



Title	肝外胆管癌におけるtumor budding grade と臨床病理学的因子・予後・EMT関連タンパク発現に関する検討
Author(s)	荻野, 真理子
Description	配架番号 : 2511
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14048号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14048
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78250
Type	doctoral thesis
File Information	Mariko_Ogino.pdf



学位論文

肝外胆管癌における tumor budding grade と臨床病理学的因子・

予後・EMT 関連タンパク発現に関する検討

(Impact of Tumor Budding Grade in Patients Who Underwent
Surgical Resection for Extrahepatic Cholangiocarcinoma)

2020 年 3 月

北海道大学

荻野真理子

学位論文

肝外胆管癌における tumor budding grade と臨床病理学的因子・

予後・EMT 関連タンパク発現に関する検討

(Impact of Tumor Budding Grade in Patients Who Underwent
Surgical Resection for Extrahepatic Cholangiocarcinoma)

2020 年 3 月

北海道大学

荻野真理子

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語集	6 頁
緒言	7 頁
方法	14 頁
結果	22 頁
考察	32 頁
結論	36 頁
謝辞	37 頁
利益相反	38 頁
引用文献	39 頁

発表論文目録および学位発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Mariko Ogino, Yoshitsugu Nakanishi, Tomoko Mitsuhashi, Yutaka Hatanaka, Toraji Amano, Katsuji Marukawa, Takeo Nitta, Takashi Ueno, Masato Ono, Shota Kuwabara, Tooru Yamada, and Satoshi Hirano

Impact of Tumour Budding Grade in 310 Patients Who Underwent Surgical Resection for Extrahepatic Cholangiocarcinoma
Histopathology 74(6):861-872, (2019)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Mariko Ogino, Yoshitsugu Nakanishi, Tomoko Mitsuhashi, Yutaka Hatanaka, Kimitaka Tanaka, Toshimichi Asano, Takehiro Noji, Yo Kurashima, Yuma Ebihara, Soichi Murakami, Toru Nakamura, Takahiro Tsuchikawa, Keisuke Okamura, Toshiaki Shichinohe, and Satoshi Hirano.

Impact of the quantity of isolated tumor buds for postoperative prognosis in patients with extrahepatic cholangiocarcinoma.

第 30 回日本肝胆膵外科学会学術集会, 2018/06/07-09, 横浜.

2. 荻野真理子、中西喜嗣、三橋智子、畑中豊、田中公貴、浅野賢道、野路武寛、倉島庸、海老原裕磨、村上壮一、中村透、土川貴裕、岡村圭祐、七戸俊明、平野聡

肝外胆管癌における tumor budding の臨床応用に向けた検討

第 119 回日本外科学会定期学術集会、2019/04/18-20、大阪

要旨

【背景と目的】

肝外胆管癌は、術後の5年生存率がわずか20～40%の極めて悪性度の高い腫瘍である。現時点では外科的切除のみが唯一根治の見込める治療法である。しかし、術後の局所再発、遠隔転移再発がしばしば経験される。特に、リンパ節転移陽性例の予後は極めて不良であり、リンパ節転移陽性例の5年生存率はわずか20%程度である。予後の改善のためには有効な補助治療の開発が急務であり、リンパ節転移を生じる癌細胞、および転移を誘導する微小環境の分子生物学的特徴を捉え、治療標的を探索することが必要である。そこで本研究は、上皮間葉転換(epithelial-mesenchymal transition: 以下, EMTと略記)と tumor budding に着目した。

EMTは、一定の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、遊走能、運動能を獲得し、間葉系形質を持つ細胞に変化する現象で、癌においては、EMTの異常な活性化が浸潤・転移に関与していると考えられている。Tumor buddingは、腫瘍先進部において個細胞性または小胞巣状の腫瘍が間質内に散らばるように浸潤する現象であり、大腸癌をはじめとする様々な癌腫において、リンパ節転移の危険因子や予後不良因子であると報告されている。EMTの過程・形態変化と tumor budding の特徴の類似性から、tumor budding は EMT の形態学的表現型と考えられてきた。

本研究の目的は、第1に、肝外胆管癌において tumor budding の程度が臨床病理学的因子と関連するか、また予後予測因子となり得るかを検証し、第2に、tumor budding と EMT の関連を形態学的、免疫組織化学的に検討し、転移巣形成に関与する分子生物学的因子を調査して、将来新たな治療標的を探索することである。

【対象と方法】

症例は、1998年1月から2016年12月の期間に、北海道大学病院消化器外科Ⅱで切除術が施行された肝外胆管癌310例(肝門部領域胆管癌195例、遠位胆管癌115例)を対象とした。臨床病理学的検討項目として、年齢、性別、腫瘍の局在、腫瘍の分化度、深達度、リンパ管侵襲、静脈侵襲、神経周囲浸潤、所属リンパ節転移、遠隔転移、切除断端、tumor budding の程度を検討した。

また、免疫組織化学染色による検討を行うにあたり、手術検体から作製したホルマリン固定パラフィン包埋標本をもとに組織マイクロアレイ

(tissue micro array: 以下、TMA と略記) の作製を行った。肝外胆管癌 266 例で TMA を作製し、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った。

Tumor buds は単一または 5 個未満の癌細胞からなる胞巣と定義する。まず HE 標本において tumor buds を評価することの妥当性を明確にするため、HE 標本と pan-cytokeratin 染色標本で tumor buds が同等に検出可能か否かを確認した。266 例の HE 染色全組織切片と pan-cytokeratin 染色 TMA 標本で観察された tumor buds 数の相関を調べ、両者間には強い正の相関があった。これにより、HE 標本における tumor buds 数の測定は、pan-cytokeratin 染色標本のそれと同等であることが示され、よって HE 染色全組織切片を用い、計 310 例の肝外胆管癌患者を対象に tumor buds 数と臨床病理学的因子との関連性を解析した。

HE 標本における tumor buds の計測法は以下のように行った。まず各症例において、tumor budding の程度が最も高い HE 標本を選出し、その標本上で、tumor buds が最も多く観察される領域、いわゆる “hotspots” において 200 倍視野 (0.785 mm^2) で tumor buds 数を測定した。

次に、tumor buds と EMT の関係を検討するために免疫組織化学的検討を行った。上皮系マーカーとして E-cadherin、間葉系マーカーとして vimentin を用い、腺管構造を呈する腫瘍細胞と tumor buds の腫瘍細胞の染色強度を比較して H score を算出し検討した。E-cadherin は、腺管構造部と同程度の染色強度を+2、弱陽性を+1、陰性を 0 とし、vimentin は間質細胞と同程度の染色強度を+2、弱陽性を+1、腺管構造部と同様に陰性を 0 と設定した。そして $\text{H score} = (\text{陽性細胞の割合} \times \text{染色強度})$ の総和を算出した。E-cadherin、vimentin それぞれの低スコア/高スコアのカットオフ値は、各々のスコアの中央値に基づき、各々 $70 \leq$ 、 $10 \leq$ を高発現と設定した。E-cadherin と vimentin の H score の組み合わせにより、EMT status を以下のように分類した。E-cadherin 高スコア/vimentin 低スコア (E-high/V-low) を “the epithelial status”、E-cadherin 低スコア/vimentin 低スコア (E-low/V-low) と E-cadherin 高スコア/vimentin 高スコア (E-high/V-high) を “the intermediate status”、そして E-cadherin 低スコア/vimentin 高スコア (E-low/V-high) を “the mesenchymal status” とした。

【結果】

肝門部領域胆管癌 195 例、遠位胆管癌 115 例各々の術後生存率を層別化する tumor buds 数のカットオフ値は再帰分割分析法によって得た。肝門部領域胆管癌では、カットオフポイントは 5 と 12 の 2 つであり、tumor buds 数は次の 3 群に分けられた：low-grade, 0–4 tumor buds; intermediate-grade, 5–11 tumor buds; high-grade, ≥ 12 tumor buds。遠位胆管癌では、カットオフポイントは 5 の 1 つであり、tumor buds 数は次の 2 群に分けられた：low-grade, 0–4 tumor buds; high-grade, ≥ 5 tumor buds。

肝門部領域胆管癌、遠位胆管癌の両方において tumor budding grade は組織学的分化度、pT 因子、リンパ管侵襲、脈管侵襲、神経周囲侵襲、所属リンパ節転移と有意に関係していた。また、肝門部領域胆管癌においては切除断端における浸潤癌の存在もまた tumor budding grade と有意に関係していた。また肝門部領域胆管癌、遠位胆管癌ともに tumor budding grade は、単変量解析において生存期間の短縮と関連しており、多変量解析において独立予後不良因子として選択された。

免疫組織化学的検討では、E-cadherin、vimentin は各々単独では tumor buds 数との相関が乏しいが、E-cadherin と vimentin のスコアを組み合わせ EMT status として検討すると、E-cadherin 低スコアかつ vimentin 高スコアの “the mesenchymal status” で有意に tumor buds 数が多かった。

【考察】

肝門部領域胆管癌、遠位胆管癌の両方において、tumor budding の程度がリンパ・脈管侵襲およびリンパ節転移に強く関連していることを明らかにした。この結果から、tumor budding が肝外胆管癌における転移形成に寄与していることが示唆された。さらに、tumor budding の程度によって術後生存率が層別化されることを示し、そして tumor buds の多寡は肝外胆管癌の独立した予後予測因子の一つとなりうる。加えて、腫瘍先進部の tumor buds の多寡が腫瘍の EMT status と関連するという結果は、腫瘍の浸潤の過程に EMT が関与し、その過程で腫瘍が tumor buds の形態へ変化を遂げ、脈管侵襲、リンパ節転移を起こし、予後に影響する仮説を支持するものである。

【結論】

Tumor buds 数は臨床現場で適切に評価することが可能であり、肝外胆管

癌患者のマネジメント決定を改善する新規の形態学的予後予測因子となりうる。さらに、**tumor budding** の多寡の程度が腫瘍先進部における EMT の程度を反映しており、腫瘍の浸潤と転移に関連していることが考えられる。

Tumor budding は将来肝外胆管癌の悪性度指標項目に含まれ、症例層別化の発展にも寄与する可能性を秘めており、さらなる多施設共同・前向き研究を行って、評価手法を検証・改良していくことが必要である。また EMT との関連が見い出せたことは、EMT プロセスの制御で腫瘍の進展を抑制する新たな薬物治療の開発を目指すために非常に重要であると考ええる。

略語集

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。

DCC	distal cholangiocarcinoma
EHCC	extrahepatic cholangiocarcinoma
EMT	epithelial-mesenchymal transition
HE	hematoxylin and eosin
IHC	immunohistochemical
ITBCC	International Tumor Budding Consensus Conference
PCK	pan-cytokeratin
PHCC	perihilar cholangiocarcinoma
TMA	tissue micro array

緒言

肝外胆管癌（extrahepatic cholangiocarcinoma：以下、EHCC と略記）は、術後の 5 年生存率がわずか 20～40%の極めて悪性度の高い腫瘍である (DeOliveira et al., 2007; Nagino et al., 2013; van der Gaag et al., 2012)。EHCC に対する治療には手術、化学療法、放射線療法があるが、根治を得られる治療法は現在のところ手術のみである。標準治療となる術式は、肝門部領域胆管癌（perihilar cholangiocarcinoma：以下、PHCC と略記）に対しては肝外胆管・尾状葉切除を伴う肝葉切除、遠位胆管癌（distal cholangiocarcinoma：以下、DCC と略記）に対しては臍頭十二指腸切除であり、いずれも極めて侵襲の大きな術式であるが、術前診断の向上による患者選択の適正化、手術手技の定型化や周術期管理の進歩により合併症は減少傾向にある。PHCC の報告で術後肝不全は 2000 年以前に 80% 程であったが、2006-2010 年には 39.8% まで改善している。しかしながら近年の報告でも、術後合併症率は 43.1%、手術関連死は 1.4% であり、やはり他臓器癌の手術と比べ危険性は依然として高いと言える (Nagino et al., 2013)。

EHCC の長期予後については、腫瘍遺残のない完全切除 (R0) はもちろんのこと、リンパ節転移陰性であることが良好な術後予後を得るうえで重要とされている (Lim et al., 2012)。PHCC の報告では、5 年生存率は M0R0 のうち N0 症例が 67.1% であったのに対して N1 症例は 22.1% であった (Nagino et al., 2013)。M0R1-2 症例は 18.0% であり、リンパ節転移は腫瘍遺残に匹敵する予後不良因子と考えられる。また DCC の報告でも、リンパ節転移を認めた症例で予後不良であり、転移リンパ節数が多くなるほど不良であった (Kiriya et al., 2015)。よって、高齢者や performance status が不良な患者の場合、遠隔転移だけではなく所属リンパ節転移を伴う進行胆管癌についても、期待される根治性を鑑み、侵襲の大きな手術を回避することほうが患者のメリットになる場合もあり、有効な集学的治療の実現が望まれる。

化学療法においては、術後補助療法に関しては本邦では未だエビデンスを確立されたものはない。しかし、2019 年に海外から capecitabine を用いた胆道癌術後補助療法の randomized control study (BILCAP trial) の結果が報告され、その有効性が報告された (Primrose et al., 2019)。これにより、本邦でも capecitabine による術後補助療法が近い将来に開始されると考えられるが、この study の症例は EHCC に加えて、肝内胆管癌、胆嚢癌を含んだものであり、EHCC のみでの効果については現状では不明といえる。また、切除不能胆道癌に対する化学治療については、ゲムシタビンとシスプラチンの併用

