

# 食道扁平上皮癌周辺におけるリンパ管増生の 病理学的解析と転移予測因子の検索

筑後孝章 木村雅友 伊藤浩行

近畿大学医学部病理学教室

## 抄 録

食道扁平上皮癌のリンパ行性進展に関して、リンパ管新生の有無を検索するとともに転移予測の可能性を検討した。食道浸潤癌切除標本38例を用い、リンパ管内皮細胞の特異的マーカー (podoplanin) およびリンパ管新生に関係する増殖因子とレセプターの発現を免疫組織学的に検討した。粘膜固有層、粘膜下層のリンパ管密度は、正常部と比べ腫瘍辺縁部では有意に増加しており、且つ増生するリンパ管内皮細胞には増殖因子 Ki-67 の発現が認められた。リンパ管増殖因子 VEGF-C とそのレセプター VEGFR2,3 の発現を検討したところ腫瘍細胞のみで VEGF-C が、又近傍のリンパ管内皮細胞で VEGFR3 の発現が認められた。次いでリンパ管新生とリンパ節転移について検討したところ、腫瘍辺縁部の粘膜下層のリンパ管数が血管数の60%以上の場合、および腫瘍辺縁部の Ki-67 陽性リンパ管出現率が粘膜固有層でも粘膜下層でも20%以上の場合、リンパ節転移の可能性が高いことが明らかとなった。これらの結果は、食道扁平上皮癌周囲では腫瘍細胞で産生される増殖因子によりリンパ管新生がもたらされる可能性を示唆するとともに、リンパ管の状態を検索することにより転移の可能性を予測することが可能であることを示している。

**Key words:** 食道扁平上皮癌, リンパ管新生, podoplanin, VEGF-C, VEGFR2, VEGFR3

## 緒 言

食道癌は同じ消化器腫瘍の中でも大腸癌や胃癌と比べて悪性度が高く、現在でも予後の悪い腫瘍の一つにあげられる。食道癌の中で最も頻度が高い胸部食道癌の進行例では頸部、胸部、腹部のリンパ節に広範囲に転移することが知られ、隣接する臓器への浸潤も多い。またリンパ節郭清とともに胸腹部食道を全摘することが一般的であるなど手術侵襲も大きく、いまだに予後は不良である<sup>1,2</sup>。我が国における食道癌の大半は扁平上皮癌であり、その進行過程の病態を解明し治療法の開発につなげることは急務と考えられる。

近年、悪性腫瘍の増殖と転移には血管やリンパ管の新生が関わっており<sup>3</sup>、血管新生は腫瘍の増殖と関連するのに対し、腫瘍組織におけるリンパ管新生はリンパ節転移と関連すると推定されている<sup>4</sup>。

近年の血管新生の研究の過程でリンパ管の内皮細胞を同定する特異なマーカーが発見され、リンパ行

性進展やリンパ節転移に関して多くの研究結果が報告されてきている<sup>5-11</sup>。しかし、食道癌におけるリンパ管新生、リンパ行性進展のメカニズムに関して詳細は依然として不明なままである<sup>6-8,12-15</sup>。今回、我々は食道扁平上皮癌においてリンパ管新生がみられるかどうか、もし認められるならばその検索から、リンパ節転移の予測が可能か否かを検討した。

## 対象と方法

### 1. 対象

対象症例は2001年以降、近畿大学医学部附属病院で外科的に治療を受けた胸部食道扁平上皮癌症例である。全例初回治療症例であり、しかも外科により患者あるいは家族に研究に関する十分な説明がなされ同意がえられた症例38例が選ばれた。また、手術前の化学療法や放射線療法は組織学的に様々な変化をもたらすと考えられたため、これら治療法を実施した症例は対象から除外した。

### 2. HE 染色標本の作製

各症例において、提出臓器は10%ホルマリンで固定後、腫瘍病変の切り出し時に腫瘍の浸潤が最深部に達している断面を標本として作製した。パラフィン包埋ブロックより作製された HE 染色標本を観察した後、腫瘍浸潤部が十分に観察可能な標本を選んだ。それぞれのパラフィン組織ブロックから3 $\mu$ m で組織を薄切し、組織全体の観察用の HE 染色標本と免疫染色用の未染標本を作製した。HE 染色は標準的方法で染色し作製した。

