

形態診断と分子診断による肝細胞がんの個別的診断法の確立

《研究の概要》

本研究では、肝がんの病理学的多様性とその背景の分子基盤を解明することで、より正確な診断、悪性度診断を可能とすることを目的に、早期肝細胞がん診断の客観化に向けた形態学的指標と分子マーカーの開発、小型肝細胞がんにおける悪性度マーカーの検討と診断への応用、広義の混合型肝がんの病理学的特徴と分子基盤の解明につき研究を行った。プロテオーム解析を行い、早期肝細胞癌で有意にタリン-1の発現が上昇していることを見出した。タリン-1の発現は、肝細胞癌進展に伴い上昇することが示され、予後予測にも有用である可能性が示唆された。Biliary / stem cell marker 陽性の肝細胞癌、p53 陽性の肝細胞癌では、有意に悪性度が高く、線維性間質を有することが示された。またβ-catenin 陽性の肝細胞癌は悪性度や線維性間質との関連が明らかでなく、AFP 値、PIVKA 値との相関のみが見られた。これらの特徴を組み合わせることで、免疫組織学的なサブクラス分類の可能性が示唆された。CYFRA 値は、肝癌症例で、慢性肝障害症例に比して有意に高値であったが、腫瘍の結節数、サイズ、組織分化度、肝内転移や門脈侵襲の有無との相関はみられなかった。混合型肝癌を対象に、WHO2010 の分類による臨床病理学的解析を行った。Cholangiolocellular type が最も予後良好であり、unclassified type が最も予後不良であり、classical type と intermediate cell type は、前二者の中間で、ほぼ同等の悪性度と考えられた。非肝細胞癌領域の形態像は5型に亜分類でき、cholangiolocellular type では血管浸潤や肝内転移の頻度が他のグループよりも低く、充実・腺管状増殖を示す solid-tubular type または紡錘形細胞を伴う spindle type では浸潤・転移能が高く、術後生存率が極めて低いことがわかった。また cholangiolocellular → tubular → solid/solid-tubular/spindle type という順に、肝細胞癌成分が高分化→中分化→低分化と段階的に移行していく可能性が示唆された。さらに、肝細胞系、胆管系、ステム細胞系各マーカーの陽性率を検索するとともに、細胆管細胞癌の腺管サイズの検討を行い、診断的意義を検討した。これらの検討を元に、WHO2010 分類と、現行の日本肝癌取り扱い規約の混合型肝癌の分類が異なる事に関して議論を行い、より実用的で、臨床的にも意義のある細分類の方向性につき検討を行った。この検討結果は、取り扱い規約の改定に今後反映していくことを予定している。

坂元 亨宇	慶應義塾大学医学部 病理学教授	研究全体の立案、悪性度マーカーの解析
中沼 安二	金沢大学医学系研究科 形態機能病理学教授	混合型肝がんの解析
中島 収	久留米大学病院 中央臨床検査部教授	早期肝細胞がんの解析
近藤 福雄	帝京大学医学部 附属病院病理部部長	早期肝細胞がんの解析
相島 慎一	九州大学医学研究院 形態機能病理学准教授	混合型肝がんの解析

研究報告

I 研究目的

肝細胞がんの多くは肝炎ウイルスの持続感染による慢性障害肝を背景に生じるが、HCVからの発がんのリスクは肝硬変では年5～8%程度と極めて高い。このようなハイリスクグループの詳細な解析から、肝細胞がんの多くが、前がん病変の異型結節ないし血管新生を伴わない早期肝細胞がん、その脱分化過程に相当する結節内結節型の肝細胞がん、そして転移能を有する進行肝細胞がんへと多段階的に発生・進展することを、本申請の研究代表者ならびに共同研究者を中心とした多くの研究により示してきた。そして、わが国が中心となり、2009年のHepatology誌に「Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: a report of the international consensus group for hepatocellular neoplasia.」として早期肝細胞がんの定義が国際的なコンセンサスとして出版（代表研究者の坂元、共同研究者の近藤が参加）され、2010年出版のWHO分類第4版（坂元並びに共同研究者の中沼、中島が執筆者として参加）でも、このコンセンサスに基づく分類が採用された。このような成果は、画像診断や各種治療法の進歩とあいまって、より早期でのがんの診断と適切な治療法の選択に貢献してきている。しかし、実際の現場においては、特に形態学的な変化の少ない早期がんの正確な診断は困難なことが多く、より客観的な診断を可能とする形態的な指標や分子マーカーの確立が望まれている。さらには、小型のがんでありながら、悪性度の高いがんも少なからず経験され、そのようながんでは幹細胞マーカーが発現するものや肝内胆管がんとの境界的な性格を有する症例（広義の混合型肝がん）もあることが明らかになりつつある。本研究では、そのような肝がんの病理学的多様性とその背景の分子基盤を解明することで、より正確な診断、悪性度診断を可能とすることを目的とする。