療法 of ゲムシタビン単独両方に対する優越性を示した 2 つの第Ⅲ相臨床試験 (ABC-02 trial (Valle et al., 2010)、BT22 trial (Okusaka et al., 2010)) の結果が報告されている。しかし、ゲムシタビンとシスプラチンの併用療法群においても生存期間中央値は、ABC-02 trial では 11.7 か月、BT22 trial では 11.1 か月に留まり、胆道癌に対する化学療法の効果は未だ限定的である。以上より、EHCC に対する有効な薬物治療の開発のためには、癌の浸潤、転移形成の分子生物学的メカニズムをさらに調査し、治療標的を探索することが必要である。胆道癌の遺伝子解析も近年行われており、新規の治療標的となる可能性を含んだ遺伝子変化のスペクトラムが明らかにされた (Nakamura et al., 2015)。今後、特定の遺伝子変異や免疫チェックポイント分子をターゲットとした治療の実現が求められると考える。そこで本研究は、EHCC の浸潤・転移のメカニズムを臨床病理学的観点から解明するために、上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition : 以下、EMT と略記) と tumor budding に着目した。

EMT とは、細胞間接着の喪失、細胞極性の喪失、および遊走特性の獲得などの表現型の変化を伴う、胚発生に不可欠な生理学的過程であるが (Thiery et al., 2009; Thiery and Sleeman, 2006)、悪性腫瘍において、EMT の異常な活性化が、腫瘍の進行および転移を促進する可能性があると考えられている (Brabletz et al., 2005; Thiery, 2002; Thiery et al., 2009)。

一方、tumor budding は臨床病理学的に観察される、腫瘍先進部において個細胞性または小胞巣状の腫瘍が間質内に散らばるように浸潤する現象であり、大腸癌をはじめとする様々な癌腫において、リンパ節転移の危険因子や予後不良因子であると報告されてきた (Hase et al., 1993; Ueno et al., 2002; Wang et al., 2009)。EMT の過程・形態変化と tumor budding の特徴の類似点は以前から注目されてきており、いくつかの報告では、tumor budding は EMT の形態学的表現型であるという仮説が提唱された (Grigore et al., 2016; Karamitopoulou, 2012; Prall, 2007)。しかしながら、tumor budding と EMT の関係は未だ議論の分かれるところである (De Smedt et al., 2017; Galvan et al., 2015; Yamada et al., 2017)。

本研究では、PHCC と DCC の各々において、tumor budding の術後生存率に対する影響を評価し、新たな形態学的予後因子となりうることを世界に先駆けて見出し、さらに tumor budding が EMT を反映している可能性があることを免疫組織化学的に検討したためここに報告する。

EMT に関して

癌の浸潤・転移は、原発巣で増殖した癌細胞が基底膜を破壊して間質へと浸潤することから始まる。浸潤癌細胞は、リンパ管・血管へと侵入して、到達した臓器で転移巣を形成する。この癌の浸潤・転移の過程を形態変化に着目すると、腫瘍は細胞間の接着を失って間質浸潤・脈管侵襲し、転移先では再び細胞同士が接着し転移病巣を形成する。この変化に関連していると考えられているのが、上皮間葉転換 (EMT)・間葉上皮転換 (mesenchymal-epithelial transition: 以下、MET と略記) という現象である (Polyak and Weinberg, 2009; Thiery et al., 2009; Thiery and Sleeman, 2006)。

EMT と MET は本来、正常な個体発生・組織構築のプロセスにおいて必要不可欠な生理的機構である。EMT 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、遊走能、運動能を獲得し、間葉系形質を持つ細胞に変化することを指す (Thiery et al., 2009; Thiery and Sleeman, 2006)。EMT は初期胚の発生や原腸形成に代表される様々な器官形成の過程において重要な役割を果たしている。一方 MET は逆に、間葉系形質を持つ細胞から細胞間接着を獲得して上皮組織を形成する過程であり、尿細管上皮の形成過程などで見られる。正常な発生過程においては所定の形態変化が完成されたのちに EMT・MET は収束し、組織構築が維持される。しかし癌においては、さまざまな成長因子やシグナルの亢進のため、生理的なレベルを逸脱して細胞機能の変化が反復して誘導され、浸潤や転移につながる (Brabletz et al., 2005; Polyak and Weinberg, 2009; Thiery, 2002; Thiery et al., 2009; Thiery and Sleeman, 2006)。このような異常な EMT により浸潤・運動能を獲得した癌細胞が、脈管侵襲を経て到達した先で確固たる転移巣を形成するには、間葉系形質から上皮系形質への再転換 MET が関連しているのではないかと考えられている (Polyak and Weinberg, 2009; Thiery et al., 2009; Thiery and Sleeman, 2006) (図 1)。

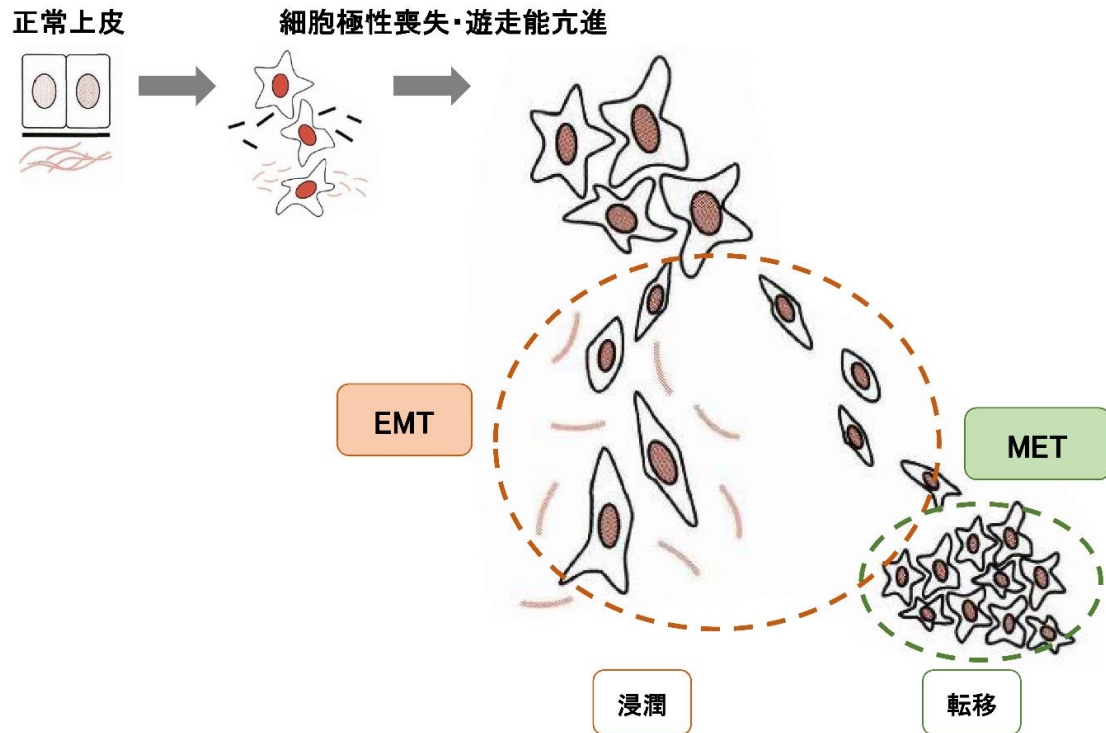


図 1. EMT、MET のシェーマ

EMT の過程で腫瘍細胞は、細胞極性を失い、上皮系形質から間葉系形質に転換し、遊走能を獲得する。

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 (Sato et al., 2010; Thiery et al., 2009)。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 (Hugo et al., 2007; Thiery, 2002; Thiery et al., 2009)。細胞接着分子 E-cadherin は、安定した細胞接着に必須の膜貫通タンパク質であり、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 (Gupta et al., 2003; Thiery, 2002; Thiery et al., 2009; Thiery and Sleeman, 2006; Tian et al., 2011)。また β -catenin は、接着結合の安定化に役割を果たしており、シグナル伝達の際に E-cadherin から解放され、Wnt 経路 (Heuberger and Birchmeier, 2010; Onder et al., 2008; Tian et al., 2011) の下流転写因子として機能する核に移行し、様々な EMT 関連転写因子を増加させると言われている (Heuberger and Birchmeier, 2010; Scheel et al., 2011)。さらに、EMT により、間葉系 cadherin 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 (Shintani et al., 2006; Thiery, 2002; Thiery et al., 2009; Thiery and Sleeman, 2006)。EMT の過程で起こる上皮系形質から間葉系形質への形質変化は癌細胞の形態変化を伴って、癌の浸潤・転移のトリガーになると考えられる。

Tumor budding に関して

癌の進行度は、深達度、リンパ節転移、遠隔転移により分類されるが、副所見としてさらなる悪性度指標を探索する試みが行われてきた。その背景には、術前・術後の補助化学療法の発展やフォローアップ法の個別化の重要性に対する再認識がある。癌悪性度に関する種々の分子病理学的因子が提唱される中、tumor budding は治療方針決定のための指標を追求する本邦の臨床家によりまず着目され (Hase et al., 1993; Morodomi et al., 1989)、臨床の現場においてその重要性が深く認識されるに至った組織所見である。

固形癌の浸潤の重要なプロセスの一つとして、de-differentiation と dissociation が挙げられる (Gabbert, 1985)。Tumor budding はこの現象の形態学的表現型と捉えることが可能であり、癌細胞が個細胞性または小胞巣を形成しつつ散在性に間質内に浸潤する組織所見である (Hase et al., 1993) (図 2)。Tumor budding は主に大腸癌において研究されてきており、腫瘍先進部領域に single cell や小胞巣が散在性に存在する所見に budding という呼称が与えられてから (Morodomi et al., 1989)、budding の評価法に関して複数の報告・再評価がなされてきた (De Smedt et al., 2016; Hase et al., 1993; Jass et al., 2003; Koelzer et al., 2016; Mitrovic et al., 2012; Rogers et al., 2016; Ueno et al., 2002; van Wyk et al., 2015; Zlobec et al., 2007)。Tumor budding の癌悪性度の指標としての重要性が世界的に認識されるようになってきたことを受け、2015 年の米国・カナダ病理学会総会で International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) が開始され、結腸直腸癌における tumor budding 評価のための勧告が報告されるに至った (Lugli et al., 2017)。

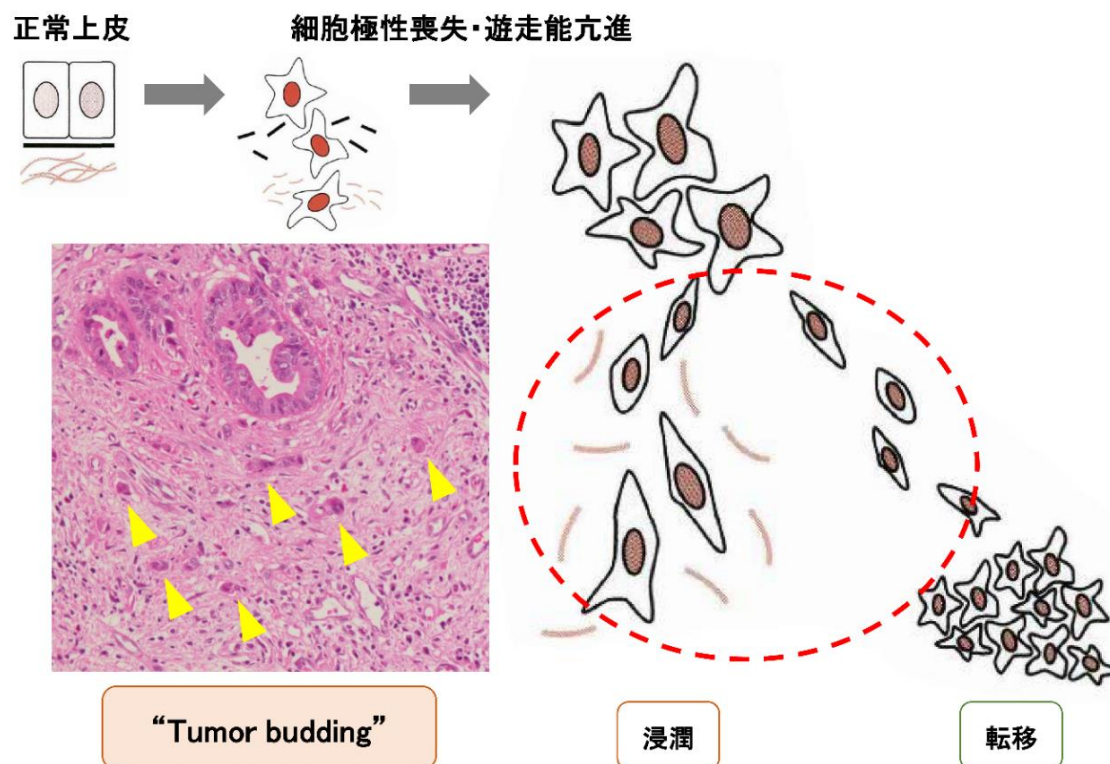


図 2. Tumor budding のシェーマと組織所見

腫瘍先進部の間質内に、個細胞性または小胞巣状の癌細胞塊 (tumor buds) が見られる。

結腸直腸癌において確立しつつある tumor budding の意義は、他の癌腫においてもその予後に対する影響が検討され、報告されてきた (Kohler et al., 2015; O'Connor et al., 2015; Ohike et al., 2010; Olsen et al., 2017; Zhang et al., 2016)。胆道癌における tumor budding の検討はこれまでに、肝内胆管癌、肝外胆管癌、乳頭部癌、胆嚢癌のすべてを含む患者群で解析が行われた報告が1つあるが (Okubo et al., 2018)、EHCC に焦点を置いた検討は未だ報告がない。