### 3. 免疫組織染色

1) 抗体：リンパ管内皮細胞マーカーとして podoplanin (D2-40, Signet Laboratories, Dedham, Mass. 希釈濃度50倍, マイクロウェーブ熱処理)を、血管の同定には CD31 (1A10, NOVOCASTRA, 希釈倍率50倍, マイクロウェーブ熱処理)を使用した。またリンパ管新生に関する代表的増殖因子として VEGF-C (polyclonal, rabbit, Invitrogen, 希釈倍率100倍, マイクロウェーブ熱処理)を、その受容体として VEGFR2 (Ab-951, Signal Way, 希釈倍率50倍)と VEGFR3 (Flt-4, polyclonal, goat, R&D System, 希釈倍率50倍, マイクロウェーブ熱処理)を使用した。さらに増殖マーカーとして Ki-67 (MIB-1, DAKO, 希釈倍率50倍, マイクロウェーブ熱処理)を用いた。

2) 免疫染色法：薄切未染色標本を脱パラフィン後、ベンタナ XT システム ベンチマークコントロールシステム (750-BXTC) を使用し染色した。単一免疫染色の場合、UltraView Universal DAB Detection Kit (760-500) を使用した。反応時間は VEGFR2 は60分、その他は30分に設定した。染色後流水で洗浄し、Hematoxylin にて核染、色出し、脱水、透徹、封入した。

3) 二重染色法：二重染色 (podoplanin と Ki-67 お

よび podoplanin と CD31) は、ベンタナ XT システム (750-BXTC) を使用し、Ki-67, CD31 はそれぞれ UltraView Universal DAB Detection Kit (760-500) を使用した。また、podoplanin 染色に関しては UltraView Universal Alkaline Phosphatase RED Detection Kit (760-501) を使用した。

### 4. リンパ管密度の測定方法と評価

組織標本上で粘膜固有層および粘膜下層で腫瘍辺縁部から 2 mm の範囲を観察・測定範囲として設定した (図 1)。

観察は弱拡大(40倍)で全体を観察し、podoplanin 陽性の明瞭なリンパ管の密度が最も高いと判断される部位 (hot spot)<sup>6</sup> を 2 カ所選定した。次に、観察倍率200倍でリンパ管の数を計測した。計測は、NIKON ECLIPSE E1000 (デジタルカメラ:DXM 1200 搭載) を使用し、モニター画面上に画像を映し出し、モニター上で認められるリンパ管をリンパ管密度とした。モニター画面上での観察範囲の総面積は18.9 mm<sup>2</sup> に相当した。血管の増生と比較するため、podoplanin と CD31 の二重染色標本を使用し、血管数とリンパ管数を上記と同様の方法で計測した。2カ所で測定した数の平均値をリンパ管数とした。

なお、正常部のリンパ管を測定するため病変部から十分に離れた部位で、200倍の拡大画面上で計測を行なった。

### 5. Ki-67 陽性リンパ管出現率の測定方法

腫瘍辺縁部の粘膜固有層および粘膜下層で hot spot における podoplanin 陽性を示したリンパ管の内、リンパ管内皮細胞が Ki-67 陽性を示したリンパ管の出現率を計測した。この際、リンパ管内皮細胞が 1 個でも Ki-67 陽性を示したリンパ管を Ki-67 陽性リンパ管と判定した。

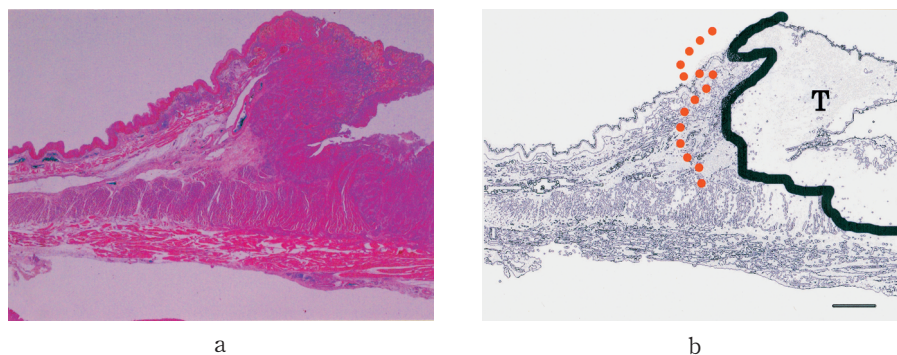


図1 リンパ管観察範囲  
 a : 腫瘍浸潤部の HE 染色組織像 (×0.5)  
 b : 観察部位：点線で示す腫瘍辺縁部から 2 mm の範囲の粘膜固有層、粘膜下層を観察・測定範囲と設定した。  
 T: 腫瘍, bar: 2 mm.

