



|                     |   |
|---------------------|---|
| Title               | 肝外胆管癌におけるケモカインレセプター（CCR7）の悪性度への関与と治療応用に関する検討  |
| Author(s)           | 大場, 光信  |
| Description         | 配架番号 : 2820   |
| Degree Grantor      | 北海道大学   |
| Degree Name         | 博士(医学)  |
| Dissertation Number | 甲第15886号  |
| Issue Date          | 2024-03-25  |
| DOI                 | <a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k15886">https://doi.org/10.14943/doctoral.k15886</a> |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/91984">https://hdl.handle.net/2115/91984</a>               |
| Type                | doctoral thesis   |
| File Information    | OBA_Mitsunobu.pdf   |



# 学位論文

肝外胆管癌におけるケモカインレセプター（CCR7）の  
悪性度への関与と治療応用に関する検討

(Studies on the effects of chemokine receptor (CCR7) on malignant  
potential and therapeutic application in extrahepatic  
cholangiocarcinoma)

2024年3月

北海道大学

大場 光信



# 学位論文

肝外胆管癌におけるケモカインレセプター（CCR7）の  
悪性度への関与と治療応用に関する検討

(Studies on the effects of chemokine receptor (CCR7) on malignant  
potential and therapeutic application in extrahepatic  
cholangiocarcinoma)

2024年3月

北海道大学

大場 光信

## 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              | 25 頁 |
| 考察              | 38 頁 |
| 結論              | 45 頁 |
| 謝辞              | 47 頁 |
| 利益相反            | 48 頁 |
| 引用文献            | 49 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. Mitsunobu Oba, Yoshitsugu Nakanishi, Tomoko Mitsunashi, Katsunori Sasaki, Kanako C. Hatanaka, Masako Sasaki, Ayae Nange, Asami Okumura, Mariko Hayashi, Yusuke Yoshida, Takeo Nitta, Takashi Ueno, Toru Yamada, Masato Ono, Shota Kuwabara, Keisuke Okamura, Takahiro Tsuchikawa, Toru Nakamura, Takehiro Noji, Toshimichi Asano, Kimitaka Tanaka, Kiyoshi Takayama, Yutaka Hatanaka, and Satoshi Hirano  
CCR7 mediates cell invasion and migration in extrahepatic cholangiocarcinoma by inducing epithelial-mesenchymal transition  
Cancers 2023, 15(6), 1878

## 要旨

### 【背景と目的】

肝門部領域胆管癌は悪性度の高い腫瘍で、現在のところ根治的治療は手術のみである。その手術は肝外胆管切除を伴う大量肝切除や膵頭十二指腸切除などで多大な侵襲を伴う。術後の局所再発、遠隔転移再発がしばしば経験され、手術を施行しても全病期における5年生存率は約40%と報告されている。特にリンパ節転移陽性例の予後は不良で5年生存率は20%程度である。近年、TS-1による術後補助療法が標準治療となったが、3年生存率は約75%と満足できる成績ではない。予後改善のためには有効な薬物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) とケモカインに着目した。

EMT は一定の細胞極性を保って規則正しく配列した上皮系細胞がその細胞極性を失い、遊走能や運動能を獲得し、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、転移に関与すると考えられている。

ケモカインは細胞遊走活性を主機能とするサイトカインの一群であり、生体における様々な細胞の移動や局在を制御している。本研究の対象とした CC 型ケモカインレセプター 7 (C-C motif chemokine receptor 7 : 以下 CCR7 と略記) は、生理的には主に T 細胞や樹状細胞などで発現している。リガンドの CC 型ケモカインリガンド 19 (C-C motif chemokine ligand 19 : 以下 CCL19 と略記) はリンパ節などの2次リンパ組織の高内皮細胞が提示するため、T 細胞や樹状細胞は再循環の過程で2次リンパ組織に効率よくホーミングする。近年、様々な癌種において、腫瘍がケモカイン受容体を発現した場合、EMT を介して細胞遊走活性を獲得し、浸潤、転移へ至ると報告されている。

本研究の目的は、第一に肝外胆管癌において CCR7 の発現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、第二に CCR7 発現と EMT の関連を検討し、転移に関与する分子生物学的因子を調査して、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、1995年3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門部領域胆管癌181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、CCR7発現の程度を検討した。

全症例の手術検体のホルマリン固定パラフィン包埋標本より、腫瘍先進部（腫瘍と正常間質の境界部）、腫瘍内部（腫瘍先進部から100細胞以上離れた腫瘍部）、正常対照群となる同一検体の正常胆管上皮から組織を採取し、組織マイクロアレイ（tissue micro array: 以下、TMAと略記）を作製した。

CCR7の発現とEMT、臨床病理学的因子の関係を検討するために、tumor buds数と、EMT関連蛋白の発現を測定した。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、様々な癌種において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の過程や形態変化とtumor buddingの特徴は類似しており、tumor buddingはEMTの形態学的表現型と考えられている。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し、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でtumor buds数を測定した。また、免疫組織化学的手法を用いて、181例のTMAにおけるCCR7、E-cadherin（上皮系マーカー）、vimentin（間葉系マーカー）の発現強度を測定した。CCR7はリンパ球と同程度に染色される腫瘍細胞の染色強度を+3、中等度を+2、弱陽性を+1、陰性を0と定義した。E-cadherinはtumor buds細胞において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と定義し、vimentinはtumor buds細胞において間質細胞と同程度の染色強度を+2、弱陽性を+1、腺管構造部と同程度の染色強度を陰性0と定義した。それらの数値を用いて各症例におけるCCR7、E-cadherin、vimentinのHscore = {(各々の染色強度の細胞の割合×染色強度)の総和}を算出した。これらの結果よりCCR7の発現とEMT、臨床病理学的因子との関連を解析した。

続いて、肝外胆管癌の細胞株を4種類（TFK-1, EGI-1, K KU-100, TYBDC-1）入手し、CCR7の発現とEMTの関連を検討した。RT-PCRにより各細胞株のCCR7の発現を評価し、Western blottingによりEMT関連蛋白の発現とCCL19刺激によるEMT関連蛋白の変化を解析した。また、Wound healing assay、Cell proliferation assay、Migration assay、Invasion

assay において CCL19 刺激による遊走、増殖、浸潤能力の変化を解析した。さらに、Migration assay において抗 CCR7 抗体により CCL19 刺激による浸潤能力の亢進が阻害されるか否かを検討した。

#### 【結果】

肝門部領域胆管癌における CCR7 の H score の中央値は 90 で、Log-rank 検定により術後の全生存日数に最も影響を与えるカットオフ値は 170 であった。CCR7 の高発現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。CCR7 の発現は、臨床病理学的因子との比較では組織学的分化度、脈管侵襲と関連を認め、EMT 関連項目との比較では tumor buds 数と関連を認めた。E-cadherin、vimentin は CCR7 との関連に乏しく、E-cadherin と vimentin のスコアを組み合わせた EMT status を検討すると、E-cadherin 低発現かつ vimentin 高発現の「mesenchymal status」で CCR7 の H score が高い傾向を認めたものの、有意差は認めなかった。

肝外胆管癌の細胞株 TFK-1、EGI-1、KKU-100、TYBDC-1 のうち、TFK-1、KKU-100、TYBDC-1 の 3 種類が CCR7 を発現していた。TFK-1、EGI-1 は E-cadherin を発現し、vimentin は極低発現であり、上皮系細胞の形質を示した。一方、KKU-100 は E-cadherin の発現を欠き、TYBDC-1 は vimentin を高発現していた。CCL19 刺激により TFK-1 では有意な E-cadherin の downregulation と vimentin の upregulation を認めたが、EGI-1、KKU-100、TYBDC-1 では有意な変化を認めなかった。Wound healing assay、Migration assay、Invasion assay においても同様に CCL19 刺激により TFK-1 の遊走、浸潤能力が有意に亢進したが、EGI-1、KKU-100、TYBDC-1 では有意な変化を認めなかった。KKU-100 は Migration assay よりも Invasion assay における遊走細胞が多かった。Cell proliferation assay においてはいずれの細胞株も増殖能力の変化を示さなかった。Migration assay において TFK-1 を抗 CCR7 抗体で前処置することにより、CCL19 刺激による浸潤能力の亢進が阻害された。

#### 【考察】

肝門部領域胆管癌の臨床病理学的検討において CCR7 の高発現は独立した予後不良因子の一つであり、組織学的分化度、脈管侵襲と関連することを明らかにした。また、CCR7 の高発現は EMT の形態学的表現型である tumor buds 数と関連したが、E-cadherin、vimentin との関連に乏しく、明

らかな EMT との関連は認めなかった。胆管癌細胞株を用いた実験においては、TFK-1 では CCL19 の刺激により E-cadherin の downregulation、vimentin の upregulation、遊走、浸潤能力の亢進を認め、EMT 様の変化が示された。ただし、CCR7 を高発現した KKU-100 を含むその他の細胞株では CCL19 の刺激による変化を認めず、CCR7 の発現と EMT の明らかな関連は認めなかった。抗 CCR7 抗体により TFK-1 による遊走能力の亢進が阻害され、CCR7 が治療標的となる可能性が示唆された。また、KKU-100 では migration assay よりも invasion assay で高い浸潤能力を示し、浸潤に関わる機構解明の手掛かりとなる可能性が示された。

#### 【結論】

肝門部領域胆管癌において、CCR7 の高発現は独立した予後不良因子であった。EMT との関連は明らかではないものの、CCR7 が治療標的となる可能性が示唆された。今後は有用な薬物治療の構築を目指して、CCR7 の高発現と予後の関連に介在する因子を探索し、CCR7 に関する分子、微小環境構成因子の検討を行う必要がある。

## 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。

|        |  |
|--------|--|
| AJCC   | American Joint Committee on Cancer               |
| ANOVA  | one-way analysis of variance                     |
| CCL19  | C-C motif chemokine ligand 19                    |
| CCL21  | C-C motif chemokine ligand 21                    |
| CCR7   | C-C motif chemokine receptor 7                   |
| DCC    | distal cholangiocarcinoma                        |
| EHCC   | extrahepatic cholangiocarcinoma                  |
| EMT    | epithelial-mesenchymal transition                |
| FBS    | fetal bovine serum                               |
| FGFR2  | fibroblast growth factor receptors 2             |
| HE     | hematoxylin and eosin                            |
| IHC    | immunohistochemical                              |
| ITBCC  | International Tumor Budding Consensus Conference |
| MET    | mesenchymal-epithelial transition                |
| MMP    | matrix metalloproteinases                        |
| OS     | overall survival                                 |
| PBMC   | peripheral blood mononuclear cell                |
| PBS    | phosphate-buffered saline                        |
| PHCC   | perihilar cholangiocarcinoma                     |
| RT-PCR | reverse transcription polymerase chain reaction  |
| TMA    | tissue micro array                               |
| WST-8  | water soluble tetrazolium salts                  |

## 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; van der Gaag et al., 2012; Nagino et al., 2013)。EHCC は解剖学的に肝門部領域胆管癌 (perihilar cholangiocarcinoma : 以下、PHCC と略記) と遠位胆管癌 (distal cholangiocarcinoma : 以下、DCC と略記) に分類され、PHCC は肝門部胆管の第 2 次分枝から胆嚢管合流部までの胆管に発生する癌、DCC は胆嚢管合流部から十二指腸乳頭部までの胆管に発生する癌と定義されている (Amin MB et al., 2016)。

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 PHCC に対しては肝外胆管・尾状葉切除を伴う肝葉切除術、DCC に対しては膵頭十二指腸切除術であり、いずれも極めて侵襲の大きな術式である。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はあり、PHCC の報告 (Nagino et al., 2013) では 2000 年以前は術後肝不全が術後 80% 程度で認められていたが、2006-2010 年には約 40% 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、依然として他臓器癌の手術と比較して危険性が高い。また、胆管癌の手術には解剖学的な切離限界線や残肝機能による切除範囲の制約があるため、今後も術式の工夫による予後の改善は期待し難く、薬物治療の発展が担う役割は大きい。

EHCC では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)。完全切除された遠隔転移のない PHCC の 5 年生存率はリンパ節転移陰性例で 67.1% であったのに対し、リンパ節転移陽性例では 22.1% であった (Nagino et al., 2013)。また、遠隔転移は認めないものの非完全切除 (R1-2) となった症例の 5 年生存率は 18.0% であり、リンパ節転移陽性は腫瘍遺残に匹敵する予後不良因子とみなし得る。また DCC においても、リンパ節転移陽性例は予後不良であり、転移リンパ節個数が多くなるほど予後不良であったと報告されている (Kiriya et al., 2015)。従って、高齢者や performance status が不良な症例では、所属リンパ節転移が陽性であれば手術の回避が望ましい場合もあり、有効な集学的治療の実現が望まれる。

術後補助化学療法に関して、2019 年に海外で capecitabine を用いた胆道癌術後補助療法の randomized control study (BILCAP trial) の有効性が報告

された (Primrose et al., 2019)。同試験では全生存期間 (overall survival : 以下、OS と略記) の中央値が切除単独群で 36.4 カ月であったのに対し capecitabine 群では 51.1 カ月と予後の延長が認められたものの、優越性は示されていない。本邦では 2022 年から日本臨床腫瘍研究グループによる JCOG 1202 試験の結果により TS-1 による術後補助療法が開始されたが、3 年生存率は切除単独群が 67.6% であったのに対し、TS-1 投与群が 77.1% と満足できる成績ではない (Nakachi et al., 2023)。切除不能胆道癌に対する化学療法については、gemcitabine と cisplatin の併用療法の gemcitabine 単独療法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。ただし、gemcitabine と cisplatin の併用療法群においても OS の中央値は、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限定的と言わざるを得ない。近年、有効な薬物治療開発のために胆道癌の遺伝子解析が行われ、新規の治療標的となる可能性を含む遺伝子変化のスペクトラムが明らかにされた (Nakamura et al., 2015)。それに伴って遺伝子異常に基づく分子標的治療薬の開発が進み、線維芽細胞増殖因子受容体 2 (fibroblast growth factor receptors 2 : 以下、FGFR2 と略記) 融合遺伝子を有する胆管癌患者における二次以降の治療として、FGFR 阻害剤の有効性を示す 2 つの第 II 相臨床試験 FIGHT-202 trial (Ghassan et al., 2020)、FOENIX-CCA2 trial (Lipika Goyal et al., 2023) の結果が報告されている。FIGHT-202 trial では pemigatinib の奏効率が 35.5%、奏功期間中央値が 7.5 カ月、追跡期間中央値 17.8 カ月の時点で OS の中央値が 21.06 カ月であり、FOENIX-CCA2 trial では futibatinib の全奏効率が 42%、奏功期間中央値が 9.7 カ月、追跡期間中央値 17.1 カ月の時点で OS の中央値が 21.7 カ月と、各々良好な治療成績が示された。また、gemcitabine と cisplatin に加えて免疫チェックポイント阻害剤を併用する有効性が報告されている。TOPAZ-1 trial では durvalumab 併用群とプラセボ併用群の OS の中央値が各々 12.8 カ月、11.5 カ月で durvalumab 併用の優越性が示され (Do-Youn et al., 2022)、KEYNOTE-966 trial では pembrolizumab 併用群とプラセボ併用群の OS の中央値が各々 12.7 カ月、10.9 カ月で pembrolizumab 併用の優越性が示された (Robin Kate Kelley et al., 2023)。しかしながら依然として他癌種の薬物治療の成績に比肩するとは言えず、癌の浸潤、転移形成の分子生物学的メカニズムの研究、新たな治療標的の探索が求められている。

所属教室では以前より EHCC における上皮間葉転換 (epithelial-

mesenchymal transition : 以下、EMT と略記) と予後との関係を臨床病理学的な観点から研究してきた (Nitta et al., 2014; Ogino et al., 2019)。そこで今回は、EMT プロセスの制御による新たな薬物治療の開発を目指すため、EHCC が EMT を起こすメカニズムの一端を考察する研究を想起した。近年、腫瘍における報告が急増しているケモカインは、細胞遊走活性を制御し、腫瘍の浸潤・転移に関与すると考えられている。また、ケモカインは EMT 誘導因子の一つとしても注目されており、EHCC におけるケモカイン、EMT、臨床病理学的因子、予後との関連を検討し、薬物治療の新たな標的を探索する研究を行った。

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や細胞間接着を失い、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を指す (Thiery and Sleeman, 2006; Thiery et al., 2009)。一方、間葉上皮転換 (mesenchymal-epithelial transition : 以下、MET と略記) 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を指す。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、MET は尿細管上皮の形成過程などにおいて観察され、正常な個体発生における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 (Thiery and Sleeman, 2006; Thiery et al., 2009)。正常の発生過程においては、生理的形態変化の完了後、EMT、MET は収束し、組織構築が維持される。しかしながら、癌においては腫瘍微小環境におけるさまざまなサイトカインやシグナル亢進のため EMT および MET が誘導され、浸潤や転移へ至ると考えられている (図 1A)。原発巣で増殖した癌細胞は EMT により細胞間接着を失って遊走、浸潤能力を獲得し、間質浸潤、脈管侵襲を経て血管、リンパ管へ侵入し、到達した臓器で MET により間葉系形質から上皮系形質へ再転換することで、転移巣を形成する (Thiery, 2002; Brabletz et al., 2005; Thiery and Sleeman, 2006; Polyak and Weinberg, 2009; Thiery et al., 2009) (図 1B)。