また、tumor budding の形態的特徴と、前項で述べた EMT の過程における形態変化の共通性から、tumor budding は EMT の形態学的表現形と捉えられるのではないかと考えられるようになってきた (Grigore et al., 2016; Karamitopoulou, 2012; Prall, 2007)。しかし tumor budding と EMT の関連性は未だ不明瞭であり、検討が必要であった。

本研究では EHCC における tumor budding の影響を検討するとともに、tumor budding と EMT の関係を形態的、免疫組織化学的に検討し、EMT に

関して新たな知見が得られたと考える。

方法

1. 症例

1998 年 1 月から 2016 年 12 月の期間に、北海道大学病院消化器外科Ⅱ で切除術が施行された肝外胆管 310 例（肝門部領域胆管癌 195 例、遠位胆管癌 115 例）を対象とした。術式の内訳を表 1 に示す。術前化学療法・放射線療法施行例は除外した。本研究のためのすべてのインフォームド・コンセントは、北海道大学自主臨床研究審査委員会のガイドラインに従って行われた（No. 015-00315）。

表 1. 手術術式

	PHCC (n = 195)	DCC (n = 115)
	n (%)	n (%)
EBDR	26 (13.3)	3 (2.6)
Caudal lobectomy + EBDR	1 (0.5)	1 (0.9)
Right hepatectomy + EBDR	68 (34.9)	
Right trisectionectomy + EBDR	7 (3.6)	
Left hepatectomy + EBDR	50 (25.6)	
Left trisectionectomy + EBDR	6 (3.1)	
Pancreatoduodenectomy	12 (6.2)	102 (88.7)
Hepatopancreatoduodenectomy	25 (12.8)	9 (7.8)

PHCC, perihilar cholangiocarcinoma; DCC, distal cholangiocarcinoma; EBDR, extrahepatic bile duct resection

2. 組織標本作成と病理組織学的診断

切除検体は 10% 緩衝ホルマリンで固定し、肉眼観察の後、厚さ 3-6mm で連続標本作製した。次に、ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを 4μm 厚の切片に薄切し、顕微鏡検査のためにヘマトキシリン&エオシン（HE）で染色した。病理組織診断は主として UICC による TNM 分類（第 8 版）に準拠した（Amin et al., 2016）。

3. 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（tissue micro array: 以下、TMA と略記）の作

製を行った。TMA 標本作製の理由は、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 heterogeneity 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、腫瘍の複数の部位から組織を採取し TMA 作製した。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。

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。この際に病理専門医（三橋智子准教授）に 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）で円柱状に打ち抜き（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、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。完成したアレイブロックを 4 μ m 厚の切片に薄切し、スライドガラスを作製した。

4. 免疫組織化学染色

組織切片をキシレン中で脱パラフィン処理し、段階的エタノール系列を用いて脱水した。熱誘導抗原賦活化は、高 pH 抗原賦活緩衝液 (BenchMark ULTRA; Roche, Switzerland) 中で行った。内因性ペルオキシダーゼは 36°C の 3% 過酸化水素水 4 分間でブロッキングした。ホースラディッシュペルオキシダーゼポリマー法 (Ventana ultraView DAB Universal Kit; Roche, Switzerland) を用いて切片を標識し、染色には自動免疫染色装置 (BenchMark ULTRA; Roche, Switzerland) を使用した。

EMT 関連マーカー抗体として抗 E-cadherin マウスモノクローナル一次抗体 (36, RTU; Ventana, Roche, Switzerland)、抗 vimentin マウスモノクローナル一次抗体 (V9, RTU; Ventana, Roche, Switzerland)、抗 pan-cytokeratin (PCK) マウスモノクローナル一次抗体 (AE1/AE3 & PCK26, RTU; Ventana, Roche, Switzerland) を使用した。

5. Tumor buds の評価方法

過去の報告のように、tumor buds は単一または 5 個未満の癌細胞からなる胞巣と定義する (Ueno et al., 2004; Ueno et al., 2002)。しかし HE 標本上では、tumor buds は腫瘍周囲の炎症細胞浸潤によって不明瞭化していることもあり、tumor buds と反応性間質細胞との区別が困難になる場合がある (Lugli et al., 2017)。このような状況下において、PCK の免疫染色は tumor buds の検出に役立ち (Mitrovic et al., 2012)、また tumor buds の評価における再現性および観察者間の合意に関して、IHC が HE より優れていると報告している研究もある (De Smedt et al., 2016; Koelzer et al., 2015; Koelzer et al., 2016)。しかしながら、日常の病理診断に広く応用していくためには、HE 標本において tumor buds を評価することの妥当性を明確にする必要がある。したがって、HE 標本と PCK 染色標本で tumor buds が同等に検出可能か否かを確認するために、266 例の HE 染色全組織切片と PCK 染色 TMA 標本で観察された tumor buds 数の相関を調べた。

まず、PCK 染色 TMA 標本の腫瘍先進部のコアを 200 倍視野で観察し、顕微鏡用デジタルカメラ Nikon Imaging Software (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) の画像面積 0.37 mm^2 上で tumor buds 数を計測し記録した (図 3A, 3B)。

続いて、同じ 266 例の HE 染色全組織切片において、次に示す International Tumor Budding Consensus Conference method を用いて tumor buds 数を測定した (図 4) (Lugli et al., 2017)。各症例において、tumor budding の程度が最も高い HE 標本を選出し、その標本上で、tumor buds が最も多く観察される領域、いわゆる “hotspots” において 200 倍視野 (0.785 mm^2) で tumor buds 数を測定した (図 3C, 3D) (Lugli et al., 2017)。

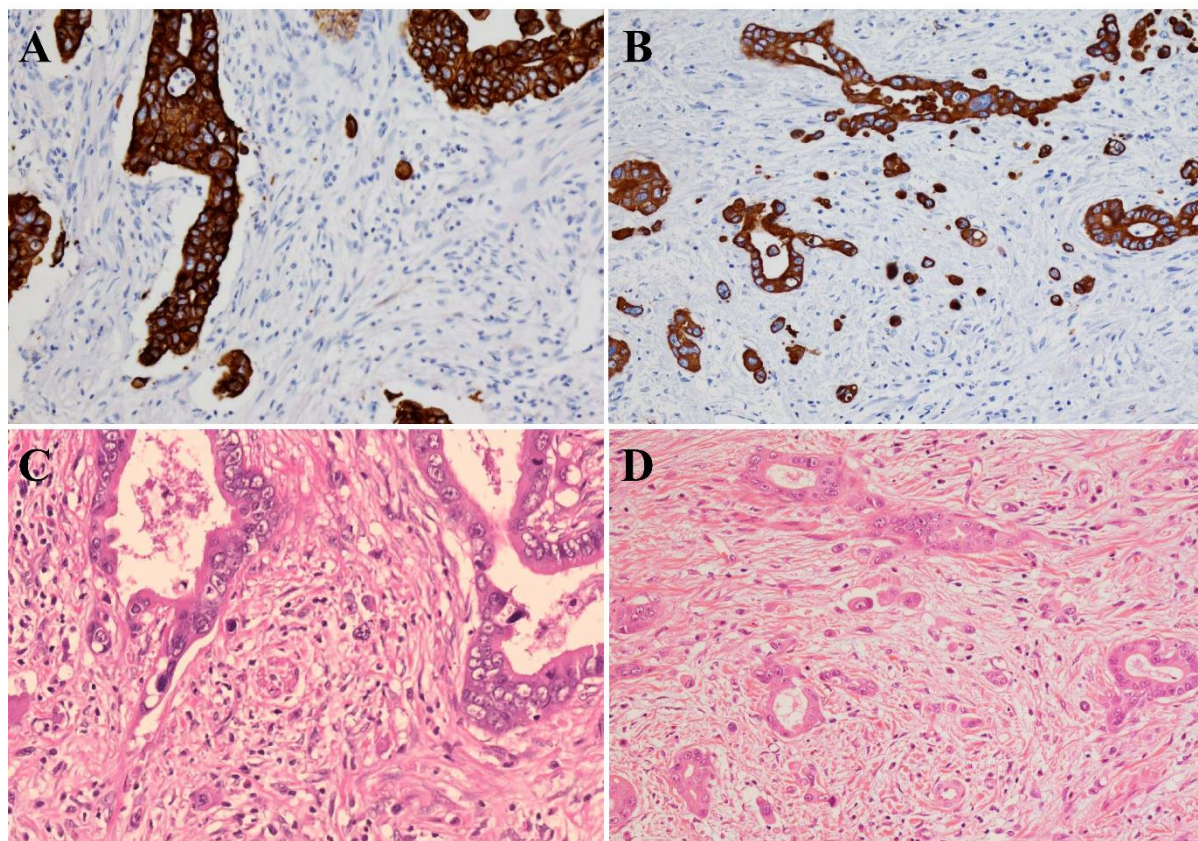


図 3. 肝外胆管癌における **tumor budding** の病理組織所見

(A) Low-grade tumor budding の Pan-cytokeratin 染色像 (200×)。 (B) High-grade tumor の Pan-cytokeratin 染色像。 (C) Low-grade tumor budding の HE 染色像 (200×)。 (D) High-grade tumor budding の HE 染色像。

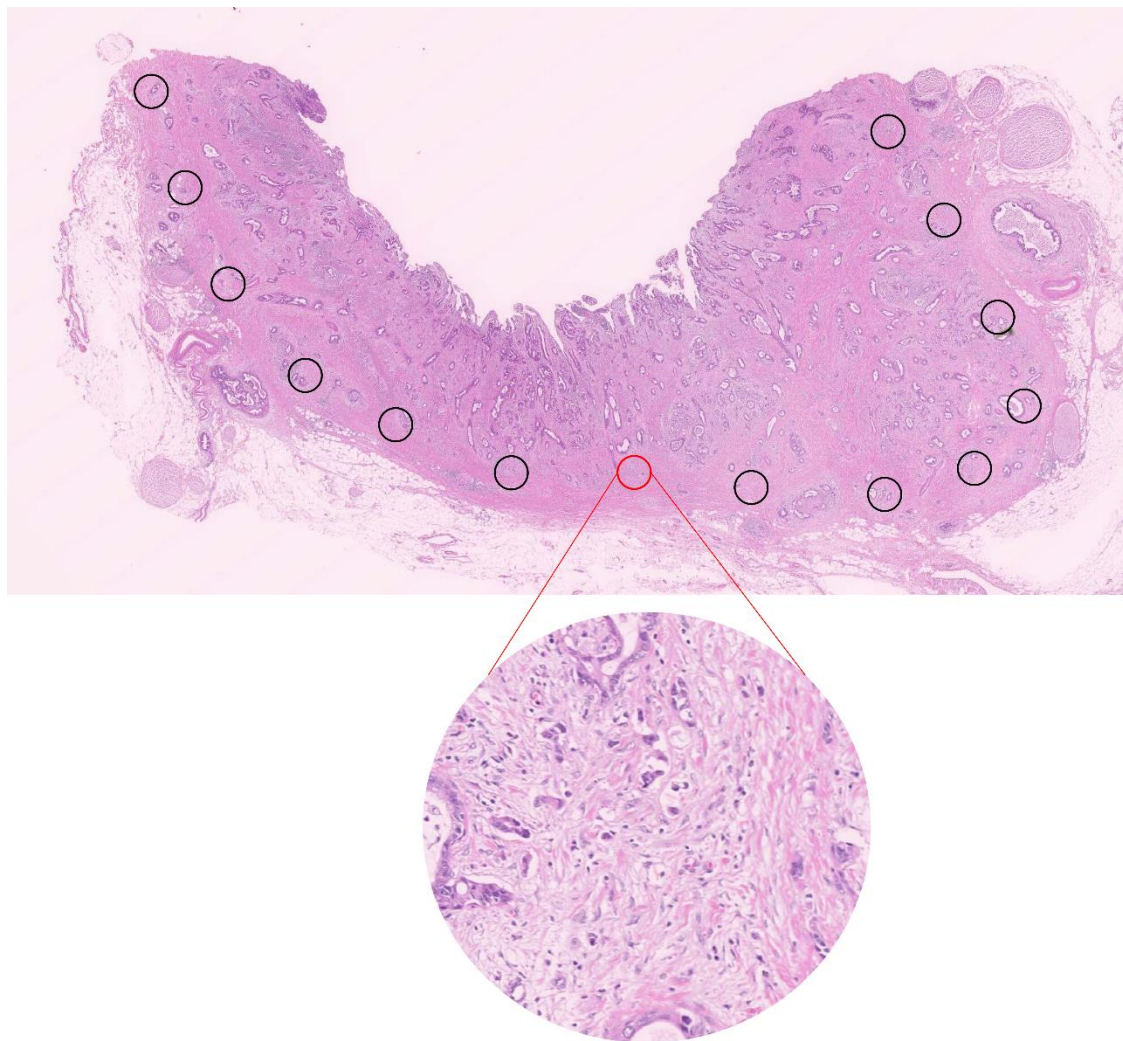


図 4. HE 染色全組織切片における tumor buds の測定法

腫瘍先進部を対物 10 倍視野でスキャンし “hotspot” を同定する。選出した “hotspot” において対物 20 倍視野で tumor buds 数を計測する。