6. 統計的解析

統計処理のすべては Abacus concept, StatView. (Abacus Concept, Inc., Berkeley, CA) を使用した。リンパ管密度は分散分析 (ANOVA) で、またリンパ節転移の有無とリンパ管内腫瘍塞栓との症例検討には  $\chi^2$  検定を用いて検討し、その他は t 検定を用いて検討した。すべての統計的検討は p 値が0.05以下を有意差ありと判定した。

結 果

1. 対象症例の臨床病理的背景 (表1)。

対象症例全体の平均年齢は61.6±7.7歳であった。性別は、男性35例、女性3例であった。浸潤壁深達度は、T1a(LPM)が1例、T1bが7例、T2は9例、T3が20例で、T4は1例であった。粘膜内癌(T1a-EP)は含まれていない。進行度 (Stage) は、I, II, III, IV<sub>a</sub>がそれぞれ4例、8例、21例、5例で、いずれも遠隔転移は認められなかった。組織学的にリンパ節転移が認められたものは29例で、9例では転移は認められなかった。TNM分類による組織学的 Grading は G1 が10例、G2 は16例、G3 は12例であった。

2. リンパ管の分布およびリンパ管密度の測定。

表2は腫瘍部、非腫瘍部におけるリンパ管数の比較を示している。非腫瘍部の粘膜固有層、粘膜下層では、それぞれ6.9±2.1本、3.0±1.0本であったが、腫瘍辺縁部では粘膜固有層で11.1±2.6本、粘膜下層で6.4±2.6本であり、いずれも有意な増加が認められた (p<0.001)。

3. 血管数に対するリンパ管数の割合 (表3)。

非腫瘍部と腫瘍辺縁部の粘膜固有層および粘膜下層におけるリンパ管/血管数比を検討した。同一部位において血管数を10とした場合のリンパ管の比で表した。正常部では、血管数10に対して粘膜固有層が9.7±0.8、粘膜下層は1.4±0.5であったが、腫瘍辺縁部では、粘膜固有層および粘膜下層はそれぞれ12.4±2.9、6.6±3.7であり、明らかにリンパ管の増加が認められた。

4. 腫瘍塞栓の認められた部位と症例数。

組織学的に腫瘍塞栓形成がみられたものは29例であった。全例がリンパ管内であり、わずか1例のみに血管内にも腫瘍塞栓が認められた。部位別の検討では、粘膜固有層のみにみられた症例は7例で、粘膜下層のみにみられた症例は9例で、例数はほぼ同様であったが粘膜固有層のみにリンパ管内腫瘍塞栓がみられた7例の全例でリンパ節転移が認められた。

5. 臨床病理的因子とリンパ管密度との関係 (表

表1 臨床病理的背景

		症例数
年齢 (歳)	<61.6	20
	≥61.6	18
性別	男性	35
	女性	3
浸潤壁深達度	T1 a	1
	T1 b	7
	T2	9
	T3	20
	T4	1
進行度	I	4
	II	8
	III	21
	IV a	5
リンパ節転移	あり	29
	なし	9
組織学的 Grading	G1	10
	G2	16
	G3	12

表2 リンパ管密度の測定結果

	非腫瘍部	腫瘍辺縁部	p
粘膜固有層 (n=38)	6.9±2.1	11.1±2.6	<0.001
粘膜下層 (n=38)	3.0±1.0	6.4±2.6	<0.001
Mean±SD			

表3 血管数に対するリンパ管数

	非腫瘍部	腫瘍辺縁部	p
粘膜固有層 (n=38)	9.7±0.8	12.4±2.9	<0.001
粘膜下層 (n=38)	1.4±0.5	6.6±3.7	<0.001

注：血管数10に対するリンパ管数を示す。  
Mean±SD.

4).

腫瘍辺縁部でリンパ管密度が高くなることから、臨床病理的因子との関連性の有無を検討した。腫瘍辺縁部では、リンパ管/血管数比が高く、またリンパ管密度は粘膜固有層と粘膜下層とで異なることから、粘膜固有層と粘膜下層とに分けて検討した結果、それぞれの因子に関して粘膜固有層でのリンパ管密度は粘膜下層のそれより高くなっていった。しかし、粘膜固有層、粘膜下層のいずれにおいても各因子との関連性は認められなかった。