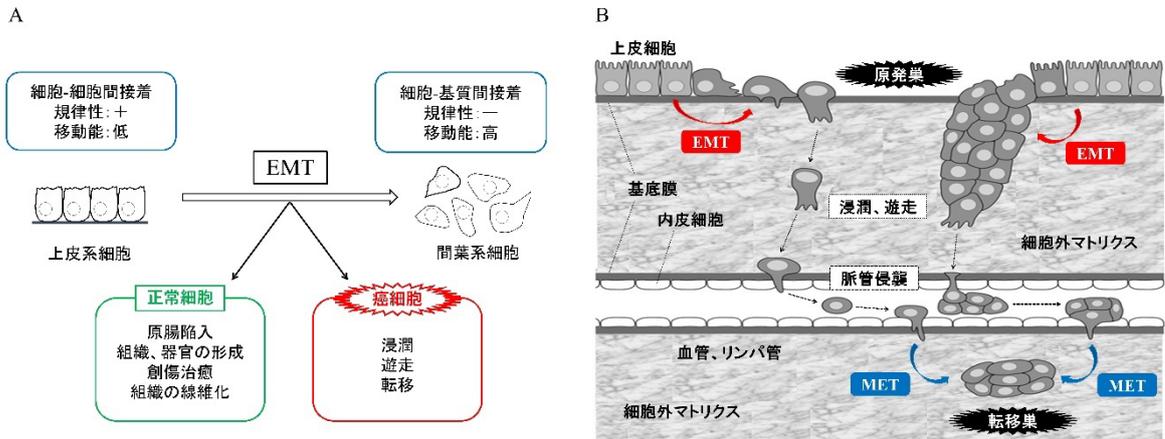


図 1. 正常細胞、癌細胞における EMT

- (A) 生理的には、胎生期の臓器形成と移動や、創傷治癒、組織の線維化に関わり、癌細胞においては浸潤、遊走、転移に関わる。
- (B) 癌細胞は、EMT により浸潤、遊走能力を獲得し、血管やリンパ管を経て他臓器へ到達し、MET により転移巣を形成すると考えられている。
- (Saito et al., 2017, 図 1 より引用し、一部改変した。)

EMT において E-cadherin の発現低下は不可欠なイベントである。E-cadherin は上皮の完全性維持に寄与する細胞接着に必須の膜貫通タンパク質であり、EMT 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なる (Thiery, 2002; Gupta et al., 2003; Thiery and Sleeman, 2006; Thiery et al., 2009; Tian et al., 2011)。E-cadherin の発現は EMT 関連転写因子である Zinc finger 型転写因子の Snail、Slug、ZEB1、ZEB2 や、bHLH (basic helix-loop-helix) 型転写因子の Twist などにより制御される (Thiery, 2002; Hugo et al., 2007; Thiery et al., 2009) (図 2)。EMT 関連転写因子は E-Cadherin 遺伝子の転写抑制に加え、マトリクスメタロプロテアーゼ (Matrix metalloproteinases : 以下、MMP と略記) の発現を誘導する。MMP は E-Cadherin を分解し、E-Cadherin の裏打ちタンパク質である  $\beta$ -Catenin を解放する。この  $\beta$ -Catenin が古典的 Wnt 経路の下流因子として核へ移行し、転写因子 TCF / LEF と結合することで、EMT エフェクターの転写を活性化する (Onder et al., 2008; Heuberger and Birchmeier, 2010; Scheel et al., 2011; Tian et al., 2011)。EMT により間葉系の細胞接着分子である N-cadherin、細胞骨格タンパク質である vimentin、細胞外マトリクス分子である fibronectin などの発現増加が認められ、代表的な間葉系マーカーとなる (Thiery, 2002; Shintani et al., 2006; Thiery and Sleeman, 2006; Thiery et al., 2009) (図 2)。

様々なサイトカインや増殖因子が対応する受容体に結合して上記の EMT 関連転写因子を活性化し、EMT を誘導する (Thiery et al., 2009; Sato et al., 2010)。近年、その EMT 誘導因子の一つとしてケモカインが注目されている。

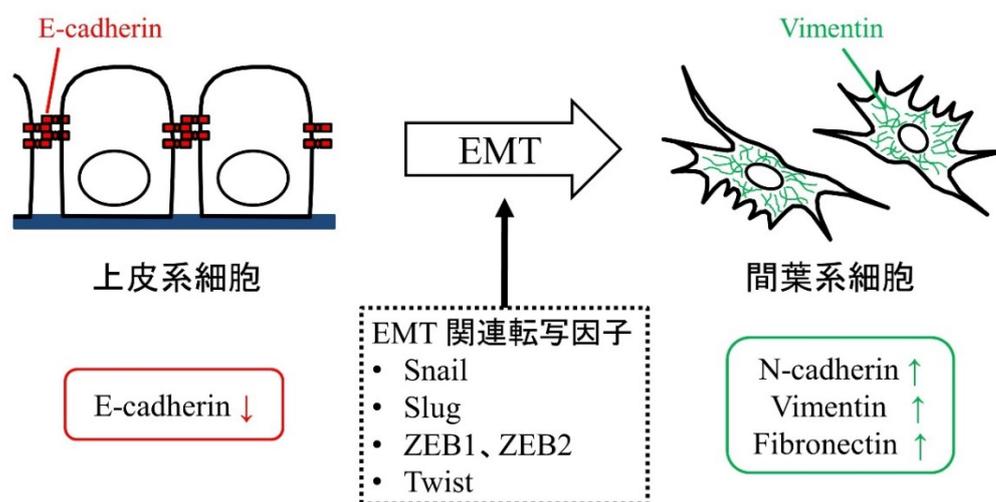
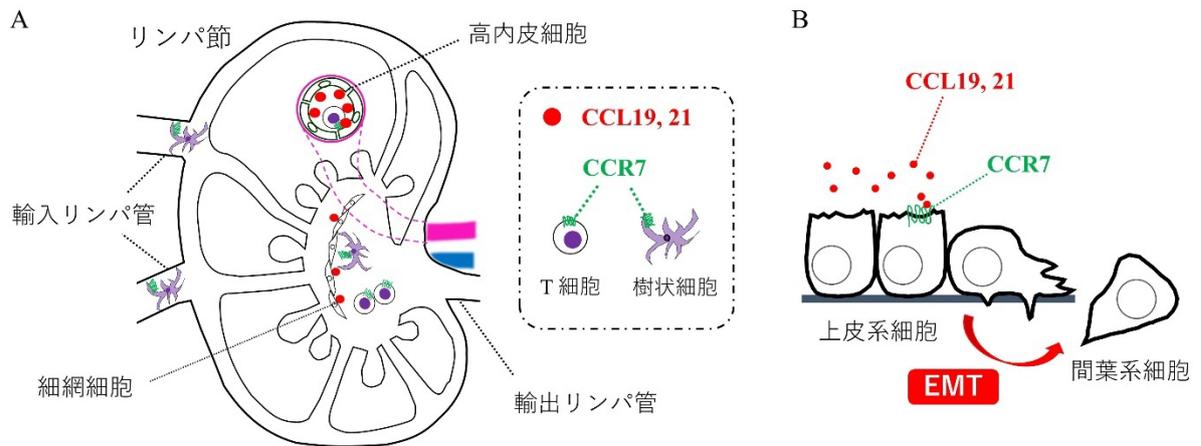


図 2. EMT 関連転写因子と EMT マーカー

EMT に伴い上皮細胞の接着結合を構成する E-cadherin は発現が抑制され、間葉系の細胞接着分子である N-cadherin、細胞骨格タンパク質である vimentin、細胞外マトリクス分子である fibronectin の発現が亢進する。E-cadherin の発現は Snail、Slug、ZEB1、ZEB2、Twist などにより制御される。

ケモカインとは、走化性を意味する chemotactic とサイトカインを組み合わせた造語で、名前の通り細胞遊走活性を主機能とするサイトカインの一群である。ケモカインは対応する G タンパク質共役型受容体に結合する低分子可溶性タンパク質で、免疫細胞の動員やリンパ組織の形成など生体における様々な細胞の組織内移動や局在を制御している (Campbell and Butcher, 2000)。これまでに 50 種類程度のケモカインと 20 種類程度のケモカインレセプターが同定されている。本研究では、肝外胆管癌がリンパ節に転移しやすいこと、リンパ節へ転移した症例では極めて予後が不良であることを考慮して、リンパ球のホーミングに関連する CC 型ケモカインレセプター 7 (C-C motif chemokine receptor 7: 以下 CCR7 と略記) に注目した。CCR7 は生理的には主に T 細胞や樹状細胞などで発現しており、そのリガンドは CC 型ケモカインリガンド 19 (C-C motif chemokine ligand 19: 以下 CCL19 と略記)、CC 型ケモカインリガンド 21 (C-C motif

chemokine ligand 21 : 以下 CCL21 と略記) である (Willmann et al., 1998; Ott et al., 2004)。CCL19, 21 はリンパ節などの 2 次リンパ組織の高内皮細胞がよく提示するため、T 細胞や樹状細胞などは再循環の過程で 2 次リンパ組織に効率よくホーミングする (Dieu et al., 1998; Hirao et al., 2000) (図 3A)。また、CCR7 は樹状細胞において MAPK 経路を介して走化性を制御する (Jose et al., 2020)。2001 年に乳癌において CCR7 の発現が報告 (Muller et al., 2001) されて以来、様々な癌種で CCR7 の発現が報告され、腫瘍細胞の増殖 (Xu et al., 2011)、浸潤 (Mo et al., 2015)、血管新生 (Zhao et al., 2011)、および転移 (Liu et al., 2014) に寄与することが明らかにされた。さらに CCR7 は膀胱癌において ERK および PI3K/AKT シグナル経路を介して Twist 発現を亢進させ (Li et al., 2016)、胃癌においては snail 発現を介して EMT を誘発 (Zhang et al., 2015) することが示された (図 3B)。腫瘍における CCR7 の発現は、肺癌においては低酸素状態による HIF-1 $\alpha$  および HIF-2 $\alpha$ 、ERK1/2 経路を介して誘導 (Li et al. 2009) されること、大腸癌においては多くの癌種で過剰発現する cyclooxygenase-2 と membrane-associated PGE synthase 1 が prostaglandin E2 を産生し、AKT/glycogen synthase kinase 3 $\beta$  シグナル伝達経路を介して CCR7 の発現を誘導することが示されている (Yu et al., 2015)。また、CCR7 の高発現が予後不良因子となることが、胃癌 (Ma et al., 2015)、食道扁平上皮癌 (Irinio et al., 2014)、膀胱癌 (Nakata et al., 2008)、膀胱癌 (Xiong et al., 2017)、腎細胞癌 (Xia et al., 2017) で示された。従って、CCR7 の過剰発現は癌の進行や転移に重要であると考えられているが、これまで PHCC における報告はない。



**図 3. CCR7 / CCL19, 21 の作用**

(A) 生理的環境では、主に T 細胞や樹状細胞のリンパ節へのホーミングに関わる。

(Brandum et al., 2021, 図 2 より作図した。)

(B) 腫瘍に発現した場合は、EMT を誘導する因子として注目されている。

本研究は、臨床病理学的に PHCC 切除例における CCR7 の発現と予後、EMT との関連を検討した。また、EHCC の細胞株を用いて CCR7 と EMT の関連を検討し、CCR7 が新たな治療の標的となる可能性があることを見出したため、ここに報告する。

## 方法

### 1. 症例

1995年3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門部領域胆管癌181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。全対象症例および末梢血単核細胞（peripheral blood mononuclear cell：以下、PBMCと略記）を分離するために末梢血を採取した健康なボランティアから書面によるインフォームドコンセントを得た。本研究は北海道大学自主臨床研究審査委員会に承認され（No. 018-0137）、同委員会のガイドライン、ヘルシンキ宣言に従って実施した。

表 1. 手術術式

| Type of surgical procedure    | n (%)     | Combined pancreato-duodenectomy<br>n (%)* | Combined portal vein resection<br>n (%)* | Combined hepatic artery resection<br>n (%)* |
|-------------------------------|-----------|---|--|---|
| Right hepatectomy + EBDR      | 78 (43.0) | 18 (23.0)                                 | 49 (62.8)                                | 4 (5.1)                                     |
| Right trisectionectomy + EBDR | 8 (4.4)   | 1 (12.5)                                  | 5 (62.5)                                 | 0 (0)                                       |
| Left hepatectomy + EBDR       | 44 (24.3) | 4 (9.1)                                   | 18 (40.9)                                | 12 (27.3)                                   |
| Left trisectionectomy + EBDR  | 9 (5.0)   | 1 (11.1)                                  | 4 (44.4)                                 | 2 (22.2)                                    |
| Caudal lobectomy + EBDR       | 3 (1.7)   | 2 (66.7)                                  | 0 (0)                                    | 0 (0)                                       |
| Pancreatoduodenectomy + EBDR  | 17 (9.4)  | -   | 1 (5.9)                                  | 2 (11.8)                                    |
| EBDR                          | 22 (12.2) | 0 (0)                                     | 2 (9.1)                                  | 7 (31.8)                                    |

\*Ratio to surgical procedure; EBDR, Extrahepatic bile duct resection.

### 2. 組織標本作成と病理組織学的診断

切除検体は肉眼観察後に10%緩衝ホルマリンで固定し、厚さ3-6mmで切り出しを行って連続標本作製した。連続標本から作製した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、ヘマトキシリンおよびエオシン（hematoxylin and eosin：以下、HEと略記）で染色し、顕微鏡で観察した。病理組織診断は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

CCR7、EMT 関連蛋白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) を作製した。TMA 標本を作製した理由は、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、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を軽減できる点を考慮したからである。一方で、TMA 作製時に採取した腫瘍部が必ずしも腫瘍全体の組織型を反映しているとは限らず、腫瘍全体を俯瞰した heterogeneity の観察には向かないため、本研究では腫瘍の複数の部位から組織を採取し TMA を作製した。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った。

まず HE 染色標本で腫瘍組織 2 カ所と正常胆管上皮 1 カ所を選定し、マーキングを行った。病理専門医の確認のもと、HE 染色標本を再検し、固定の良悪や腫瘍の大きさなどから本研究で使用可能かの判断を行った。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  $\mu\text{m}$  厚の切片に薄切し、スライドガラスを作製した (図 4)。

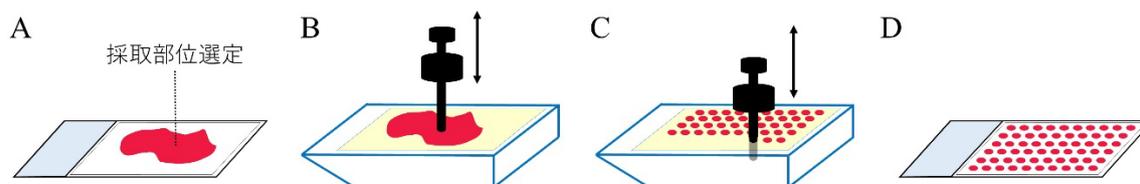


図 4. TMA の作製手順

- (A) 全症例の HE 染色標本を見直して、各症例における代表切片、採取部位を選定した。
- (B) パラフィンブロック上の選定対応部位の組織を直径 2.0 mm の針で採取した。
- (C) 採取した組織断片をアレイブロックに挿入、整列させた。
- (D) 作成したパラフィンブロックを 4  $\mu\text{m}$  の厚さで薄切して標本を作製した。

(Oga et al., 2007, 図 1 より作図した。)

### 4. 免疫組織化学染色

自動免疫染色装置 (BenchMark ULTRA; Roche, Switzerland) を用いて染

色を行った。組織切片はキシレンで脱パラフィン処理を行い、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 ULTRA Cell Conditioning Solution (Cat. 951-224, pH 8.5, Roche) 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。抗 CCR7 マウスモノクローナル一次抗体 (clone P-007, 1:100,000 dilution; NB Health Laboratory, Sapporo, Japan)、抗 E-cadherin マウスモノクローナル一次抗体 (Cat. 790-4497, clone 36, RTU, RRID:AB\_397580; Ventana/Roche)、抗 vimentin マウスモノクローナル一次抗体 (Cat. 790-2917, clone V9, RTU, RRID:AB\_306239; Ventana/Roche) で抗体反応を行い、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た。

## 5. Tumor buds の評価方法

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され (Ueno et al., 2002; Ueno et al., 2004)、EMT により間質細胞の形質を獲得した腫瘍細胞の形態学的表現型と考えられている (Prall, 2007; Karamitopoulou, 2013; Grigore et al., 2016)。また、EHCC においては主要先進部の tumor buds 数が EMT を反映し、腫瘍の浸潤、転移に関連することが明らかにされた (Ogino et al., 2019)。本研究では 181 例の tumor buds 数を計測し、CCR7 発現との関連を評価した。International Tumor Budding Consensus Conference method に従い、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であるいわゆる「hotspots」において 200 倍視野 (0.785 mm<sup>2</sup>) で tumor buds 数を計数した (Lugli et al., 2017) (図 5)。

