



Title	肝外胆管癌における病理学的desmoplastic reaction分類の術後予後との関連に関する検討
Author(s)	吉田, 雄亮
Description	配架番号 : 2944
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16553号
Issue Date	2025-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16553
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95991
Type	doctoral thesis
File Information	YOSHIDA_Yusuke.pdf



学 位 論 文

肝外胆管癌における病理学的 desmoplastic reaction 分類の
術後予後との関連に関する検討

(Impact of Pathological Classification of Desmoplastic
Reaction for Postoperative Prognosis in Patients with
Extrahepatic Cholangiocarcinoma)

2025 年 6 月

北 海 道 大 学

吉 田 雄 亮

学 位 論 文

肝外胆管癌における病理学的 desmoplastic reaction 分類の
術後予後との関連に関する検討

(Impact of Pathological Classification of Desmoplastic
Reaction for Postoperative Prognosis in Patients with
Extrahepatic Cholangiocarcinoma)

2025 年 6 月

北 海 道 大 学

吉 田 雄 亮

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・	5 頁
緒言・	6 頁
方法・	13 頁
結果・	21 頁
考察・	31 頁
結論・	35 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会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Yusuke Yoshida, Yoshitsugu Nakanishi, Tomoko Mitsunobu, Hiroyuki Yamamoto, Mariko O. Hayashi, Mitsunobu Oba, Takeo Nitta, Takashi Ueno, Toru Yamada, Masato Ono, Shota Kuwabara, Yutaka Hatanaka and Satoshi Hirano.
Postoperative Prognosis according to Pathological Categorization of Desmoplastic Reaction in Patients with Extrahepatic Cholangiocarcinoma. *Annals of Surgical Oncology*, 30, 7348-7357 (2023).

本研究の一部は以下の学会に発表予定である。

1. 吉田雄亮、中西喜嗣、三橋智子、田中公貴、松井あや、浅野賢道、中村透、平野聡。
肝外胆管癌における Desmoplastic reaction 分類と術後予後の検討
第 80 回日本消化器外科学会総会、2025/7/16-18・神戸

要旨

【背景・目的】

肝外胆管癌は消化器癌の中でも悪性度の高い腫瘍として知られ、根治的外科的切除後の5年生存率は20～40%と報告されている。特に、リンパ節転移陽性例は予後不良であり、5年生存率はわずか20%程度にとどまる。近年、胆道癌においても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%であり、生存期間を6ヶ月延長したのみであり、未だ満足できる成績ではない。したがって、肝外胆管癌の予後改善には再発を抑制しうる補助療法の開発が急務であり、そのためには腫瘍進展の転移メカニズムの解明が必須である。

近年、腫瘍の進展には腫瘍細胞のみではなく、その周囲の微小環境が重要な役割を担っていると考えられている。この微小環境を構成する要素のひとつとして腫瘍周囲間質があげられ、腫瘍周囲間質が腫瘍進展に伴い変化することは間質線維反応(Desmoplastic Reaction; 以下、DRと略記)と呼ばれる。この間質変化には癌関連線維芽細胞(Cancer-associated fibroblasts; 以下、CAFsと略記)の関与が示唆されている。大腸癌においては、DRの形態学的分類が提唱され、予後予測因子として注目されている。

本研究の目的は、第1に肝外胆管癌において、DRの形態学的分類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、形態学的、免疫組織学的検討によりDRとCAFsの関連を明らかにすることである。

【方法】

検討に用いる症例は、2004年1月から2017年12月の期間に北海道大学消化器外科Ⅱで根治的切除術が施行された肝外胆管癌335例のうち、病理組織学的に検討が可能であった283例(肝門部領域胆管癌174例、遠位胆管癌109例)とした。肝外胆管癌においてDR分類が適応可能かを判断するために、観察者内研究および観察者間研究を設定した。観察者内研究では、病理診断を日常的に行う観察者1が最初の分類を行い、その3ヶ月後に全標本を再分類した。観察者間研究では、無作為に抽出した100標本について、同じく病理診断を日常的に行う観察者2名がそれぞれDR分類を行い、一致率を検討した。観察者間研究の後に、3人の観察者のコンセンサスによって、全標本のDR分類の最終判断を決定した。

DRの形態学的分類は腫瘍の代表切片を用いて評価し、myxoid changesを伴

う線維性間質が高倍率視野を占めて観察された場合には“immature”、keloid-like collagen が成熟した間質と混在し、成熟した膠原線維と並行して存在する場合には “intermediate”、線維性間質が多層性に配列した線維のみで構成されている場合は“mature”と分類した。

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、脈管侵襲、神経周囲浸潤、所属リンパ節転移、tumor budding の程度、形態学的 DR 分類について集計・解析した。

免疫組織化学染色による検討のために、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) の作製を行なった。胆管癌 208 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 ヶ所から腫瘍組織を、正常対照群として同一検体の正常胆管上皮から 1 ヶ所の、計 3 ヶ所から組織採取を行なった。

加えて、作製した TMA を用いて hematoxylin and eosin (以下、HE と略記) 染色標本で DR の評価と、抗 α -SMA 抗体染色による CAFs の分布との関係を検討した。

DR の分類と、上皮間葉転換の程度の形態学的表現型と考えられている tumor budding、および CAFs の分布の関係を検討するために、腫瘍を代表する切片の HE 染色標本および TMA を用いた HE 染色標本、免疫染色標本 (抗 α -SMA 抗体) を作製し、評価を行なった。

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。Tumor budding を構成する単一または 5 個未満の癌細胞からなる胞巣を tumor bud と定義し、各症例において tumor budding の程度が最も高い HE 染色標本を選出し、その標本上で tumor bud 数が最も多く観察される領域でその個数を測定した。

【結果】

DR 分類の観察者内および観察者間の検討において 3 人の観察者間で高い再現性と一致性が確認された。肝門部領域胆管癌 174 症例、遠位胆管癌 109 症例の両群において、DR 分類は pT 分類、静脈浸潤、神経周囲浸潤、局所リンパ節転移、および 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 DR 分類は、単変量解析において生存期間の短縮と関連しており、成熟度が低いほど予後が不良であり、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。

TMA を用いた検討においては、“immature type”と分類された症例においては筋線維芽細胞が密にびまん性に存在し、“mature type”と分類された症例においてはまばらに存在する傾向を認めた。

【考察】

肝門部領域胆管癌、遠位胆管癌の両者において、DR 分類がリンパ・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。この一貫した所見は、腫瘍先進部にける腫瘍間質の形態学的変化が“mature”から“intermediate”および“immature”にかけて aggressive な腫瘍の性質を反映していることを示唆していると考ええる。この結果から、DR 分類は肝外胆管癌における悪性度評価の指標のひとつとなり得ることが示唆された。さらに、DR 分類により術後生存率が層別化され、肝外胆管癌の独立した予後予測因子の一つとなり得ることが示された。加えて、腫瘍先進部の DR 分類と CAFs (α -SMA 陽性) の分布パターンの中に有意な関連を示していたことから、CAFs の量および分布の差異が DR 分類の群間で予後に影響している可能性がある。さらに、各群の比較から、腫瘍進展を促進する因子が“immature type”の腫瘍微小環境内に存在する可能性が考えられた。これは、DR および CAFs が腫瘍微小環境の変容に関連し、予後に影響する仮説を支持するものであると考えられた。

【結論】

DR 分類は、胆道癌の術後病理標本において HE 染色のみで評価することが可能であり、新規の形態学的予後予測因子となり得ると考えられた。今後、胆道癌 DR 分類に関する多施設共同・前向き研究を行い、評価手法を検証・改良していくことが望まれる。加えて、生検組織検体における DR 分類の応用可能性に関しても検討を行う必要があると考える。また、DR 分類と 1 種類の CAFs の分布との関連が見出せたことから、他の種類の CAFs との分布との検討を加え、さらに DR の変化を引き起こす CAFs から産生される液性因子などの検討を行うことで、胆道癌進展の局所メカニズムがより明らかになることが期待される。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

ADAMs	A disintegrin and metalloproteinases
apCAFs	antigen-presenting cancer-associated fibroblasts
CAFs	cancer-associated fibroblasts
DCC	distal cholangiocarcinoma
DR	desmoplastic reaction
EBDR	extrahepatic bile duct resection
EHCC	extrahepatic cholangiocarcinoma
EMT	epithelial-mesenchymal transition
ECM	extracellular matrix
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded
FGFR2	fibroblast growth factor receptors 2
HE	hematoxylin and eosin
iCAFs	inflammatory cancer-associated fibroblasts
MET	mesenchymal-epithelial transition
MST	median survival time
MMPs	matrix metalloproteinases
myCAFs	myofibroblastic cancer-associated fibroblasts
OS	overall survival
PHCC	perihilar cholangiocarcinoma
RFS	relapse free survival
TMA	tissue microarray
UICC	the International Union Against Cancer

緒言

1) 肝外胆管癌に関して

肝外胆管癌 (extrahepatic cholangiocarcinoma; 以下、EHCC と略記) は、胆管上皮から発生する比較的稀な上皮系の悪性腫瘍であり、腫瘍の主座により肝門部領域胆管癌 (perihilar cholangiocarcinoma; 以下、PHCC と略記) と遠位胆管癌 (distal cholangiocarcinoma; 以下、DCC と略記) に分類される。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、DCC 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、患者選択の適正化、手術手技の定型化や周術期管理の向上により、術後合併症は減少傾向にあると言える。しかし、近年の報告でも、術後合併症率は 43.1%、手術関連死亡は 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 の長期予後は、腫瘍遺残のない完全切除 (R0 症例) に加えて、リンパ節転移陰性であることが良好な術後予後を得る上で重要とされている (Lim et al, 2012)。根治的切除後でも再発が多く、5 年生存率は PHCC で 9-44%、DCC で 20-45% と報告されている (Blechacz et al, 2017; DeOliveira et al, 2007; Nagino et al, 2013; Nakanishi et al, 2020)。前述の通り、EHCC においてリンパ節転移陽性は強力な予後不良因子であるとされている (DeOliveira et al, 2007; Murakami et al, 2011)。PHCC では、遠隔転移陰性 (M0) かつ R0 切除が可能であった症例のうち、リンパ節転移陰性で 5 年生存率が 67.1% であるのに対し、リンパ節転移陽性では 22.1% であったと報告されている (Nagino et al, 2013)。一方、M0 であっても癌遺残陽性 (R1-2) 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であるといえる (Nagino et al, 2013)。

EHCC に対する術後化学療法の予後改善効果についての報告も存在している (Hoehn et al, 2015; Morine et al, 2017)。リンパ節転移陽性の PHCC について、術後の 5 年生存率が手術単独では 15.0% であったのに対し、術後化学療法 (gemcitabine) 併施では 32.9% であったと報告している (Mizuno et al, 2017)。また、2019 年には国外から 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、有効性が報告された (Primrose et al, 2019)。本邦においても、胆道癌に対する S-1 術後補助療法の第Ⅲ相臨床研究がなされ、3 年生存率が経過観察群で 67.6% であったのに対し、補

助療法としての S-1 投与群では 77.1%と有意に延長する結果が得られたことより、(Nakachi et al, 2023)、現在では S-1 が胆道癌の術後補助療法として標準治療となっている。