6. 腫瘍辺縁部におけるリンパ管の増生に関する Ki-67 の観察結果。

腫瘍辺縁部で著しい増生がみられたリンパ管が既存のリンパ管の拡張・増生か、あるいは新生リンパ管であるかを検討するために podoplanin と増殖マ

表4 臨床病理的因子とリンパ管密度との関係

		リンパ管密度 (粘膜固有層)	p	リンパ管密度 (粘膜下層)	p
年齢 (歳)	<61.6	10.3±2.5	0.107	6.0±1.9	0.234
	≥61.6	12.0±2.4		7.0±3.2	
性別	男性	11.3±2.5	0.683	6.4±2.7	0.542
	女性	8.5±1.8		7.3±2.1	
浸潤壁深達度	T1 a	8.5	0.762	5.0	0.369
	T1 b	11.9±1.9		5.4±2.3	
	T2	10.9±3.5		7.8±2.8	
	T3	11.1±2.4		6.2±2.6	
	T4	10.0		8.0	
進行度	I	10.4±2.2	0.344	5.3±2.3	0.528
	II	12.6±3.2		6.8±3.3	
	III	10.8±2.5		6.8±2.4	
	IV a	10.6±1.5		5.3±2.8	
リンパ節転移	あり	11.1±2.6	0.865	6.4±2.6	0.528
	なし	11.2±2.6		6.4±2.9	
組織学的 Grading (TNM 分類)	G1	11.1±1.5	0.979	6.5±3.2	0.885
	G2	11.0±2.3		6.2±1.9	
	G3	11.2±3.6		6.7±3.0	
リンパ管内腫瘍塞栓	あり	11.5±2.5	0.160	6.7±2.8	0.357
	なし	9.9±2.4		5.7±2.0	

Mean±SD

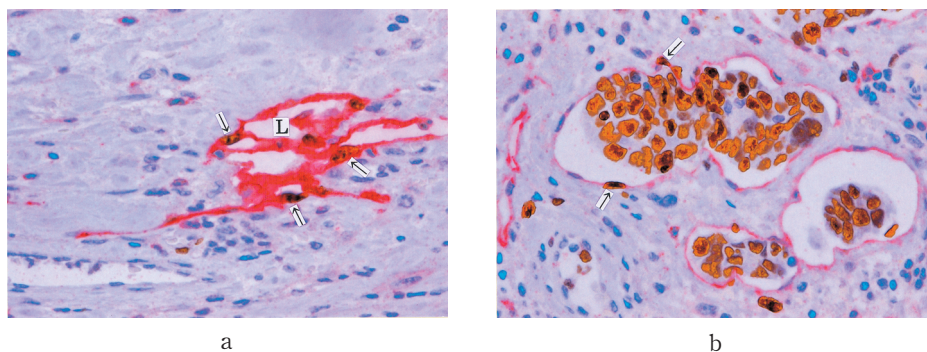


図2 リンパ管増生と腫瘍塞栓  
 a : 粘膜下層におけるリンパ管増生. podoplanin (リンパ管, 赤色) と Ki-67 (増殖マーカー, 褐色) の二重染色の結果 (×400).  
 不規則に拡張, 増生するリンパ管 (L) では, リンパ管内皮細胞の核は Ki-67 陽性 (→) を示している.  
 b : 粘膜固有層における腫瘍塞栓と腫瘍増殖因子. podoplanin (リンパ管, 赤色) と Ki-67 (増殖マーカー, 褐色) の二重染色の結果 (×400).  
 拡張したリンパ管内には腫瘍塞栓の形成がみられ, リンパ管内皮細胞の核は Ki-67 陽性 (→) を示している.

マーカー (Ki-67) の二重染色を行ない検討した (図 2 a, b). 粘膜固有層および粘膜下層でリンパ管は不規則に蛇行・拡張しており, その内皮細胞の核に一致して Ki-67 陽性像が認められた. また, リンパ管内腫瘍塞栓を伴い著しく拡張したリンパ管の内皮細胞の核も Ki-67 陽性を示した. この観察結果は, 全例で認められた.

#### 7. 新生リンパ管の形成メカニズムに関する検討.

腫瘍辺縁部で形成されたリンパ管の形成メカニズムを検討するために, リンパ管増殖に関する代表的な因子である VEGF-C とそのレセプターである VEGFR2, VEGFR3 の免疫染色を行ない検討した. VEGF-C 染色の結果, 増殖, 浸潤する腫瘍細胞に一致して陽性像が認められた (図 3 a). 一方,