II 研究計画および材料と方法

1. 早期肝細胞がん診断の客観化に向けた形態学的指標と分子マーカーの開発

1) 形態学的指標による早期診断

- ① 真の浸潤と偽浸潤における肝細胞ならびに周囲間質の詳細な解析
- ② 細胞運動性・浸潤の指標となる機能的マーカー分子（CAP2等）の発現と形態像と

の比較検討

③ 細胞密度、細胞異型、構造異型の画像定量解析と診断への応用

2) 分子マーカーによる早期診断

① 既に報告されている複数の分子マーカーの多施設共同での検討による有用性の詳細な評価

② 手術標本、生検標本における各マーカーの陽性率の検討に基づく、特異性の高いカットオフ値の検討

③ 感度・特異度を高めるマーカーの組み合わせの検討

④ 既に保有するマイクロアレイデータならびに新規の解析データに基づく、新規マーカーの更なる探索とその有用性の評価

2. 小型肝細胞がんにおける悪性度マーカーの検討と診断への応用

1) がん遺伝子・がん抑制遺伝子異常と悪性度

① 遺伝子変異の免疫組織学的評価による臨床病理学的検討

2) シグナル伝達異常と悪性度

① 細胞株を用いたシグナル伝達ネットワークの異常の解析

② ①にて同定された分子の臨床検体での評価

③ 分子標的薬剤の反応性とシグナル伝達異常との関連性の検討

3) 幹細胞マーカー発現と悪性度

① 幹細胞マーカーの発現と臨床病理学的意義の検討

② 各種幹細胞マーカーの発現パターンの解析と上記遺伝子変異・シグナル伝達異常との関連性の検討

3. 広義の混合型肝がんの病理学的特徴と分子基盤の解明

1) 中間型細胞・細胆管細胞・幹細胞成分の病理学的解析

① 超微形態像、細胞学的特徴、間質所見等から見た幹細胞様の特徴の解析

② 各種幹細胞マーカーの発現と上記形態所見との相関解析

③ 幹細胞様成分の割合と分布に基づく詳細な解析と臨床病理学的特性の比較に基づく、亜分類の意義の検討

2) 肝がん細胞株を用いた分化の多様性、いわゆる幹細胞集団の解析とその分子基盤

① ヒト肝がん由来の肝がん細胞株のパネルを用いた、各種分化マーカー、幹細胞マーカーの発現解析

② 上記マーカーによる分類と生物学的幹細胞性獲得の有無の解析

③ 各種幹細胞様細胞サブグループ間における特徴的な分子発現の解析、相互の移行の有無の解析と移行を制御するシグナル系の解析

④ ③で得られた成果の臨床検体での評価

III 研究成果・考察

1. 早期肝細胞癌マーカーの分子病理学的検討

肝細胞癌に対する生体肝移植手術 2 症例の摘出全肝から得られた 4 つの早期肝細胞癌結節および 4 つの非癌部肝組織片を使用した。各検体のトリプシンによる加水分解処理後のペプチド混合物に対して、二次元液体クロマトグラフィー (2DLC) - タンデム質量分析