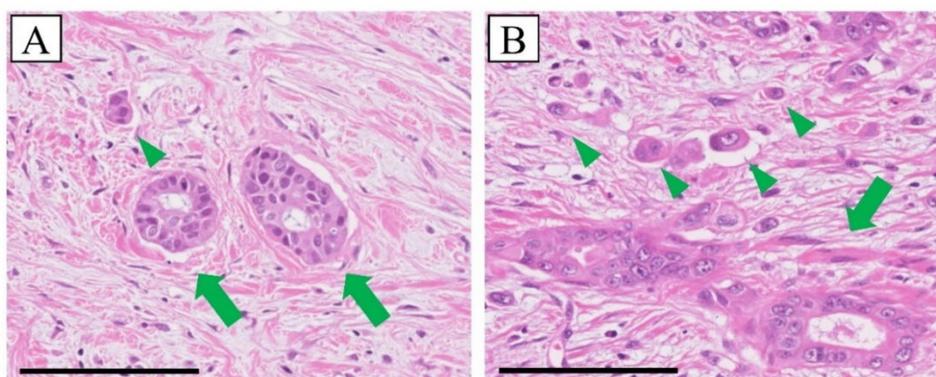


図 5. PHCC における tumor budding の病理組織所見

(A) Low-grade tumor budding、(B) High-grade tumor budding の HE 染色像。

矢印は腫瘍腺管構造を示し、矢頭は tumor buds 細胞を示す。Scale bar, 100  $\mu$ m。

## 6. CCR7、E-cadherin、vimentin 発現の評価方法

CCR7 の発現と EMT および臨床病理学的因子の関係を検討するために免疫組織化学的手法を用いて 181 例の TMA における CCR7、E-cadherin（上皮系マーカー）、vimentin（間葉系マーカー）の発現強度を測定した。免疫染色の評価には H score として報告されている陽性細胞の割合と染色強度の積の総和を用いた (Bacus et al., 1988)。

CCR7 では細胞質や細胞膜に周囲のリンパ球と同程度に染色される部位の染色強度を grade +3 とし、中等度を grade +2、弱陽性を grade +1、陰性を grade 0 として 4 段階で染色強度を評価した。次に、全腫瘍細胞に対する各々の染色強度の腫瘍細胞の割合を算出した。例えば、染色強度 grade 0, +1, +2, +3 の腫瘍細胞の全腫瘍細胞に占める割合が各々 10%, 30%, 35%, 25% である場合、H score は  $(0 \times 10 + 1 \times 30 + 2 \times 35 + 3 \times 25) = 175$  である。

EMT 関連蛋白についても CCR7 と同様に H score を用いて発現を評価した。E-cadherin は tumor buds 構成細胞の細胞膜の染色強度が腺管構造部と同程度に染色される部位の染色強度を grade +2 とし、弱陽性を grade +1、陰性を grade 0 として 3 段階で評価し、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に染色される部位の染色強度を grade +2 とし、弱陽性を grade +1、陰性を grade 0 として 3 段階で評価し、各々 H score を算出した。評価は臨床情報を知らない 2 人の研究者 (M.O., T.M.) が独立して行い、相違は研究者間で合議した。

## 7. EMT status と CCR7 発現の関連の検討

E-cadherin と vimentin の H score の組み合わせに基づき、EMT status を以下のように定義した。

- Epithelial status : E-cadherin 高発現かつ vimentin 低発現  
(E-high/V-low)
- Mesenchymal status : E-cadherin 低発現かつ vimentin 高発現  
(E-low/V-high)
- Intermediate status : 上記以外の状態  
(E-low/V-low or E-high/V-high)

E-cadherin、vimentin のカットオフ値は、各々の H score の中央値に基づき E-cadherin は 70、vimentin は 10 とした。

上記の EMT status と CCR7 の H score の関連を検討した。

## 8. EHCC 細胞株の入手と培養

本研究では、4種類のEHCC細胞株を使用した。TFK-1は理化学研究所バイオリソース研究センター (RIKEN BRC, Tsukuba, Japan)、EGI-1はGerman Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH (DSMZ, Braunschweig, Germany) から入手し、KKU-100およびTYBDC-1は国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンク (NIBIOHN, Ibaraki, Japan) から購入した。

TFK-1、KKU-100、TYBDC-1は各々RPMI-1640 (FUJIFILM Wako, Osaka, Japan)、DMEM (FUJIFILM Wako)、DMEM/Ham's F12 (FUJIFILM Wako) を培地とした。EGI-1は4 mM L-glutamine (FUJIFILM Wako)、2×MEM amino acids (both essential and non-essential) (FUJIFILM Wako) を添加したEMEM (FUJIFILM Wako) で培養した。各培地には10% (v/v) のウシ胎児血清 (fetal bovine serum: 以下、FBSと略記; Biosera, Nuaille, France)、100 U/mL penicillin (FUJIFILM Wako)、100 µg/mL streptomycin (FUJIFILM Wako) を添加した。全細胞株は37°C、5% CO<sub>2</sub>のもと、0.5~2.0×10<sup>6</sup> cells/mLの密度で培養した。

PBMCは、書面によるインフォームドコンセントを得て健康なボランティアから静脈血を採取し、Ficoll (GE Healthcare Limited, Buckinghamshire, UK) を用いた密度勾配遠心分離により分離した。

## 9. RNA抽出および逆転写ポリメラーゼ連鎖反応

各細胞株の*CCR7*のmRNAを逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription polymerase chain reaction: 以下、RT-PCRと略記) を用いて定量した。RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) を用いて各細胞株からtotal RNAを抽出し、NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて核酸量を定量化した。Super Script<sup>TM</sup> III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies, CA, USA) を用いて1.0 µgのRNAからcDNAを合成した。

RT-PCRはGeneTouch Thermal Cycler (Hangzhou Bioer Technology, Zhejiang, China)、酵素はKOD Plus Ver.2 (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いて行った。*CCR7*は94°Cで2分間の初期変性の後、98°Cで10秒間の熱変性、60°Cで30秒間のアニーリング、68°Cで30秒間の伸長を33サイクル行った。*B-actin*は94°Cで2分間の初期変性の後、98°Cで10秒間の熱変

性、68°Cで30秒間のアニーリング、68°Cで30秒間の伸長を25サイクルで行った。プライマーはEurofins Genomics (Tokyo, Japan)で下記の通り合成した。

CCR7 sense : 5' - ACATCGGAGACAACACCACA - 3'

CCR7 antisense : 5' - CATGCCACTGAAGAAGCTCA - 3'

$\beta$ -actin sense : 5' - CAACCGCGAGAAGATGACCC - 3'

$\beta$ -actin antisense : 5' - GGAACCGCTCATTGCCAATGG - 3'

RT-PCR産物はChemiDoc™ XRS Plus System (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA)を用いて臭化エチジウム (0.5  $\mu$ g/mL; NIPPON GENE, Tokyo, Japan)で視覚化した。定量分析は、LightCycler®96 system (NIPPON Genetics, Tokyo, Japan)、TaqMan gene expression assays (CCR7 Assay ID Hs01013469\_m1、ACTB Assay ID Hs01060665\_g1; Applied Biosystems/ThermoFisher Scientific)、酵素はGeneAmp Probe qPCR Mix II (NIPPON GENE)を用いて行った。95°Cで10分間の初期変性の後、95°Cで30秒間の熱変性、60°Cで1分間のアニーリングおよび伸長を45サイクル行った。CCR7 mRNAの発現レベルは、CCR7 mRNAと $\beta$ -actin mRNAの比率を計算した。

## 10. Western blot 解析

各細胞株を100 mmの細胞培養用ディッシュに $1.0 \times 10^6$  cellsの細胞数で播種して48時間培養した。その際、リガンド刺激を行う細胞株は100 ng/mL CCL19 (Cat. 582104, Lot. B269188; BioLegend, San Diego, CA, USA)とともに培養した。採取した細胞を50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl, 1% (v/v) Nonidet P-40 alternative、0.1% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS)、0.5% (w/v) sodium deoxycholate、protease inhibitor cocktail (Promega, Madison, WI, USA)で懸濁し、超音波処理で細胞を破碎した。遠心分離により総タンパク質を抽出し、TaKaRa BCA protein assay kit (Takara Bio, Kusatsu, Japan)を用いてタンパク濃度を定量した。1 wellあたり20  $\mu$ gのタンパク量でロードした細胞溶解液を、7.5% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)で分離し、polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Immobilon-P Transfer Membrane; Merck Millipore, Darmstadt, Germany)へ転写した。メンブレンはTween 20 (TBS-T)を含むTris-buffered saline (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8.0)で溶解した5% (w/v) スキムミルクでブロッキングした。

E-cadherin rabbit polyclonal antibody (Cat. 20874-1-AP, 1:10,000 dilution;

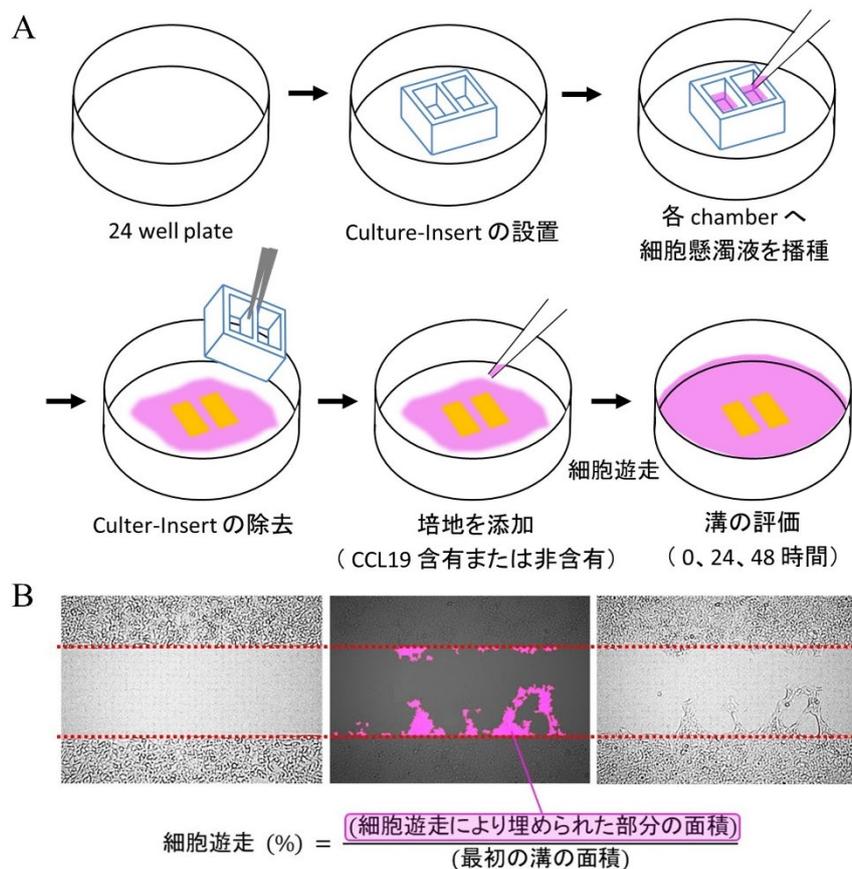
Proteintech Group, Chicago, IL, USA)、および vimentin rabbit polyclonal antibody (Cat. 10355-1-AP, 1:2000 dilution; Proteintech Group) を用いて 25 °C、90 分で一次抗体反応を行い、TBS-T で洗浄後、anti-rabbit IgG antibodies conjugated to horseradish peroxidase (1:10,000 dilution; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) を用いて 25 °C、60 分で二次抗体反応を行った。β-actin に関しては、anti-β-actin IgG antibodies conjugated to horseradish peroxidase (Cat. 122625, Lot. 2, 1:10,000 dilution; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を用いて 25 °C、60 分で抗体反応を行った。

Amersham ECL Prime western blotting Detection Reagent (GE Healthcare Limited, Buckinghamshire, UK) と反応操作後、chemiluminescent detection system (ChemiDoc™ XRS Plus System; Bio-Rad Laboratories) でタンパク質のバンドを検出した。その後、メンブレンを western blotting stripping buffer (TaKaRa Bio) でストリッピングし、洗浄して上記の抗体で再度反応させた。半定量分析は、Image Lab™ 5.1 (Bio-Rad Laboratories) を用いて行った。B-Actin を内在性ローディングコントロールとして使用した。実験は 3 回行った。

## 11. Wound healing assay

2 つの 70 μL well を備えたシリコン製の仕切りとなる Culture-Insert 2 well (Ibidi, Grafelfing, Germany) を 24 well プレーットの底に設置し、各チャンバーで  $3.5 \times 10^4$  cells の細胞を、37°C、5% CO<sub>2</sub>、24 時間で培養した。その後、Culture-Insert を取り除き、リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate-buffered saline : 以下、PBS と略記) で 2 回洗浄した後、100 ng/mL CCL19 を含むか、または含まない 500 μL の無血清培地で培養した (図 6A)。0、24、48 時間後に、high-resolution imaging and analysis system BZ-9000 (KEYENCE, Osaka, Japan) を用いて細胞遊走による溝の面積の変化を測定し、顕微鏡写真を記録した。細胞遊走の程度は下記の式で計算した (図 6B)。実験は 3 回行った。

$$\text{細胞遊走 (\%)} = \frac{\text{(遊走した細胞の占める面積)}}{\text{(最初の溝の面積)}}$$



## 図 6. Wound healing assay

(A) Culture-Insert を利用した溝の形成。製品情報シートより作図した。

(B) 細胞遊走により溝が埋められた部分の面積を計測し、細胞遊走の程度を評価した。

## 12. Cell proliferation assay

細胞を 96 well プレートに 2000 cells/well の密度で播種し、100 ng/mL CCL19 を含む培地、または含まない培地で、37°C、5% CO<sub>2</sub> で、0 時間、24 時間および 48 時間で培養した後、one-step Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を用いて細胞数を評価した。CCK-8 は細胞外の水溶性テトラゾリウム塩 (water soluble tetrazolium salts : 以下、WST-8 と略記) が生細胞内の乳酸脱水素酵素の補酵素である NADH から電子を受け取って還元され、吸収波長が 450 nm の WST-8 formazan を生成する呈色反応を利用した高感度の生細胞数測定キットである。培養後、10 μL の CCK-8 溶液を 96 well プレートの各 well に添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> で、3 時間培養した後、SpectraMax 190 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) を用いて 450 nm および 650 nm の吸光度を計測した (図 7)。実

験は3回行った。

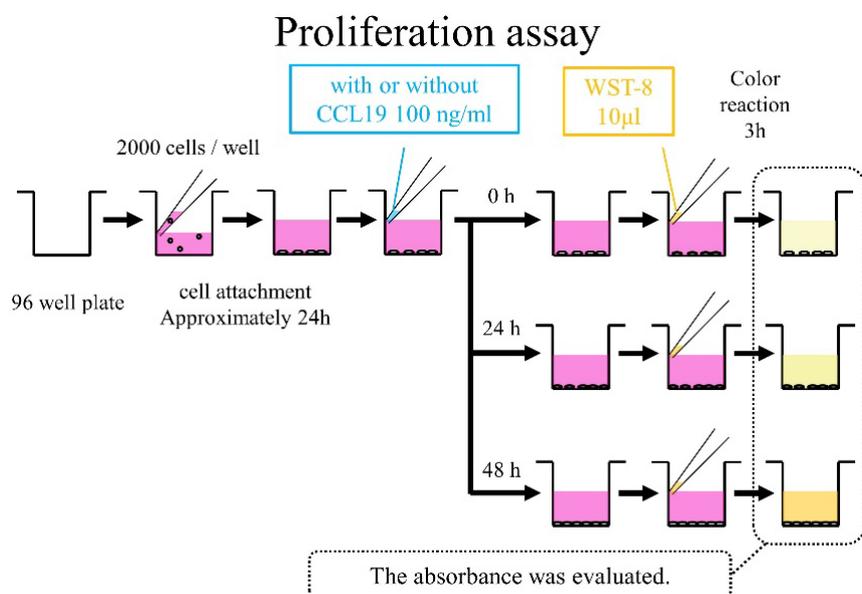


図 7. Cell proliferation assay

Wound healing assay と同じ条件で cell proliferation assay を行った。WST-8 の呈色反応を用いて生細胞数を測定し、細胞増殖の程度を評価した。

### 13. Migration assay と invasion assay (図 8A)

Migration assay は 8 µm の小孔が開いたポリカーボネート製のメンブレンインサートである Transwell® inserts (6.5 mm diameter, 8 µm pores; Corning, NY, USA) を、invasion assay では上記メンブレンをマトリゲルでコーティングした Matrigel® invasion chambers (6.4 mm diameter, 8 µm pores; Corning) を使用し、遊走細胞、浸潤細胞を検出した。100 ng/mL CCL19を含むか、または含まない 1% FBS を添加した培地でそれぞれの細胞株を懸濁し、細胞懸濁液 200 µL を上部チャンバーへ播種した。Migration assay では、TFK-1 は  $5.0 \times 10^4$  個、EGI-1 と KKU-100 は  $1.0 \times 10^4$  個、TYBDC-1 は  $1.0 \times 10^5$  個の細胞を播種した。また、invasion assay では TFK-1 と TYBDC-1 は  $1.0 \times 10^5$  個、EGI-1 と KKU-100 は  $1.0 \times 10^4$  個の細胞を播種した。10% FBS を添加した 500 µL の培地を下部チャンバーに入れた。