切除不能胆道癌に対する化学療法に関しては、gemcitabine と cisplatin 併用療法が gemcitabine 単独療法に対する優越性を示した 2 つの試験 (ABC-02 trial; BT22 trial) の結果が報告されている (Valle et al, 2010; Okusaka et al, 2010)。しかし、併用療法群の生存期間中央値は、ABC-02 trial で 11.7 ヶ月、BT22 trial では 11.1 ヶ月に留まり、胆道癌に対する化学療法の効果に関しては限定的であった。

2015 年に胆道癌における遺伝子解析の結果が報告され、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)。その結果を受けて、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) の結果が報告された。FIGHT-202 trial では pemigatinib の奏効率が 35.5%、奏功期間中央値が 7.5 ヶ月、追跡期間中央値 17.8 ヶ月の時点で OS の中央値が 21.1 ヶ月であり、FOENIX-CCA2 trial では futibatinib の全奏効率が 42%、奏功期間中央値が 9.7 ヶ月、追跡期間中央値 17.1 ヶ月の時点で OS の中央値が 21.7 ヶ月と、それぞれで良好な治療成績が示された。

また近年、発展の著しい免疫チェックポイント阻害剤については、gemcitabine と cisplatin に加えて durvalumab を併用することの有効性について検討した TOPAZ-1 trial において durvalumab 併用群とプラセボ併用群の OS の中央値が各々 12.8 ヶ月、11.5 ヶ月で 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 ヶ月、10.9 ヶ月で pembrolizumab 併用の優越性が示されている (Robin Kate Kelley et al, 2023)。

以上のように、胆道癌においても新規化学療法薬、免疫チェックポイント阻害剤などを使用した新規治療法が開発され、徐々に予後が改善している。しかしながら、依然として他癌種と比較して薬物治療の選択肢は少なく、予後も不良であり、胆道癌の浸潤及び転移形成に関する分子生物学的機序に関する研究による、新たな治療標的の探索が求められている。

2) 近年の癌の浸潤・転移に関する研究成果

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周囲間質へと浸潤することから始まる。癌細胞は腫瘍微小環境を構成する血管やリンパ管へと侵入して、到達したリンパ節や臓器で転移巣を形成する。これら癌の浸潤・転移の過程を形態変化に着目して考えると、腫瘍はまず、腫瘍細胞間の接着を失って間質に浸潤・脈管に侵襲を来とし、転移先では再び腫瘍細胞同士が接着し、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 (Epithelial-mesenchymal transition: 以下、EMT と略記) および間葉上皮転換 (mesenchymal-epithelial transition: 以下、MET と略記) といった現象である (Polyak and Weinberg, 2009; Thiery et al, 2009; Thiery and Sleeman, 2006)。

EMT および 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 は一定の細胞極性を持って、基底膜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うことで遊走能、運動能を獲得し、間葉系の形質を持つ細胞に変化することを示している (Thiery et al, 2009; Thiery and Sleeman, 2006)。一方で、MET は間葉系の形質を持つ細胞が細胞間接着能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みられるものである。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 および MET は収束し、組織構築が維持されていく。しかしながら、癌においては、様々な液性因子やシグナル伝達亢進の影響を受け、生理的なレベルを逸脱して EMT および MET の異常な活性化をきたすことで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)。

さらに間質に関しては詳細な研究が行われ、腫瘍周囲微小環境における間質の役割が注目されている。近年、腫瘍の進展は腫瘍細胞のみではなく、腫瘍細胞とその周囲の腫瘍微小環境 (図1) との相互作用によって調節されるとされている (Jing et al, 2011)。腫瘍微小環境には間質細胞、血管、リンパ管、神経線維、シグナル伝達分子、細胞外基質が含まれる (Kalluri et al, 2006; Ohlund et al, 2014; Sanegre et al, 2020)。

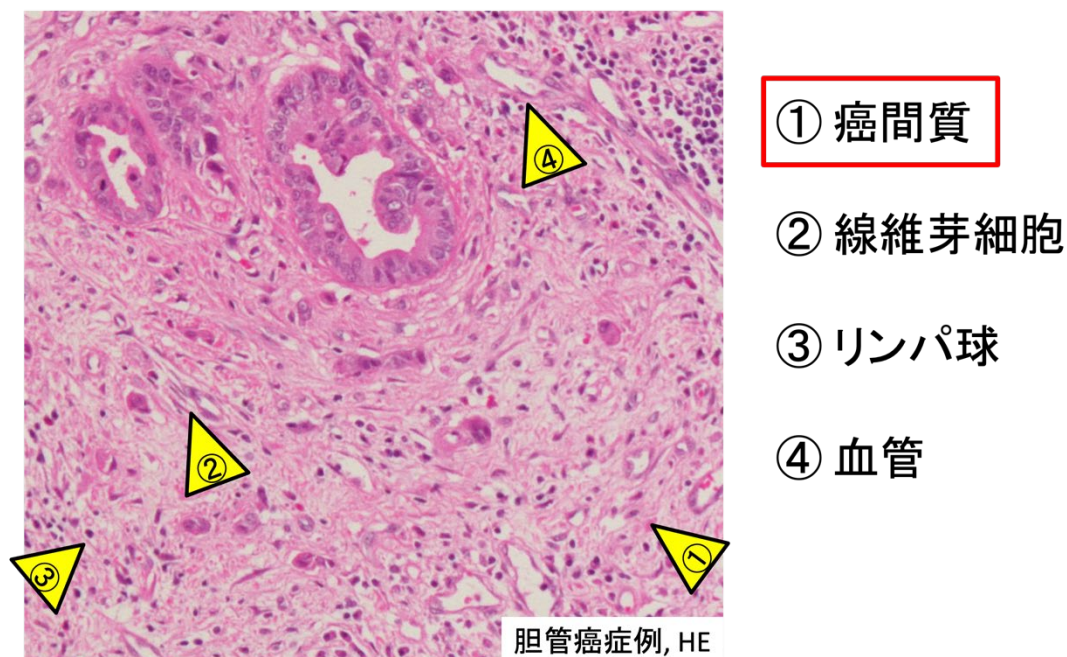


図 1. 腫瘍微小環境 胆管癌症例 HE

腫瘍細胞は腫瘍微小環境において、増殖抑制的な環境を回避し、さらには積極的に環境を改変しながら、発生・進展をする。癌関連線維芽細胞 (Cancer-associated fibroblasts; 以下、CAFs と略記) によって生じる癌微小環境における Extra-Cellular Matrix (以下、ECM と略記) の合成と再構築は Desmoplastic Reaction (以下、DR と略記) と呼ばれている (Ohlund et al, 2014; Chen et al, 2019)。この間質反応は癌の進展のみならず、組織障害に対する自然な生体反応であり、線維化の形成は膵癌の発生においても重要な因子である。線維化には複数のプロセスが関与しており、腫瘍の増殖・転移を促進する様々なサイトカインやケモカイン、炎症、酸化ストレス、様々な成長因子などが挙げられる (Sato et al, 2023)。

Ueno らは、大腸癌において DR を形態学に分類 (後述) し、これによって予後が層別化し得ると報告した (Ueno et al, 2001; Ueno et al, 2004)。

正常組織の創傷治癒の過程では、活性化した線維芽細胞がコラーゲンやフィブロネクチン、ラミニンなどの ECM の産生を行い、他の間質細胞と協調することで組織の修復を行う。一方、癌組織においては、CAFs が分泌する液性因子などにより ECM の分解が生じ、浸潤が促進され则认为られている。DR とは、腫瘍の存在により腫瘍周囲の ECM の合成・再構築が生じた状態であり、癌の発生・進展に伴い、観察されうる現象である (Ohlund et al, 2014; Chen et al, 2019)。DR 分類は、腫瘍先進部における間質の状態がパター

ン分類できるかどうか、また、その分類から予後を層別化可能かといった観点で大腸癌の研究者により報告され(Ueno et al, 2002)、肝内胆管癌、胃癌、食道癌、子宮頸癌といった他癌種においても予後層別化因子として報告がなされている(Kojima et al, 2020; Sakai et al, 2021; Akimoto et al, 2022; Kouzu et al, 2022; Pun et al, 2022)。大腸癌においては、DR 分類は、myxoid stroma や ケロイド様コラーゲンの有無で腫瘍先進部間質を mature、intermediate、immature の 3 つの type に分類された。大腸癌で、Mature から Immature に移行するに従い予後不良となることが報告されている (Ueno et al, 2002)。この機序としては、腫瘍により活性化された筋線維芽細胞が T リンパ球の腫瘍への侵入を防ぐ physical barrier を形成するために DR が immature である時、CD8 陽性リンパ球や腫瘍関連マクロファージなどの宿主免疫細胞の数が減少するためと推測する報告があるが (Ueno et al, 2015)、実際には未だ不明である。

前述したように ECM の再構成、つまりは癌先進部における腫瘍周囲の間質、間質の変化に寄与している可能性のある CAFs に着目した。線維芽細胞は様々な領域において存在するが、図 2 に示すように CAFs は癌塊内に存在する線維芽細胞として定義され、線維芽細胞、上皮細胞、血管内皮細胞、血管周皮細胞、星細胞、前脂肪細胞、骨髄由来間葉系細胞など種々の前駆細胞から起源するものである。

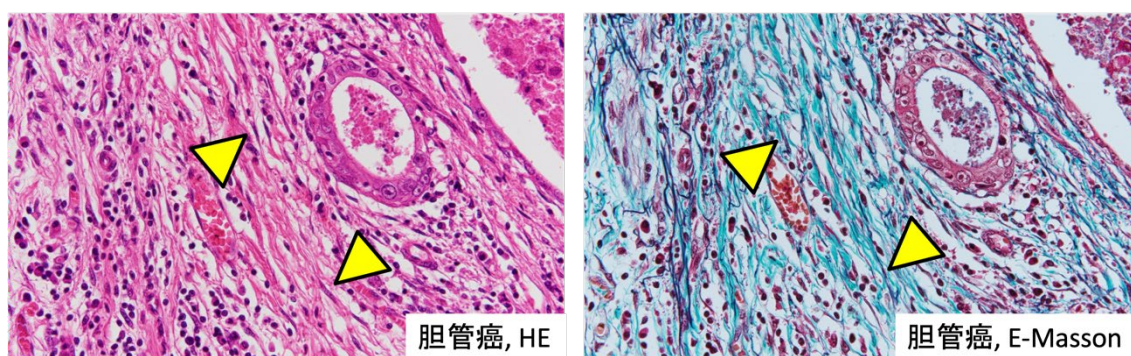


図 2. 線維芽細胞 胆管癌症例 (HE・E-Masson 染色)

腫瘍先進部において、線維芽細胞が確認される。

通常組織において線維芽細胞は、細胞外基質の再構成、上皮細胞の分化促進、免疫応答の制御などの機能を担っている。線維芽細胞はコラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞外基質、基底膜構成成分の主要な産生源であり、同時に matrix metalloproteinases (以下、MMPs と略記) や A disintegrin and

metalloproteinases (以下、ADAMs と略記)などのプロテアーゼを産生することで ECM の恒常性を調整している (Sato et al, 1994; Sato et al, 2010)。創傷治癒過程では、活性化線維芽細胞がこのような細胞外基質の産生を行い、他の間質細胞と協調することで組織を修復する。これらの活性化線維芽細胞は myofibroblasts と称され、創傷治癒の完了とともにアポトーシスおよび形態の変化を起こして減少していく。一方、癌の組織において CAFs は活性化状態を維持し、様々なサイトカインやケモカインを放出することで、癌細胞の増殖の促進や血管新生の促進、脈管浸潤促進、免疫応答の制御などを通じて癌の浸潤に有利な微小環境を構築することがわかってきている (Kobayashi et al, 2019; Joshi RS et al, 2021) (図 3)。

