal transition, fibrosis and regeneration in diseases? *J. Mol. Med. (Berl)*. **86**, 507–522 (2008).
39. Helfman, D. M., Kim, E. J., Lukanidin, E. & Grigorian, M. The metastasis associated protein S100A4: role in tumour progression and metastasis. *Br. J. Cancer* **92**, 1955–1958 (2005).