Migration assay における中和抗体を用いた実験の際は、15 µg/mL のヒト抗 CCR7 抗体 (Cat. MAB197, Lot. FNP1118121, clone 150503; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) またはアイソタイプコントロールとしてのマウスモノクローナル IgG (Cat. MAB003, Lot. MV0919011, clone 20102; R&D Systems) とともに、播種する細胞を 37°C、5% CO<sub>2</sub> で、6 時間前培

養した (図 8B)。上記の条件で、37°C、5% CO<sub>2</sub> で、48 時間前培養した後、メンブレン上面の非遊走細胞を綿棒で取り除いた。メンブレンの下面へ浸潤した細胞を Diff-Quik stain (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) で染色し、顕微鏡写真を撮影した (図 8A)。腫瘍細胞が浸潤した面積を high-resolution imaging and analysis system BZ-9000 (KEYENCE) で評価した。各実験は 3 回行った。

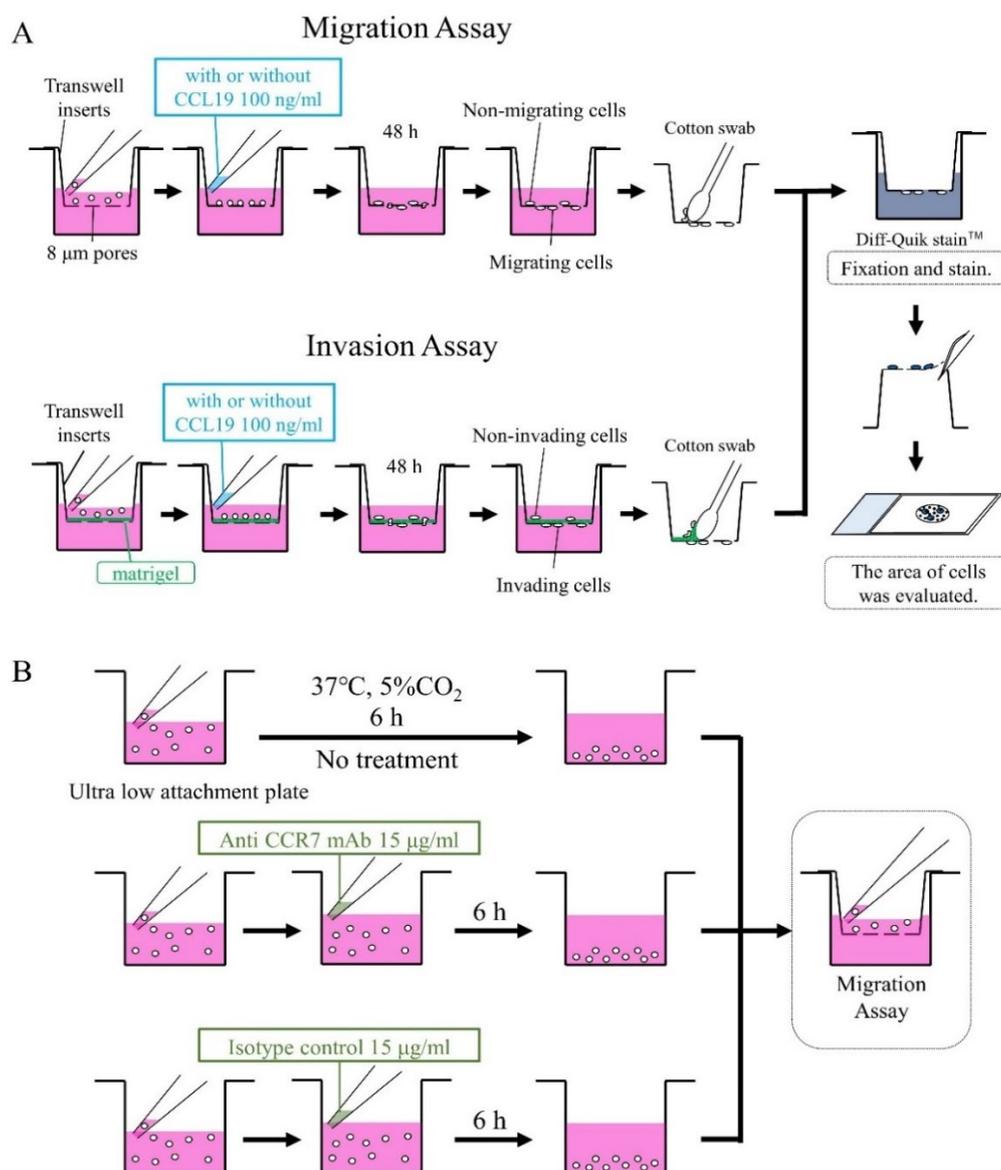


図 8. Migration assay と invasion assay

(A) Invasion assay では、migration assay で使用したメンブレンをマトリゲルでコーティングした製品を使用した。

(B) 抗 CCR7 抗体とアイソタイプコントロールで前処理した細胞株を用いて migration assay を行った。

#### 14. 統計学的解析

質的変数は  $\chi^2$  検定で解析した。パラメトリックな量的変数は一元配置分散分析 (one-way analysis of variance : 以下、ANOVA と略記) で二群以上の群間比較を行い、多群間の比較は分散分析後に post-hoc pairwise t-test を行った。ノンパラメトリックな量的変数は Kruskal-Wallis test で二群以上の群間比較を行い、各群毎の比較は Wilcoxon rank sum test を行った。CCR7、E-cadherin、vimentin の H score と tumor buds 数の関連はスピアマンの順位法で評価した。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 法を用いて、log-rank test により比較した。再帰分割分析法を用いて、OS を最もよく層別化する CCR7 の H score のカットオフ値を決定した (Lee et al., 2006)。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  $p < 0.05$ 、信頼区間は 95% に設定した。統計解析は Windows 用の JMP software (version 14.0; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) を用いた。

## 結果

### 1. CCR7、E-cadherin、vimentin の発現と H score のカットオフ値

IHC 標本において CCR7 は PHCC の細胞質および細胞膜で染色された (図 9A-D)。腫瘍腺管と tumor buds の染色態度に一定の傾向は認めなかった。上皮系マーカーとなる E-cadherin は腫瘍腺管の細胞膜で染色され、tumor buds 細胞の細胞膜では染色強度に差異を認めた (図 9E-G)。一方、間葉系マーカーとなる vimentin は腫瘍腺管では染色されなかったが、tumor buds 細胞では染色される細胞を認めた (図 9H-J)。

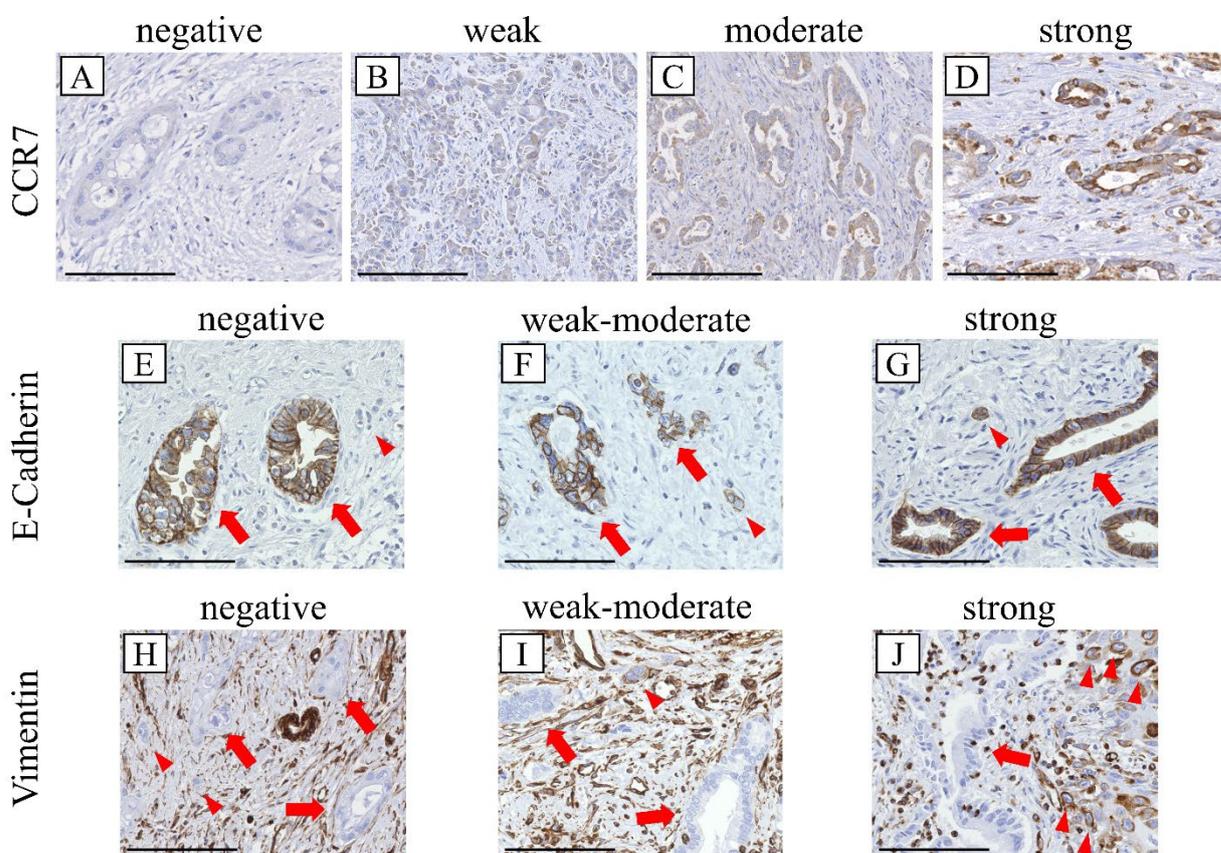


図 9. CCR7、E-cadherin、vimentin の染色強度の代表的組織所見

(A-D) CCR7 : (A) grade 0, (B) grade +1, (C) grade +2, (D) grade +3。

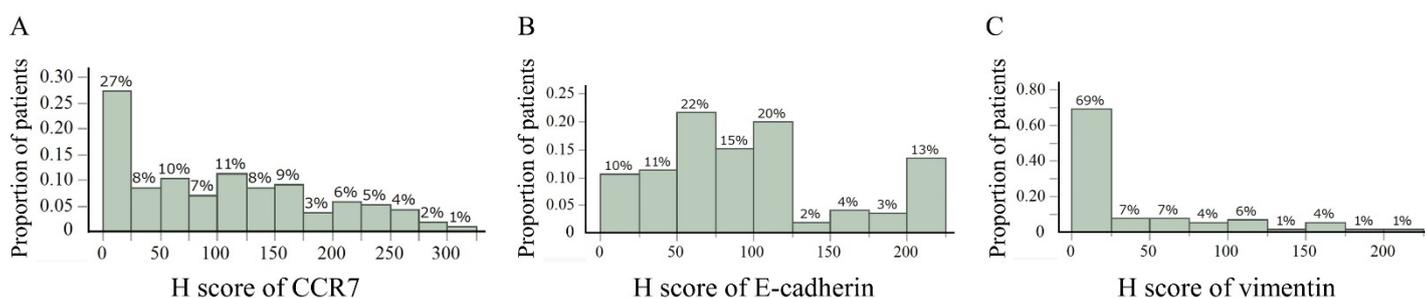
(E-G) E-cadherin : (E) grade 0, (F) grade +1, (G) grade +2。

(H- J) vimentin : (H) grade 0, (I) grade +1, (J) grade +2。

矢印は腫瘍腺管、矢頭は tumor buds 細胞を示す。Scale bar は 100  $\mu$ m を示す。

CCR7、E-cadherin、vimentin の H score の中央値 (範囲) は、各々 90 (0 - 300)、80 (0 - 200)、0 (0 - 200) であった。CCR7 の H score のヒストグ

ラムを図 10 に示す。CCR7 の H score は再帰分割分析法により生存解析 log-rank test の統計量  $\chi^2$  値が有意かつ最大となる 170 をカットオフ値とし (Lee et al., 2006)、CCR7 の発現を low-grade (H score : 0-169)、high-grade (H score : 170-300) の二群に分類した。E-cadherin、vimentin の H score のカットオフ値は、中央値に基づいて各々 70、10 と定義し、E-cadherin の発現を low-grade (H score : 0-69)、high-grade (H score : 70-200)、vimentin の発現を low-grade (H score : 0-9)、high-grade (H



score : 10-200) の二群に分類した。

図 10. CCR7、E-cadherin、vimentin の H score による患者分布のヒストグラム  
(A) CCR7、(B) E-cadherin、(C) vimentin。

## 2. CCR7 発現強度と臨床病理学的因子の比較

CCR7 の高発現は組織学的な低分化 ( $p = 0.003$ ;  $\chi^2$  検定) および顕微鏡的静脈侵襲 ( $p = 0.036$ ;  $\chi^2$  検定) と関連していた (表 2)。

表 2. CCR7 と臨床病理学的因子の比較 (181 例)

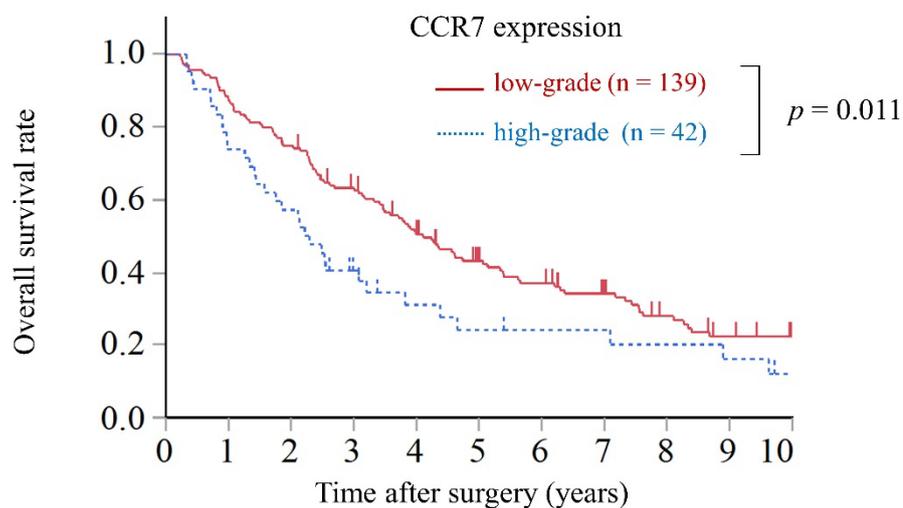
| clinicopathological feature           | CCR7 expression grades |     |                   |     | P - value    |              |
|---------------------------------------|------------------------|-----|-------------------|-----|--------------|--------------|
|                                       | Low-grade (n=139)      |     | High-grade (n=42) |     |              |              |
|                                       | n                      | (%) | n                 | (%) |              |              |
| Age                                   | < 70                   | 66  | (47.5)            | 27  | (64.3)       | 0.055        |
|                                       | ≥70                    | 73  | (52.5)            | 15  | (35.7)       |              |
| Sex                                   | Male                   | 108 | (77.7)            | 35  | (83.3)       | 0.423        |
|                                       | Female                 | 31  | (22.3)            | 7   | (16.7)       |              |
| Histological grade                    | G1                     | 45  | (32.4)            | 4   | (9.5)        | <b>0.003</b> |
|                                       | G2                     | 68  | (48.9)            | 23  | (54.8)       |              |
|                                       | G3                     | 26  | (18.7)            | 15  | (35.7)       |              |
| pT classification (AJCC, 8th edition) | T1                     | 3   | (2.2)             | 2   | (4.8)        | 0.242        |
|                                       | T2                     | 94  | (67.6)            | 23  | (54.8)       |              |
|                                       | T3                     | 25  | (18.0)            | 7   | (16.7)       |              |
|                                       | T4                     | 17  | (12.2)            | 10  | (23.8)       |              |
| pN classification (AJCC, 8th edition) | N0                     | 75  | (54.0)            | 24  | (57.1)       | 0.674        |
|                                       | N1                     | 55  | (39.6)            | 14  | (33.3)       |              |
|                                       | N2                     | 9   | (6.5)             | 4   | (9.5)        |              |
| pM classification (AJCC, 8th edition) | M0                     | 137 | (98.6)            | 41  | (97.6)       | 0.688        |
|                                       | M1                     | 2   | (1.4)             | 1   | (2.4)        |              |
| Microscopic lymphatic invasion        | Absent                 | 66  | (47.5)            | 18  | (42.9)       | 0.598        |
|                                       | Present                | 73  | (52.5)            | 24  | (57.1)       |              |
| Microscopic venous invasion           | Absent                 | 61  | (43.9)            | 11  | (26.2)       | <b>0.036</b> |
|                                       | Present                | 78  | (56.1)            | 31  | (73.8)       |              |
| Microscopic perineural invasion       | Absent                 | 11  | (7.9)             | 6   | (14.3)       | 0.235        |
|                                       | Present                | 128 | (92.1)            | 36  | (85.7)       |              |
| Invasive carcinoma at resected margin | Negative               | 124 | (89.2)            | 34  | (81.0)       | 0.176        |
|                                       | Positive               | 15  | (10.8)            | 8   | (19.1)       |              |
| Median survival time (years)          | 3.9                    |     | 2.3               |     | <b>0.018</b> |              |

G1, well differentiated; G2, moderately differentiated; G3, poorly differentiated (according to the AJCC 8th edition). Low-grade, H-score of CCR7 staining 0–169; high-grade, H-score of CCR7 staining ≥170.