その結果、HE 染色全組織切片における tumor buds 数と PCK 染色 TMA 標本における tumor buds 数の間には図 5 に示すように、強い正の相関があった ($r=0.763$, $p<0.001$)。これにより、HE 標本における tumor buds 数の測定は、PCK 染色標本のそれと同等であることが示され、よって HE 染色全組織切片を用い、計 310 例の EHCC 患者を対象に tumor buds 数と臨床病理学的因子との関連性を解析した。

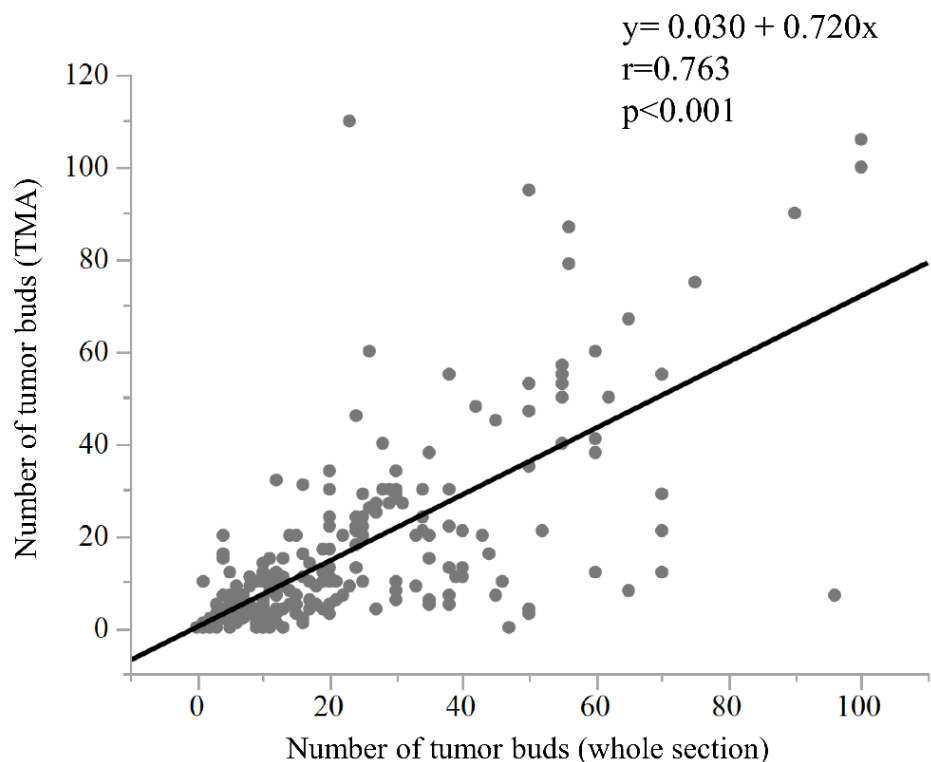


図 5. HE 染色全組織切片における tumor buds 数と PCK 染色 TMA 標本における tumor buds 数の相関

HE 染色全組織切片における tumor buds 数と PCK 染色 TMA 標本における tumor buds 数の間には強い正の相関があった。

6. E-cadherin および vimentin 発現の評価方法

免疫染色の評価には、過去に H score として報告されている評価方法を用いた(Bacus et al., 1988)。H score は、陽性細胞の割合と染色強度の積の総和である。本研究では、tumor buds 構成細胞の染色強度を、腺管構造を呈している腫瘍細胞の染色強度を比較してスコアをつけた。E-cadherin は tumor buds 構成細胞の細胞膜の染色強度が、腺管構造の腫瘍と同程度の強陽性の場合を (grade +2)、vimentin は tumor buds 構成細胞の細胞質の染色強度が、周囲の間質細胞と同程度の強陽性の場合を (grade +2) とし、[grade 0 (陰性), +1 (弱陽性または減弱), +2 (強陽性)] の 3 段階に分類した。

H score 評価方法の例は以下のとおりである。Tumor buds 構成細胞の染色強度を上記の 3 段階に分類し、各コアの全 tumor buds に占める割合を掛け合わせたものの総和をスコアとした。例えば、染色強度 grade 0, +1, +2 がそれぞれ 35%, 30%, 35% のコアでは、 $(0 \times 35 + 1 \times 30 + 2 \times 35) = 100$ がスコアとなる。

7. Tumor buds 数と EMT status の関係に関する検討

E-cadherin と vimentin の免疫染色スコアの組み合わせに基づいて tumor buds 数と EMT status の間の関連を調べた。EMT status は以下の 4 パターンに分類した。E-cadherin 高スコア/ vimentin 低スコア (E-high/V-low) を “the epithelial status” (図 6A, 6B)、E-cadherin 低スコア/ vimentin 低スコア (E-low/V-low) と E-cadherin 高スコア/ vimentin 高スコア (E-high/V-high) を “the intermediate status”、そして E-cadherin 低スコア/ vimentin 高スコア (E-low/V-high) を “the mesenchymal status” (図 6C, 6D)とした。E-cadherin、vimentin それぞれの低スコア/高スコアのカットオフ値は、各々のスコアの中央値に基づき、E-cadherin は 70 以上、vimentin は 10 以上を高スコアとした。

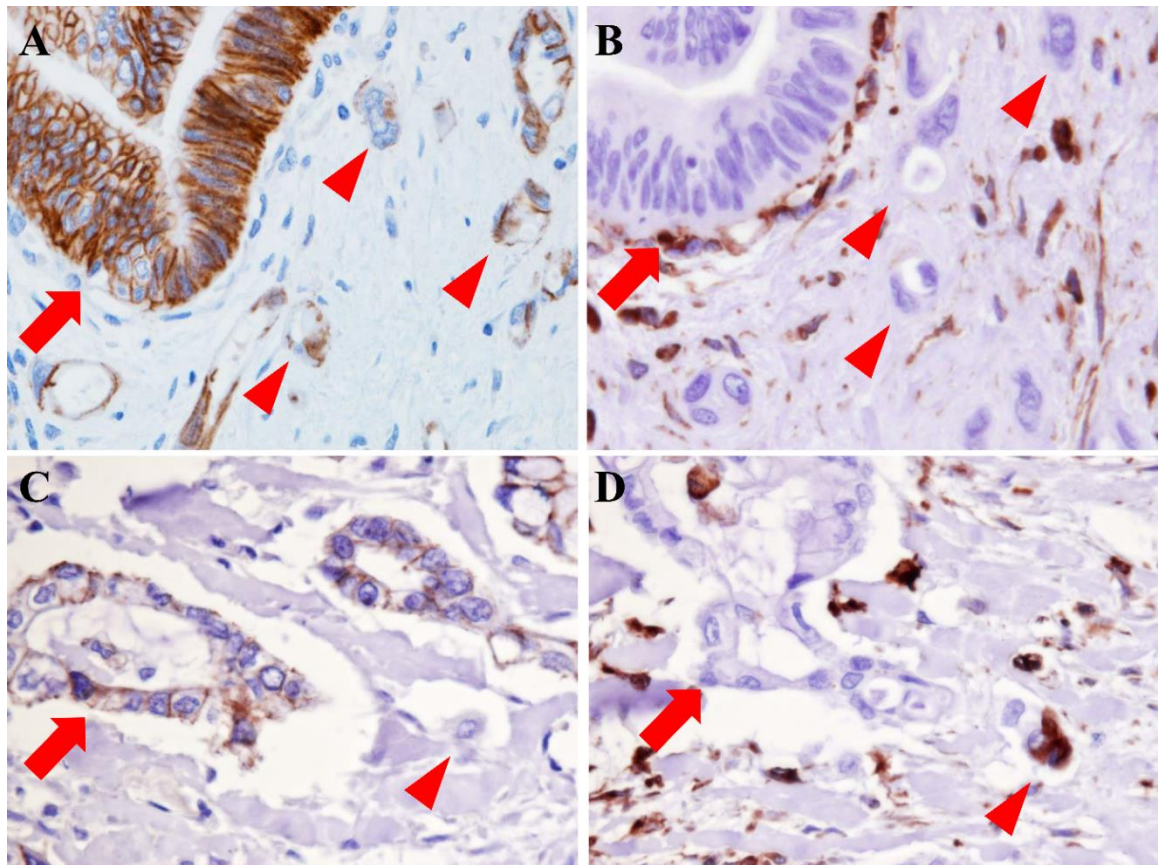


図 6. EMT status に関する組織所見

(A-B) Epithelial status. (A) 腫瘍腺管構造 (矢印)、tumor buds の細胞 (矢頭)の両方において、細胞膜に E-cadherin 陽性である。(B) 腫瘍腺管構造 (矢印)、tumor buds の細胞 (矢頭)の両方において、vimentin 陰性である。(C-D) Mesenchymal status. (C) 腫瘍腺管構造 (矢印) 細胞膜に E-cadherin 陽性であり、tumor buds の細胞 (矢頭)では E-cadherin 陰性である。(D) 腫瘍腺管構造 (矢印)では vimentin 陰性であり、tumor

buds の細胞 (矢頭)において、vimentin が細胞質に陽性である。(400×)

8. 統計学的解析

各臨床病理学的因子の群間比較は、 χ^2 検定または Mann-Whitney U 検定を使用した。HE 染色全組織切片と PCK 染色 TMA 標本における tumor buds 数の相関、tumor buds 数と E-cadherin、vimentin の免疫染色スコアとの相関は、スピアマンの順位法を用いて評価した。生存率を分かつ tumor buds 数のカットオフポイントを決定するために、R (<http://www.r-project.org>) の rpart 関数を使用して再帰分割分析法を実行した (Lee et al., 2006)。多群間の比較は分散分析の後、post-hoc pairwise t-test を行った。全生存期間(OS)は、手術日から経過観察終了日または死亡日までの日数とした。生存解析は Kaplan-Meier 法を用いた log-rank test により比較した。OS の多変量解析は Cox 比例ハザードモデルを用いて行った。有意水準は $p < 0.05$ であり、信頼区間は 95% とした。統計解析には Windows 用の JMP 12.0 ソフトウェアパッケージ (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) を用いた。

結果

1. 予後層別化のための tumor buds 数のカットオフポイント

PHCC 195 例、DCC 115 例の HE 染色全組織切片で計測した tumor buds 数の中央値 (range) はそれぞれ、13 (0–100)、14 (0–100) であった。PHCC および DCC における tumor buds 数のヒストグラムを図 7 に示す。術後生存率を層別化する tumor buds 数のカットオフポイントは再帰分割分析法によって得た。再帰分割分析法は、生存解析 log-rank test の統計量 χ^2 値が有意かつ最大となる測定値をカットオフ値として採用する方法である (Lee et al., 2006)。PHCC では全 195 例で実行した 1 度目の解析で第 1 のカットオフポイント 5 (χ^2 score = 29.617, $p < 0.001$) が求められた。次に、tumor buds 数 5 以上の 155 例で実行した 2 度目の解析で第 2 のカットオフポイント 12 (χ^2 score = 5.676, $p = 0.0172$) が求められた (図 8A)。DCC では、全 115 例で実行した 1 度目の解析で第 1 のカットオフポイント 5 (χ^2 score = 12.322, $p < 0.001$) が求められた。次に、tumor buds 数 5 以上の 92 例で実行した 2 度目の解析では 11 (χ^2 score = 2.411) がカットオフポイントの候補となったが $p = 0.121$ で有意な値ではなかった (図 8B)。この結果、PHCC では、5 と 12 の 2 つのカットオフポイントに基づいて、tumor buds 数は次の 3 群に分けられた：low-grade, 0-4 tumor buds; intermediate-grade, 5-11 tumor buds; high-grade, ≥ 12 tumor buds (図 8C)。DCC では、5 の 1 つのカットオフポイントに基づいて、tumor buds 数は次の 2 群に分けられた：low-grade, 0-4 tumor buds; high-grade, ≥ 5 tumor buds (図 8D)。