近年、CAFs は機能的に腫瘍に対して促進的に働くものと、抑制的に働くサブタイプに分類できる可能性があると報告されている (Mizutani et al, 2019)。単一細胞の RNA シーケンシング解析を中心とした網羅的解析の結果、myofibroblastic CAFs (以下、myCAFs と略記)、inflammatory CAFs (以下、iCAFs と略記)、antigen-presenting CAFs (以下、apCAFs と略記)といった亜集団が報告されている (Caligiuri and Tuveson, 2023; Laviet et al, 2022)。CAFs のマーカーは多数報告されているが、 α -SMA は代表的な myCAFs を定義するマーカーであり、筋線維芽細胞の形態を持つ CAFs を同定可能である。通常、筋線維芽細胞の形態をもつ CAFs は腫瘍促進的なものと報告されている (Akatsu et al, 2021)。myCAFs は組織硬化を介して癌細胞の浸潤を促進するだけではなく、細胞障害性 T 細胞の腫瘍内への浸潤を抑制すると報告されている (Caligiuri and Tuveson, 2023; Laviet et al, 2022)。加えて myCAFs で産生された TGF- β はパラクライン効果により近傍の癌細胞や免疫細胞にも作用し、部分的に上皮間葉転換を促進することで浸潤や転移を調節している (Sahai et al, 2020)。また、iCAFs は膵癌や乳癌の解析で確認され、癌細胞の増殖の促進や M2 マクロファージや骨髄由来免疫抑制細胞の誘導などを通して免疫抑制環境の構築に寄与していると報告されている (Laviet et al, 2022)。apCAFs は膵癌の解析において、podoplanin 陽性線維芽細胞中で抗原提示分子である主要組織適合性複合体 class II を発現する亜集団として確認されており、他に肺癌や乳癌でも同様に apCAFs の存在が報告されている。apCAFs には、抗原提示を介してナイーブ CD4 陽性 T 細胞を Treg に誘導する作用がある (Elyada et al, 2019; Huang et al, 2022)。

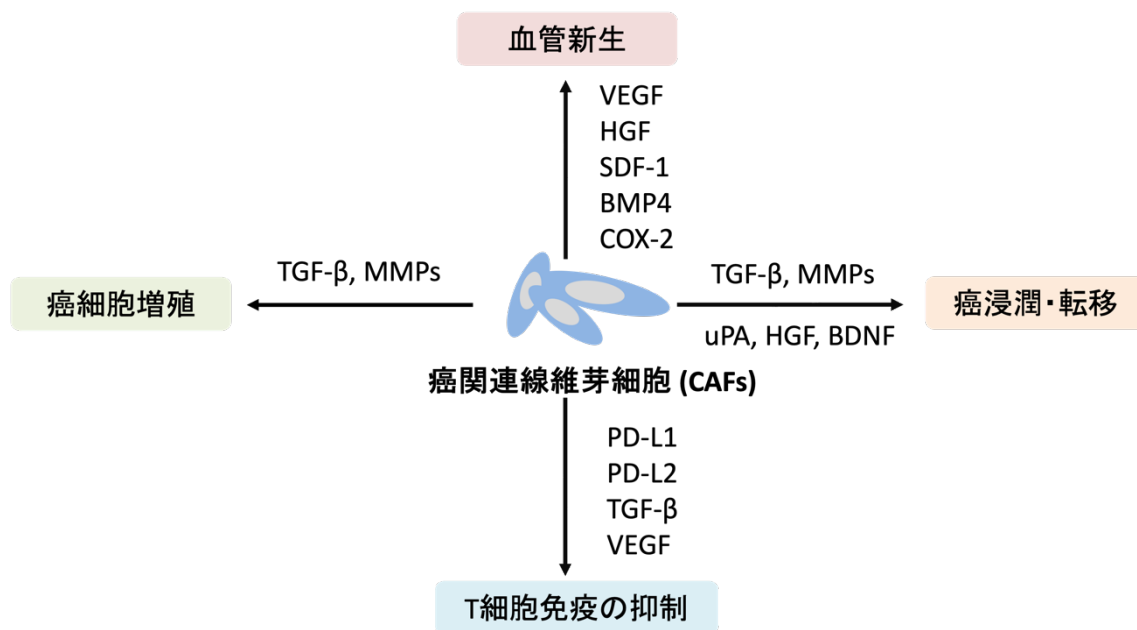


図 3. CAFs (Akatsu et al, 2021 より引用改変)

CAFs は様々なサイトカインや増殖因子の産生を介して癌細胞の増殖、血管新生、浸潤・転移を促し、T 細胞の免疫を抑制することで有利な微小環境を構築している。

3) 研究の目的

EHCC に対する有効な薬物治療の開発のためには、EMT・MET を基盤とした癌の浸潤、転移に関する分子生物学的メカニズムを調査し、治療の標的を探索することが必要である。本研究においては、EHCC における癌の浸潤のメカニズムを臨床病理学的観点から解明するために、癌先進部における腫瘍周囲の間質、間質の変化 (DR) および間質の変化に寄与している可能性のある CAFs に着目した。

大腸癌においては、Uenoらによる形態学的 DR分類の術後生存期間に対する影響が報告されているものの、本邦においてEHCCにおけるDRと臨床病理学的分類、術後予後との関係に関する研究報告はない。本研究では、PHCCおよびDCCの各々において、形態学的 DR分類の術後生存期間に対する影響を評価し、新たな予後因子となり得るかを検討することとした。

方法

対象症例

本研究では、2004 年1月から 2017 年 12 月までの期間に、北海道大学病院消化器外科 II で切除術が施行された EHCC 335 症例を対象とした。在院死 19 症例、他癌種の併存 3 症例、非浸潤癌 8 症例、姑息手術 3 症例、再発 10 症例、術前化学療法や放射線治療を受けた 6 症例、検体不適切 3 症例の計 52 症例は除外した。術式の内訳を表1に示す。

本研究では、手術前に「将来的に医学研究に用いる目的で保管し使用すること」を文章で同意（包括同意）した患者の検体のみを使用した。本研究は、北海道大学病院自主臨床研究審査委員会の承認を得たものである（承認番号：019-0444）。

手術術式

PHCC の標準手術は、尾状葉切除と肝外胆管切除を含む major hepatectomy である。浸潤癌が膵内胆管に浸潤している場合は、膵頭十二指腸切除が併施された。腫瘍が総胆管内に位置し、残肝量が不足など肝切除リスクがある場合には肝外胆管切除のみ、または膵頭十二指腸切除を受けた患者もいた。DCC 患者では、門脈分岐レベルで胆管を切除する亜全胃温存膵頭十二指腸切除を施行した。

表 1. 手術術式

施行術式	PHCC (N =174)	DCC (N = 109)
	症例数 (%)	症例数 (%)
肝外胆管切除	22 (12.6)	3 (2.7)
肝中央二区域切除+ 肝外胆管切除	1 (0.6)	
肝右葉切除 + 肝外胆管切除	61 (35.1)	
肝右三区域切除+ 肝外胆管切除	4 (2.3)	
肝左葉切除 + 肝外胆管切除	46 (26.4)	
肝左三区域切除+ 肝外胆管切除	7 (4.0)	
膵頭十二指腸切除	9 (5.2)	96 (88.1)
肝切除を伴う膵頭十二指腸切除	24 (13.8)	10 (9.2)

PHCC, perihilar cholangiocarcinoma; DCC, distal cholangiocarcinoma

組織標本作製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 4 μ m 厚の切片に薄切し、haematoxylin and eosin (以下、HE と略記)で染色した。病理診断は the International Union Against Cancer (UICC) TNM classification of malignant tumors, 8th edition に準拠した (Amin et al, 2016)。

組織マイクロアレイ (Tissue Microarray) の作製

腫瘍先進部の線維間質反応の形態学的差異と筋線維芽細胞分布に関して免疫組織化学染色を用いて検討を行うにあたり、TMA の作製を行なった。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 ヶ所から腫瘍組織を採取し、正常対象群として同一検体の正常胆管上皮から 1 ヶ所の合計 3 ヶ所から組織採取を行った。

作製の手順として、まず連続標本の HE 染色標本にて腫瘍組織 2 ヶ所と正常胆管上皮 1 ヶ所を特定し 2.0mm 大の印をつけた。この際に、病理専門医が HE 染色標本を鏡検し、固定状態の良悪、腫瘍の大きさなどを含め、本研究にて使用可能か否かの判断を併せて行なった。

同部位に相当するパラフィンブロックの部位を 2.0mm 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包埋し、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隣接して作製した。完成したアレイブロックを 4 μ m 厚の切片に薄切し、スライドを作製した (図 4)。

TMA 標本作製、使用した理由は、免疫染色の労力・経費削減といった利点の他、同一個体の腫瘍組織と非腫瘍組織を比較して観察できる点、加えて多数の標本を同時に染色することで、切片毎の染色条件の差異を最小限にするためである。

一方で、TMA を用いる欠点としては採取した腫瘍部分が必ずしも腫瘍全体の組織型やタンパク質の発現における 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、本研究においては通常の連続標本および TMA の両方で HE 染色を施行し、評価を行なった。

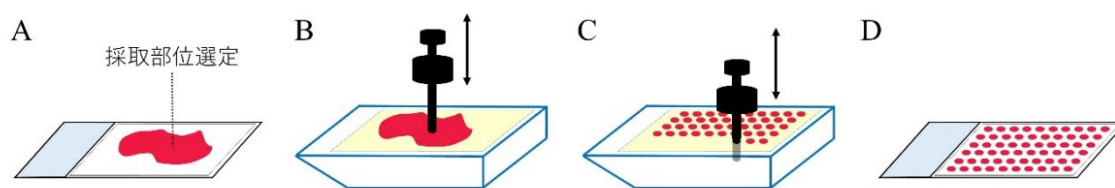


図 4. TMA の作製手順 (Oga et al, 2007 図 1 より引用改変)

- (A) 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) パラフィンプ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) 作製したパラフィンプロックを 4 μm の厚さで薄切して標本作製した。
- (E) 実際の TMA の HE 染色後のプレパラート

免疫組織化学染色

組織切片をキシレン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 URTRA; Roche, Switzerland) 中に行なった。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) を用いた。免疫染色した切片をヘマトキシリンで対比染色し、エタノールで脱水後、キシレンで透徹した。免疫染色は抗 α -SMA マウスモノクローナル一次抗体 (1A4; Abcam, Cambridge, UK) を使用した。

DR の評価方法

HE 染色標本で腫瘍を代表する切片を選択したのち、**図 5A** で示すように低倍率(対物レンズ 4 倍)または中倍率(対物レンズ 10、40 倍)で腫瘍先進部の DR を評価した。腫瘍先進部に“myxoid changes”を伴う線維化間質(“myxoid stroma”)が観察された場合には DR は“immature”と判断する。“myxoid changes”は好酸性またはわずかに塩基性の細胞外基質(extracellular matrix; 以下、ECM と略記)から成る非晶質性物質と定義され、ヒアリン化コラーゲンが錯綜して配列し存在している。40 倍の視野を完全に“myxoid changes”を伴う線維化間質が占めている場合(40 倍視野を越える範囲に存在する場合)、DR の分類は“immature”と判断する(Ueno et al, 2021)(**図 5B**)。“keloid-like collagen”が成熟した間質と混在し、成熟した膠原線維と並行して存在する場合には、“intermediate”と分類する(**図 5C**)。“keloid-like collagen”とは、創傷治癒過程において生じるケロイド癍痕の際に観察される、明るい好酸性の hyalinized collagen bundles に類似した膠原線維の太い束と定義されている。“keloid-like collagen”は弱拡大から中拡大で認識され得る幅を有したものとする。DR は腫瘍先進部の領域において、上述した“myxoid stroma”および“keloid-like collagen”を有さずに、線維性間質が繊細に一定方向に多層性に配列し成熟したコラーゲン線維のみで構成されている場合“mature”と分類した(**図 5D**)。