### 3. CCR7 発現強度、臨床病理学的因子と全生存率 (OS) の比較

術後経過観察期間の中央値 (範囲) は、40 (3-231) ヲ月であった。CCR7 高発現群は有意に OS が低値であった ( $p = 0.011$ ; 図 11)。Log-rank 検定による単変量解析では CCR7 発現以外の臨床病理学的因子として AJCC の T 分類 ( $p = 0.001$ )、N 分類 ( $p < 0.001$ )、M 分類 ( $p = 0.011$ )、顕微鏡的静脈侵

襲 ( $p = 0.009$ )、切除断端における癌遺残 ( $p < 0.001$ ) が OS と関連していた (表 3)。それらの項目で、Cox 比例ハザードモデルによる多変量解析を行うと、AJCC の T 分類 ( $p = 0.026$ )、N 分類 ( $p < 0.001$ )、CCR7 高発現 ( $p = 0.017$ ) が独立した予後不良因子として選択された (表 3)。



| No. at risk | 0   | 1   | 2   | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 |
|-------------|-----|-----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| low-grade   | 139 | 122 | 104 | 85 | 66 | 50 | 42 | 34 | 25 | 18 | 14 |
| high-grade  | 42  | 31  | 24  | 14 | 9  | 7  | 7  | 6  | 5  | 4  | 2  |

図 11. CCR7 の H score による全生存曲線の比較

CCR7 の高発現群と低発現群の全生存期間を Kaplan-Meier 法を用いて解析し、log-rank test により比較した。

表 3. 全生存率に関する予後規定因子の検討 (181 例)

| Variable   | No. of patients |            | Univariate               |         | Multivariate           |                 |
|--|-----------------|------------|--------------------------|---------|------------------------|-----------------|
|  | n               | (%)        | Median survival (months) | P-value | Relative risk (95% CI) | P-value         |
| Age (years)  | < 70            | 93 (51.4)  | 46                       | 0.491   |                        |                 |
|  | ≥70             | 88 (48.6)  | 44                       |         |                        |                 |
| Sex  | Male            | 143 (79.0) | 46                       | 0.529   |                        |                 |
|  | Female          | 38 (21.0)  | 44                       |         |                        |                 |
| Histological grade                                   | G1              | 49 (27.1)  | 56                       | 0.221   |                        |                 |
|  | G2              | 91 (50.3)  | 43                       |         |                        |                 |
|  | G3              | 41 (22.7)  | 28                       |         |                        |                 |
| pT classification<br>(AJCC, 8 <sup>th</sup> edition) | T1              | 5 (2.8)    | 53                       | 0.001   | 1                      | <b>0.026</b>    |
|  | T2              | 117 (64.6) | 53                       |         | 1.07 (0.39 - 4.45)     |                 |
|  | T3              | 32 (17.7)  | 30                       |         | 1.70 (0.56 - 7.36)     |                 |
|  | T4              | 27 (14.9)  | 21                       |         | 2.14 (0.71 - 9.30)     |                 |
| pN classification<br>(AJCC, 8 <sup>th</sup> edition) | N0              | 99 (54.7)  | 76                       | <.001   | 1                      | <b>&lt;.001</b> |
|  | N1              | 69 (38.1)  | 29                       |         | 2.32 (1.60 - 3.36)     |                 |
|  | N2              | 13 (7.2)   | 19                       |         | 3.21 (1.54 - 6.16)     |                 |
| pM classification<br>(AJCC, 8 <sup>th</sup> edition) | M0              | 178 (98.3) | 46                       | 0.011   | 1                      | 0.265           |
|  | M1              | 3 (1.7)    | 16                       |         | 2.27 (0.49 - 7.78)     |                 |
| Microscopic lymphatic invasion                       | Absent          | 84 (46.4)  | 57                       | 0.094   |                        |                 |
|  | Present         | 97 (53.6)  | 30                       |         |                        |                 |
| Microscopic venous invasion                          | Absent          | 72 (39.8)  | 53                       | 0.009   | 1                      | 0.183           |
|  | Present         | 109 (60.2) | 32                       |         | 1.30 (0.88 - 1.93)     |                 |
| Microscopic perineural invasion                      | Absent          | 17 (9.4)   | 58                       | 0.195   |                        |                 |
|  | Present         | 164 (90.6) | 43                       |         |                        |                 |
| Invasive carcinoma at resected margin                | Negative        | 158 (87.3) | 49                       | <.001   | 1                      | 0.056           |
|  | Positive        | 23 (12.7)  | 21                       |         | 1.66 (0.98 - 2.67)     |                 |
| CCR7 expression grade                                | Low             | 139 (76.8) | 50                       | 0.011   | 1                      | <b>0.017</b>    |
|  | High            | 42 (23.2)  | 27                       |         | 1.67 (1.10 - 2.48)     |                 |

PHCC, perihilar cholangiocarcinoma; G1, well differentiated; G2, moderately differentiated; G3, poorly differentiated (according to the AJCC 8<sup>th</sup> edition). Low-grade, H-score of CCR7 staining 0–169; high-grade, H-score of CCR7 staining ≥170. CI, Confidence interval.

#### 4. CCR7 発現強度と EMT の関連の検討

CCR7 の H score と tumor buds 数は正の相関を認めた ( $p < 0.001$ ,  $r = 0.247$ ; スピアマンの順位法; 図 12A)。また、CCR7 の H score が大きくなるほど E-cadherin の H score が小さくなり ( $p = 0.034$ ,  $r = -0.158$ ; 図 12B)、vimentin の H score が大きくなる ( $p = 0.126$ ,  $r = 0.114$ ; 図 12C) 傾向を認めた。さらに、前述のように E-cadherin と vimentin の発現を組み合わせ、「Epithelial status (E-high/V-low)」、「Intermediate status (E-low/V-low or E-high/V-high)」、「Mesenchymal status (E-low/V-high)」と定義した EMT status とも比較を行った。「Epithelial status」、「Intermediate status」、「Mesenchymal status」の 3 群における CCR7 の H score の中央値 (範囲) は、各々 90 (0–290)、60 (0–250)、130 (0–300) であり、有意差を認めなかった ( $p = 0.1057$ , Kruskal-Wallis test; 図 12D)。各群毎の比較では CCR7 の H score は「Epithelial status」よりも「Mesenchymal status」で高い傾向を認め ( $p = 0.073$ , Wilcoxon rank sum test; 図 12D)、「Intermediate status」よりも「Mesenchymal status」で有意に高かった ( $p = 0.049$ , Wilcoxon rank sum test; 図 12D)。

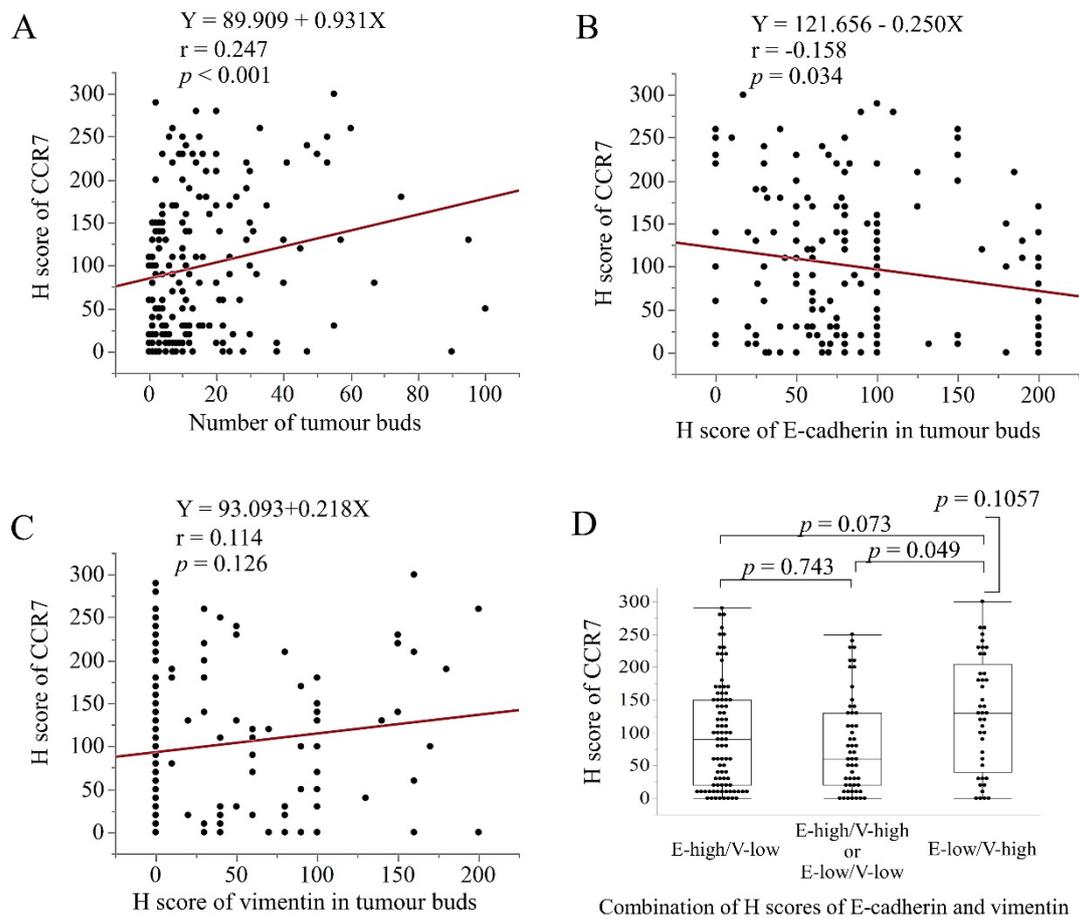


図 12. CCR7、EMT 関連タンパクの免疫組織学的発現と tumor buds 数の比較

- (A) CCR7 の H score と tumor buds 数の比較。
- (B) CCR7 と E-cadherin の H score の比較。
- (C) CCR7 と vimentin の H score の比較。
- (D) CCR7 の H score と EMT status の比較。

### 5. EHCC 細胞株における CCR7 発現の検討

CCL19 / CCR7 相互作用による EHCC 細胞株の遊走、増殖、浸潤能力の検討に先立ち、TFK-1、EGI-1、KKU-100、TYBDC-1 における CCR7 mRNA の発現を RT-PCR により検査した。CCR7 mRNA の発現水準は、 $\beta$ -actin により標準化した。CCR7 /  $\beta$ -actin 比は、TFK-1、KKU-100、TYBDC-1、PBMC では各々  $2.70 \times 10^{-6}$ 、 $2.39 \times 10^{-5}$ 、 $5.25 \times 10^{-7}$ 、 $6.13 \times 10^{-3}$  であり、EGI-1 では検出されなかった (図 13)。

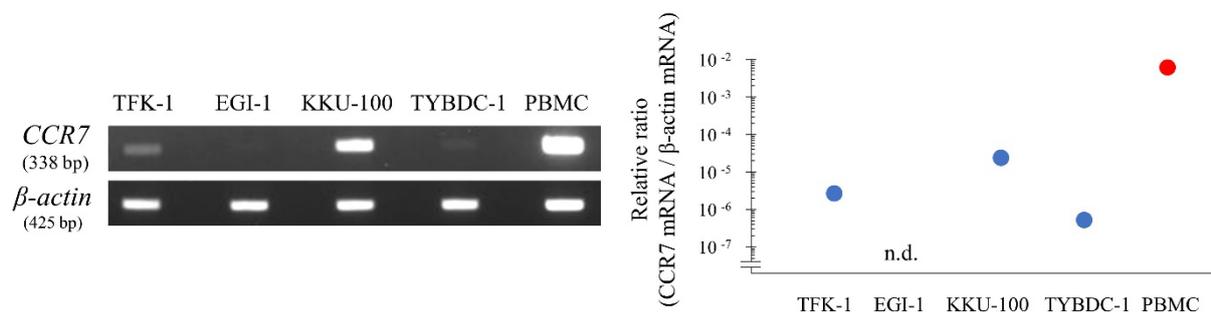


図 13. EHCC 細胞株における *CCR7* 発現

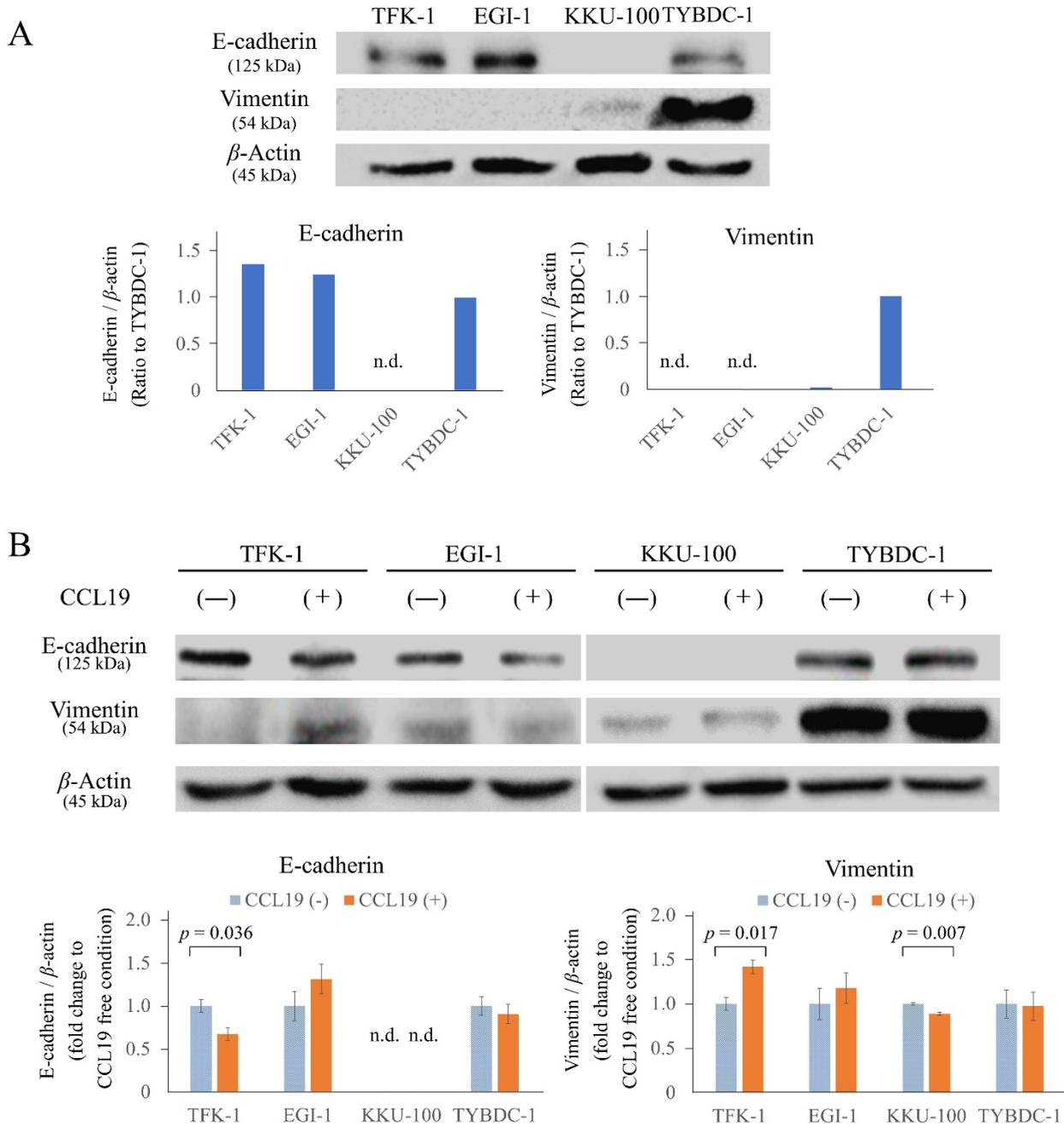
RT-PCR により、各細胞株における *CCR7* mRNA の発現を解析した。*CCR7* mRNA の発現水準は、 $\beta$ -actin により標準化した。「n.d.」は「not detected」を示す。

## 6. EHCC 細胞株における EMT 関連蛋白の発現と CCL19 刺激による変化

Western blot 解析により、各細胞株の元々の E-cadherin、vimentin の発現と CCL19 刺激後の変化を検討した。

E-cadherin は TFK-1、EGI-1、TYBDC-1 で発現していたが、KKU-100 では検出されなかった (図 14A)。Vimentin は TYBDC-1 で強く発現し、KKU-100 でわずかに発現していたが、TFK-1、EGI-1 では検出されなかった (図 14A)。このように各細胞株間で E-cadherin や vimentin の発現に差異を認めた。