(MS/MS) の手法を用いたプロテオーム解析を行い、取得した 2DLC・MS/MS データを基にデータベース検索によるペプチドの同定および肝細胞癌・非癌部間の差異の統計学的解析を行った。その結果、肝細胞癌で発現が上昇している 61 種の蛋白質が同定され、その 61 種の中に細胞骨格蛋白質であるタリン - 1 (talin-1) が含まれていた。肝細胞癌におけるタリン - 1 発現上昇というプロテオーム解析の結果を検証するために、106 個の肝細胞癌結節検体の抗タリン - 1 抗体による免疫組織化学的検索を行った。非癌部の肝細胞と比較し早期肝細胞癌で有意にタリン - 1 の発現が上昇していたこと ($p=0.003$) のみならず、タリン - 1 の発現が肝細胞癌の脱分化に伴い漸増していたこと ($p=0.001$) が判明した。低分化型肝細胞癌に関しては、タリン - 1 発現上昇を伴う癌細胞の結節内に占める割合が高いだけでなく、抗タリン - 1 抗体による細胞質の染まりが非常に強いことが多いのが特徴的であった。タリン - 1 発現上昇を伴う癌細胞数の割合が結節内全癌細胞数の 50% 以上の群と 50% 未満の群とに分け、臨床病理学的因子とタリン - 1 発現の関係について検討したところ、肝細胞癌の脱分化度は両群間で有意な差があった ($p=0.004$)。またタリン - 1 低発現群に比べ、高発現群において門脈浸潤を伴っている率が有意に高いことが判明した ($p=0.029$)。追跡が可能であった 72 人の肝細胞癌患者の無病生存期間について分析したところ、高発現群では有意に無病生存期間が短かったことが判明した ($p=0.039$)。本研究により、肝細胞癌進展に伴いタリン - 1 の発現が上昇することが明らかにされ、予後予測にも有用である可能性が示唆された。

2. 肝細胞癌における biliary / stem cell marker の発現

1) biliary / stem cell marker である CK19、EpCAM、CD133、癌抑制遺伝子である p53、癌遺伝子である β -catenin の肝細胞癌における発現および臨床病理学的な特徴に関する検討を行った。結果は CK19 陽性例が 12/211 例(5.6%)、EpCAM 陽性例は 25/211 例(11.8%)、p53 陽性例は 20/211 例(10.4%)、 β -catenin 陽性例は 18/211(8.5%)であった。臨床病理学的因子について検討したところ、CK19 陽性例では CK19 陰性例と比較して有意に、分化度が低く、門脈浸潤例が多く、線維性間質を有する症例が多かった。EpCAM 陽性例は EpCAM 陰性例に比べて有意に、分化度が低く、線維性間質を有する症例が多かった。p53 陽性例は p53 陰性例に比べ、分化度が低く、門脈浸潤が多く、線維性間質を有する症例が多かった。 β -catenin 陽性例は AFP、PIVKA 値が高いものが多かった。マーカー同士の関連に関しては、CK19 陽性例と EpCAM 陽性例、EpCAM 陽性例と p53 陽性例で有意な関連が見られた。予後に関しては、CK19 陽性例は CK19 陰性例と比べて、有意に再発率が高かったが ($p<0.05$)、生存率に関しては有意な差は見られなかった($p=0.185$)。EpCAM 陽性例、p53 陽性例および β -catenin 陽性例では陰性例と比べて、再発および生存率に関する有意な差は得られなかった。p53 陽性例に関しては再発例も多く見られたが、今回の検討では p53 陰性例に比べ、再発が有意に多いという結果は得られなかった。またウイルス学的背景因子との関連に関しては、CK19 陽性例および p53 陽性例では陰性例に比べて、HBs 抗原陽性のものが有意に多かった($p<0.05$)。いずれも HCV 抗体陽性率に関する相関は見られなかった。EpCAM 陽性例および β -catenin 陽性例では、HBs 抗原陽性率、HCV 抗体陽性率との相関はいずれも認めなかった。以上の検討から、Biliary / stem cell marker 陽性の肝細胞癌、p53 陽性の肝細胞癌では、有意に悪性度が高く、線維性間質を有することが示された。また β -catenin 陽性の肝細胞癌は悪性度や線維性間質との関連が