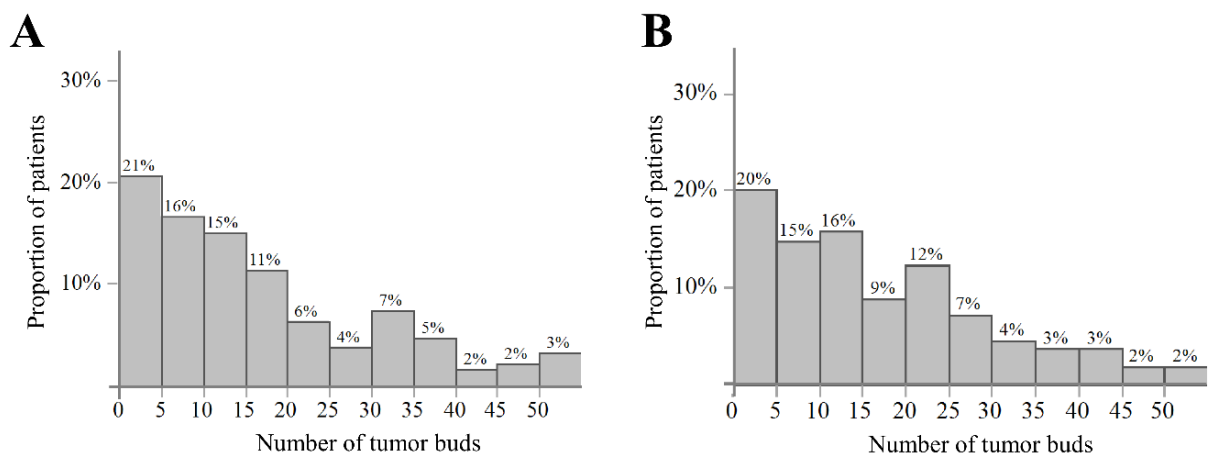


図 7. Tumor buds 数による患者分布のヒストグラム

(A) PHCC、(B) DCC

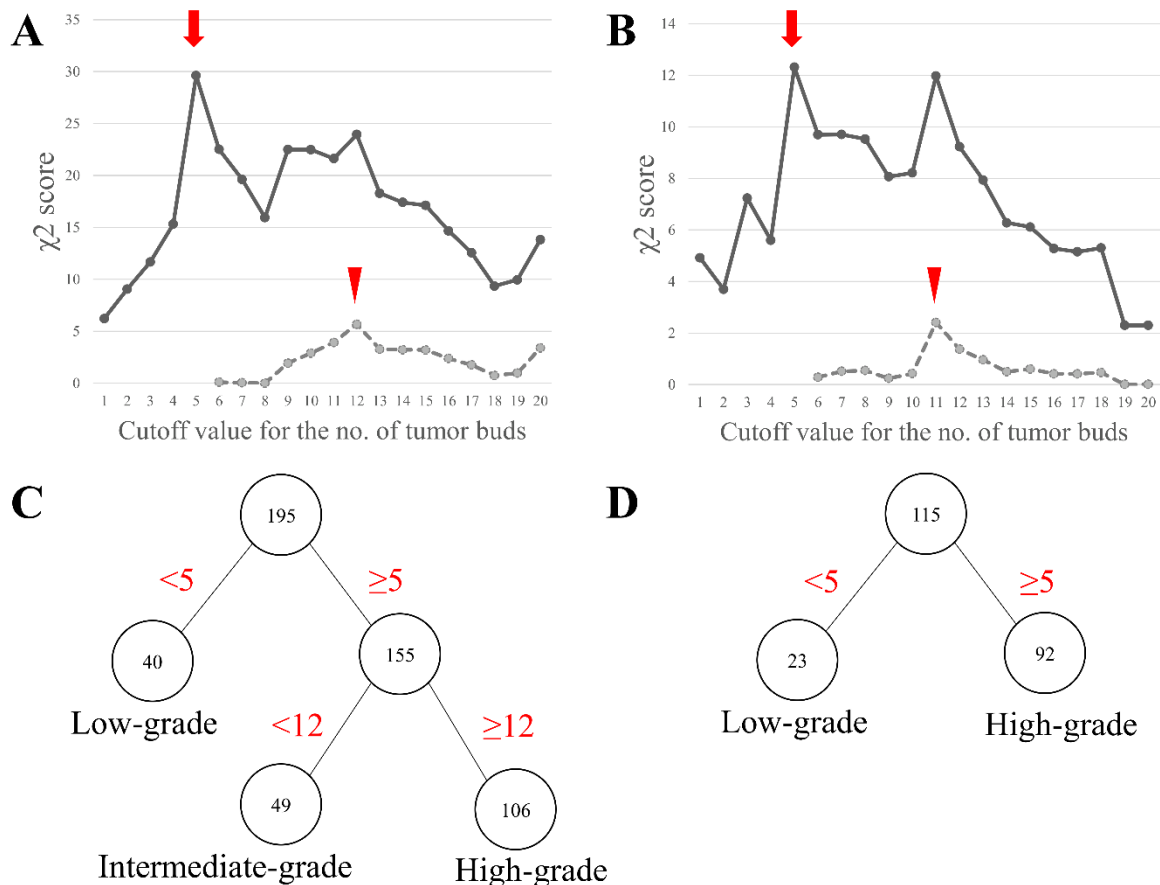


図 8. 再帰分割分析法によるカットオフポイントの決定

(A) PHCC : 1 度目の解析で第 1 のカットオフポイント 5 (χ^2 score = 29.617, $p < 0.001$) が求められた (矢印)。Tumor buds 数 5 以上の症例で実行した 2 度目の解析で第 2 のカットオフポイント 12 (χ^2 score = 5.676, $p = 0.0172$) が求められた (矢頭)。(B) DCC: 1 度目の解析で第 1 のカットオフポイント 5 (χ^2 score = 12.322, $p < 0.001$) が求められた (矢印)。Tumor buds 数 5 以上の症例で実行した 2 度目の解析では 11 (χ^2 score = 2.411) がカットオフポイントの候補となったが $p = 0.121$ で有意な値ではなかった (矢頭)。(C) PHCC : low-grade, 0-4 tumor buds; intermediate-grade, 5-11 tumor buds; high-grade, ≥ 12 tumor buds. (D) DCC : low-grade, 0-4 tumor buds; high-grade, ≥ 5 tumor buds.

2. Tumor budding grade による臨床病理学的因子の比較

PHCC、DCC の両方において tumor budding grade は 組織学的分化度、pT 因子、リンパ管侵襲、脈管侵襲、神経周囲侵襲、所属リンパ節転移と有意に関係していた。また、PHCC においては切除断端における浸潤癌の存在も tumor budding grade と有意に関係していた (表 2)。

表 2A. Tumor budding grade と臨床病理学的因子との関連 (PHCC 195 例)

Variable	Tumor budding grade			p-value
	Low-grade (n = 40) n (%)	Intermediate-grade (n = 49) n (%)	High-grade (n = 106) n (%)	
Age(years)				0.236
<70	21 (52.5)	19 (38.8)	56 (52.8)	
≥70	19 (47.5)	30 (61.2)	50 (47.2)	
Sex				0.259
Male	9 (22.5)	17 (34.7)	24 (22.6)	
Female	31 (77.5)	32 (65.3)	82 (77.4)	
Histological grade				<0.001
G1	25 (62.5)	19 (38.8)	18 (17.0)	
G2/G3	15 (37.5)	30 (61.2)	88 (83.0)	
T factor				<0.001
T1, T2	38 (95.0)	32 (65.3)	68 (64.1)	
T3, T4	2 (5.0)	17 (34.7)	38 (35.9)	
Lymphatic invasion				0.011
Absent	27 (67.5)	28 (57.1)	44 (41.5)	
Present	13 (32.5)	21 (42.9)	62 (58.5)	
Venous invasion				<0.001
Absent	30 (75.0)	25 (51.0)	32 (30.2)	
Present	10 (25.0)	24 (49.0)	74 (69.8)	
Perineural invasion				<0.001
Absent	18 (45.0)	4 (8.2)	10 (9.4)	
Present	22 (55.0)	45 (91.8)	96 (90.6)	
Regional lymph node metastasis				0.005
Absent	33 (82.5)	28 (57.1)	58 (54.7)	
Present	7 (17.5)	21 (42.9)	48 (45.3)	
Distant metastasis				0.378
Absent	40 (100.0)	48 (98.0)	103 (97.2)	
Present	0 (0.0)	1 (2.0)	3 (2.8)	
Resected margin status (invasive)				0.006
Absent	40 (100.0)	43 (87.8)	91 (85.9)	
Present	0 (0.0)	6 (12.2)	15 (14.1)	

Low-grade, 0–4 tumor buds; Intermediate-grade, 5–11 tumor buds; High-grade, ≥12 tumor buds

表 2B. Tumor budding grade と臨床病理学的因子との関連 (DCC 115 例)

Variable	Tumor budding grade		p-value
	Low-grade (n = 23)	High-grade (n = 92)	
	n (%)	n (%)	
Age (years)			0.851
<70	10 (43.5)	42 (45.7)	
≥70	13 (56.5)	50 (54.3)	
Sex			0.060
Male	15 (65.2)	77 (83.7)	
Female	8 (34.8)	15 (16.3)	
Histological grade			<0.001
G1	18 (78.3)	22 (23.9)	
G2/G3	5 (21.7)	70 (76.1)	
T factor			0.002
T1, T2	23 (100.0)	72 (78.3)	
T3	0 (0.0)	20 (21.7)	
Lymphatic invasion			0.015
Absent	15 (65.2)	34 (37.0)	
Present	8 (34.8)	58 (63.0)	
Venous invasion			<0.001
Absent	19 (82.6)	36 (39.1)	
Present	4 (17.4)	56 (60.9)	
Perineural invasion			<0.001
Absent	13 (56.5)	13 (14.1)	
Present	10 (43.5)	79 (85.9)	
Regional lymph node metastasis			0.001
Absent	20 (87.0)	48 (52.2)	
Present	3 (13.0)	44 (47.8)	
Distant metastasis			0.244
Absent	23 (100.0)	89 (96.7)	
Present	0 (0.0)	3 (3.3)	
Resected margin status (invasive)			0.244
Absent	23 (100.0)	89 (96.7)	
Present	0 (0.0)	3 (3.3)	

Low-grade, 0–4 tumor buds; High-grade, ≥5 tumor buds

3. Tumor budding grade による全生存率 (OS) 解析

PHCC および DCC 患者の術後生存期間に対する臨床病理学的因子の影響に関する単変量および多変量解析の結果を表 3 に示す。PHCC (表 3A, 図 9A) と DCC (表 3B, 図 9B) の両方で、tumor budding grade は、単変量解析において生存期間の短縮と関連しており、多変量解析において独立予後不良因子として選択された。

表 3A. 全生存率に関する予後規定因子の検討 (PHCC 195 例)

Variable	No, of patients, n (%)	Univariate			Multivariate	
		Median survival (months)	5-year survival rate (%)	p-value	Relative Risk (95% CI)	p-value
Age (years)				0.911		
<70	96 (49.2)	56	44.0			
≥70	99 (50.8)	52	44.2			
Sex				0.188		
Male	145 (74.4)	50	42.6			
Female	50 (25.6)	69	48.5			
Histological grade				0.012		0.823
G1	62 (31.8)	76	54.2		1	
G2/G3	133 (68.2)	43	39.3		1.05 (0.69–1.55)	
T factor				<0.001		0.018
T1, T2	138 (70.8)	66	51.8		1	
T3, T4	57 (29.2)	30	25.2		1.60 (1.09–2.34)	
Lymphatic invasion				0.151		
Absent	99 (50.8)	63	51.1			
Present	96 (49.2)	39	36.8			
Venous invasion				0.006		0.683
Absent	87 (44.6)	69	53.2		1	
Present	108 (55.4)	42	36.2		1.08 (0.75–1.58)	
Perineural invasion				0.001		0.440
Absent	32 (16.4)	98	65.9		1	
Present	163 (83.6)	46	39.6		1.25 (0.71–2.37)	
Regional lymph node metastasis				<0.001		<0.001
Absent	119 (61.0)	89	60.3		1	

Present	76 (39.0)	28	18.2	2.24 (1.54–3.27)	
Distant metastasis				0.148	
Absent	191 (97.9)	53	45.4		
Present	4 (2.1)	28	0.0		
Resected margin status (invasive)				<0.001	0.045
Absent	174 (89.2)	58	48.8	1	
Present	21 (7.9)	23	5.7	1.74 (1.01–2.84)	
Tumor budding grade				<0.001	<0.001
Low-grade	40 (20.5)	142	78.1	1	
Intermediate-grade	49 (25.1)	58	46.0	1.80 (0.94–3.58)	
High-grade	106 (54.4)	38	29.0	2.95 (1.64–5.63)	

Low-grade, 0–4 tumor buds; Intermediate-grade, 5–11 tumor buds; High-grade, ≥12 tumor buds

表 3B. 全生存率に関する予後規定因子の検討 (DCC 115 例)

Variable	No, of patients, n (%)	Univariate			Multivariate	
		Median survival (months)	5-year survival rate (%)	p-value	Relative Risk (95% CI)	p- value
Age (years)				0.301		
<70	52 (45.2)	62	51.8			
≥70	63 (54.8)	44	39.7			
Sex				0.988		
Male	92 (80.0)	51	46.9			
Female	23 (20.0)	40	40.0			
Histological grade				0.042		0.655
G1	40 (34.8)	70	65.8		1	
G2/G3	75 (65.2)	40	36.5		1.14 (0.65– 2.06)	
T factor				0.007		0.297
T1, T2	95 (82.6)	62	51.8		1	
T3	20 (17.4)	25	15.9		1.36 (0.75– 2.34)	
Lymphatic invasion				0.042		0.890
Absent	49 (42.6)	70	55.6		1	
Present	66 (57.4)	38	37.8		1.03 (0.62– 1.70)	
Venous invasion				0.006		0.508
Absent	55 (47.8)	70	62.1		1	
Present	60 (52.2)	36	28.2		1.20 (0.70– 2.07)	
Perineural invasion				0.057		
Absent	26 (22.6)	85	64.1			
Present	89 (77.4)	44	41.3			
Regional lymph node metastasis				<0.001		0.001
Absent	68 (59.1)	70	64.8		1	
Present	47 (40.9)	25	13.6		2.50 (1.48– 4.25)	
Distant metastasis				<0.001		0.039