リガンド刺激による EMT 誘導の効果を検討するため、各細胞株を 100 ng /mL CCL19 とともに 48 時間培養し、E-cadherin、vimentin の発現変化を検討した。CCL19 刺激後に TFK-1 では E-cadherin の発現が有意に減少し ( $p = 0.036$ ; 図 14B)、vimentin の発現が有意に増加し ( $p = 0.017$ ; 図 14B)、KKU-100 では vimentin の発現が有意に減少した ( $p = 0.007$ ; 図 14B)。



**図 14. Western blot 解析による EMT 関連蛋白の評価**

- (A) 各細胞株における、元々の E-cadherin、vimentin 発現を評価した。各タンパクの発現水準は、 $\beta$ -actin により標準化した。数値は TYBDC-1 との比を示す。「n.d.」は「not detected」を示す。
- (B) 各細胞株を CCL19 で前処理した後に、E-cadherin、vimentin 発現の変化を評価した。各タンパクの発現水準は、 $\beta$ -actin により標準化した。グラフは、平均値±標準偏差を示す。

## 7. Wound healing assay による遊走能力の検討

各細胞株の側方への遊走能力および CCL19 刺激後の遊走能力の変化を検討した。TFK-1、EGI-1 と比較して、KKU-100、TYBDC-1 は元々の遊走能力が高かった (図 15)。CCL19 刺激により TFK-1 は遊走能力が有意に亢進したが ( $p = 0.035$ ; 図 15)、他の細胞株では有意な変化を認めなかった ( $p > 0.05$ ; 図 15)。

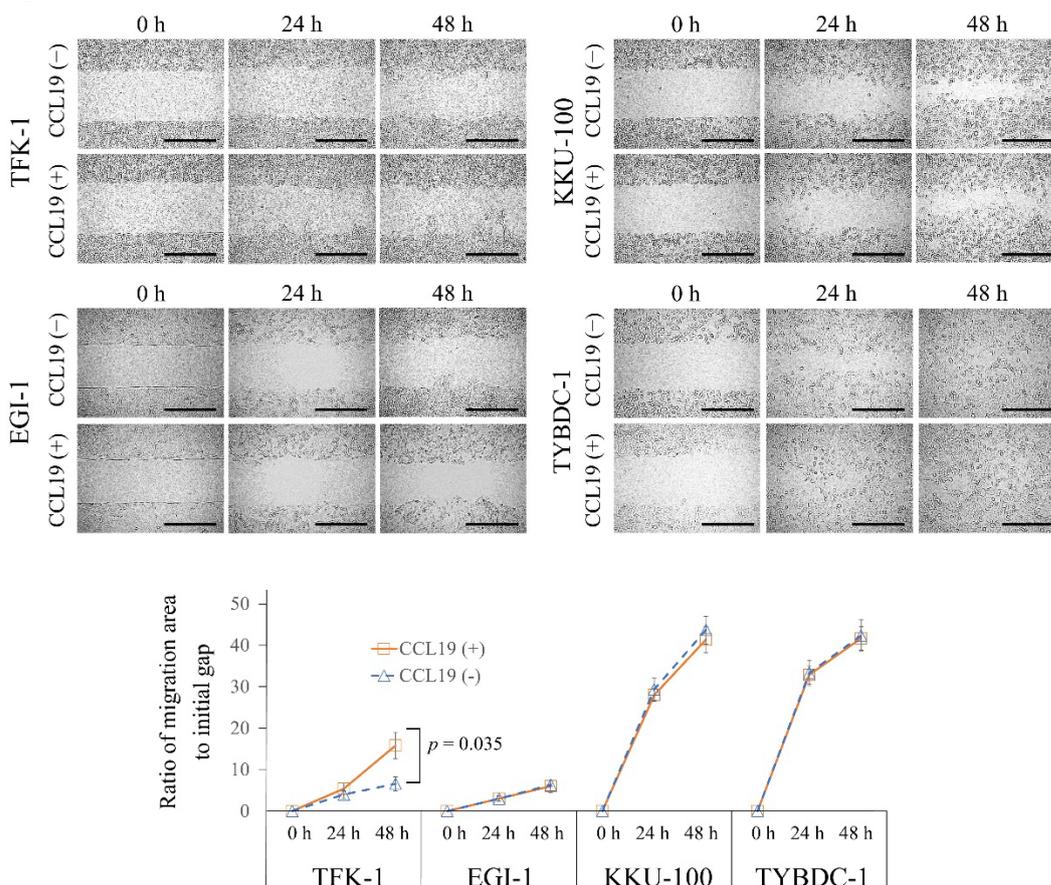


図 15. Wound healing assay による各細胞株の遊走能力の評価

CCL19 の前処理による遊走能力の変化を評価した。Scale bar は 500  $\mu\text{m}$  を示す。グラフは平均値  $\pm$  標準偏差を示す。

## 8. Cell proliferation assay による増殖能力の検討

Wound healing assay では細胞遊走のみならず細胞増殖によっても溝が塞がる。そのため、Wound healing assay の結果の解釈にあたりどの程度細胞増殖の影響を考慮すべきかを評価する目的で、Wound healing assay と同じ条件で培養した細胞株の細胞増殖の程度を評価した。CCL19 刺激による細胞増殖の変化は観察されなかった ( $p > 0.05$ ; 図 16)。

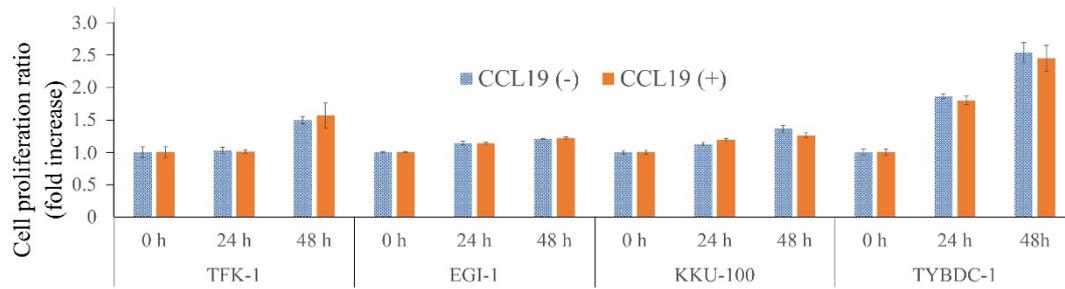


図 16. Cell proliferation assay による各細胞株の増殖能力の評価

グラフは平均値±標準偏差を示す。

### 9. Migration assay と invasion assay による遊走および浸潤能力の検討

Transwell® inserts と Matrigel® invasion chambers を使用して、各細胞株の垂直方向への遊走能力と浸潤能力、および CCL19 刺激による変化を評価した。EGI-1 と KKU-100 は播種した細胞が TFK-1 や TYBDC-1 と比較して少ない割に遊走能力と浸潤能力が高かった。また、KKU-100 は migration assay と invasion assay で同じ細胞数を播種したにも関わらず、invasion assay で移動した細胞が多かった。CCL19 刺激により TFK-1 では遊走能力および浸潤能力が有意に亢進したが ( $p = 0.016$ ; 図 17A、および  $p < 0.001$ ; 図 17B)、その他の細胞株では有意な変化を認めなかった ( $p > 0.05$ ; 図 17A, B)。

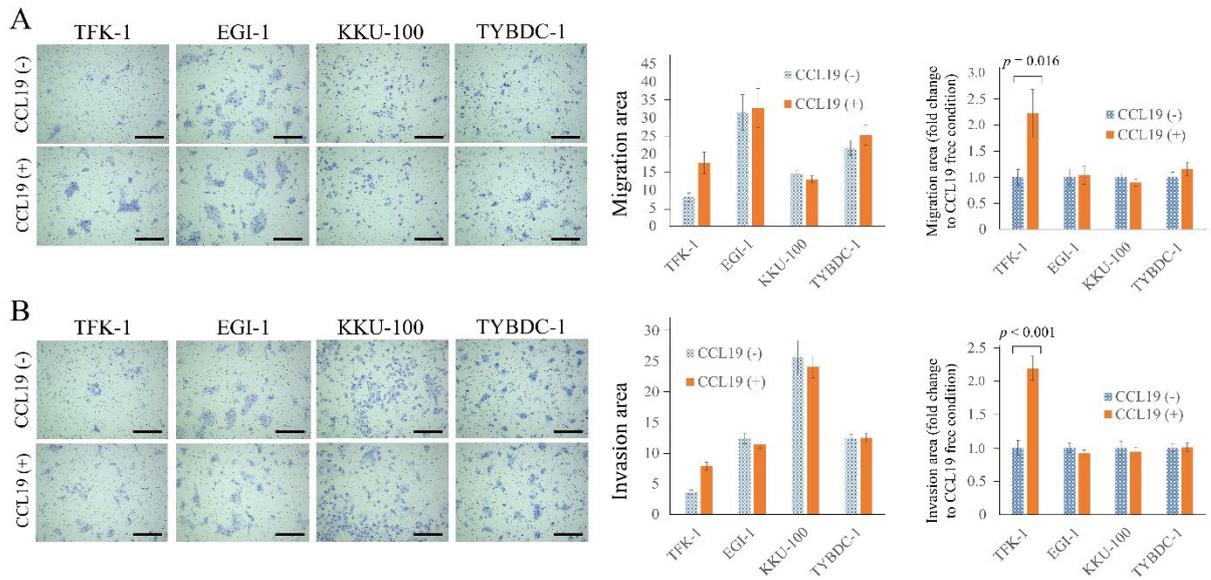


図 17. Migration assay と invasion assay による各細胞株の遊走、浸潤能力の評価

(A) Migration assay で CCL19 の前処理による遊走能力の変化を評価した。左のグラフは遊走細胞の面積占拠率、右のグラフはリガンド刺激による変化率を示す。

(B) Invasion assay で CCL19 の前処理による浸潤能力の変化を評価した。左のグラフは浸潤細胞の面積占拠率、右のグラフはリガンド刺激による変化率を示す。

Scale bar は 500  $\mu\text{m}$  を示す。グラフは、(平均値)  $\pm$  (標準偏差) を示す。

## 10. 中和交代による CCL19 / CCR7 相互作用の阻害効果の検討

Migration assay において CCL19 による TFK-1 の遊走能力亢進が抗 CCR7 抗体で阻害可能かを評価した。抗 CCR7 抗体による前処理で CCL19 による TFK-1 の遊走能力の亢進は抑制されたが、アイソタイプコントロールによる前処理では抑制されなかった (図 18)。

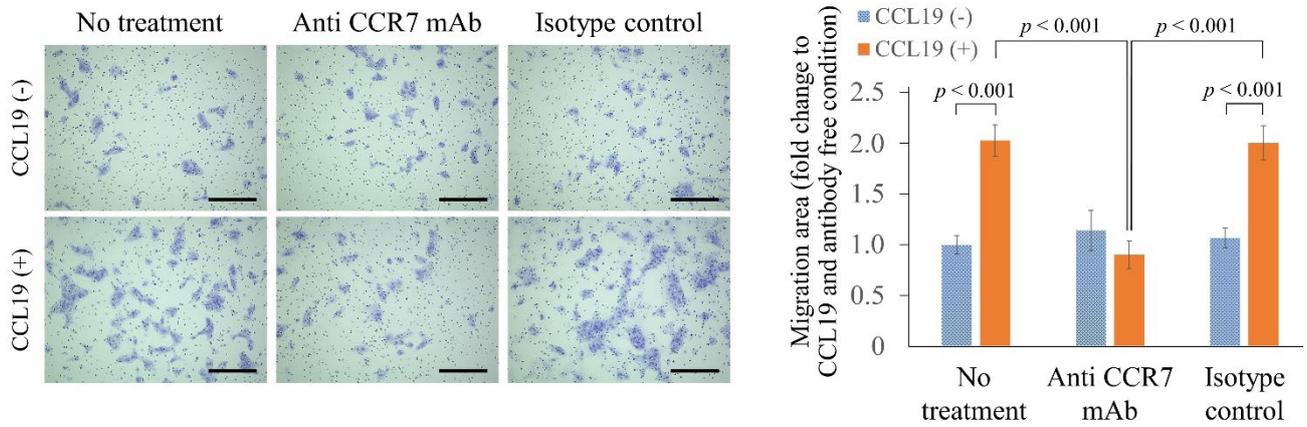


図 18. Migration assay における中和抗体の効果の評価

TFK-1 を用いて CCL19 および中和交代の前処理による遊走能力の変化を評価した。

Scale bar は 500  $\mu\text{m}$  を示す。グラフは平均値  $\pm$  標準偏差を示す。

## 考察

ケモカインは、生理的環境における多くの細胞の移動制御において重要な役割を果たしており (Campbell and Butcher, 2000)、近年、腫瘍微小環境の形成などにより腫瘍の浸潤、転移などに関連することが報告されている (Xu et al., 2011; Zhao et al., 2011; Liu et al., 2014; Mo et al., 2015)。現在までに 50 種類程度のケモカインと 20 種類程度のケモカインレセプターが同定されている。本研究では PHCC がリンパ節に転移しやすいことを考慮し、生理的には免疫細胞の 2 次リンパ組織へのホーミングを制御する CCL19 / CCR7 (Dieu et al., 1998; Hirao et al., 2000) を検討の対象とした。

EMT は一定の細胞形態を保って基底膜上に整列した上皮系細胞が、極性および細胞間接着を失い、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を指す (Thiery and Sleeman, 2006; Thiery et al. 2009)。EMT は正常の発生過程では様々な器官形成の過程、組織構築のプロセスに不可欠な生理的機構であるが、腫瘍においては EMT の異常な活性化により癌細胞が細胞間接着を失って遊走能、浸潤能を獲得し、間質浸潤から脈管侵襲を経て転移巣を形成すると考えられている (Thiery, 2002; Brabletz et al., 2005; Thiery and Sleeman, 2006; Polyak and Weinberg, 2009; Thiery et al., 2009)。EMT とケモカインの関連についてはケモカインは元々細胞遊走活性の制御を主機能とするサイトカインの一群であるため、EMT を誘導する因子となることも想像に難くない。実際に今回、研究の対象とした CCR7 は乳癌 (Xu et al., 2017)、胃癌 (Zhang et al., 2015)、膵臓癌 (Zhang et al., 2016) で EMT を誘発することが示されている。しかしながら、PHCC における CCR7 の発現と EMT 誘導の関連に言及した報告はない。従って、本研究は予後不良の悪性腫瘍である PHCC の転移過程の一端を解明するため、腫瘍細胞の浸潤や遊走を誘導する因子として注目される CCR7 に着目し、まず切除検体における CCR7 の発現と臨床病理学的因子、予後との関係を検討した。さらに、CCR7 による腫瘍細胞の移動能力の亢進が EMT を介して誘導される可能性に着目し、ケモカインと EMT との関連を臨床病理学的解析および細胞株を用いた *in vitro* の実験の両面から検討した。

CCR7 は一部の症例では大半の腫瘍細胞が周囲のリンパ節と同様の染色強度で染色され、H score が 300 に近い値を示した。しかしながら、大部分の症例では H score が低く、少なくとも高発現している症例は少なかった。

た。予後や各臨床病理学的因子との比較にあたり、染色強度のカットオフ値を定める必要があったが、中央値付近の score では log-rank test の統計量  $\chi^2$  値が低く、検定統計量が最大となる score である 170 をカットオフ値と定めた。カットオフ値の 170 は H score の分布の中では中央値の 90 よりやや高い値であり、CCR7 が臨床的意義を持つにはある程度の高発現が必要条件となることが示唆された。

CCR7 の発現と予後との比較では、CCR7 高発現群では有意に OS が低く、多変量解析においても AJCC の T 分類、N 分類と並んで独立した予後不良因子として選択された。また、CCR7 の H score と tumor buds 数は正の相関を認め、CCR7 の H score が大きくなるほど、E-cadherin の H score が小さくなり、vimentin の H score が大きくなる傾向を認めたが、数値としての関連は小さかった。また E-cadherin と vimentin の発現を組み合わせた EMT status と CCR7 の H score に有意差はなく、CCR7 の発現と EMT の明らかな関連は認めなかった。

CCR7 の発現によって予後が不良となる原因を検索するために、CCR7 の発現と臨床病理学的因子の比較を行うと、組織学的グレード、微小静脈侵襲と関連を認めた。組織学的グレードとの関連からは CCR7 の発現が腫瘍の形質に影響を与えていること、脈管侵襲との関連からは CCR7 の発現が腫瘍の遊走、浸潤能に影響を与えていることが示唆された。舌癌において CCR7 の高発現と組織学的グレードの関連を示す報告を認めたが (Xia et al., 2015)、その機序に言及した報告はない。樹状細胞において CCR7 は RhoA 情報伝達経路を介してアクチン動態とそれに関連する細胞構造を制御する (Jose et al., 2020) ことが知られている。また、甲状腺癌においては CCR7 がアクチン重合を介して細胞の増殖や遊走を促進すること (Sancho et al., 2006)、頭頸部癌 (Xu et al., 2015) や慢性白血病 (Gema et al., 2013) では細胞骨格のリモデリングと関わる small GTPases Rho、Cdc42 (Vicente et al., 2004) を活性化することが報告されている。このような CCR7 による細胞骨格の形態的变化が、組織学的グレードに反映されている可能性がある。