明らかでなく、AFP 値、PIVKA 値との相関のみが見られた。各 marker 間での関連は認めるものの、予後、ウイルス学的背景因子などに差異も認められることから、今後さらに悪性度に係わるマーカーに関して検討し、サブクラス分類との関連を検討する。

2) 腫瘍マーカーとしての CYFRA (CK19) の有用性を検討した。107 例の切除肝癌 (男 81、女 26)、年齢 ; 50 歳~97 歳 (平均 : 70.9±8.3 歳)、肝炎ウイルス ; HCV 関連 : 62、HBV 関連 : 16、NonBNonC:24、HBVHCV 関連 : 4 で検討した。腫瘍径は 7.8mm~132mm (平均 : 27.3±20.5mm) である。腫瘍マーカー ; AFP : 0.96-415132ng/ml (平均 4730±40465)、PIVKA-II : 5-75000AU/ml (平均 2902.8±9771.3)、CEA : 1.2-46ng/ml (平均 3.7±4.8)、CA19-9 : 1-125.7U/ml (平均 30.3±26.3)、CYF:2.6-26.7ng/mL (平均 7.06±4.12) であった。CYF 値と臨床背景の関では、性別とは関連ないが年齢が高くなるにしたがい CYF 値は上昇した (p=0.014)。肝炎ウイルスとの関連性はないが NonBNonC と比べて HBV では有意に低値であった (P=0.04)。腫瘍の結節数、サイズ、組織分化度、肝内転移や門脈侵襲の有無、背景肝組織状態 (慢性肝炎 or 肝硬変) 等との相関はみられなかった。CYF 値と各種腫瘍マーカーとの相関では、CYF 値と AFP、PIVKA-II、CEA、CA19-9 との間にはいずれも相関がみられなかった。約 30 名の担癌状態にない慢性肝障害 (慢性肝炎~肝硬変) 患者やコントロール患者について CYF 値を見た結果、肝癌患者と比較して有意差を持って低値であった。その推移をみた結果、ほとんどの症例が有意な上昇は示しておらず、引き続き経過を見る必要がある。これらの症例中には明らかな発癌症例は現時点では認めていない。AFP や PIVKA-II の動向と比較しながら CYF の動きを引き続き観察する予定である。

3. 混合型肝癌の形態診断と分子診断の確立

1) 肝切除 3200 例 (1986 年~2011 年に外科切除) より抽出した混合型肝癌 100 症例を対象として、①WHO2010 の分類、②非肝細胞癌領域の形態像による分類による臨床病理学的因子の比較を行った。①WHO2010 分類では Classical type 69 例、Cholangiolocellular type 8 例、Intermediate cell type 17 例、Unclassified type 6 例で、Ttypical subtype に該当する症例はなかった。Cholangiolocellular type が最も予後良好であり、Unclassified type が最も予後不良であり、Classical type と Intermediate cell type は cholangiolocellular type と unclassified type の間でほぼ同等の悪性度と考えられた。②非肝細胞癌領域の形態像は 5 型に亜分類でき、Cholangiolocellular type (n=25)、tubular type (n=14)、solid type (n=18)、solid-tubular type (n=33)、spindle type (n=10) であった。Cholangiolocellular type では血管浸潤や肝内転移の頻度が他のグループよりも低く、充実・腺管状増殖を示す solid-tubular type、または紡錘形細胞を伴う spindle type では浸潤・転移能が高く、術後生存率が極めて低いことがわかった。また cholangiolocellular → tubular → solid/solid-tubular/spindle type という順に、肝細胞癌成分が高分化→中分化→低分化と段階的に移行していく可能性が示唆された。二つの分類法において、WHO2010 による Cholangiolocellular type 8 例はすべて②の分類の Cholangiolocellular type であり、WHO2010 で分類できなかった Unclassified type 6 例も②の分類の Spindle cell type であった。また Typical subtype 該当症例はなかったものの、約 1/4 の症例では腫瘍内に部分的に観察された。