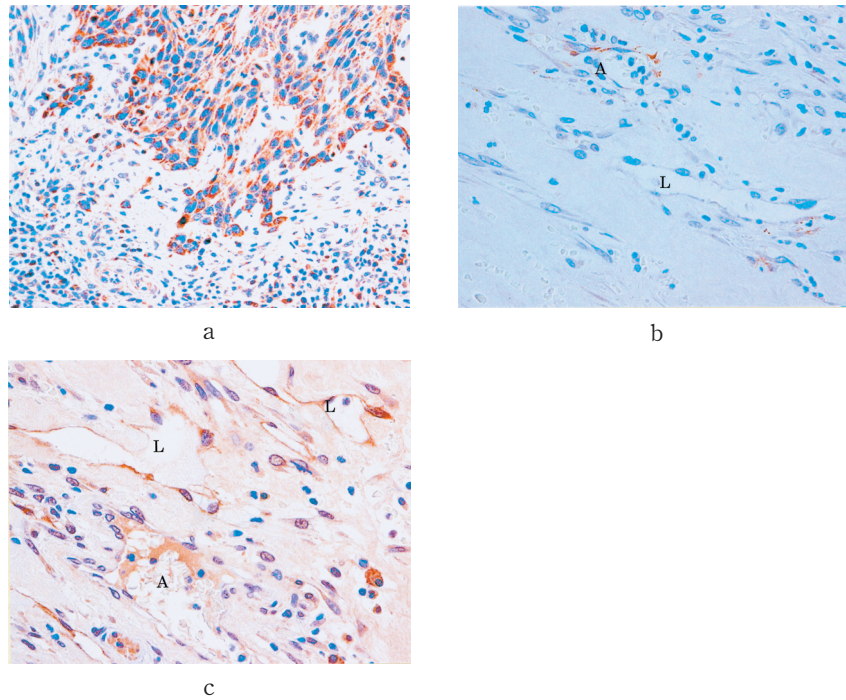


図3 VEGFR2, VEGFR3 および VEGF-C 免疫染色の結果 (腫瘍辺縁部, 粘膜下層)  
 a : VEGF-C 免疫染色の結果 (×200).  
 浸潤する腫瘍細胞に一致して陽性所見が認められる。  
 b : VEGFR2 免疫染色の結果 (×200).  
 A : 血管, L : リンパ管  
 血管内皮細胞に一致して陽性像が認められる。リンパ管内皮細胞は陰性である。  
 c : VEGFR3 免疫染色の結果 (×200).  
 リンパ管内皮細胞に一致して陽性所見が認められる。血管内皮細胞は陰性である。

VEGFR2 の染色では, 血管内皮細胞に陽性像がみられた (図 3 b) が, リンパ管内皮細胞は陰性であった。VEGFR3 の染色では, VEGFR2 の染色態度とは逆となり, 血管内皮細胞では陰性で, リンパ管内皮細胞に一致して陽性所見が認められた (図 3 c)。この結果は全例で認められた。

8. リンパ節転移の有無によるリンパ管内腫瘍塞栓形成, リンパ管/血管数比, Ki-67 陽性リンパ管出現率。

リンパ節転移と関連する因子の検索のため, 組織学的にリンパ節転移の認められなかった症例 (N0) とリンパ節転移の認められた症例 (N+) とを検討した。N0 では, 腫瘍塞栓形成がみられなかったものは 9 例中 6 例で, 3 例は腫瘍塞栓形成が一部にみられた。また, N+ では, 腫瘍塞栓形成が認められたものは 29 例中 26 例で, みられなかったものは 3 例であった。リンパ節転移とリンパ管内腫瘍塞栓との間には有意な関連性が認められた ( $p < 0.001$ )。

腫瘍辺縁部におけるリンパ管/血管数比とリンパ節転移の有無に関して検討した。表 6 に示されているように, 粘膜固有層では N0 は  $12.0 \pm 2.6/10$ , N+ は  $12.5 \pm 3.0/10$  で有意差はみられなかった。粘膜下

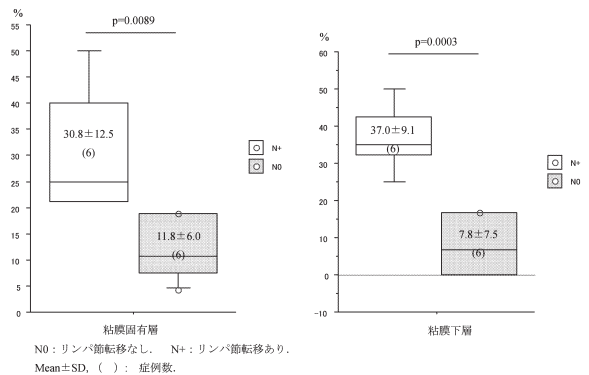


図4 リンパ節転移の有無による Ki-67 陽性リンパ管出現率  
 N0 : リンパ節転移なし, N+ : リンパ節転移あり。  
 Mean ± SD, ( ) : 症例数。

層では N0 は  $3.9 \pm 1.6/10$ , N+ は  $7.3 \pm 3.8/10$  で有意差 ( $p = 0.045$ ) が認められた。さらに, 腫瘍辺縁部の Ki-67 陽性リンパ管数の出現率を N0, N+ それぞれ 6 例ずつについて検討したところ, 図 4 にみられるように粘膜固有層では N0 は  $11.8 \pm 6.0\%$  で, N+ は  $30.8 \pm 12.5\%$  であり, 粘膜下層では N0 は  $7.8 \pm 7.5\%$ , N+ は  $37.0 \pm 9.1\%$  であった。いずれの