また、EHCC の細胞株を用いて *in vitro* で CCR7 の発現と EMT の関連を検討した。入手した EHCC 細胞株のうち、CCR7 は TFK-1、KKU-100、TYBDC-1 で発現を認め、EGI-1 では検出されなかった。また、E-cadherin は TFK-1、EGI-1、TYBDC-1 で発現していたが KKU-100 では検出されず、Vimentin は TYBDC-1、KKU-100 で発現していたが、TFK-1、EGI-1 では

検出されなかった (表 4)。このように、各細胞株間で E-cadherin や vimentin の発現に差異を認め、TFK-1、EGI-1 は上皮系細胞の形質、KKU-100 は間質系細胞の形質を示すなど、EMT status には個体差を認めた (表 4)。

表 4. 各 EHCC 細胞株の生物学的特徴

| Cell line | mRNA expression        | protein expression |          | EMT status          |
|-----------|------------------------|--------------------|----------|---------------------|
|           | CCR7/<br>β-actin ratio | E-cadherin         | Vimentin |                     |
| TFK-1     | 2.697E-06              | ○                  | ×        | Epithelial status   |
| EGI-1     | Not detected           | ○                  | ×        | Epithelial status   |
| KKU-100   | 2.394E-05              | ×                  | ○        | Mesenchymal status  |
| TYBDC-1   | 5.254E-07              | ○                  | ○        | Intermediate status |

○, positive; ×, negative

CCL19 による刺激後、TFK-1 では E-cadherin の発現が有意に減少するとともに vimentin の発現が有意に増加し、EMT 様の変化が観察された。一方、KKU-100 では vimentin の発現減少が観察された (表 5)。これは EMT との関連というよりは、KKU-100 では vimentin の発現が少なく、Western blot 解析のバンドが薄いため、ノイズの可能性もある軽微な変化を過大評価している可能性が考えられた。また、KKU-100 は他の 3 種類の細胞株と比較して細胞が大きく、容易にコンフルエントに達する特徴があり、48 時間の培養で形成された高密度単層の接触阻害による変化を観察している可能性も考えられた。

CCL19 の刺激により TFK-1 では 遊走能力、浸潤能力が有意に亢進した (表 5)。TFK-1 のみに着目すると、上記の EMT 関連蛋白の変化と合わせて、CCL19 の刺激により EMT が誘導された可能性もあるが、TFK-1 における CCR7 の発現量が少なかった点と、本研究では E-cadherin や vimentin 以外の EMT 調節因子の検討がない点に留意すべきである。EMT の国際会議による声明では、EMT の厳密な定義がないことが問題点として指摘されている (Yang et al., 2020)。E-cadherin の部分喪失を EMT とみなす研究もあるが、数値的な基準は報告されていない。EMT に伴う一連の複雑な細胞変化には、多数の分子が関わっており、現時点では EMT 誘導シグナル、EMT 関連転写因子、上皮細胞および間葉細胞の様々な特性を考慮して総合的に

EMT か否かを判断することが推奨されている。本研究においても Snail、Slug、ZEB1、ZEB2 の発現を検討することで EMT との関連を精査し得るが、現状では CCR7 の発現と EMT の明確な関連が示唆されたとは言い難い。

TFK-1 以外の細胞株を含めると、Wound healing assay では K KU-100、TYBDC-1 が TFK-1、EGI-1 と比較してよく遊走し、migration assay や invasion assay においては EGI-1 と K KU-100 は播種した細胞が TFK-1 や TYBDC-1 より少ない割に遊走細胞、浸潤細胞が多かった (表 5)。各細胞株間の比較しかないことや系の違いを考慮すべきではあるものの、上皮系形質を示した EGI-1 は migration assay や invasion assay においては比較的高い遊走能力を示しており、単純な E-cadherin や vimentin の多寡でこの結果を説明することはできない。

また、K KU-100 は migration assay と invasion assay で同じ細胞数を播種したにも関わらず、invasion assay で移動した細胞が多かった。Invasion assay においてはメンブレンにコーティングされたマトリゲルに浸潤する必要があり、K KU-100 は MMP 等の発現が高い可能性がある。MMP-9 は前立腺癌において浸潤を促進すること (Xu et al., 2010)、頭頸部扁平上皮癌において CCR7/CCL19 相互作用がアクチン細胞骨格の再構成や MMP-9 の upregulation を介して細胞の走化性や遊走を調節することが示されている (Guo et al., 2014)。また、MMP-9 は E-cadherin を抑制すること (Karen et al., 2013) から、K KU-100 が MMP-9 を高発現していると仮定すると E-cadherin が検出されなかったこととも関連する可能性がある。本研究において K KU-100 が高い浸潤能力を示した理由を明らかにすることはできないが、浸潤に関わる機構解明の手掛かりとなる可能性が示されたと考える。

CCR7 の mRNA 発現量には各細胞株で差異を認め、TFK-1 ではその発現量が低いにも関わらず CCL19 刺激による変化を認めた。個々の細胞株で生物活性を発現させるために必要な CCR7 の発現量は明らかにされていない。本研究の臨床病理学的検討からは臨床的効果の発現にはある程度 CCR7 が高発現している必要が示唆されたが、評価に用いた H score は発現量と発現割合が混在した数値であり、個々の細胞において CCR7 の発現量が増えることで効果が増強されるかは明らかではない。そのため、CCR7 を knock down した TFK-1 と、CCR7 を knock in した TFK-1 で同様の実験を行うことで、CCR7 が低発現でも効果が得られるか、受容体量に依存して効果が増強するかを検討する必要がある。一方で、CCR7 の mRNA 発現量の高い K KU-100 では、少なくとも観察した実験系においては CCL19 刺激

による変化を認めなかった。KKU-100 の高い浸潤能力が CCR7 の高発現と関連するかについては、CCL21 や CCR7 の別のシグナルを含めた検討が必要である。

表 5. CCL19 刺激後の各 EHCC 細胞株の変化

| Cell line                | CCR7 mRNA<br>( $\beta$ -actin ratio) | original EMT<br>status | Bioactivity   |           |          | protein expression |          |
|--------------------------|--------------------------------------|------------------------|---------------|-----------|----------|--------------------|----------|
|                          |                                      |                        | Proliferation | Migration | Invasion | E-cadherin         | Vimentin |
| TFK-1                    | 2.697E-06                            | Epithelial             | →             | ↑         | ↑        | ↓                  | ↑        |
| TFK-1<br>+ anti CCR7 mAb |                                      |                        |               | →         |          |                    |          |
| EGI-1                    | Not detected                         | Epithelial             | →             | →         | →        | →                  | →        |
| KKU-100                  | 2.394E-05                            | Mesenchymal            | →             | →         | →        | →                  | ↓        |
| TYBDC-1                  | 5.254E-07                            | Intermediate           | →             | →         | →        | →                  | →        |

anti CCR7 mAb, anti CCR7 monoclonal antibody; ↑, enhancement or upregulation; →, No significant change; ↓, suppression or downregulation

CCR7 が予後に影響する経路は明確ではないものの、臨床病理学的検討において CCR7 高発現が AJCC の T 分類、N 分類と並んで独立した予後不良因子として選択された点、migration assay において抗 CCR7 抗体により CCL19 による TFK-1 の遊走能力の亢進が抑制された点 (表 5) から、CCR7 が治療標的となる可能性が示唆された。CCR7 を標的とした治療に関してはマウスによる *in vivo* の検討で異種移植片ヒトマントル細胞リンパ腫に対する抗 CCR7 抗体治療の有効性が報告されている (Somovilla-Crespo et al., 2013)。しかしながら、抗 CCR7 抗体は免疫寛容に関与する制御性 T 細胞や半成熟樹状細胞などの遊走にも関与している (Forster et al., 2008; Forster et al., 2012)。抗 CCR7 療法はそのような生理的 CCR7 発現細胞の遊走を抑制する可能性もあり、実際に CCR7 の慢性的な欠乏が自己免疫疾患を誘発する可能性があるとの報告もある (Winter et al., 2011)。そのため、特定の免疫不全が誘発される可能性も念頭に置いて臨床応用に臨む必要があり、必要に応じて腫瘍細胞の CCR7 を特異的に標的にする、または、CCR7 に関連する特定のシグナル伝達経路を阻害するなどの代替戦略を要する可能性がある。頭頸部扁平上皮癌においては AKT シグナル経路を介して cisplatin 耐性を阻害することが示唆されており (Wang et al., 2008)、臨床応用が実現した場合には既存の化学療法の有効性を高める補助療法となる可能性がある。具体的には、切除標本または生検標本で CCR7 の高発現が認

められた場合に、抗 CCR7 抗体を gemcitabine や cisplatin と組み合わせて投薬することで、奏効率の向上、再発率の抑制に寄与することが期待される。

本研究には制約がある。第一に、本研究は国内単一施設の後向き研究である。メタ解析では、CCR7 の高発現が OS に与える影響は、白人よりもアジア人でより顕著であることが報告されており (Zu et al., 2019)、本研究の結果の解釈にも留意すべきである。ただし、本研究の対象とした PHCC は高度な手術手技と注意深い周術期管理を要することから、治療可能な施設は限定的であり、単一施設の研究としても一定の意義を有すると考えられる。

第二に、切除標本における CCR7 発現の評価を IHC で行った点にも留意が必要である。IHC 染色は検体におけるタンパク質発現の研究で広く採用されているが、施設毎、研究毎に染色の手技やスコアリングに差があるという欠点もある。今回の検討で暫定的に定めた CCR7 のカットオフ値は普遍的なものではないが、少なくともある水準以上 CCR7 が高発現していなければ、臨床的な意義に乏しいことが示唆された。治療対象となる症例選抜の精度向上を目的として、至適カットオフ値のさらなる検討や乳癌における HER2 と同様に検体における CCR7 遺伝子増幅の検査が CCR7 過剰発現の診断補助となるかの検討が必要である。

第三に、生体における CCL19 の濃度や供給源に関するデータがない。*In vitro* の検討では、transwell migration assay における CCL19 による遊走活性に与える影響が 10 nM でピークを示したという既報 (Astrid et al., 2019) を踏まえ、100 ng/ml (約 10 nM) で CCL19 によるリガンド刺激を行った。しかしながら、健常者における CCL19 の血漿濃度は約 30-90 pg/ml と報告されており (Damas et al., 2009; Ilir et al., 2013)、100 ng/ml と比較してはるかに低い。ただし、CCR7 や CCL19、CCL21 の欠損が生体内で免疫不全を引き起こすことから (Forster et al., 2008)、生体内における低リガンド濃度でも CCR7 が機能する機構を有することが予想されている。具体的には CCR7 のホモ二量体化によりリガンドとの結合能が増強する可能性を示唆する報告 (Kobayashi et al., 2017) もあるが、十分に明らかにはされていない。リガンドの供給源については、頭頸部扁平上皮癌では autocrine や paracrine による CCR7 シグナル伝達の活性化が示されている (Wang., 2008)。本研究では病理組織試料において CCL19 の免疫染色を試みたが非特異的な染色所見しか得られずに断念し、生体における腫瘍周囲のリガン

ド発現の情報がない。保存した血清中の CCL19 濃度を確認する選択肢はあるものの、血清値は腫瘍周囲微小環境を反映していない可能性がある。胆管癌細胞株における培養上清中のリガンド濃度計測を行うことも考えられ、今後の研究課題である。

第四に、ケモカインのリガンドの重複性に関する検討がない。本研究では、CCL19 / CCR7 相互作用を検討したが、CCR7 のリガンドは、CCL19 の他に CCL21 の存在も知られている (Willimann et al., 1998; Ott et al., 2004)。CCL19 は EMT に関連する ERK1/2 の活性化において CCL21 より効率的であると考えられているが (Kohout et al., 2004)、両者はアミノ酸同一性を 32% しか共有しておらず、リガンドバイアスを有している (Steen et al., 2014)。従って、CCL21 に関する検討を加えることで、さらなる知見が得られる可能性がある。

第五に、TFK-1 において実際に EMT が誘導されたかを検証する必要がある。EMT 関連の転写因子である Snail、Slug、ZEB1、ZEB2、Twist など (Thiery, 2002; Hugo et al., 2007; Thiery et al., 2009) の PCR による検討を加えて総合的に判断すべきである。

第六に、肝外胆管癌において CCR7 の高発現がどのような経路で予後に影響しているかが明らかになっていない。本研究では EMT との関連を推測して検討を行ったが、明確な相関を示す結果は得られなかった。ただし今日までに報告されている CCR7 の機能は、遊走の制御や EMT の誘導だけではない。CCR7 は樹状細胞において走化性のみならず、PI3K/AKT 経路を介して生存を制御し、RhoA 経路を介してアクチン動態を調節し、遊走速度、細胞構造、エンドサイトーシスを制御することが報告されている (Jose et al., 2020)。また、腫瘍細胞においても浸潤や転移のみならず、非小細胞肺癌において ERK 経路を介して細胞を増殖させること (Xu et al., 2011)、乳癌において AKT シグナル伝達経路を介して血管内皮増殖因子を発現させリンパ管新生を亢進させること (Fatan et al., 2015) が明らかにされている。これらの CCR7 のシグナル経路の検討を加えることで、有効な薬物治療の標的を探索できる可能性がある。

CCR7 に関連する分子、微小環境構成因子の検討を深め、有用な薬物治療の構築を目指したさらなる研究が必要である。

## 結論

### ① 本研究から得られた新知見

1. PHCC の切除標本を用いた臨床病理学的な検討において、CCR7 の発現は IHC による評価が可能であり、H score による発現強度の分類が可能であった。
2. CCR7 の発現と予後との比較では CCR7 高発現群では有意に OS が低く、多変量解析においても AJCC の T 分類、N 分類と並ぶ独立した予後不良因子として選択された。
3. CCR7 の高発現は腫瘍の形質や遊走、浸潤能力を反映していると考えられる組織学的グレード、微小静脈侵襲と関連を認めた。また、EMT 関連蛋白である E-cadherin、vimentin や EMT の形態学的表現型と考えられている tumor budding 数と弱い関連を認めた。
4. 4 種類の EHCC の細胞株を用いた検討では CCR7 は TFK-1、KKU-100、TYBDC-1 で発現を認め、EGI-1 では検出されなかった。E-cadherin や vimentin の発現には個体差を認めた。
5. CCL19 による刺激後、TFK-1 において E-cadherin の発現減少、vimentin の発現増加、遊走能力、浸潤能力の亢進を認め、EMT 様の変化を示した。
6. EGI-1、KKU-100、TYBDC-1 においては、CCL19 刺激による EMT 関連蛋白と遊走、浸潤能力の有意な変化を認めなかった。
7. Migration assay において、抗 CCR7 抗体により CCL19 による TFK-1 の遊走能力の亢進が抑制され、CCR7 が効果的な治療標的である可能性が示唆された。
8. KKU-100 では migration assay よりも invasion assay で高い浸潤能力を示し、浸潤に関わる機構解明の手掛かりとなる可能性が示された。

### ② 新知見の意義

本研究は PHCC において CCR7 の発現と予後、臨床病理学的因子との関連を検討した世界初の報告である。PHCC において CCR7 の高発現は独立した予後不良因子であり、CCR7 が治療標的となる可能性が示唆された。CCR7 の発現は IHC により簡便に評価可能であり、切除標本による診断のみならず、生検標本を用いて術前に腫瘍の性質を診断することも可能である。臨床応用が実現した場合、標本における CCR7 の高発現が認められた症例に対して gemcitabine や cisplatin と組み合わせ

せて抗 CCR7 療法を行うことで、奏効率の向上に寄与することが期待される。このように CCR7 は PHCC の予後予測因子、かつ治療標的となる可能性がある。

#### ③ 今後どのような研究が展開されうるか

臨床的には CCR7 発現の至適カットオフ値の検索を含めた評価法の検証、改良を進める。また治療対象となる症例選抜の精度向上を目的として、組織標本における CCR7 遺伝子増幅の検査が CCR7 過剰発現の診断補助となるかの検証も検討される。

PHCC において CCR7 の高発現と EMT との明らかな関連は不明であり、どのような経路で予後に影響しているかを探索する必要がある。様々な経路を想定して CCR7 に関連する分子、微小環境構成因子の検討を行い、有用な薬物治療の構築を目指した研究を行う。

#### ④ 今後の課題

CCR7 の高発現と予後の関連に介在する因子を探索し、CCL19 に加えて CCL21 を含めた検討を要する。また、探索した因子が受容体の発現量や外因性のリガンドに依存するかの検討が必要である。

## 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。

また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 特任助教に深謝致します。

さらに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（現 北海道大学病院病理診断科 医員）、技術面の指導や支援を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 特任准教授、畑中 佳奈子 特任講師、北海道大学病院病理部 丸川 活司 主任技師（現 北海道医療大学 医療技術学部臨床検査学科 講師）、北海道大学病院病理部 我孫子 光春 主任技師、北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室 II 佐々木 勝則 学術研究員に厚く御礼申し上げます。

最後に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 の皆様に心より感謝申し上げます。

## 利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

## 引用文献

Amin BM, Edge S, Greene F, Byrd RD, Brookland KR, Mary KW, Jeffrey E, Gershenwald CC, Compton KR, Hess DC, et al (2016) AJCC Cancer Staging Manual, 8th edn (New York: Springer).