検索した限り、本研究は EHCC 患者における DR 分類に関する最初の検討、報告である。従って、この DR 分類が EHCC の臨床検体に適応できるかどうかを検討するために観察者内研究および観察者間研究を行なった。

観察者内研究では、病理診断を日常的に行う観察者 1 が最初の分類を行い、その 3 ヶ月後に全標本を再分類した。

観察者間研究では、無作為に抽出した 100 標本について、同じく病理診断を日常的に行う観察者 2 名がそれぞれ DR 分類を行い、一致率を検討した。観察者間研究の後に、3 人の観察者のコンセンサスによって、全標本の DR 分類の最終判断を決定した。

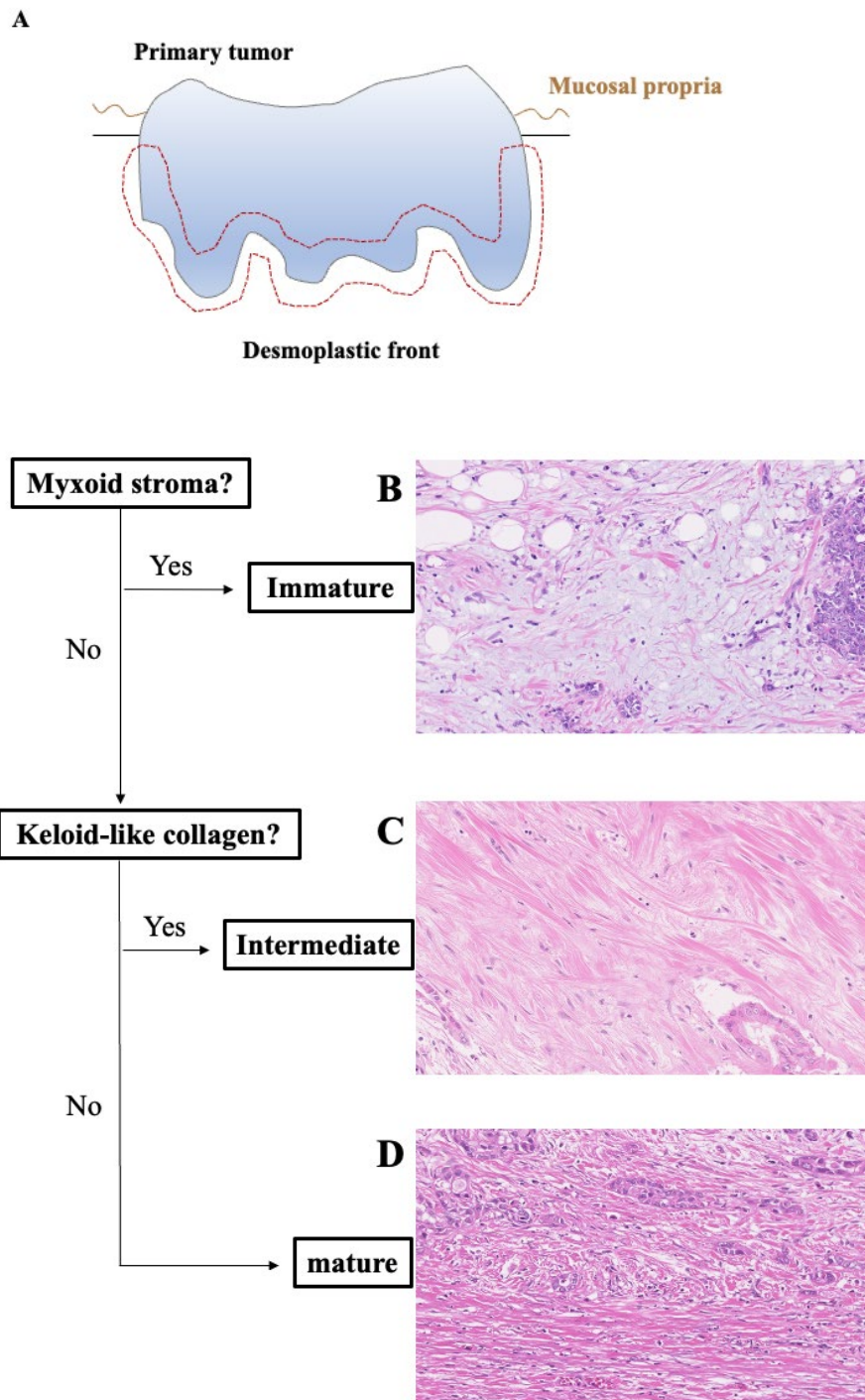


図 5. DR 分類のフローチャート

A: 腫瘍先進部組織学的シェーマ。先進部における間質（点線）を観察する。

B: Immature category (myxoid stroma)

C: Intermediate category (keloid-like collagen)

D: mature category

Tumor budding の評価方法

Tumor bud は脱分化した単一の癌細胞または 5 個以下の癌細胞からなる胞巣 (図 6) と定義されている (Ueno et al, 2002; Ueno et al, 2004)。Tumor buds は EMT の形態学的表現型であると報告されており ((Prall, 2007; Karamitopoulou, 2013; Grigore et al, 2016)、当教室の先行研究においては、EHCC の腫瘍先進部の 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ている (Ogino et al, 2019)。

DR 分類と tumor buds の数との関連も検討し、計測には“the International Tumor Budding Consensus Conference measurement method”を用いた (Lugli et al, 2016)。腫瘍先進部を対物レンズ 10 倍でスキャンし“hotspots”を同定し、その視野において対物 20 倍レンズで tumor buds 数を計測した。分類に関しては、所属する研究グループの既存の研究 (Ogino et al, 2019) に基づき、0-4 個の tumor buds は low-grade、5 個以上は high-grade として分類した。

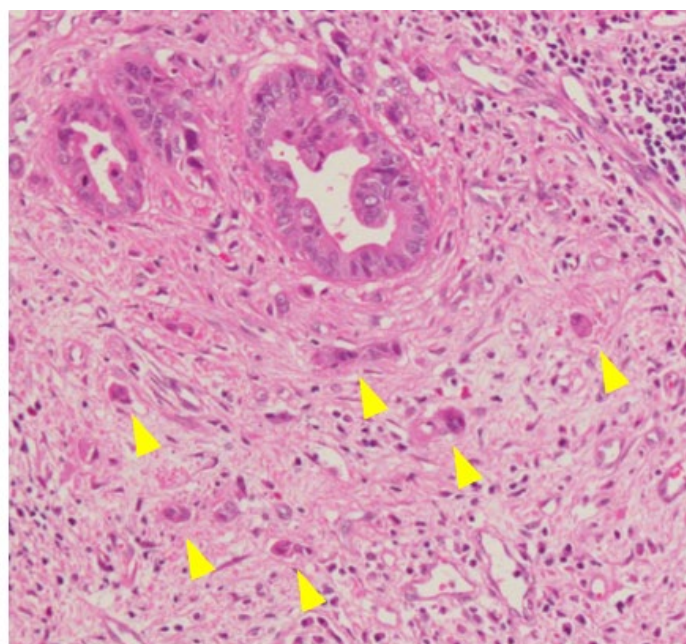


図 6. Tumor budding 評価

Tumor buds は脱分化した単一の癌細胞または 5 個以下の癌細胞からなる胞巣と定義される (▲矢頭)。腫瘍先進部において“hotspot”を同定し、対物レンズ 20 倍で tumor buds 数を計測する。

DR 分類と筋線維芽細胞の分布パターンの関連性の評価方法

代表的な腫瘍促進的な CAFs のマーカーである α -SMA を識別することで、筋線維芽細胞の形態を持つ CAFs の同定を目的とした。

EHCC 患者の 191 症例の TMA 切片において DR 分類と抗 α -SMA 抗体によって同定された筋線維芽細胞の分布の関連を検討した。腫瘍先進部における筋線維芽細胞の局在パターンは、大腸癌で観察されたように“confined”と“pervasive”の 2 つに分類可能であった (Ueno et al, 2004)。“confined”とは腫瘍からの距離が離れるにつれて筋線維芽細胞の分布がまばらになるもの (Figure.3A)、“pervasive”とは腫瘍先進部において筋線維芽細胞が密集し、微慢性に分布するものと定義された (図 7)。

DR 分類と筋線維芽細胞の分布は同じ TMA 切片で染色を行なった HE 染色標本と抗 α -SMA 抗体染色を用いて評価した。

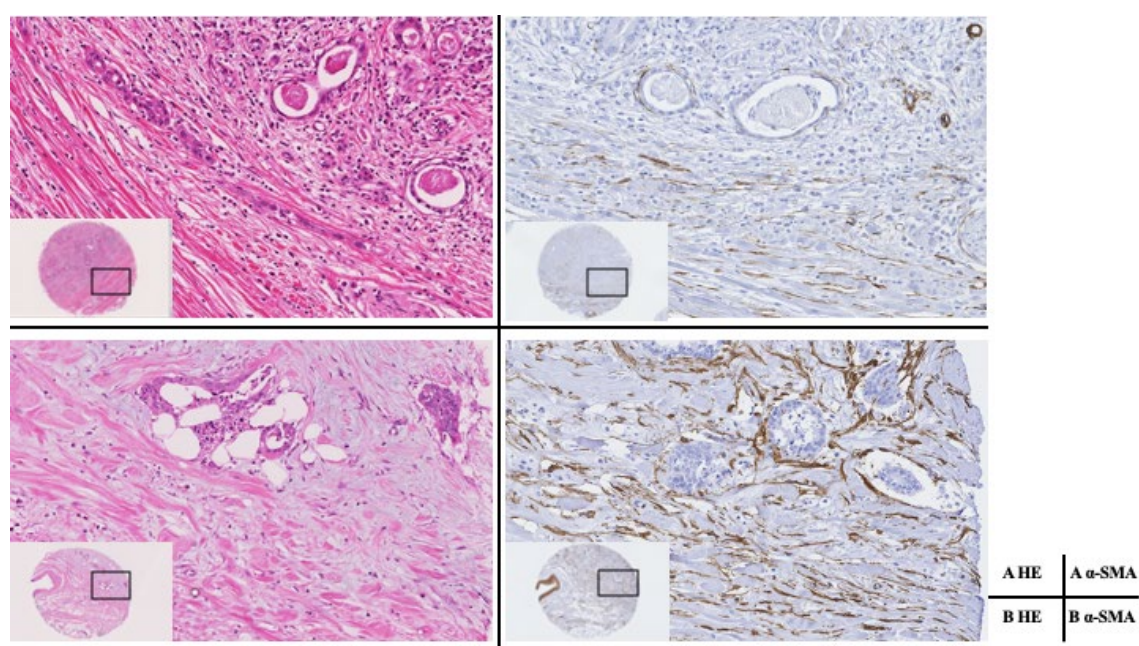


図 7. TMA 評価

A. Confined type: 抗 α -SMA 抗体染色陽性の筋線維芽細胞が腫瘍先進部にまばらに存在する。

B. Pervasive type: 抗 α -SMA 抗体染色陽性の筋線維芽細胞が腫瘍先進部に密にびまん性に存在する

術後フォローアップ

術後フォローアップとして、5 年間を目標に 3～6 ヶ月毎の通院を継続した。受診毎に造影 CT 検査を行った。本検討では最終フォローアップを 2021 年 3 月までとした。術後化学療法は当院では施行しなかったが、一部の症例はかかりつけ医との相談で術後化学療法が施行された。