2) 混合型肝癌における 3 つの SC 亜型の発生頻度とその意義について臨床病理学的検討

を行った。対象は混合型肝癌 62 症例の外科切除材料。SC 亜型 (TS, INT, CLC)、肝細胞癌 (HCC)、胆管癌のそれぞれの成分の発生頻度を、粘液染色と免疫染色 (CK7、CK19、EMA、EpCAM、NCAM、AFP、Hep Par 1) の所見を参考に病理組織学的に評価した。混合型肝癌では全例で、様々な割合、組み合わせで SC 亜型成分を認めた。それぞれの亜型の頻度は、TS : 10(16.1%)、INT : 52 (83.9%) ; CLC : 44 (71%)であった。TS 成分の割合は炎症の程度と逆相関した ($p < 0.01$)。INT 成分の割合は併存する HCC の異型度、腫瘍径と相関した ($p < 0.01$)。一方、CLC 成分の割合は併存する HCC の異型度、腫瘍径と逆相関した ($p < 0.01$)。CLC 成分の割合は、線維化の程度、炎症細胞浸潤の程度と相関した ($p < 0.01$)。混合型肝癌の SC 亜型は、併存 HCC の異型度、腫瘍径、線維化、炎症細胞浸潤とそれぞれ異なる相関を示し、異なる臨床病理学的意義を持つ事が示唆された。

3) 肝切除 3200 例 (1986 年~2011 年) より抽出し、生命予後解析可能な混合型肝癌 90 症例を対象として、肝臓の Stem cell marker に関連のある分子「SALL4、OV6、EpCAM、NCAM、Oct3/4、Nanog」、肝細胞分化に関連する因子「AFP、Glypican3」を選び、免疫染色を施行した後、特に SALL4 発現に注目し、臨床病理学的因子・予後との関連を評価した。各マーカーの陽性率は高いものから順に「OV6(60%)、Glypican3(53%)、EpCAM(40%)、NCAM(32%)、SALL4(31%)、AFP(20%)、Oct3/4(1%)、Nanog(0%)」であり、各種マーカーの発現は予後や WHO 分類亜分類とは相関しなかった。SALL4 陽性群は HBsAg 陽性、血清 AFP 上昇と相関を認め、EpCAM、AFP、GPC3 発現と正の相関がみられた。SALL4 発現は胆管癌成分や分化不明瞭成分よりも HCC 成分に高く発現していた。他の原発性肝癌での SALL4 陽性率は肝芽腫 > HCC > 混合型肝癌 > 肝内胆管癌であった。これまで HCC において「HBx protein で EpCAM が活性化」「HCC で SALL4 陽性群は HBV 多く、EpCAM 陽性 cancer stem cell では SALL4 も活性化」との報告があり、SALL4 活性化には HBV が関与している可能性が示唆される。また SALL4 は AFP、GPC3 と正の相関があり、陽性率は「肝芽腫 > HCC > 混合型 > ICC」であることから肝細胞分化との関連が示唆される。HCC では SALL4 発現が予後因子との報告あるが、混合型肝癌では有意差がなく、混合型は悪性度のより高い胆管癌成分が関与し予後不良であるためかも知れない。ただし SALL4 は単独では予後因子となりえなかったが、今後治療標的の選択肢となる可能性が示唆された。

4) 肝細胞癌切除例の各腫瘍径群『I : -2.0cm(n=29) / II : 2.1-5.0cm(n=54) / III : 5.1cm-8.0cm(n=12)』における肝細胞マーカーの発現頻度は、AFP : 0% / 12.9% / 15.4% ; Hep Par 1 全例陽性。胆管細胞マーカーは「CK7 : 79.3% / 75.9% / 83.8% ; CK19 : 13.8% / 20.4% / 41.7% ; MUC1 : 6.9% / 12.9% / 50% ; EMA 腺腔膜側 : 10.3% / 40.7% / 58.3% ; EMA 細胞質 : 6.7% / 16.7% / 33.3% ; CEA 腺腔膜側 : 3.4% / 16.7% / 66.7% ; CEA 細胞質 : 0% / 12.9% / 50%に陽性」。肝幹細胞/前駆細胞マーカーは「c-Kit 全例陰性、CD56 : 3.4% / 7.4% / 33.3%に陽性」であった。各分化度『高(n=16)、中(n=75)、低(n=4)』におけるそれぞれの発現頻度は、「AFP : 0% / 10.7% / 25% ; Hep Par 1 全例陽性。CK7 : 87.5% / 80% / 25% ; CK19 : 18.8% / 20% / 50% ; MUC1 : 0% / 16% / 75% ; EMA 腺腔膜側 : 0% / 40% / 50% ; EMA 細胞質 : 0% / 17.3% / 50% ; CEA 腺腔膜側 : 0% / 22.7% / 25% ; CEA 細胞質 : 0% / 17.3% / 0% ; c-Kit 全例陰性。CD56 : 6.2% / 9.3% / 50%に陽性」であった。肝細胞癌において胆管細胞マーカー、肝幹/前駆細胞マーカーの発現を認めた。これらのマーカー