部位においても20%以下では転移は認められず、両者には明瞭な差異が認められた。

### 考 察

多くの悪性腫瘍においてリンパ管新生がリンパ節転移、腫瘍の増殖、予後に関係することが報告されている<sup>7,8,12,16-30</sup>。リンパ行性進展に関する組織学的な研究は、血管とリンパ管とを正確に区別する方法がこれまで容易でなかったため遅れていた。近年、リンパ管に特異的な抗体の開発によりリンパ管を同定することが容易となり、この分野の研究は急速に進展し新しい知見が集積されつつある<sup>11</sup>。今回、リンパ管の特異的なマーカーである podoplanin を用いて検索した。

血管新生が腫瘍浸潤部の周囲にほぼ一様にみられるのに対しリンパ管の組織内の分布にはばらつきが大きい。そのため過去の多くの報告では、リンパ管密度の測定は組織内のリンパ管数の最も多い部位 (hot spot) を選び、一定面積内のリンパ管数を計測する方法をとっている。我々は非腫瘍部におけるリンパ管密度およびリンパ管/血管数比を観察し、腫瘍辺縁部と比較検討した。

今回の結果から粘膜固有層の観察では新生リンパ管の数が、また粘膜下層の観察ではリンパ管/血管数比の増加 (リンパ管/血管数比が6.6/10) が重要であることが示された。

さらにこれらのリンパ管において内皮細胞の核の Ki-67 陽性をしめすリンパ管の出現率の検討をした。Ki-67 は細胞増殖関連抗原で、細胞周期において、休止期 (G0) 以外の全周期 (G1, S, G2, M 期) で発現する核タンパクである<sup>31</sup>。今回の観察では、リンパ管内腫瘍塞栓形成部位で腫瘍細胞とともにリンパ管内皮細胞の核に Ki-67 陽性像が認められ、また腫瘍塞栓がみられない部位でも増生するリンパ管内皮細胞に陽性所見が認められた。このことから、腫瘍辺縁では既存のリンパ管だけでなく、新生リンパ管も存在することが確認された。

このような癌巣周囲におけるリンパ管新生の機序に関して、近年、悪性腫瘍が産生するさまざまなサイトカインの役割が注目されている<sup>10,12-14,32,33</sup>。脈管新生の制御に関連するサイトカインには、VEGF, VEGF-B, VEGF-C/D, VEGF-E, VEGF-C 256S 等が知られている<sup>5</sup>。このうち、VEGF-C/D と VEGF-C156S はリンパ管内皮細胞上の VEGFR3 に作用し、リンパ管新生を誘引することが報告されている。VEGF-C/D の一部は、VEGFR2 に作用すると考えられている。VEGFR2 はリンパ管内皮細胞のみでなく血管内皮細胞上にも発現し、多

くは血管新生と関連性があるが、その一部はリンパ管新生と関連することが推定されている。我々の観察では、食道扁平上皮癌では腫瘍細胞で VEGF-C の産生が、また、腫瘍辺縁部ではリンパ管内皮細胞に VEGFR3 の発現が認められた。Kitadai 等<sup>12</sup>あるいは Mobius 等<sup>13</sup>により、食道扁平上皮癌では腫瘍細胞と間質細胞に VEGF-C 産生が認められ、しかもこの産生は腫瘍の浸潤の深さ、Stage, 血管侵襲、リンパ管侵襲、リンパ節転移と関連があることが報告されている。これらの報告と今回の結果を併せて考えると、食道扁平上皮癌では腫瘍細胞から産生される VEGF-C によって新生リンパ管の形成が促されることが推測される。

このようなリンパ管の増生と臨床病理学的所見との相関について、Mori 等の報告<sup>6</sup>では、リンパ管密度と臨床病理学的パラメーター (リンパ管侵襲、リンパ節転移を含め、腫瘍サイズ、浸潤の深さ、Stage など) にはいずれも有意差は認められていない。我々も Mori 等<sup>6</sup>と同様の方法をとって観察したところ臨床病理学的パラメーターと新生リンパ管との間には強い関連性はないと思われた。

そこで、リンパ節転移の無い症例 (N0) と転移のある症例 (N+) について比較検討した。その結果、リンパ節転移と関連する因子の一つとして、リンパ管内腫瘍塞栓形成が考えられた (表5)。この結果からは通常おこなわれている病理組織学的検索における Iy 因子の評価が重要であることが再確認された。脈管侵襲の検索方法に関しては、Weidner 等<sup>3</sup>が浸

表5 リンパ節転移の有無とリンパ管内腫瘍塞栓との関係 (症例数)