生存解析と統計解析

PHCC および DCC 患者における DR 分類と臨床病理学的特徴との関連を解析した。DR 分類に従って、外科的切除後の全生存期間 (overall survival; 以下、OS と略記) と無再発生存期間 (recurrence free survival; 以下、RFS と略記) を推定した。OS は手術日を起点とし、いかなる原因でも死亡したものを発生例とし、観察期間終了まで生存していたものは打ち切り例とした。RFS は手術日を起点とし、再発が明らかになった時点、またはいかなる原因でも死亡した時点で発生例とし、観察期間終了時点で無再発生存であった場合を打ち切り例とした。

DR 分類の観察者内および観察者間の一致は、 κ 指数を用いて評価した。変数間の比較は、適宜、 χ^2 検定または Mann-Whitney U 検定を用いて行った。量的変数同士の比較においては Spearman's rank method、多群間の比較 (量的変数と質的変数の比較) の検討においては、分散分析 (ANOVA) を施行し、群間に有意差を認めた場合には、post-hoc pairwise t 検定を用いてそれぞれの群間の平均値の差を t 検定した。生存曲線は Kaplan-Meier 法を用いて推定し、各群間の比較は log-rank 検定を用いて検討した。単変量解析で有意性を示した予後因子は、その後多変量 Cox 比例ハザードモデルに導入し、独立予後規定因子の選択を行った。有意性の閾値は $p < 0.05$ とし、信頼区間は 95% とした。全ての統計解析は JMP ソフトウェア (SAS Institute Japan, Tokyo, Japan) を用いて行った。

結果

EHCC における DR 分類の観察者内・観察者間比較

DR 分類における観察者内および観察者間の症例一致数を表 2 に示す。観察におけるばらつきを示す κ 係数は、それぞれ観察者内 0.83、観察者間 0.75 / 0.83 であった。PHCC 症例の DR 分類は、mature (n=51、29.3%)、intermediate (n=63、36.2%)、immature (n=60、34.5%) であり、DCC 症例の DR 分類は、mature (n=39、35.8%)、intermediate (n=38、34.9%)、immature (n=32、29.3%) であった。PHCC 症例と DCC 症例では、DR 分類の分布に有意差は認められなかった ($p=0.4825$)。

表 2. 観察者内・観察者間比較

	症例一致数	κ 係数 (95% CI)
観察者内	259 / 283	0.83 (0.70-0.90)
観察者2	84 / 100	0.75 (0.63-0.86)
観察者3	89 / 100	0.83 (0.81-0.96)

DR 分類による臨床病理学的因子の比較

PHCC および DCC 両群において、DR 分類と、それぞれの臨床病理学的因子との検討を行った結果を表 3 および表 4 に示す。PHCC および DCC の両群において、DR 分類は pT 分類、静脈浸潤、神経周囲浸潤、局所リンパ節転移、および tumor budding grade と有意に関連していた。

表 3. PHCC における DR 分類と臨床病理学的因子との検討

		Desmoplastic reaction 分類			P値
		Mature (N=51) n (%)	Intermediate (N=60) n (%)	Immature (N=63) n (%)	
年齢 (歳)					0.179
	<70	22 (43.1)	38 (60.3)	33 (55.0)	
	≥70	29 (56.9)	25 (39.7)	27 (45.0)	
性別					0.872
	男性	36 (70.6)	46 (73.0)	45 (75.0)	
	女性	15 (29.4)	17 (28.3)	15 (23.8)	
組織学的グレード					0.117
	G1	21 (41.2)	14 (22.2)	13 (21.7)	
	G2	24 (47.1)	35 (55.6)	34 (56.6)	
	G3	6 (11.7)	14 (22.2)	13 (21.7)	
T 因子					<.0001
	T1	10 (19.6)	—	—	
	T2	37 (72.5)	40 (63.5)	42 (70.0)	
	T3	3 (5.9)	14 (22.2)	5 (8.3)	
	T4	1 (2.0)	9 (14.3)	13 (21.7)	
リンパ管侵襲 (Ly)					0.021
	なし	35 (68.6)	29 (46.0)	27 (45.0)	
	あり	16 (31.4)	34 (54.0)	33 (55.0)	
静脈侵襲 (V)					0.002
	なし	30 (58.8)	24 (38.1)	16 (26.7)	
	あり	21 (41.2)	39 (61.9)	44 (73.4)	
神経周囲侵襲 (Pn)					<.0001
	なし	19 (37.3)	6 (9.5)	5 (8.3)	
	あり	32 (62.7)	57 (90.5)	55 (91.7)	
領域リンパ節転移					<.0001
	N0	44 (86.3)	34 (54.0)	25 (41.7)	
	N1	6 (11.8)	28 (44.4)	29 (48.3)	
	N2	1 (1.9)	1 (1.6)	6 (10.0)	
Ttumor budding grade					<.0001
	Low-grade	22 (43.1)	11 (17.5)	6 (10.0)	
	High-grade	29 (56.9)	52 (82.5)	52 (90.0)	

表 4. DCC における DR 分類と臨床病理学的因子との検討

		Desmoplastic reaction 分類			P値
		Mature (N=39) n (%)	Intermediate (N=38) n (%)	Immature (N=32) n (%)	
年齢 (歳)					0.8126
	<70	18 (47.4)	19 (50.0)	14 (42.4)	
	≥70	20 (52.6)	19 (50.0)	19 (57.6)	
性別					0.1487
	男性	30 (79.0)	35 (92.1)	25 (75.8)	
	女性	8 (21.0)	3 (7.9)	8 (24.2)	
組織学的グレード					0.0262
	G1	20 (52.6)	10 (26.3)	6 (18.2)	
	G2	14 (36.9)	23 (60.5)	23 (69.7)	
	G3	4 (10.5)	5 (13.2)	4 (12.1)	
T 因子					<.0001
	T1	20 (52.6)	10 (26.3)	6 (18.2)	
	T2	14 (36.9)	23 (42.1)	23 (69.7)	
	T3	4 (10.5)	6 (15.8)	4 (12.1)	
リンパ管侵襲 (Ly)					0.6752
	なし	19 (48.7)	15 (39.5)	13 (39.4)	
	あり	20 (51.3)	23 (60.5)	20 (60.6)	
静脈侵襲 (V)					0.0021
	なし	26 (66.7)	17 (44.7)	8 (25.0)	
	あり	13 (33.3)	21 (55.3)	24 (75.0)	
神経周囲侵襲 (Pn)					<.0001
	なし	16 (41.0)	3 (7.9)	1 (3.1)	
	あり	23 (59.0)	35 (92.1)	31 (96.9)	
領域リンパ節転移					<.0001
	N0	34 (87.2)	18 (47.4)	11 (34.4)	
	N1	4 (10.3)	19 (50.0)	16 (50.0)	
	N2	1 (2.5)	1 (2.6)	5 (15.6)	
Tumour budding grade					0.001
	Low-grade	18 (46.2)	6 (15.8)	4 (12.5)	
	High-grade	21 (53.8)	32 (84.2)	28 (87.5)	

EHCC における DR 分類と筋線維芽細胞の関係の検討

DR 分類と筋線維芽細胞の局在パターンとの関連を表 5 に示す。筋線維芽細胞の局在パターンは DR 分類間で有意差を認めた。“mature”と分類された 51 症例のうち 43 症例 (84.3%) は筋線維芽細胞の分布が“confined type” (まばらに存在) であった。一方で、“immature”と分類された 45 症例においては筋線維芽細胞が“pervasive type” (密にびまん性に存在) であった。 χ^2 検定で“mature”と“intermediate”の比較では $p < 0.001$ 、“intermediate”と“immature”の比較では $p < 0.001$ と有意差を認めた。

表 5. DR 分類と筋線維芽細胞の関係の検討

Type of DR	Distribution patterns of myofibroblast		
	Total	Confined	Pervasive
	No. of patients (%)		
Mature	51 (100%)	43 (84.3)	8 (15.7)
Intermediate	95 (100%)	41 (43.2)	54 (56.8)
Immature	45 (100%)	0 (0)	45 (100)
Total	191 (100%)	84	107

EHCC における DR 分類を用いた予後の層別化

PHCC および DCC 患者の術後の全生存期間(overall survival: 以下、OS と略記) と無再発生存期間(relapse free survival: 以下、RFS と略記) に対する臨床病理学的因子の影響に関する単変量と多変量解析の結果を表 5 と表 6 に示す。

PHCC 174 症例 (表 6, 表 7, 図 8) において DR 分類毎の、生存期間中央値は “mature” で 10.4 年、“intermediate” で 5.0 年、“immature” で 2.3 年であり、単変量解析で mature vs intermediate ; $p=0.0009$ 、intermediate vs immature ; $p<0.001$ と有意差を認めた。RFS の生存期間中央値が “mature” で not reach、“intermediate” で 2.7 年、“immature” で 0.9 年と成熟度が低いほど予後が不良であり、単変量解析で mature vs intermediate ; $p<0.001$ 、intermediate vs immature ; $p<0.001$ であった。

DCC 109 症例 (表 8, 表 9, 図 9) においては、OS の中央値が “mature” で not reach、“intermediate” で 4.0 年、“immature” で 2.4 年と短縮しており、単変量解析で OS mature vs intermediate ; $p<0.001$ 、intermediate vs immature ; $p=0.0072$ と有意差を認めた。RFS では生存期間中央値が “mature” で not

reach、“intermediate”で 2.4 年、“immature”で 1.0 年と成熟度が低いほど予後が不良であり、単変量解析で mature vs intermediate ; $p<0.001$ 、intermediate vs immature ; $p=0.003$ であった。

DR 分類は術後 OS と RFS の両者を層別化することができ、多変量解析において独立した予後因子として選択されていた。

表 6. PHCC の全生存率に関する予後規定因子の検討

		症例数 n (%)	単変量 生存期間中央値(年)	P値	多変量 相対危険度 (95% CI)	P値
年齢 (歳)				0.911		
	<70	93 (53.4)	4.6			
	≥70	81 (46.6)	4.1			
性別				0.450		
	男性	127 (73.0)	4.2			
	女性	47 (27.0)	4.6			
組織学的グレード				0.053		
	G1	48 (27.6)	5.1			
	G2	93 (53.4)	4.4			
	G3	33 (19.0)	2.5			
T 因子				<.0001		0.107
	T1	10 (5.8)	10.0		1	
	T2	119 (68.4)	4.7		1.22 (0.39-3.74)	
	T3	22 (12.6)	3.7		1.51 (0.43-5.28)	
	T4	23 (13.2)	1.9		2.30 (0.66-7.93)	
リンパ管侵襲 (Ly)				0.447		
	なし	91 (52.3)	4.7			
	あり	83 (47.7)	3.8			
静脈侵襲 (V)				0.115		
	なし	70 (40.2)	5.0			
	あり	104 (59.8)	3.8			
神経周囲侵襲				0.003		0.865
	なし	30 (17.2)	6.2		1	
	あり	144 (82.8)	3.8		1.18 (0.65-2.13)	
領域リンパ節転移				<0.001		0.026
	N0	103 (59.2)	6.9		1	
	N1	63 (36.2)	2.6		1.48 (1.01-2.17)	
	N2	8 (4.6)	1.9		2.46 (1.13-5.36)	
Tumour budding grade				0.001		0.125
	Low-grade	39 (22.4)	10.0		1	
	High-grade	135 (77.6)	2.6		1.46 (0.89-2.38)	
間質線維反応 (DR) 分類				<0.001		<0.001
	mature	51 (29.3)	10.4		1	
	intermediate	63 (36.2)	5.0		1.77(1.05-2.99)	
	immature	60 (34.5)	2.3		4.07 (2.36-7.00)	