Agalliu I, Xue X, Cushman M, Cornell E, Hsing AW, Kaplan RC, Anastos K, Rajpathak S and Ho GY (2013) Detectability and reproducibility of plasma levels of chemokines and soluble receptors. *Results Immunol* 3:79–84.

Astrid SJ, Larsen O, Allmen EY, Luckmann M, Legler DF, Frimurer TM, Veldkamp CT, Hjorto GM and Rosenkilde MM (2019) Biased Signaling of CCL21 and CCL19 Does Not Rely on N-Terminal Differences, but Markedly on the Chemokine Core Domains and Extracellular Loop 2 of CCR7. *Front. Immunol* 10, 2156.

Bacus S, Flowers JL, Press MF, Bacus JW and McCarty KS Jr. (1988) The evaluation of estrogen receptor in primary breast carcinoma by computer-assisted image analysis. *Am J Clin Pathol* 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.

Brandum EP, Jorgensen AS, Rosenkilde MM and Hjorto GM (2021) Dendritic Cells and CCR7 Expression: An Important Factor for Autoimmune Diseases, Chronic Inflammation, and Cancer. *Int J Mol Sci* 22, 8340.

Campbell JJ and Butcher EC (2000) Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol* 12, 336-341.

Damas JK, Landro L, Fevang B, Heggelund L, Tjonnfjord GE, Floisand Y, Halvorsen B, Froland SS and Aukrust P (2009) Homeostatic chemokines

CCL19 and CCL21 promote inflammation in human immunodeficiency virus-infected patients with ongoing viral replication. *Clin Exp Immunol* 157, 400–407.

DeOliveira ML, Cunningham SC, Cameron JL, Kamangar F, Winter JM, Lillemoe KD, Choti MA, Yeo CJ and Schulick RD (2007) Cholangiocarcinoma: thirty-one-year experience with 564 patients at a single institution. *Ann surg* 245, 755-762.

Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Ait-Yahia S, Briere F, Zlotnik A, Lebecque S and Caux C (1998) Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 188, 373-386.

Do-Youn O, Aiwu RH, Shukui Q, Li-Tzong C, Takuji O, Arndt V, Jin WK, Thatthan S, Myung AL, Masayuki K, et al (2022) Durvalumab plus Gemcitabine and Cisplatin in Advanced Biliary Tract Cancer. *NEJM Evidence* 1, 8.

Fatan ET, Majumder M, Xin X and Lala PK (2015) The role of CCL21/CCR7 chemokine axis in breast cancer-induced lymphangiogenesis. *Mol Cancer* 14, 35.

Forster R, Davalos-Miszlitz AC and Rot A (2008) CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol* 8, 362-371.

Forster R, Braun A and Worbs T (2012) Lymph node homing of T cells and dendritic cells via afferent lymphatics. *Trends Immunol* 33, 271-280.

Gema ME, Julien V, Loic Y, Manon F, Fanny L, Guy L, Frederique GI, Giorgio S and Loic Dupre (2013) CIP4 controls CCL19-driven cell steering and chemotaxis in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 73, 3412-3424.

Ghassan KA, Vaibhav S, Antoine H, Gina V, Davide M, Raed A, Andrew SP, Mitesh JB, David G, Adrian GM, et al (2020) Pemigatinib for previously

treated, locally advanced or metastatic cholangiocarcinoma: a multicentre, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol* 21, 671-684.

Grigore AD, Jolly MK, Jia D, Farach-Carson MC and Levine H (2016) Tumor Budding: The Name is EMT. Partial EMT. *J Clin Med* 5, 51-74.

Guo N, Liu F, Yang L, Huang J, Ding X and Sun C (2014) Chemokine receptor 7 enhances cell chemotaxis and migration of metastatic squamous cell carcinoma of head and neck through activation of matrix metalloproteinase-9. *Oncol Rep* 32, 794-800.

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

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

Hirao M., Onai N, Hiroishi K, Watkins SC, Matsushima K, Robbins PD, Lotze MT and Tahara H (2000) CC chemokine receptor-7 on dendritic cells is induced after interaction with apoptotic tumor cells: critical role in migration from the tumor site to draining lymph nodes. *Cancer Res* 60, 2209-2217.

Hugo H, Ackland ML, Blick T, Lawrence MG, Clements JA, Williams ED and Thompson EW (2007) Epithelial--mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression. *J Cell Physiol* 213, 374-383.

Irino T, Takeuchi H, Matsuda S, Saikawa Y, Kawakubo H, Wada N, Takahashi T, Nakamura R, Fukuda K, Omori T, et al (2014) CC-Chemokine receptor CCR7: a key molecule for lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 14, 1471-2407.

Jose RF and Olga CG (2020) The Chemokine Receptor CCR7 Uses Distinct Signaling Modules With Biased Functionality to Regulate Dendritic Cells. *Front. Immunol* 11, 1–10.

Karamitopoulou E (2013) Tumor budding cells, cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition-type cells in pancreatic cancer. *Front Oncol* 2, 209.

Karen D, Cowden D, Jaime S, Yan N, Elisa G, David AF, Brian PA, Stack MS and Laurie GH (2008) Matrix metalloproteinase (MMP)-9 is a mediator of epidermal growth factor dependent E-cadherin loss in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 68, 4606–4613.

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. *Br J Surg* 102, 399-406.

Kobayashi D, Endo M, Ochi H, Hojo H, Miyasaka M and Hayasaka H (2017) Regulation of CCR7-dependent cell migration through CCR7 homodimer formation. *Sci Rep* 7, 8536.

Kohout TA, Nicholas SL, Perry SJ, Reinhart G, Junger S and Struthers RS (2004) Differential desensitization, receptor phosphorylation, beta-arrestin recruitment, and ERK1/2 activation by the two endogenous ligands for the CC chemokine receptor 7. *J Biol Chem* 279, 23214-23222.

Lee JW, Um SH, Lee JB, Mun J and Cho H (2006) Scoring and staging systems using cox linear regression modeling and recursive partitioning. *Methods Inf Med* 45, 37-43.

Li X, Xu B, Xu G and Liu R (2016) CCR7 regulates Twist to induce the epithelial-mesenchymal transition in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Tumour Biol* 37, 419-424.

Li Y, Qiu X, Zhang S, Zhang Q and Wang E (2009) Hypoxia-induced CCR7 expression via HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  correlates with migration and invasion in lung cancer cells. *Cancer Biol. Ther.*, 8. 322-330.

Lim CS, Jang JY, Lee SE, Kang MJ and Kim SW (2012) Reappraisal of hepatopancreatoduodenectomy as a treatment modality for bile duct and gallbladder cancer. *J Gastrointest Surg* 16, 1012-1018.

Lipika G, Funda M, Antoine H, Juan WV, Chigusa M, Thomas BK, Thomas AA, Junji F, Robin KK, Philippe AC, et al (2023) Futibatinib for FGFR2-Rearranged Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *N Engl J Med*, 388, 228-239.

Liu FY, Safdar J, Li ZN, Fang QG, Zhang X, Xu ZF and Sun CF (2014) CCR7 regulates cell migration and invasion through JAK2/STAT3 in metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Biomed Res Int* 415375, 27.

Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, Bosman F, Cathomas G, Dawson H, El Zimaity H, Flejou JF, Hansen TP, Hartmann A, et al (2017) Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod Pathol*, 30, 1299-1311.

Ma H, Gao L, Li S, Qin J, Chen L, Liu X, Xu P, Wang F, Xiao H, Zhou S, et al (2015) CCR7 enhances TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition and is associated with lymph node metastasis and poor overall survival in gastric cancer. *Oncotarget* 6, 24348-24360.

Mo M, Zhou M, Wang L, Qi L, Zhou K, Liu LF, Chen Z and Zu XB (2015) CCL21/CCR7 enhances the proliferation, migration, and invasion of human bladder cancer T24 cells. *PLoS One* 10, e0119506.

Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, et al (2001) Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, 50-56.

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. *Ann surg* 258, 129-140.

Nakachi K, Ikeda M, Konishi M, Nomura S, Katayama H, Kataoka T, Todaka A, Yanagimoto H, Morinaga S, Kobayashi S, et al (2023) Adjuvant S-1 compared with observation in resected biliary tract cancer (JCOG1202, ASCOT): a multicentre, open-label, randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet* 401, 195-203.

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

Nakata B, Fukunaga S, Noda E, Amano R, Yamada N and Hirakawa K (2008) Chemokine receptor CCR7 expression correlates with lymph node metastasis in pancreatic cancer. *Oncology* 74, 69-75.

Nitta T, Mitsuhashi T, Hatanaka Y, Miyamoto M, Oba K, Tsuchikawa T, Suzuki Y, Hatanaka KC, Hirano S and Matsuno Y (2014) Prognostic significance of epithelial-mesenchymal transition-related markers in extrahepatic cholangiocarcinoma: comprehensive immunohistochemical study using a tissue microarray. *Br J Cancer* 111, 1363-1372.

Oga A, Kawauchi S, Furuya T, Ikemoto K and Sasaki K (2007) Introduction of tissue microarray (TMA) for cancer research. *Cytometry Res* 17, 5-9.

Ogino M, Nakanishi Y, Mitsuhashi T, Hatanaka Y, Amano T, Marukawa K, Nitta T, Ueno T, Ono M, Kuwabara S, et al (2019) Impact of tumour budding grade in 310 patients who underwent surgical resection for extrahepatic cholangiocarcinoma. *Histopathology* 74, 861-872.

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. *Br J Cancer* 103, 469-474.

Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES and Weinberg RA (2008) Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream

transcriptional pathways. *Cancer Res* 68, 3645-3654.

Ott TR, Pahuja A, Nickolls SA, Alleva DG and Struthers RS (2004) Identification of CC chemokine receptor 7 residues important for receptor activation. *J Biol Chem* 279, 42383-42392.

Polyak K and Weinberg RA (2009) Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 9, 265-273.

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

Primrose JN, Fox RP, Palmer DH, Malik HZ, 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. *Lancet Oncol* 20, 663-673.

Robin KK, Makoto U, Changhoon Y, Richard SF, Junji F, Zhenggang R, Thomas Y, Heinz-Josef K, Stephen LC, Masato O, et al (2023) Pembrolizumab in combination with gemcitabine and cisplatin compared with gemcitabine and cisplatin alone for patients with advanced biliary tract cancer (KEYNOTE-966): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 401, 1853-1865.

Saito K and Ota Y (2017) Control of switching between migration modes in cancer invasion. *Seikagaku* 89, 90-93.

Sancho M, Vieira JM, Casalou C, Mesquita M, Pereira T, Cavaco BM, Dias S and Leite V (2006) Expression and function of the chemokine receptor CCR7 in thyroid carcinomas. *J Endocrinol* 191, 229-238.

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- $\beta$  1/Snail activation aggravates invasive growth of cholangiocarcinoma. *Am J Pathol* 177, 141-152.

Scheel C, Eaton EN, Li SH, Chaffer CL, Reinhardt F, Kah KJ, Bell G, Guo W, Rubin J, Richardson AL, et al (2011) Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast. *Cell* 145, 926-940.

Shintani Y, Hollingsworth MA, Wheelock MJ and Johnson KR (2006) Collagen I promotes metastasis in pancreatic cancer by activating c-Jun NH(2)-terminal kinase 1 and up-regulating N-cadherin expression. *Cancer Res* 66, 11745-11753.

Somovilla-Crespo B, Alfonso-Perez M, Cuesta-Mateos C, Carballo-de Dios C, Beltran AE, Terron F, Perez-Villar JJ, Gamallo-Amat C, Perez-Chacon G, Fernandez-Ruiz E, et al (2013) Anti-CCR7 therapy exerts a potent anti-tumor activity in a xenograft model of human mantle cell lymphoma. *J Hematol Oncol* 6, 1756-8722.

Steen A, Larsen O, Thiele S, Rosenkilde MM (2014) Biased and G protein-independent signaling of chemokine receptors. *Front Immunol.* 5, 277.

Thiery JP (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2, 442-454.

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

Thiery JP, Acloque H, Huang RY and Nieto MA (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871-890.

Tian X, Liu Z, Niu B, Zhang J, Tan TK, Lee SR, Zhao Y, Harris DC and Zheng G (2011) E-cadherin/beta-catenin complex and the epithelial barrier. *J Biomed Biotechnol* 2011, 567305.

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

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.

Valle J, Wasan H, Palmer DH, Cunningham D, Anthoney A, Maraveyas A, Madhusudan S, Iveson T, Hughes S, Pereira SP, et al (2010) Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. *N Engl J Med* 362, 1273-1281.

van der Gaag NA, Kloek JJ, de Bakker JK, Musters B, Geskus RB, Busch OR, Bosma A, Gouma DJ and van Gulik TM (2012) Survival analysis and prognostic nomogram for patients undergoing resection of extrahepatic cholangiocarcinoma. *Ann Oncol* 23, 2642-2649.

Vicente MM and Sanchez MF (2004) Role of cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat Rev. Immunol* 4, 110-122.

Wang J, Seethala RR, Zhang Q, Gooding W, van Waes C, Hasegawa H and Ferris RL (2008) Autocrine and paracrine chemokine receptor 7 activation in head and neck cancer: implications for therapy. *J Natl Cancer Inst* 100, 502-512

Willimann K, Legler DF, Loetscher M, Roos RS, Delgado MB, Clark-Lewis I, Baggiolini M and Moser B (1998) The chemokine SLC is expressed in T cell areas of lymph nodes and mucosal lymphoid tissues and attracts activated T cells via CCR7. *Eur J Immunol* 28, 2025-2034.

Winter S, Rehm A, Wichner K, Scheel T, Batra A, Siegmund B, Berek C, Lipp M and Hopken UE (2011) Manifestation of spontaneous and early autoimmune

gastritis in CCR7-deficient mice. *Am J Pathol* 179, 754-765.

Xia Y, Liu L, Xiong Y, Bai Q, Wang J, Xi W, Qu Y, Xu J and Guo J (2017) Prognostic value of CC-chemokine receptor seven expression in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with tyrosine kinase inhibitor. *BMC Cancer* 17, 017-3065.

Xia X, Liu K, Zhang H and Shang Z (2015) Correlation between CCR7 expression and lymph node metastatic potential of human tongue carcinoma. *Oral Dis* 21, 123-131.

Xiong Y, Huang F, Li X, Chen Z, Feng D, Jiang H, Chen W and Zhang X (2017) CCL21/CCR7 interaction promotes cellular migration and invasion via modulation of the MEK/ERK1/2 signaling pathway and correlates with lymphatic metastatic spread and poor prognosis in urinary bladder cancer. *Int J Oncol* 51, 75-90.

Xu B, Zhou M, Qiu W, Ye J and Feng Q (2017) CCR7 mediates human breast cancer cell invasion, migration by inducing epithelial-mesenchymal transition and suppressing apoptosis through AKT pathway. *Cancer Med* 6, 1062-1071.

Xu D, McKee CM, Cao Y, Ding Y, Kessler BM and Muschel RJ (2010) Matrix metalloproteinase-9 regulates tumor cell invasion through cleavage of protease nexin-1. *Cancer Res* 70, 6988-6998.

Xu Y, Liu L, Qiu X, Jiang L, Huang B, Li H, Li Z, Luo W and Wang E (2011) CCL21/CCR7 promotes G2/M phase progression via the ERK pathway in human non-small cell lung cancer cells. *PLoS One* 6, 16.

Xu Z, Zheng X, Yang L, Liu F, Zhang E, Duan W, Bai S, Safdar J, Li Z and Sun C (2015) Chemokine receptor 7 promotes tumor migration and invasiveness via the RhoA/ROCK pathway in metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oncol. Rep.* 33, 849–855.

Yang J, Antin P, Berx G, Blanpain C, Brabletz T, Bronner M, Campbell K,

Cano A, Casanova J, Christofori G, et al (2020) Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 341-352.

Yu S, Hou Q, Sun H, Liu J and Li J (2015) Upregulation of C-C chemokine receptor type 7 expression by membrane-associated prostaglandin E synthase-1/prostaglandin E2 requires glycogen synthase kinase 3 $\beta$ -mediated signal transduction in colon cancer cells. *Mol Med Rep* 12, 7169-7175.

Zhang J, Zhou Y and Yang Y (2015) CCR7 pathway induces epithelial-mesenchymal transition through up-regulation of Snail signaling in gastric cancer. *Med Oncol* 32, 014-0467.

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.

Zhao B, Cui K, Wang CL, Wang AL, Zhang B, Zhou WY, Zhao WH and Li S (2011) The chemotactic interaction between CCL21 and its receptor, CCR7, facilitates the progression of pancreatic cancer via induction of angiogenesis and lymphangiogenesis. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 18, 821-828.

Zu G, Luo B, Yang Y, Tan Y, Tang T, Zhang Y, Chen X and Sun D (2019) Meta-analysis of the prognostic value of C-C chemokine receptor type 7 in patients with solid tumors. *Cancer Manag Res* 11, 1881-1892.