Absent	112 (97.4)	51	47.8	1
Present	3 (2.6)	6	0.0	4.99 (1.11–16.34)
Resected margin status (invasive)			0.146	
Absent	112 (97.4)	51	46.8	
Present	3 (2.6)	22	0.0	
Tumor budding grade			<0.001	0.046
Low-grade	23 (20.0)	169	75.8	1
High-grade	92 (80.0)	40	39.4	2.25 (1.01–5.74)

Low-grade, 0–4 tumor buds; High-grade, ≥ 5 tumor buds

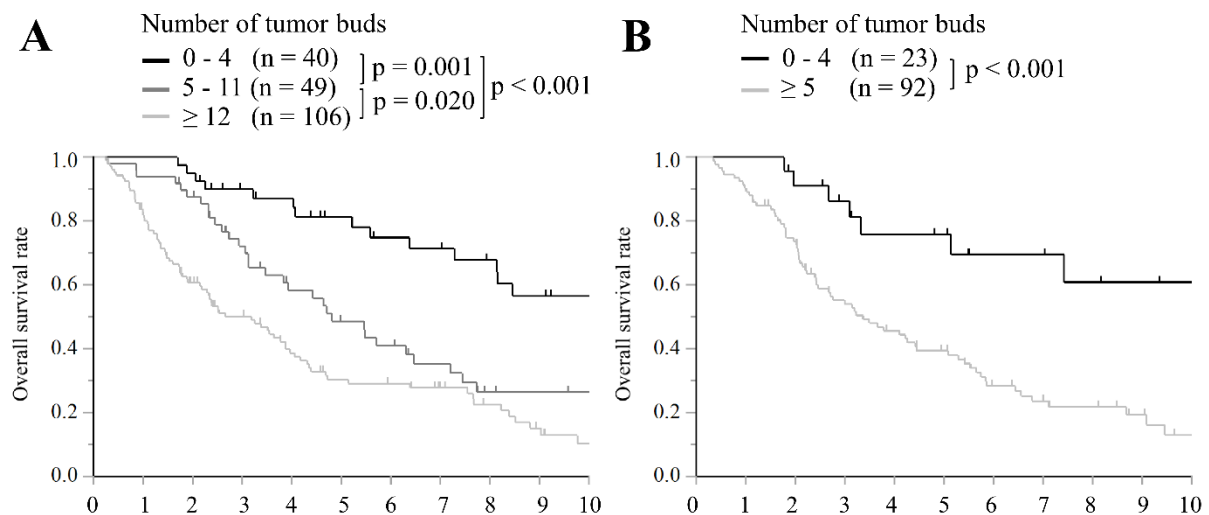


図 9. Tumor budding grade による全生存曲線

(A) PHCC、(B) DCC

4. Tumor buds 数と E-cadherin、vimentin の発現との関係

Tumor buds の染色強度 grade 0 (陰性)、+1 (弱陽性または減弱)、+2 (強陽性) の代表組織所見を図 10 に示す。

EHCC 266 症例の TMA 標本における E-cadherin および vimentin 発現の H score と tumor buds 数の関係をそれぞれ 図 11A と 11B に示す。Tumor buds の数の増加は E-cadherin score の減少と弱い相関があった。一方、vimentin score の増加とは相関が乏しかった。

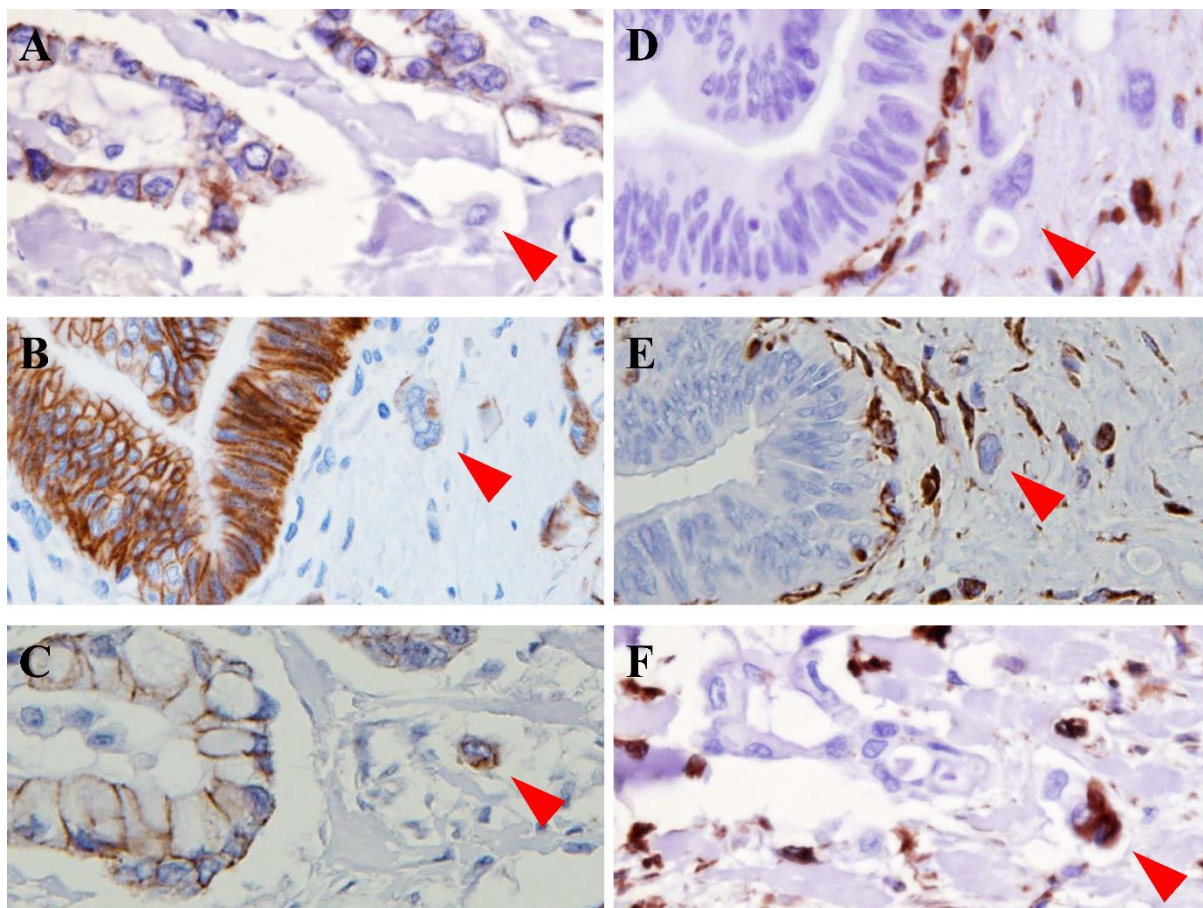


図 10. Tumor buds の染色強度の代表的組織所見

(A-C) E-cadherin : (A) grade 0, (B) grade +1, (C) grade +2. (D-F) vimentin : (D) grade 0, (E) grade +1, (F) grade +2.

5. Tumor buds 数と EMT status の関係

EHCC 266 症例の TMA 標本上で、tumor buds が観察される領域における E-cadherin および vimentin スコアの中央値はそれぞれ、71 (range, 0-200) および 0 (0-200)であった。したがって、E-cadherin および vimentin の高スコアをそれぞれ、 ≥ 70 および ≥ 10 と定義した。E-high/V-low、E-low/V-low、E-high/V-high、および E-low/V-high 群の tumor buds 数の中央値はそれぞれ、8 (range, 1-100)、10 (1-110)、8 (1-106)、および 23 (2-95) であった。図 11 C で示すように、tumor buds 数は E-low/V-high (間葉系状態)群で有意に多かった。

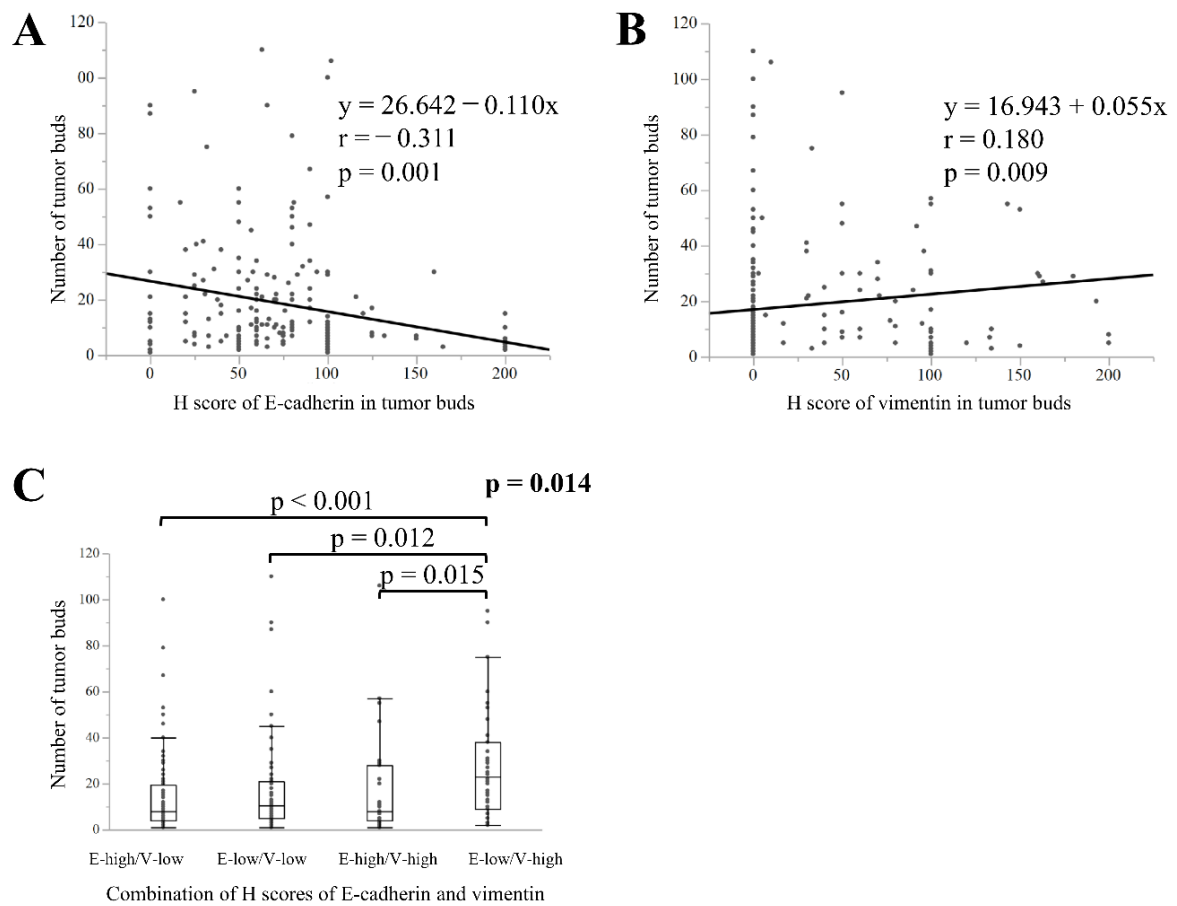


図 11. Tumor buds 数と免疫組織化学所見の関係

(A) E-cadherin の H score と tumor buds 数の関係。(B) vimentin の H score と tumor buds 数の関係。(C) EMT status と tumor buds 数の関係。

考察

上皮由来の癌が転移するには、原発巣で増殖した癌細胞が基底膜を破壊して間質へと浸潤することが必要である。腫瘍の浸潤先進部では、癌細胞が個細胞性または小胞巣状の形態をとって腫瘍中心から遊離し、散在性に間質内に浸潤する。この浸潤癌細胞は、間質内の細胞外マトリックスを介して移動し、リンパ管及び脈管に侵入し、所属リンパ節、遠隔臓器へと移動する (De Smedt et al., 2016)。この浸潤過程で生じる腫瘍先進部の浸潤癌細胞 **tumor buds** は、癌の浸潤・転移のプロセス解明の鍵になると考えられる。本研究は、予後不良の悪性腫瘍である EHCC の転移プロセスの解明のために、主に大腸癌でリンパ節転移の予測因子として脚光を浴びている **tumor budding** に着目し、その多寡による臨床病理学的因子、ならびに予後との関係を検討したものである。さらに **tumor budding** の形態的特徴と、腫瘍浸潤・転移プロセスに必須と考えられている EMT の概念の類似性に着目し、**tumor budding** が EMT の形態的表現形であると仮定し、その関連を検討した。