表 7. PHCC の無再発生存率に関する予後規定因子の検討

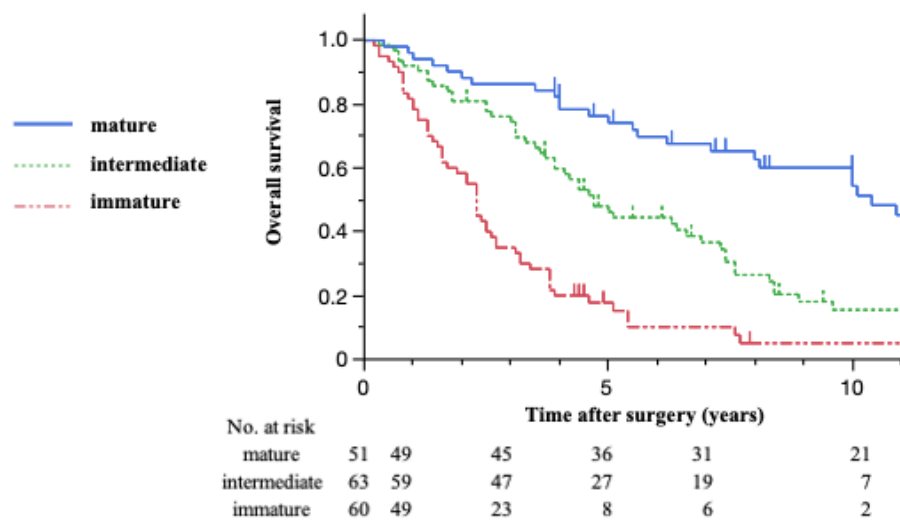
		症例数	単変量		多変量	
		n (%)	生存期間中央値(年)	P値	相対危険度(95% CI)	P値
年齢 (歳)				0.502		
	<70	93 (53.4)	2.2			
	≥ 70	81 (46.6)	2.6			
性別				0.220		
	男性	127 (73.0)	2.1			
	女性	47 (27.0)	2.7			
組織学的グレード				0.247		
	G1	48 (27.6)	3.6			
	G2	93 (53.4)	2.1			
	G3	33 (19.0)	1.8			
T 因子				<.0001		0.378
	T1	10 (5.8)	8		1	
	T2	119 (68.4)	2.8		1.24 (0.33-4.60)	
	T3	22 (12.6)	2.2		1.35 (0.31-5.80)	
	T4	23 (13.2)	0.9		1.86 (0.44-7.91)	
リンパ管侵襲 (Ly)				0.111		
	なし	91 (52.3)	3.3			
	あり	83 (47.7)	1.8			
静脈侵襲 (V)				0.154		
	なし	70 (40.2)	3.6			
	あり	104 (59.8)	1.9			
神経周囲侵襲 (Pn)				0.035		0.485
	なし	30 (17.2)	4.9		1	
	あり	144 (82.8)	2.1		0.81 (0.45-1.45)	
領域リンパ節転移				<0.001		0.002
	N0	103 (59.2)	5.0		1	
	N1	63 (36.2)	1.2		1.65 (1.11-2.45)	
	N2	8 (4.6)	0.7		3.49 (1.56-7.81)	
Ttumour budding grade				0.0056		0.706
	Low-grade	39 (22.4)	8.0		1	
	High-grade	135 (77.6)	2.0		1.10 (0.65-1.87)	
間質線維反応 (DR) 分類				<0.001		<0.001
	mature	51 (29.3)	N.R		1	
	intermediate	63 (36.2)	2.7		3.09 (1.65-5.77)	
	immature	60 (34.5)	0.9		8.76 (4.57-16.81)	

表 8. DCC の全生存率に関する予後規定因子の検討

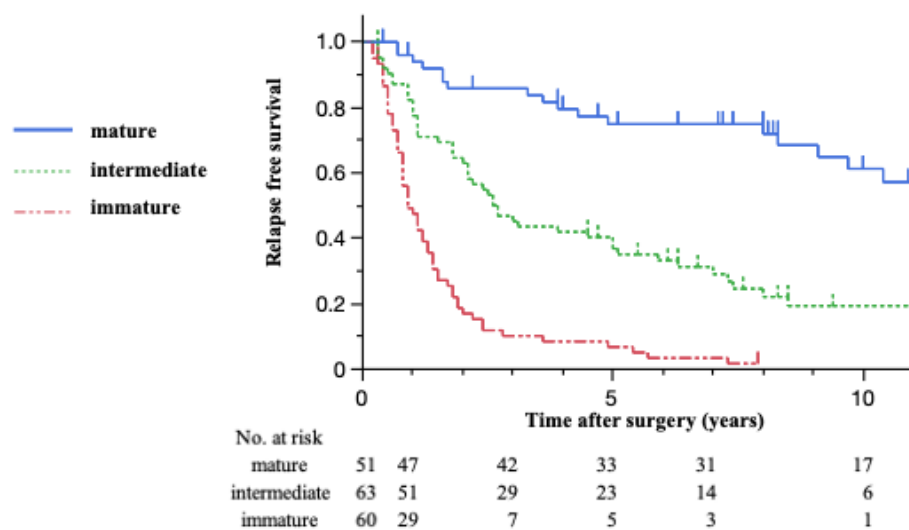
		症例数 n(%)	単変量		変量	
			生存期間中央値 (年)	P値	相対危険度(95% CI)	P値
年齢 (歳)	<70	51 (56.8)	5.3	0.127		
	≥70	58 (53.2)	3.7			
性別	男性	90 (82.6)	4.4	0.820		
	女性	19 (17.4)	3.1			
組織学的グレード	G1	36 (33.0)	6.0	0.055		
	G2	60 (55.0)	3.6			
	G3	13 (12.0)	5.6			
T 因子	T1	38 (34.9)	7.0	0.003	1	0.844
	T2	54 (49.5)	3.5		1.12 (0.54-2.32)	
	T3	17 (15.6)	2.1		1.32 (0.50-3.43)	
リンパ管侵襲 (Ly)	なし	47 (43.1)	5.7	0.140		
	あり	62 (56.9)	3.3			
静脈侵襲 (V)	なし	51 (46.8)	5.8	0.013	1	0.527
	あり	58 (53.2)	3.2		1.19 (0.68-2.07)	
神経周囲侵襲 (Pn)	なし	20 (18.3)	N.R	0.046	1	0.207
	あり	89 (81.7)	4.0		0.54 (0.21-1.40)	
領域リンパ節転移	N0	63 (57.8)	6.0	<0.001	1	0.688
	N1	39 (35.8)	2.1		1.31 (0.70-2.45)	
	N2	7 (6.4)	2.8		1.15 (0.43-3.08)	
Tumour budding grade	Low-grade	28 (25.6)	8.0	0.0169	1	0.598
	High-grade	81 (74.3)	3.6		1.21 (0.58-2.50)	
間質線維反応 (DR) 分類	mature	39 (35.8)	N.R	<0.001	1	0.0002
	intermediate	38 (34.9)	4.0		4.01 (1.70-9.48)	
	immature	32 (29.3)	2.4		6.83 (2.75-16.9)	

表 9. DCC の無再発生存率に関する予後規定因子の検討

		症例数	単変量		多変量	
		n(%)	生存期間中央値 (年)	P値	相対危険度(95% CI)	P値
年齢 (歳)				0.649		
	<70	51 (56.8)	2.7			
	≥ 70	58 (53.2)	3.3			
性別				0.582		
	男性	90 (82.6)	2.8			
	女性	19 (17.4)	5.1			
組織学的グレード				0.161		
	G1	36 (33.0)	5.3			
	G2	60 (55.0)	2.4			
	G3	13 (12.0)	1.7			
T 因子				0.004		0.257
	T1	38 (34.9)	9.4		1	
	T2	54 (49.5)	2.6		0.60 (0.39-1.21)	
	T3	17 (15.6)	1.1		0.88 (0.37-2.10)	
リンパ管侵襲 (Ly)				0.056		
	なし	47 (43.1)	5.0			
	あり	62 (56.9)	1.7			
静脈侵襲 (V)				0.007		0.974
	なし	51 (46.8)	5.0		1	
	あり	58 (53.2)	1.9		1.00 (0.41-1.74)	
神経周囲侵襲 (Pn)				0.001		0.666
	なし	20 (18.3)	N.R		1	
	あり	89 (81.7)	2.5		1.28 (0.41-3.98)	
領域リンパ節転移				<0.001		0.380
	N0	63 (57.8)	5.4		1	
	N1	39 (35.8)	1.1		1.36 (0.74-2.51)	
	N2	7 (6.4)	0.9		1.79 (0.70-4.58)	
Tumour budding grade				0.0006		0.297
	Low-grade	28 (25.6)	13.0		1	
	High-grade	81 (74.3)	1.9		1.52 (0.68-3.38)	
間質線維反応 (DR) 分類				<0.001		<0.001
	mature	39 (35.8)	N.R		1	
	intermediate	38 (34.9)	2.4		5.53 (2.12-12.91)	
	immature	32 (29.3)	1.0		10.32 (3.83-27.78)	



(A) PHCC



(B) PHCC

図 8. Desmoplastic reaction 分類による生存解析

(A) Perihilar cholangiocarcinoma (PHCC) の全生存期間 (overall survival)

(B) Perihilar cholangiocarcinoma (PHCC) の無再発生存期間 (recurrence free survival)