	腫瘍塞栓なし		腫瘍塞栓あり	
	6		3	
N0 (9例)	6		3	
N+ (29例)	3		26	
合計	9		29	

N0: リンパ節転移なし。N+: リンパ節転移あり。  
p<0.001

表6 リンパ節転移の有無による腫瘍辺縁部のリンパ管/血管数比

	N0 (9)	N+ (29)	p
粘膜固有層 (38)	12.0±2.6/10	12.5±3.0/10	0.777
粘膜下層 (38)	3.9±1.6/10	7.3±3.8/10	0.045

注: 血管数10に対するリンパ管数比。

N0: リンパ節転移なし。N+: リンパ節転移あり。  
Mean±SD. ( ): 症例数

潤性乳癌に対して血管新生の検索を組織内の血管密度を測定する方法をとったことが最初であった。リンパ管新生に関して、初期の研究では小型のリンパ管が増生するという形態学的な定義をとる報告<sup>7</sup>がみられた。

我々の検討の結果、新しい因子として、腫瘍辺縁部の粘膜下層のリンパ管/血管数比(表6)が6/10以上の場合、および腫瘍辺縁部のKi-67陽性リンパ管出現率(図4)が粘膜固有層でも粘膜下層でも約20%以上であればリンパ節転移の可能性が高いことが明らかになった。これらの結果は、腫瘍塞栓、リンパ管新生の程度、Ki-67陽性リンパ管の出現率は予測因子として応用可能であることを示唆している。

今回の検索は症例数も十分ではなく、又、検索部位もhot spotに限られている。今後さらに例数を増やして詳細な検討を加え、より正確な予測因子を確立するための検索を続ける予定である。

#### 謝 辞

稿を終えるにあたり、免疫染色に関して多くの貴重な助言を頂きました本学附属病院病理部上杉忠雄氏に深謝いたします。

#### 文 献

- 食道癌診断・治療ガイドライン (2008): 日本食道学会/編, 金原出版
- Stahl M, Oliveira J (2008) Esophageal cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 19: ii21-ii22
- Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J (1991) Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Eng J Med* 324: 1-8
- Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K (2002) Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer* 8: 573-583
- Achen MG, Stacker SA (2008) Molecular control of lymphatic metastasis. *Ann N Y Acad Sci* 1131: 225-234
- Mori D, Yamasaki F, Shibaki M, Tokunaga O (2007) Lateral peritumoral lymphatic vessel invasion can predict lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Mod Pathol* 20: 694-700
- Tomita N, Matsumoto T, Hayashi T, Arakawa A, Sonoue H, Kajiyama Y, Tsurumaru M (2008) Lymphatic invasion according to D2-40 immunostaining is a strong predictor of nodal metastasis in superficial squamous cell carcinoma of the esophagus: algorithm for risk of nodal metastasis based on lymphatic invasion. *Pathol Int* 58: 282-287
- Inoue A, Moriya H, Katada H, Tanabe S, Kobayashi N, Watanabe M, Okayasu I, Ohbu M (2008) Intratumoral lymphangiogenesis of esophageal squamous cell carcinoma and relationship with regulatory factors and prognosis. *Pathol Int* 58: 611-619
- Iwakiri S, Nagai S, Katakura H, Takenaka K, Date H, Wada H, Tanaka F (2009) D2-40-positive lymphatic vessel density is a poor prognostic factor in squamous cell carcinoma of the lung. *Ann Surg Oncol* 16: 1678-1685
- Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, Lackson DG, Hong YK, Detmar M (2005) Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinoma and germ cell tumors. *Am J Pathol* 166: 913-921
- Kato S, Shimoda H, Ji RC, Miura M (2006) Lymphangiogenesis and expression of specific molecules as lymphatic endothelial cell markers. *Anatomical Science International* 81: 71-83
- Kitadai Y, Amioka T, Haruma K, Yoshihara M, Sumii K, Matsutani N, Yasui W, Chayama K (2001) Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C in human esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 93: 662-666
- Mobius C, Freire J, Beker I, Feith M, Brucher BLD, Henning M, Siewert JR, Stein HJ (2007) VEGF-C expression in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the esophagus. *World J Surg* 31: 1768-1772
- Chuang WY, Yeh CJ, Wu YC, Chao YK, Liu YH, Tseng CK, Chang HK, Liu HP, Hsueh C (2009) Tumor cell expression of podoplanin correlates with nodal metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Histol Histopathol* 24: 1021-1027
- Ren Y, Law S, Huang X, Lee PY, Bacher M, Srivastava G, Wong J (2005) Macrophage migration inhibitory factor stimulates angiogenic factor expression and correlates with differentiation and lymph node status in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg* 242: 55-63
- Ji RC, Eshita Y, Kato S (2007) Investigation of intratumoral and peritumoral lymphatic expressed by podoplanin and LYVE-1 in the hybridoma-induced tumours. *Int J Exp Pathol* 88: 257-270
- Miyahara M, Tanuma J, Sugihara K, Semba I (2007) Tumor lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis and clinicopathologic parameters in oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 110: 1287-1294
- Zhao D, Pan J, Li XQ, Wang XY, Tang C, Xuan M (2008) Intratumoral lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma and its clinicopathological significance. *J Oral Pathol Med* 37: 616-625
- Williams CSM, Leek RD, Robson AM, Banerji S, Prevo R, Harris A, Jackson DG (2003) Absence of lymphangiogenesis and intratumoral lymph vessels in human metastatic breast cancer. *J Pathol* 200: 195-206
- Arnaout-Alkarain A, Kahn HJ, Narod SA, Sun PA, Marks AN (2007) Significance of lymph vessel invasion identified by the endothelial lymphatic marker D2-40 in node negative breast cancer. *Mod Pathol* 20: 183-191
- Yu H, Zhang S, Zhang R, Zhang L (2009) The role of VEGF-C/D and Flt-4 in the lymphatic metastasis of