の発現頻度が I 群より II、III 群で、高分化より中、低分化で高くなる傾向を示したことより、腫瘍の増大と脱分化に伴う形質転換の可能性が示唆された。

5) 細胆管細胞癌の病理学的解析から発生母地の検討を行った。細胆管細胞癌の外径の平均値は $31.8\ \mu\text{m}$ で細胆管の平均値 $13.8\ \mu\text{m}$ よりはるかに大きく、小・小葉間胆管の平均値 $26.5\ \mu\text{m}$ と大・小葉間胆管の平均値 $65.0\ \mu\text{m}$ の間の値であった。また、細胆管細胞癌の内径の平均値は $9.3\ \mu\text{m}$ で、細胆管の平均値 $1.1\ \mu\text{m}$ よりはるかに大きく、小・小葉間胆管の平均値 $3.6\ \mu\text{m}$ と大・小葉間胆管の平均値 $24.7\ \mu\text{m}$ の間の値であった。細胆管細胞癌は、肝細胞マーカーHep Par1、AFP は陰性、かつ胆管細胞マーカーCK7、CK19 に高率陽性であり、胆管細胞の形質を有していた。MUC1 は低率だが陽性腺管があった。幹細胞／前駆細胞マーカーc-Kit 陽性は1.9%であり、細胆管47%よりはるかに低い値であった。EMA の細胞膜陽性所見は94.6%であり、細胆管100%と近い値であったが、小・小葉間胆管の93.2%の方により近い値であった。以上より、細胆管細胞癌の発生母地として、細胆管だけでなく小葉間胆管の可能性を追求する必要がある。

IV 研究成果の発表

1. Yamazaki K, Masugi Y, **Sakamoto M**. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma: Altering transforming growth factor- β signaling in hepatocarcinogenesis. **Digestive Diseases**. 29: 284-288, 2011.
2. Tsuchiya K, Komuta M, Yasui Y, Tamaki N, Hosokawa T, Ueda K, Kuzuya T, Itakura J, Nakanishi H, Takahashi Y, Kurosaki M, Asahina Y, Enomoto N, **Sakamoto M**, Izumi N. Expression of keratin19 is related to high recurrence of hepatocellular carcinoma after radiofrequency ablation. **Oncology**. 80: 278-288, 2011.
3. Kanamori H, Kawakami T, Effendi K, Yamazaki K, Mori T, Ebinuma H, Masugi Y, Du W, Nagasaka K, Ogiwara A, Kyono Y, Tanabe M, Saito H, Hibi T, **Sakamoto M**. Identification by Differential Tissue Proteome Analysis of Talin-1 as a Novel Molecular Marker of Progression of Hepatocellular Carcinoma. **Oncology**. 80: 406-415, 2011.
4. Yoneda N, Sato Y, Kitao A, Ikeda H, Sawada-Kitamura S, Miyakoshi M, Harada K, Sasaki M, Matsui O, **Nakanuma Y**. Epidermal growth factor induces cytokeratin 19 expression accompanied by increased growth abilities in human hepatocellular carcinoma. **Lab Invest**. 91: 262-72, 2011.
5. **Nakanuma Y**, Xu J, Harada K, Sato Y, Sasaki M, Ikeda H, Kim J, Yu E. Pathological spectrum of intrahepatic cholangiocarcinoma arising in non-biliary chronic advanced liver diseases. **Pathol Int**. 61: 298-305, 2011.
6. Fujita N, **Aishima S**, Iguchi T, Mano Y, Taketomi A, Shirabe K, Honda H, Tsuneyoshi M, Oda Y. Histologic classification of microscopic portal venous invasion to predict prognosis in hepatocellular carcinoma. **Hum Pathol**. 42: 1531-8, 2011.