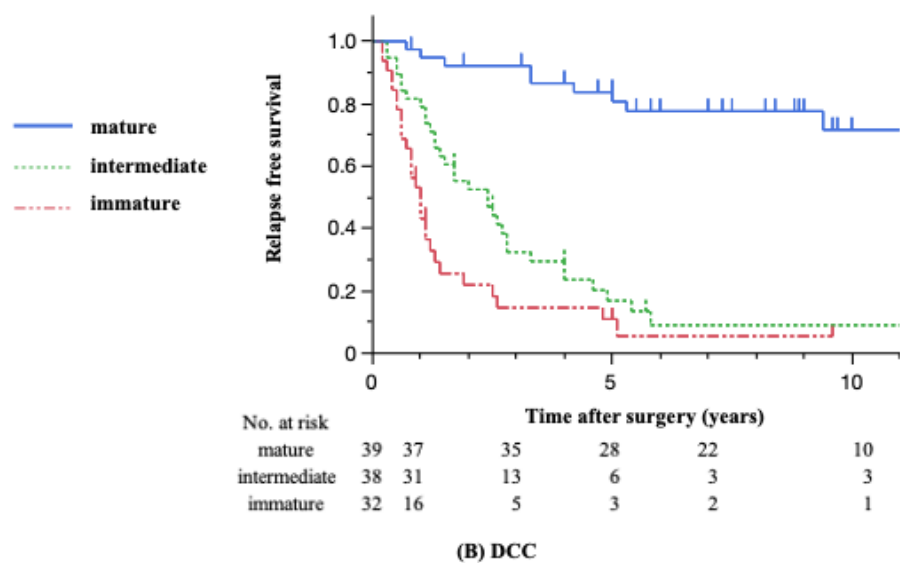
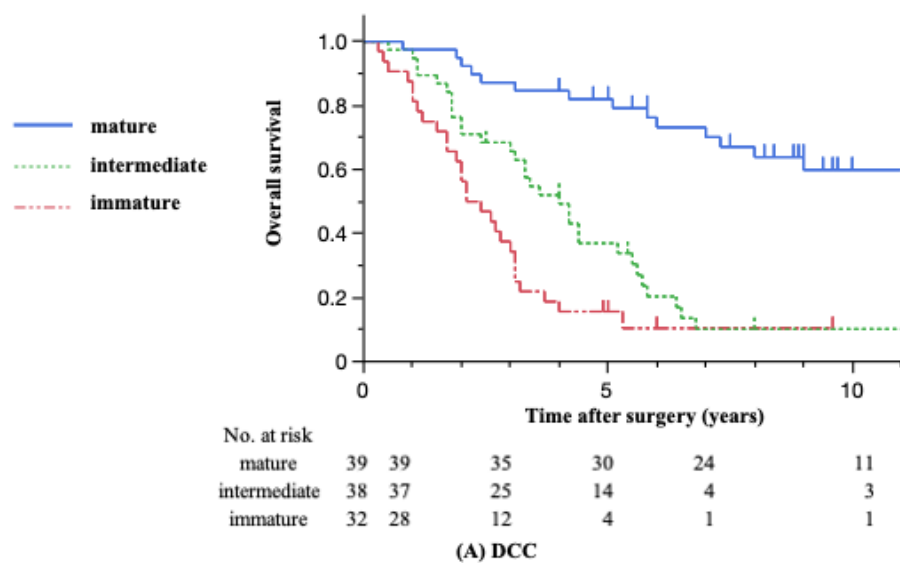


図 9. Desmoplastic reaction 分類による生存解析
 (A) Distal cholangiocarcinoma (DCC) の全生存期間 (overall survival)
 (B) Distal cholangiocarcinoma (DCC) の無再発生存期間 (recurrence free survival)

考察

上皮系由来の癌が増大、浸潤、転移をきたす際には癌細胞が基底膜を破壊し間質へ浸潤する必要がある。癌細胞の浸潤は、間質内の ECM を介して移動し、リンパ管や脈管に侵入し、所属リンパ節、遠隔臓器へと移動する (De Smedt et al, 2016)。その際には、様々なサイトカイン、ケモカイン、増殖因子が放出され、腫瘍微小環境の再構築が生じている。間質の形態学的変化の一つとして DR があり、この DR の形態学的分類は腫瘍微小環境の解明に寄与すると考えられる。DR は、浸潤および転移プロセスの解明のために、主に大腸がんで予後因子として研究・報告がなされている。本研究は DR の形態学的分類に着目し、その変化に伴う臨床病理学的因子、ならびに予後との関係を検討したものである。さらに腫瘍微小環境の変容に影響を与えるとされている CAFs の代表的マーカーの一つである、 α -SMA の分布に関しても検討した。

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、その中でも本研究の対象となる EHCC は既報にある大腸癌と同様に管腔の上皮原発の悪性腫瘍であることから、腫瘍先進部で DR の形態学的分類を評価・検討することで、実臨床で予後予測因子となり得る可能性があるかと予測された。実際に、EHCC 患者における病理学的 DR 分類の報告はこれまでになく、本研究の中で DR 分類の観察者内および観察者間の検討において、3 人の観察者間で高い再現性 (κ 統計量 = 0.83) と一致性 (κ 統計量 = 0.83) が確認された。このことから、DR 分類は EHCC 患者の標本においても適応可能であることが示された。EHCC の手術検体においても適応可能と考えられたため、PHCC と DCC の 2 群において、DR 分類と臨床病理学的因子との関連、および術後予後に及ぼす影響を解析した。

DR 分類と臨床病理学的因子の特徴は両群で一貫しており、“immature type” は“mature type”よりも進展能・深達度 (pT grade) が高く、神経周囲浸潤、静脈浸潤、リンパ節転移率も高率に見られ、tumor budding の数とも関連していることが明らかになった。この一貫した所見は、腫瘍先進部にける腫瘍間質の形態学的変化が“mature”から“intermediate”および“immature”にかけて aggressive な腫瘍の性質を反映していることを示唆していると考えている。生存期間分析においても、DR 分類は OS および RFS の両方で層別化することで可能であり、独立した予後因子であった。

DR 分類は術後予後を層別化することができ、PHCC および DCC 患者における独立した予後因子である。さらに、DR 分類は筋線維芽細胞の分布パターンと関

連していた。本研究デザインが後方視的であったため、各患者において再発後に実施された治療法に差異があることは考慮しなくてはならない。しかしながら、PHCC 群と DCC 群の両方で OS と RFS は“mature”から“intermediate”および“immature”にかけて短縮していくという一貫した所見が得られたことから、DR 分類は EHCC 患者群において新しいバイオマーカーであることが示唆された。加えて、DR 分類を検討するにあたり、必要となるのは通常の手術検体の HE 染色標本のみであり、簡便な手法であると言える。

さらに、臨床病理学的因子の検討においては、“intermediate type”と“immature type”の群の間にほとんど差は見られなかったが、“immature type”群では“intermediate type”群に比べて術後予後が不良となっており、EHCC 患者の予後不良となる、腫瘍進展を促進する因子が“immature type”群の腫瘍微小環境内に存在する可能性があると考えられた。この点に関して、Ueno らは“immature type”は“intermediate / mature type”と比較し hypovascularity であり、免疫細胞の分布も少なく、腫瘍周囲の細胞外基質が豊富であると報告しており (Ueno et al, 2015; Ueno et al, 2017)、今後 EHCC においても免疫細胞の分布との関連を検討する必要がある。

本研究において、DR 分類を用いた形態学的な分類が可能であったが、この形態的な特徴の差異が生じる背景としては、CAFs を主体とした ECM 再構築時の分子制御機構の差が DR の形態学的な多様性として反映されている可能性が考えられる。本研究で DR 分類と CAFs (α -SMA 陽性)の分布パターンの間に有意な関連を示しており、“mature type”の 84%では分布が“Confined type”であり、対照的に“immature type”では全て“pervasive type”であった。CAFs は先に述べたように腫瘍の浸潤転移、増殖などに関与している (Kobayashi et al, 2019; Joshi RS et al, 2021)。今回、 α -SMA 陽性 CAFs である myCAFs に関して、TMA を用いた CAFs 標識の検討から腫瘍微小環境における myCAFs の量および分布の差異が DR 分類の群間で予後の際に関連している可能性がある。本研究では、“mature type”以外の“intermediate type”と“immature type”両群における EHCC 患者の低い生存率と DR 分類と腫瘍の悪性度に関連する分子学的基盤に関する研究は行っていない。

大腸癌において CAFs から産生される ADAMs に着目した研究がなされている。大腸癌より採取した CAFs のうち、immature type の DR を呈する症例から採取したものでは、mature type の DR を呈する症例のものより、ADAM9 の発現が増強しているという結果であった。直接的に腫瘍増殖に与える影響も評価されており、癌細胞との共培養によって immature type の DR から採取された CAFs との培養群で有意に増殖が促進される結果であった (Ao et al, 2022)。

原発性大腸癌の切除後、肝転移をきたした症例の DR 分類は原発部位の DR 分類と正の相関を示す報告がある (Ao et al, 2019)。原発腫瘍の DR 分類が術後予後因子としてのバイオマーカーとなるだけではなく、さらなる分子生物学的な探究により、初回治療への応用の可能性、生検検体における術前情報として治療方針の決定に使用できる可能性、再発に対する治療戦略の立案に活用できる可能性がある。

大腸癌において、癌細胞が粘膜筋板を越えて粘膜下層に浸潤すると先進部付近の粘膜下層に DR の発現を認めるようになり (Martin et al, 1996; Nishigami et al, 2000; Watanabe et al, 2005)、癌の浸潤に伴い進展し腫瘍の表層に及ぶようになる。そのため、表層部で腫 DR の発現を認めた場合には粘膜下層への浸潤を疑うと報告されている (Nishigami et al, 2000)。しかしながら、大腸癌で DR の発現がリンパ節転移の予測因子となり得る可能性があるとの研究報告があり、切除標本での DR の発現が表層まで認められる場合には、生検組織標本においても約半数で DR の発現を確認できたとされている。そのため複数個の生検を行うことで、DR の発現についての評価精度を上げることができると報告されている (Watanabe et al, 2005)。しかしながらこの検討においては DR の形態学的分類には言及されてはいない。

EHCC においては、大腸癌と比較して生検が難しく、現在の技術では先進部の検体を確保できない可能性が高い。前述したように大腸癌においては DR の存在は、リンパ節転移の予測因子となり得る可能性が示唆されているが、DR の形態学的分類との関連についての報告はない。今後、EHCC の生検組織標本での DR の発現および形態学的分類、切除標本における DR の形態学的分類との比較検討によって、治療方針の確立に寄与する可能性がある。

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ろ向き研究であり、症例数が限定的である。しかしながら、PHCC は高度な手術手技および慎重な周術期管理を要することから、治療可能な施設が限定的であり、単一施設の研究としても一定の意義は有すると考えている。

第二の制約は、CAFs の分布の検討においては代表的マーカーである α -SMA のみで評価を行っていることである。前述したように他の CAFs の亜集団を標識するマーカーとしては他にも報告があり、腫瘍に対して促進的、抑制的に働くマーカーの探索および分布様式の検索を行うことで、より線維化の形態を詳細に検討できる可能性がある。一例として、膵癌で腫瘍抑制的に働く CAFs のマーカーとして meflin が報告されている (Maeda et al, 2016)。腫瘍抑制的に働く CAFs

と促進的に働く CAFs、他の亜集団である iCAFs や apCAFs の分布や量、割合などを詳細に検討することが、腫瘍間質における CAFs の役割や腫瘍進展に対する影響を検討する上で必要であると考ええる。

第三に、癌微小環境の変容の過程で CAFs によって産生される液性因子(図 3)、TGF- β 、IL-6、L-11、CXCL7、といったサイトカイン・ケモカイン、前述した MMPs や ADAMs などの質・量などの検討が行われておらず、CAFs の分布だけではなく、CAFs が周囲に与える影響についても検討することが今後の検討課題である。

DR に関連する線維芽細胞の分類、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。

総括および結論

① 本研究から得られた新知見

1. EHCC の切除標本を用いた臨床病理学的な検討において、腫瘍先進部における DR の形態学的分類が可能であった。
2. DR 分類では、未成熟な群であるほど、有意に OS および RFS が低く、多変量解析においても AJCC の 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. DR 分類毎に線維芽細胞の分布に差異が認められた。

② 新知見の意義

本研究は PHCC および DCC において DR 分類と予後、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。EHCC において予後予測因子となり得る可能性が示唆された。また、DR 分類毎に CAFs のマーカーの一つである、 α -SMA において分布形態に差異を認め、DR の形態変化に関与していることが示唆された。