- early-stage invasive cervical carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 28 : 98
22. Saad RS, Kordansky L, Liu YL, Denning K, Kandil HA, Silverman JF (2006) Lymphatic microvessel density as prognostic marker in colorectal cancer. *Mod Pathol* 19 : 1317-1323
23. Morita H, Ishikawa Y, Akishima-Fukasawa Y, Ito K, Akasaka Y, Nishimura C, Igarashi Y, Miki K, Ishii T (2009) Histopathological predictor for regional lymph node metastasis in gastric cancer. *Virchows Arch* 454 : 143-151
24. Roma AA, Magi-Galluzzi C, Kral MA, Jin TT, Klein EA, Zhou M (2006) Peritumoral lymphatic invasion is associated with regional lymph node metastases in prostate adenocarcinoma. *Mod Pathol* 19 : 392-398
25. Dadras SS, Paul T, Bertocini J, Brown LF, Muzikansky A, Jackson DG, Ellwanger U, Garbe C, Mihm MC, Detmar M (2003) Tumor lymphangiogenesis. A novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival. *Am J Pathol* 162 : 1951-1960
26. Horiguchi A, Ito K, Sumitomo M, Kimura F, Asano T, Hayakawa M (2008) Intratumoral lymphatics and lymphatic invasion are associated with tumor aggressiveness and poor prognosis in renal cell carcinoma. *Urology* 71 : 928-932
27. Vamos FR, Tovari J, Fillinger J, Timar J, Paku S, Kenessey I, Ostoros G, Agocs L, Soltesz I, Dome B (2005) Lymphangiogenesis correlates with node metastasis, prognosis and angiogenic phenotype in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 11 : 7344-7353
28. Von Marschall Z, Scholz A, Stacker SA, Achen MG, Jackson DG, Alves F, Schirner M, Haberey M, Thierach KH, Wiedenmann B, Rosewicz S (2005) Vesicular endothelial growth factor-D induces lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in models of ductal pancreatic cancer. *Int J Oncol* 27 : 669-679
29. Yamanashi T, Nakanishi Y, Fujii G, Akishima-Fukasawa Y, Moriya Y, Kanai Y, Watanabe M, Hiroshi S (2009) Podoplanin expression identified in stromal fibroblast as a favorable prognostic marker in patients with colorectal carcinoma. *Oncology* 77 : 53-62
30. Aishima S, Nishihara Y, Iguchi T, Taguchi K, Takemoto A, Maehara Y, Tsuneyoshi M (2008) Lymphatic spread is related to VEGF-C expression and D2-40-positive myofibroblasts in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Mod Pathol* 21 : 256-264
31. Scholzen T, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein : From the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182 : 311-322
32. Shimizu K, Kubo H, Yamaguchi K, Kawashima K, Ueda Y, Matsuo K, Awane M, Shimahara Y, Takabayashi A, Yamaoka Y, Satoh S (2004) Suppression of VEGFR-3 signaling inhibits lymph node metastasis in gastric cancer. *Cancer Sci* 95 : 328-333
33. Liu P, Chen W, Zhu H, Liu B, Song S, Shen W, Wang F, Tucker S, Zhong B, Wang D (2009) Expression of VEGF-C correlates with a poor prognosis based on analysis of prognostic factors in 73 patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 39 : 644-650
34. Gockel I, Moehler M, Grerichs K, Drescher D, Trinh TT, Duenschede F, Borschitz T, Schimanski K, Biesterfeld S, Herzer K, Galle P, Lang H, Junginger T, Schimanski CC (2008) Co-expression of receptor tyrosine kinases in esophageal adenocarcinoma and squamous cell cancer. *Oncol Rep* 20 : 845-850