Tumor budding はこれまで、結腸直腸癌 (Hase et al., 1993; Ueno et al., 2002; Wang et al., 2009)、胃癌 (Gabbert et al., 1992; Gulluoglu et al., 2015; Olsen et al., 2017)、膵癌 (Karamitopoulou, 2012; Karamitopoulou et al., 2013; Masugi et al., 2010; O'Connor et al., 2015)、Vater 乳頭部癌 (Ohike et al., 2010)において、臨床病理学的因子や予後と関連すると報告されてきた。胆道は解剖学的に、肝内胆管、肝外胆管、胆嚢、Vater 乳頭部に分類されるが、その中でも本研究で対象とした EHCC は、**tumor budding** の測定が既に臨床応用されている結腸直腸癌と同様に管腔臓器の上皮原発癌であり、腫瘍先進部で **tumor budding** を評価・検討することにより、実臨床で有用な予後予測因子であることが研究立案時点で予想された。また胆道癌において **tumor budding** の検討を行った研究については、肝内胆管癌、肝外胆管癌、乳頭部癌、胆嚢癌のすべてを含む患者群で解析された報告はあるが (Okubo et al., 2018)、これらの胆道癌は解剖学的特徴により、それぞれ独自の Staging 分類で定義されているため、臨床病理学的因子との関連を調査するためには各々の癌腫で検討する必要がある。よって、本研究は PHCC、DCC において **tumor budding** を測定・検討した世界初のものである。

また本研究は、**tumor budding** を実臨床の病理診断時に評価し、予後因子の一つとして普及させることを目指しており、まず通常病理診断で作製する HE 染色標本上で **tumor buds** が同定・測定可能か否かを判定する必要

があった。Tumor buds 数測定の際には注意すべき点がある。粘液癌および印環細胞癌では、粘液プールに浮遊している腫瘍細胞を tumor buds として数えるべきではないし、また髄様癌では、炎症に随伴する腫瘍細胞の解離を真の tumor buds と区別することが不可能な場合がある。これらの組織型では、tumor buds の評価は慎重に行う必要がある。また、全組織型に共通して言えることだが、EHCC は高率に胆管炎を随伴しているため、間質内の炎症細胞浸潤により tumor buds の同定が困難になる場合や、反応性間質細胞と tumor buds が判別困難になる場合がある。しかし、実臨床では全ての症例で PCK 染色を行うことはコストの面から困難であり、通常の HE 染色での評価が必要となる。ITBCC の報告は、HE 標本は IHC 標本での評価と予後予測力が実質的に異ならず、費用対効果も面からも、世界中で tumor budding を評価できると述べ、HE 標本で測定することを推奨している (Lugli et al., 2017)。本研究では、上皮細胞を明瞭化した PCK 染色標本上での tumor buds 数と HE 染色標本上での tumor buds 数の関係を検討し、両者に強い正の相関があることを示した。これにより、EHCC 症例における tumor buds 数測定は実臨床の場で可能であることが証明された。ただし、粘液癌、印環細胞癌、髄様癌の症例あるいは分化型腺癌でも腫瘍腺管が高度に断片化している症例などにおいて、正確な tumor buds 数測定を実行できない場合は、「評価不能」とすべきである。また、術前化学療法、放射線療法施行症例では、腫瘍組織に治療の修飾が加わるため、さらに治療の予後的意義に関するデータが不十分であるため、tumor buds 数の評価をすべきではないと考える。

次に、EHCC 症例における tumor buds 数測定が実臨床の場で可能であることを証明した上で、EHCC の予後を層別化する tumor budding grade のカットオフポイントを、再帰分割分析法を用いて探索した。ITBCC の提言によれば、結腸直腸癌においては、0-4 tumor buds を low-grade、5-9 tumor buds を intermediate-grade、 ≥ 10 tumor buds を high-grade としているが (Lugli et al., 2017)、これは膨大な結腸直腸癌症例の統計から設定されたカットオフポイントであり、必ずしも EHCC に適用可能であるとは限らない。本研究のコホートにおける解析結果では、PHCC には 2 つ、DCC には 1 つのカットオフポイントが導き出され、tumor buds 数により PHCC では 3 群、DCC では 2 群に術後生存率が層別化されることが示された。さらに、tumor budding grade は多変量解析においても、独立した予後規定因子として選択された。このことから、tumor budding grade は、EHCC における有用な予後予測因子であることが明らかになった。さらに、PHCC、

DCC 各々において、設定した tumor budding grade 群間と臨床病理学的因子との関係を検討したところ、tumor budding grade の上昇と浸潤傾向に関わる因子（組織学的分化度、pT 因子、リンパ管侵襲、脈管侵襲、神経周囲侵襲、所属リンパ節転移）が有意に関連していた。このことから、tumor budding grade は、EHCC における転移形成に重要な役割を担っていると推測された。

PHCC と DCC の間で、生存率を層別化する grade 分類が異なっている理由は、今回の検討では明らかにはできなかった。考えうる理由としては、まず DCC の検討症例数が PHCC と比較して少なかったことが挙げられるが、さらに肝門部胆管と遠位胆管の解剖学的特徴の差異によるものである可能性がある。肝外胆管の壁の組織学的構造は、その部位によって異なる (Hong et al., 2000; Hong et al., 2006)。平滑筋線維の分布は、肝外胆管の下部では密で、上部では粗である (Hong et al., 2000)。さらに、遠位胆管は大部分が密な腓実質に囲まれている。それとは対照的に、肝門部胆管の大部分は、血管と神経を豊富に含む目の粗い結合組織に包まれている。上部胆管の方が下部胆管より tumor buds が間質に浸潤しやすい傾向にあり、またその程度が段階的に生存率に反映され、予後不良因子として影響しやすいことが考えられる。いずれにせよ、今後さらに症例数を加えて検討する必要がある。

本研究では、tumor budding と EMT の関係を明らかにするべく、IHC の手法を用いて、E-cadherin と vimentin の発現パターンと tumor buds 数との関係を検討した。その結果、tumor budding 領域が間葉系形質（E-cadherin 陰性、vimentin 陽性）を呈する場合、tumor buds 数が有意に増加していることを示した。先に述べたように、腫瘍先進部の tumor buds は、腫瘍中心から遊離して間質内を遊走し、リンパ管・脈管に侵入する能力をもつ。これは EMT の過程における形態変化と共通しており、tumor buds が EMT の表現型である可能性が以前より指摘されてきた (Grigore et al., 2016; Karamitopoulou, 2012; Prall, 2007)。過去の報告では、結腸直腸癌における tumor budding 領域の遺伝子発現プロファイルが EMT 状態を反映することや、tumor buds が EMT 関連タンパク質および マイクロRNA を発現することを示したのものがあった (De Smedt et al., 2017; Galvan et al., 2015)。本研究の結果は、tumor budding の多寡の程度が腫瘍先進部における EMT の程度を反映していることを示唆すると推察される。このことは、実臨床において腫瘍先進部の tumor buds 数を測定することにより、個々の EHCC 症例がどの程度 EMT 変化を起こしているかを高価な検査を

施行せずとも、臨床医がある程度把握することができることを示唆している。よって、**tumor budding** 数の測定は、単に術後予後の予測因子としてだけではなく、EMT 変化の指標として、将来的に EMT 変化を阻害する新規化学治療が開発された場合などに、術後補助療法の適否などの観点から有益な情報となりうると考えられた。

本研究は、単一施設の限られた症例に対する後ろ向き研究である。手術適応、術式、高度な手術手技に大きな施設間格差が存在する疾患であることを考慮すると、本研究が単一施設の cohorts においては一定の意義を見出すことはできるが、エビデンスレベルは高いとは言えない。今後、本研究の追試として、多施設共同での前向き研究ができるだけ早期に行われる必要がある。また、EMT については、その変化の程度把握ができたとしても、現時点では EMT 変化を制御する治療法は臨床応用に至っていないが、EMT プロセスを利用して癌の転移を予防あるいは治療標的とするためのアプローチがこれまで研究されてきている (Davis et al., 2014)。例えば、EMT 関連転写因子 **Twist** の阻害が、乳癌マウスモデルにおける肺転移の頻度を低下させ (Yang et al., 2004)、マイクロ RNA ベースの研究においては、特定の RNA が EMT を介した癌細胞浸潤を阻害することを示した (Ling et al., 2013; Shi et al., 2013)。

今後、EMT プロセスを構成する分子や微小環境構成因子を標的とした治療アプローチを探索し、有用な薬物治療の構築を目指してさらなる研究が必要である。

結論

本研究は、PHCC、DCC それぞれにおいて、tumor budding 数の多寡が実臨床において、さらには EMT との関係に於いてどのような意味合いを持つかを検討した世界初の報告であり、以下のような結果と結論が得られた。

- ・ EHCC において、tumor budding 数の測定値は、通常 HE 染色検体と PCK 染色検体間で強い相関があった。このことから、tumor budding 数は HE 染色検体での評価が可能であると考えられた。
- ・ 再帰分割分析法を用いて作成された tumor budding grade は、EHCC において浸潤傾向を表す臨床病理学的因子を有意に関連していた。このことから、tumor budding grade は、浸潤性の強弱の指標になると考えられた。
- ・ Tumor budding grade は、術後生存を層別化するばかりでなく、多変量解析においても独立した予後不良因子の一つとして選択された。これにより、tumor budding の多寡は EHCC に於いて、再発に関する重要な予後規定因子であると考えられた。
- ・ IHC による検討において、E-cadherin 陰性かつ vimentin 陽性の EMT パターンを示す群における tumor buds 数は他のパターンの場合と比較して、有意に高値であった。このことから、tumor buds 数の多寡は、EHCC に於いて腫瘍先進部における癌細胞の EMT 変化を反映していると推察された。

Tumor budding は、EHCC 患者の術後マネジメント決定を改善する新規の形態学的予後予測因子となりうる。さらに tumor budding の程度が腫瘍先進部における EMT の程度を反映しており、tumor buds 数の測定により、簡便に各症例における腫瘍の EMT 変化の程度を把握することができるという意味で、非常に価値がある結果である。腫瘍は EMT 変化により浸潤すると考えられるが、転移巣形成の際に起こるとされている MET については今回検討しておらず、今後の研究課題である。

Tumor budding は将来 EHCC の悪性度指標項目に含まれ、症例層別化の発展にも寄与する可能性を秘めている。今後さらなる多施設共同・前向き研究を行い、評価手法を検証・改良し、形態学的予後層別化法の確立を目指すとともに、EMT・MET プロセスに関わる分子生物学的因子を解明し、腫瘍の進展を抑制する新たな薬物治療の開発を目指すための研究が必要である。

謝辞

本研究の機会を与えていただき、御指導いただきました、北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室 II 平野聡 教授に深く感謝いたします。

多大な御指導をいただきました北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室 II 中西喜嗣 特任助教に深く感謝いたします。

病理組織学的診断や免疫組織化学染色の検討について御指導いただいた北海道大学病院病理診断科 三橋智子 准教授、技術面の指導、支援していただいた北海道大学病院ゲノムコンパニオン診断研究部門 畑中豊 特任講師、北海道大学病院病理部 丸川活司 主任技師に深く感謝いたします。

また本研究にお力添えいただいた、北海道大学病院病理部の皆様、北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室 II の皆様に感謝申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Amin, B.M., Edge, S., Greene, F., Byrd, R.D., Brookland, K.R., Washington, K.M., Gershenwald, E.J., Compton, C.C., Hess, R.K., Sullivan, C.D., et al. (2016). AJCC Cancer Staging Manual, 8th edn (New York: Springer).

Bacus, S., Flowers, J.L., Press, M.F., Bacus, J.W., and McCarty, K.S., Jr. (1988). The evaluation of estrogen receptor in primary breast carcinoma by computer-assisted image analysis. *American journal of clinical pathology* 90, 233-239.

Brabletz, T., Hlubek, F., Spaderna, S., Schmalhofer, O., Hiendlmeyer, E., Jung, A., and Kirchner, T. (2005). Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. *Cells, tissues, organs* 179, 56-65.

Davis, F.M., Stewart, T.A., Thompson, E.W., and Monteith, G.R. (2014). Targeting EMT in cancer: opportunities for pharmacological intervention. *Trends Pharmacol Sci* 35, 479-488.

De Smedt, L., Palmans, S., Andel, D., Govaere, O., Boeckx, B., Smeets, D., Galle, E., Wouters, J., Barras, D., Suffiotti, M., et al. (2017). Expression profiling of budding cells in colorectal cancer reveals an EMT-like phenotype and molecular subtype switching. *British journal of cancer* 116, 58-65.

De Smedt, L., Palmans, S., and Sagaert, X. (2016). Tumour budding in colorectal cancer: what do we know and what can we do? *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 468, 397-408.

DeOliveira, M.L., Cunningham, S.C., Cameron, J.L., Kamangar, F., Winter, J.M., Lillemoe, K.D., Choti, M.A., Yeo, C.J., and Schulick, R.D. (2007). Cholangiocarcinoma: thirty-one-year experience with 564 patients at a single institution. *Annals of surgery* 245, 755-762.

Gabbert, H. (1985). Mechanisms of tumor invasion: evidence from in vivo observations. *Cancer metastasis reviews* 4, 293-309.

Gabbert, H.E., Meier, S., Gerharz, C.D., and Hommel, G. (1992). Tumor-cell dissociation at the invasion front: a new prognostic parameter in gastric cancer patients. *International journal of cancer* 50, 202-207.