7. Shibuya M, **Kondo F**, Sano K, Takada T, Asano T. Immunohistochemical study of hepatocyte, cholangiocyte and stem cell markers of hepatocellular carcinoma. **J Hepatobiliary Pancreat Sci.** 18: 537-43, 2011.
8. **Kondo F**. Assessment of stromal invasion for correct histological diagnosis of early hepatocellular carcinoma. **Int J Hepatol.** 2011: 241652, 2011.
9. Fukuma M, Tanese K, Effendi K, Yamazaki K, Masugi Y, Suda M, **Sakamoto M**. Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 regulates epithelial cell phenotype and survival of hepatocellular carcinoma cells. **Exp Cell Res.** 319: 113-21, 2013.
10. Effendi K, Yamazaki K, Mori T, Masugi Y, Makino S, **Sakamoto M**. Involvement of hepatocellular carcinoma biomarker, cyclase-associated protein 2 in zebrafish body development and cancer progression. **Exp Cell Res.** 319: 35-44, 2013.
11. Ikeda H, Harada K, Sato Y, Sasaki M, Yoneda N, Kitamura S, Sudo Y, Ooi A, **Nakanuma Y**. Clinicopathologic significance of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma with stem cell subtype components with reference to the expression of putative stem cell markers. **Am J Clin Pathol.** 140: 329-340, 2013.
12. Mano Y, **Aishima S**, Fujita N, Tanaka Y, Kubo Y, Motomura T, Taketomi A, Shirabe K, Maehara Y, Oda Y. Tumor-Associated Macrophage Promotes Tumor Progression via STAT3 Signaling in Hepatocellular Carcinoma. **Pathobiology.** 80: 146-154, 2013.
13. Akiba J, **Nakashima O**, Hattori S, Tanikawa K, Takenaka M, Nakayama M, Kondo R, Nomura Y, Koura K, Ueda K, Sanada S, Naito Y, Yamaguchi R, Yano H. Clinicopathologic analysis of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma according to the latest WHO classification. **Am J Surg Pathol.** 37: 496-505, 2013.
14. Hasegawa K, Kokudo N, Makuuchi M, Izumi N, Ichida T, Kudo M, Ku Y, **Sakamoto M**, **Nakashima O**, Matsui O, Matsuyama Y. Comparison of resection and ablation for hepatocellular carcinoma: a cohort study based on a Japanese nationwide survey. **J Hepatol.** 58: 724-9, 2013.
15. Ohama H, Imai Y, **Nakashima O**, Kogita S, Takamura M, Hori M, Seki Y, Sawai Y, Igura T, Fukuda K, Makino Y, Morimoto O, Ohsawa M, **Sakamoto M**, Murakami T. Images of Sonazoid-enhanced ultrasonography in multistep hepatocarcinogenesis: comparison with Gd-EOB-DTPA-enhanced MRI. **J Gastroenterol.** 2013.
16. Sasaki M, Sato H, Kakuda Y, Sato Y, Choi JH, **Nakanuma Y**. Clinicopathological significance of “subtypes with stem-cell feature” in combined hepatocellular - cholangiocarcinoma. **Liver Int.** 2014.
17. Sumie S, **Nakashima O**, Okuda K, Kuromatsu R, Kawaguchi A, Nakano M, Satani M,

Yamada S, Okamura S, Hori M, Kakuma T, Torimura T, Sata M. The Significance of Classifying Microvascular Invasion in Patients with Hepatocellular Carcinoma. **Ann Surg Oncol.** 21:1002-9, 2014.