③ 本研究で得られた新知見から今後どのような研究が展開され得るか

DR type 毎に CAFs の分布の種類・量および間質におけるサイトカインやケモカインといった液性因子の検討を加えることで、腫瘍浸潤、転移の抑制につながる因子の検討や治療標的となり得る分子の同定つながる可能性がある。生検組織検体での DR の発現・分類の検討、切除標本との DR 分類との比較検討を行うことで、生検検体から予後予測および初回治療の方針決定に寄与する可能性がある。

④ 今後の課題

本研究の課題として、単施設のみの症例での検討であり、症例数が限定的であったことが挙げられる。今後、より大規模な多施設共同での研究が望まれる。さらに、切除標本のみの DR の発現・形態学的分類の検討であり、生検組織検体への DR 分類の応用可能性に関して、比較検討を行う必要があると考える。加えて、今回 CAFs のマーカーの検討を α -SMA の 1 種類のみで施行しており、抑制的 CAFs のマーカーと報告されている meflin、他の亜集団である iCAF や apCAF を標識するマーカーなど、他の分子を用いた検討も必要である。加えて腫瘍間質における CAFs の役割を検討する上では、DR type 毎の CAFs や、細胞株を用いて、CAFs の種類、ECM 構成分子（I 型・V 型コラーゲンやフィブ

ロネクチン、テネイシン C など)の質的・量的差異や、ECM の変化に寄与する分子生物学的制御機構の差異を検討することも必要であると考える。

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 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、北海道大学病院病理部 我孫子 光春 主任技師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ありません。

引用文献

Akatsu Y, Takahashi N, Yoshimatsu Y, Kimuro S, Muramatsu T, Katsura A, Maishi N, Suzuki H, Inazawa J, Hida K, et al (2021) Fibroblast growth factor signals regulate transforming growth factor-beta induced endothelial-to-myofibroblast transition of tumor endothelial cells via Elk1. *Mol Oncol* 13, 1706-1724.

Akimoto T, Takasawa A, Takasawa K, Aoyama T, Natsuura M, Tamate M, Iwasaki M, Habata S, Murakami T, Osanai M, et al (2022) Pathological classification of desmoplastic reaction is prognostic factor in cervical adenocarcinoma. *Med Mol Morphol* 55, 275-282.

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).

Ao T, Kajiwarra Y, Yonemura K, Shinto E, Mochizuki S, Okamoto K, Aosasa S and Ueno H (2019) Prognostic significance of histological categorization of desmoplastic reaction in colorectal liver metastases. *Virchows Arch* 475, 341-348.

Ao T, Mochizuki S, Kajiwarra Y, Yonemura K, Shiraishi T, Nagata K, Shinto E, Okamoto K, Nearchou IP, Shimazaki H, et al (2022) Cancer-associated fibroblasts at the unfavorable desmoplastic stroma promote colorectal cancer aggressiveness: Potential role of ADAM9. *Int J Cancer* 150, 1706-1721.

Blechacz B (2017). Cholangiocarcinoma: current knowledge and new developments. *Gut Liver*. 11, 13-26.

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.

Caligiuri G and Tuveson DA (2023) Activated fibroblasts in cancer: Perspectives and challenges. *Cancer cell*. 41, 434-449.

Chen X and Song E (2019) Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Drug Discov.* 18, 99-115.

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.

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.

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.

Elyada E, Boilisetty M, Laise P, Flynn WF, Courtois ET, Burkhart RA, Teinor JA, Belleau P, Biffi G, Lucito MS. et al (2019) Cross-Species Single-Cell Analysis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Reveals Antigen-Presenting Cancer-Associated Fibroblasts. *Cancer Discov* 9, 1102-1123.

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.

Huang H, Wang Z, Zhang Y, Pradhan RN, Ganguly D, Chandra R, Murimwa G, Wright S, Gu X, Maddipati R, et al (2022) Mesothelial cell-derived antigen-presenting cancer-associated fibroblasts induce expansion of regulatory T cells in pancreatic cancer. *Cancer Cell* 6, 656-673.

Hoehn, RS, Wima, K, Ertel AE, Meier A, Ahmad SA, Shah SA, Abbott DE (2015). Adjuvant chemotherapy and radiation therapy is associated with improved survival for patients with extrahepatic cholangiocarcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* 22, 1133-1139.

Jing Y, Han Z, Zhang S, Liu Y and Wei L (2011) Epithelial-Mesenchymal Transition in tumor microenvironment. *Cell Biosci.* 31, 1-29.

Joshi RS, Kanugula SS, Sudhir S, Pereira MP, Jain S and Aghi MK (2021) The Role of Cancer-Associated Fibroblasts in Tumor Progression. *Cancers (Basel)* 13.

Kalluri R and Zeisberg M (2006) Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 6, 392-401.

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

Kobayashi H, Enomoto A, Woods SL, Burt AD, Takahashi M and Worthley DL (2019) Cancer-associated fibroblasts in gastrointestinal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16, 282-295.

Kojima S, Hikasa T, Midorikawa R, Naito Y, Akiba J, Tanigawa M, Yano H, Akagi Y and Okuda K (2020) Prognostic Impact of Desmoplastic Reaction Evaluation for Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Anticancer Res* 40, 4749-4754.

Kouzu K, Nearchou IP, Kajiwarra Y, Tsujimoto H, Lillard K, Kishi Y and Ueno H (2022) Deep-learning-based classification of desmoplastic reaction on H&E predicts poor prognosis in oesophageal squamous cell carcinoma. *Histopathology* 81, 255-263.

Lavie D, Ben-Shmuel A, Erez N and Scherz-Shouval R (2022) Cancer-associated fibroblasts in the single-cell era. *Nat Cancer* 3, 793-807.

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.

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.

Maeda K, Enomoto A, Hara A, Asai N, Kobayashi T, Horinouchi A, Maruyama S, Ishikawa Y, Nishiyama T, Kiyoi H, et al (2016) Identification of Meflin as a Potential Marker for Mesenchymal Stromal Cells. *Sci Rep*, 6:22288.

Martin M, Pujuguet P and Martin F (1996) Role of stromal myofibroblasts infiltrating colon cancer in tumor invasion. *Pathol Res Pract*, 192, 712-717.

Mizuno T, Ebata T, Yokoyama Y, Igami T, Sugawara G, Yamaguchi J, Nagino M (2017). Adjuvant gemcitabine monotherapy for resectable perihilar cholangiocarcinoma with lymph node involvement: a propensity score matching analysis. *Surg. Today*. 47, 182-192.

Mizutani Y, Kobayashi H, Iida T, Asai N, Masamune A, Hara A, Esaki N, Ushida Ka, Mii S, Shiraki Y, et al (2019) Meflin-Positive Cancer-Associated Fibroblasts Inhibit Pancreatic Carcinogenesis. *Cancer Res* 79, 5367-5381.

Morine Y, Shimada M, Ikemoto T, Arakawa Y, Iwahashi S, Saito YU, Yamada S, Imura S (2017). Effect of adjuvant gemcitabine combined with low-dose 5-fluorouracil and cisplatin chemotherapy for advanced biliary carcinoma. *Anticancer Res*. 37, 6421-6428.

Murakami Y, Uemura K, Sudo T, Hashimoto Y, Nakashima A, Kondo N, Sakabe R, Ohge H, Sueda T (2011). Prognostic factors after surgical resection for

intrahepatic, hilar, and distal cholangiocarcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* 18, 651-658.

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.

Nakanishi Y, Okamura K, Tsuchikawa T, Nakamura T, Noji T, Asano T, Matsui A, Tanaka K, Murakami S, Ebihara Y, et al. (2020) Time to recurrence after surgical resection and survival after recurrence among patients with perihilar and distal cholangiocarcinomas. *Ann. Surg. Oncol.* 27, 4171-4180.

Nishigami T, Fukui S, Yamamura M, Satomi M and Uematsu K (2000) The significance of desmoplastic reaction in the diagnosis of submucosal invasive carcinoma of the colon and rectum. *ECC* 4, 177-185.

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, Mitsunashi 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.

Ohlund D, Elyada E and Tuveson D (2014) Fibroblast heterogeneity in the cancer

wound. *J Exp Med* 211, 1503-1523.

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.

Pan C, Luu S, Swallow C, Kirsch R and Conner JR (2022) Prognostic Significance of Tumour Budding and Desmoplastic Reaction in Intestinal-Type Gastric Adenocarcinoma. *Int J Surg Pathol* 31, 957-966

Polyak K and Weinberg RA (2022) 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 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..

Sahai E, Astsaturov I, Cukierman E, DeNardo DG, Egeblad M, Evans RM, Fearon D, Greten FR, Ni SR, Hunter T and Hynes RO, et al (2020) A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Cancer* 20, 174-186.

Sakai A, Nakashima Y, Miyashita Y, Ao T, Kimura Y, Shinto E, Oki E, Shimokawa M, Ueno H, Oda Y, et al (2021) Histological categorisation of the desmoplastic reaction is a predictor of patient prognosis in oesophageal squamous cell carcinoma. *Histopathology* 79, 219-226.

Sanegre S, Lucantoni F, Burgos-Panadero R, de La Cruz-Merino L, Noguera R and Alvaro Naranjo T (2020) Integrating the Tumor Microenvironment into Cancer Therapy. *Cancers (Basel)* 12.

Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E and Seiki M (1994) A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 370, 61-65.

Sato H and Takino T (2010) Coordinate action of membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) and MMP-2 enhances pericellular proteolysis and invasion. *Cancer sci* 101, 834-837.

Sato H, Hara T, Meng S, Tsuji Y, Arao Y, Saito YY, Sasaki K, Kobayashi S, Doki Y and Eguchi H, et al (2023) Multifaced roles of desmoplastic reaction and fibrosis in pancreatic cancer progression: Current understanding and future directions. *Cancer sci* 114, 3487-3495.

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.

Ueno H, Jones A, Jass JR and Talbot IC (2002) Clinicopathological significance of the 'keloid-like' collagen and myxoid stroma in advanced rectal cancer.

Histopathology 40, 327-334.

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, Jones AM, Wilkinson KH, Jass JR and Talbot IC (2004) Histological categorisation of fibrotic cancer stroma in advanced rectal cancer. Gut 53, 581-586.

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, Shinto E, Shimazaki H, Kajiwarra Y, Sueyama T, Yamamoto J and Hase K (2015) Histologic categorization of desmoplastic reaction: its relevance to the colorectal cancer microenvironment and prognosis. Ann Surg Oncol 22, 1504-1512.

Ueno H, Kanemitsu Y, Sekine S, Ishiguro M, Ito E, Hashiguchi Y, Kondo F, Shimazaki H, Mochizuki S, Kajiwarra Y, et al (2017) Desmoplastic Pattern at the Tumor Front Defines Poor-prognosis Subtypes of Colorectal Cancer. Am J Surg Pathol 41, 1506-1512.

Ueno H, Kajiwarra Y, Ajioka Y, Sugai T, Sekine S, Ishiguro M, Takashima A, Kanemitsu Y (2017) Histopathological atlas of desmoplastic reaction characterization in colorectal cancer. Jpn J Clin Oncol 51, 1004-1012.

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.

Watanabe T, Kasamaki S, Kawai K, Sasaki M, Matsuda M, Tomiki Y, Sakamoto K and Kamano T (2005) Clinical Significance of Tumor Surface Desmoplastic

Reaction as a Predictor of Lymph Node Metastasis in Colorectal Cancer with Submucosal Invasion. Jpn J gGastroenterol Surg 38, 1675-1683.