Galvan, J.A., Zlobec, I., Wartenberg, M., Lugli, A., Gloor, B., Perren, A., and Karamitopoulou, E. (2015). Expression of E-cadherin repressors SNAIL, ZEB1 and ZEB2 by tumour and stromal cells influences tumour-budding phenotype and suggests heterogeneity of stromal cells in pancreatic cancer. *British journal of cancer* 112, 1944-1950.

Grigore, A.D., Jolly, M.K., Jia, D., Farach-Carson, M.C., and Levine, H. (2016). Tumor Budding: The Name is EMT. Partial EMT. *J Clin Med* 5.

Gulluoglu, M., Yegen, G., Ozluk, Y., Keskin, M., Dogan, S., Gundogdu, G., Onder, S., and Balik, E. (2015). Tumor Budding Is Independently Predictive for Lymph Node Involvement in Early Gastric Cancer. *International journal of surgical pathology* 23, 349-358.

Gupta, A., Deshpande, C.G., and Badve, S. (2003). Role of E-cadherins in development of lymphatic tumor emboli. *Cancer* 97, 2341-2347.

Hase, K., Shatney, C., Johnson, D., Trollope, M., and Vierra, M. (1993). Prognostic value of tumor "budding" in patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 36, 627-635.

Heuberger, J., and Birchmeier, W. (2010). Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a002915.

Hong, S.M., Kang, G.H., Lee, H.Y., and Ro, J.Y. (2000). Smooth muscle distribution in the extrahepatic bile duct: histologic and immunohistochemical studies of 122 cases. *The American journal of surgical pathology* 24, 660-667.

Hong, S.M., Presley, A.E., Stelow, E.B., Frierson, H.F., Jr., and Moskaluk, C.A.

(2006). Reconsideration of the histologic definitions used in the pathologic staging of extrahepatic bile duct carcinoma. *The American journal of surgical pathology* 30, 744-749.

Hugo, H., Ackland, M.L., Blick, T., Lawrence, M.G., Clements, J.A., Williams, E.D., and Thompson, E.W. (2007). Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression. *Journal of cellular physiology* 213, 374-383.

Jass, J.R., Barker, M., Fraser, L., Walsh, M.D., Whitehall, V.L., Gabrielli, B., Young, J., and Leggett, B.A. (2003). APC mutation and tumour budding in colorectal cancer. *Journal of clinical pathology* 56, 69-73.

Karamitopoulou, E. (2012). Tumor budding cells, cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition-type cells in pancreatic cancer. *Front Oncol* 2, 209.

Karamitopoulou, E., Zlobec, I., Born, D., Kondi-Pafiti, A., Lykoudis, P., Mellou, A., Gennatas, K., Gloor, B., and Lugli, A. (2013). Tumour budding is a strong and independent prognostic factor in pancreatic cancer. *Eur J Cancer* 49, 1032-1039.

Kiriyama, M., Ebata, T., Aoba, T., Kaneoka, Y., Arai, T., Shimizu, Y., and Nagino, M. (2015). Prognostic impact of lymph node metastasis in distal cholangiocarcinoma. *The British journal of surgery* 102, 399-406.

Koelzer, V.H., Zlobec, I., Berger, M.D., Cathomas, G., Dawson, H., Dirschmid, K., Hadrich, M., Inderbitzin, D., Offner, F., Puppa, G., et al. (2015). Tumor budding in colorectal cancer revisited: results of a multicenter interobserver study. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 466, 485-493.

Koelzer, V.H., Zlobec, I., and Lugli, A. (2016). Tumor budding in colorectal cancer--ready for diagnostic practice? *Hum Pathol* 47, 4-19.

Kohler, I., Bronsert, P., Timme, S., Werner, M., Brabletz, T., Hopt, U.T., Schilling, O., Bausch, D., Keck, T., and Wellner, U.F. (2015). Detailed analysis of epithelial-mesenchymal transition and tumor budding identifies predictors of

long-term survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Journal of gastroenterology and hepatology* 30 Suppl 1, 78-84.

Lee, J.W., Um, S.H., Lee, J.B., Mun, J., and Cho, H. (2006). Scoring and staging systems using cox linear regression modeling and recursive partitioning. *Methods of information in medicine* 45, 37-43.

Lim, C.S., Jang, J.Y., Lee, S.E., Kang, M.J., and Kim, S.W. (2012). Reappraisal of hepatopancreatoduodenectomy as a treatment modality for bile duct and gallbladder cancer. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 16, 1012-1018.

Ling, H., Fabbri, M., and Calin, G.A. (2013). MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nature reviews Drug discovery* 12, 847-865.

Lugli, A., Kirsch, R., Ajioka, Y., Bosman, F., Cathomas, G., Dawson, H., El Zimaity, H., Flejou, J.F., Hansen, T.P., Hartmann, A., et al. (2017). Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 30, 1299-1311.

Masugi, Y., Yamazaki, K., Hibi, T., Aiura, K., Kitagawa, Y., and Sakamoto, M. (2010). Solitary cell infiltration is a novel indicator of poor prognosis and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer. *Hum Pathol* 41, 1061-1068.

Mitrovic, B., Schaeffer, D.F., Riddell, R.H., and Kirsch, R. (2012). Tumor budding in colorectal carcinoma: time to take notice. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 25, 1315-1325.

Morodomi, T., Isomoto, H., Shirouzu, K., Kakegawa, K., Irie, K., and Morimatsu, M. (1989). An index for estimating the probability of lymph node metastasis in

rectal cancers. Lymph node metastasis and the histopathology of actively invasive regions of cancer. *Cancer* 63, 539-543.

Nagino, M., Ebata, T., Yokoyama, Y., Igami, T., Sugawara, G., Takahashi, Y., and Nimura, Y. (2013). Evolution of surgical treatment for perihilar cholangiocarcinoma: a single-center 34-year review of 574 consecutive resections. *Annals of surgery* 258, 129-140.

Nakamura, H., Arai, Y., Totoki, Y., Shiota, T., Elzawahry, A., Kato, M., Hama, N., Hosoda, F., Urushidate, T., Ohashi, S., et al. (2015). Genomic spectra of biliary tract cancer. *Nature genetics* 47, 1003-1010.

O'Connor, K., Li-Chang, H.H., Kalloger, S.E., Peixoto, R.D., Webber, D.L., Owen, D.A., Driman, D.K., Kirsch, R., Serra, S., Scudamore, C.H., et al. (2015). Tumor budding is an independent adverse prognostic factor in pancreatic ductal adenocarcinoma. *The American journal of surgical pathology* 39, 472-478.

Ohike, N., Coban, I., Kim, G.E., Basturk, O., Tajiri, T., Krasinskas, A., Bandyopadhyay, S., Morohoshi, T., Shimada, Y., Kooby, D.A., et al. (2010). Tumor budding as a strong prognostic indicator in invasive ampullary adenocarcinomas. *The American journal of surgical pathology* 34, 1417-1424.

Okubo, S., Mitsunaga, S., Kato, Y., Kojima, M., Sugimoto, M., Gotohda, N., Takahashi, S., Hayashi, R., and Konishi, M. (2018). The prognostic impact of differentiation at the invasive front of biliary tract cancer. *Journal of surgical oncology* 117, 1278-1287.

Okusaka, T., Nakachi, K., Fukutomi, A., Mizuno, N., Ohkawa, S., Funakoshi, A., Nagino, M., Kondo, S., Nagaoka, S., Funai, J., et al. (2010). Gemcitabine alone or in combination with cisplatin in patients with biliary tract cancer: a comparative multicentre study in Japan. *British journal of cancer* 103, 469-474.

Olsen, S., Jin, L., Fields, R.C., Yan, Y., and Nalbantoglu, I. (2017). Tumor budding in intestinal-type gastric adenocarcinoma is associated with nodal metastasis and recurrence. *Hum Pathol* 68, 26-33.

Onder, T.T., Gupta, P.B., Mani, S.A., Yang, J., Lander, E.S., and Weinberg, R.A. (2008). Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer research* 68, 3645-3654.

Polyak, K., and Weinberg, R.A. (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature reviews Cancer* 9, 265-273.

Prall, F. (2007). Tumour budding in colorectal carcinoma. *Histopathology* 50, 151-162.

Primrose, J.N., Fox, R.P., Palmer, D.H., Malik, H.Z., Prasad, R., Mirza, D., Anthony, A., Corrie, P., Falk, S., Finch-Jones, M., et al. (2019). Capecitabine compared with observation in resected biliary tract cancer (BILCAP): a randomised, controlled, multicentre, phase 3 study. *The Lancet Oncology* 20, 663-673.

Rogers, A.C., Winter, D.C., Heeney, A., Gibbons, D., Lugli, A., Puppa, G., and Sheahan, K. (2016). Systematic review and meta-analysis of the impact of tumour budding in colorectal cancer. *British journal of cancer* 115, 831-840.

Sato, Y., Harada, K., Itatsu, K., Ikeda, H., Kakuda, Y., Shimomura, S., Shan Ren, X., Yoneda, N., Sasaki, M., and Nakanuma, Y. (2010). Epithelial-mesenchymal transition induced by transforming growth factor- β 1/Snail activation aggravates invasive growth of cholangiocarcinoma. *The American journal of pathology* 177, 141-152.

Scheel, C., Eaton, E.N., Li, S.H., Chaffer, C.L., Reinhardt, F., Kah, K.J., Bell, G., Guo, W., Rubin, J., Richardson, A.L., et al. (2011). Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast. *Cell* 145, 926-940.

Shi, Z., Zhang, J., Qian, X., Han, L., Zhang, K., Chen, L., Liu, J., Ren, Y., Yang, M., Zhang, A., et al. (2013). AC1MMYR2, an inhibitor of dicer-mediated

biogenesis of Oncomir miR-21, reverses epithelial-mesenchymal transition and suppresses tumor growth and progression. *Cancer research* 73, 5519-5531.

Shintani, Y., Hollingsworth, M.A., Wheelock, M.J., and Johnson, K.R. (2006). Collagen I promotes metastasis in pancreatic cancer by activating c-Jun NH(2)-terminal kinase 1 and up-regulating N-cadherin expression. *Cancer research* 66, 11745-11753.

Thiery, J.P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature reviews Cancer* 2, 442-454.

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

Thiery, J.P., and Sleeman, J.P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 131-142.

Tian, X., Liu, Z., Niu, B., Zhang, J., Tan, T.K., Lee, S.R., Zhao, Y., Harris, D.C., and Zheng, G. (2011). E-cadherin/beta-catenin complex and the epithelial barrier. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011, 567305.

Ueno, H., Mochizuki, H., Hashiguchi, Y., Shimazaki, H., Aida, S., Hase, K., Matsukuma, S., Kanai, T., Kurihara, H., Ozawa, K., et al. (2004). Risk factors for an adverse outcome in early invasive colorectal carcinoma. *Gastroenterology* 127, 385-394.

Ueno, H., Murphy, J., Jass, J.R., Mochizuki, H., and Talbot, I.C. (2002). Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology* 40, 127-132.

Valle, J., Wasan, H., Palmer, D.H., Cunningham, D., Anthoney, A., Maraveyas, A., Madhusudan, S., Iveson, T., Hughes, S., Pereira, S.P., et al. (2010). Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. *The New England journal of medicine* 362, 1273-1281.

van der Gaag, N.A., Kloek, J.J., de Bakker, J.K., Musters, B., Geskus, R.B., Busch, O.R., Bosma, A., Gouma, D.J., and van Gulik, T.M. (2012). Survival analysis and prognostic nomogram for patients undergoing resection of extrahepatic cholangiocarcinoma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 23, 2642-2649.

van Wyk, H.C., Park, J., Roxburgh, C., Horgan, P., Foulis, A., and McMillan, D.C. (2015). The role of tumour budding in predicting survival in patients with primary operable colorectal cancer: a systematic review. *Cancer treatment reviews* 41, 151-159.

Wang, L.M., Kevans, D., Mulcahy, H., O'Sullivan, J., Fennelly, D., Hyland, J., O'Donoghue, D., and Sheahan, K. (2009). Tumor budding is a strong and reproducible prognostic marker in T3N0 colorectal cancer. *The American journal of surgical pathology* 33, 134-141.

Yamada, N., Sugai, T., Eizuka, M., Tsuchida, K., Sugimoto, R., Mue, Y., Suzuki, M., Osakabe, M., Uesugi, N., Ishida, K., et al. (2017). Tumor budding at the invasive front of colorectal cancer may not be associated with the epithelial-mesenchymal transition. *Hum Pathol* 60, 151-159.

Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., and Weinberg, R.A. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117, 927-939.

Zhang, L., Guo, L., Tao, M., Fu, W., and Xiu, D. (2016). Parasympathetic neurogenesis is strongly associated with tumor budding and correlates with an adverse prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Chin J Cancer Res* 28, 180-186.

Zlobec, I., Lugli, A., Baker, K., Roth, S., Minoo, P., Hayashi, S., Terracciano, L., and Jass, J.R. (2007). Role of APAF-1, E-cadherin and peritumoral lymphocytic infiltration in tumour budding in colorectal cancer. *The Journal of pathology* 212, 260-268.