REVIEW ARTICLE

간세포암종의 병리진단에 대한 최신 지견

남지해¹, 박영년^{1,2}

연세대학교 의과대학 병리학교실¹, 연세대학교 대학원 의과학과 BK21연세첨단의과학교육연구단²

Up-to-date Knowledge on the Pathological Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma

Ji Hae Nahm¹ and Young Nyun Park^{1,2}

Department of Pathology, Yonsei University College of Medicine¹, Seoul; Graduate School of Medical Science, Brain Korea 21 Project, Yonsei University College of Medicine², Seoul, Korea

Hepatocellular carcinoma (HCC) has heterogeneous molecular and pathological features and biological behavior. Large-scale genetic studies of HCC were accumulated, and a pathological-molecular classification of HCC was proposed. Approximately 35% of HCCs can be classified into distinct histopathological subtypes according to their molecular characteristics. Among recently identified subtypes, macrotrabecular massive HCC, neutrophil-rich HCC, vessels encapsulating tumor clusters HCC, and progenitor phenotype HCC (HCC with CK19 expression) are associated with a poor prognosis, whereas the lymphocyte-rich HCC subtype is related to a better prognosis. This review provides up-to-date knowledge on the pathological diagnosis of HCC according to the updated World Health Organization Classification of Digestive System Tumors 5th ed. (**Korean J Gastroenterol 2021;78:268-283**)

Key Words: Carcinoma, hepatocellular; Subtype; Pathology; Molecular classification

서론

간세포암종(hepatocellular carcinoma, HCC)은 간에서 발생하는 가장 흔한 암종으로, 간세포로의 분화를 보이는 악성 종양이다. 진행성 간세포암종은 매우 다양한 분자유전학적 이질성을 보이며, 최근 10여년 동안 대규모 분자유전학적 분석이 수행되어 간세포암종의 분자유전학적 분류들이 보고되었다.¹⁻⁵ 이를 기반으로 임상병리학적 소견을 종합 분석하여 병리-분자유전학적 분류가 최근 제시되고 있으며, 간세포암종의 약 35%가 분자유전학적 특성에 기반한 병리학적 특수 아형으로 분류할 수 있다.⁶ 최근에 보고된 거대 기둥형(macrotrabecular-massive), 호중구-과도(neutrophil-rich), vessels encapsu-

lating tumor clusters (VETC) 아형은 불량한 예후와 연관되며, 림프구-과도(lymphocyte-rich), 투명세포(clear cell) 아형은 좋은 예후를 보인다.⁶

본고에서는 최근 개정된 세계보건기구의 소화기계 종양 분류(World Health Organization classification of tumors, digestive system) 5판에서 개정된 부분을 중점으로 간세포암종의 병리학적 진단에 대한 최신 지견을 소개하여 간세포암종의 병리 보고서 작성 및 이해에 도움이 되고자 한다.

Received October 12, 2021. Revised October 21, 2021. Accepted October 22, 2021.

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2021. Korean Society of Gastroenterology.

교신저자: 박영년, 03722, 서울시 서대문구 연세로 50-1, 연세대학교 의과대학 병리학교실

Correspondence to: Young Nyun Park, Department of Pathology, Yonsei University College of Medicine, 50-1 Yonsei-ro, Seodaemun-gu, Seoul 03722, Korea. Tel: +82-2-2228-1768, Fax: +82-2-362-0860, E-mail: young0608@yuhs.ac, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0357-7967>

Financial support: This research was supported by the basic science research program of the National Research Foundation of Korea (NRF) (NRF-2020R1A2B5B01001646), and by the Bio and Medical Technology Development Program of the NRF funded by the Ministry of Science and ICT (NRF-2016M3A9D5A01952416).

Conflict of interest: None.

본 론

1. 간세포암종의 육안적 소견

육안 관찰 시 간세포암종의 색은 지방이나 담즙 성분의 함량에 따라 다양하게 나타날 수 있으나 대개 황록색을 띠며, 종양 내 섬유성 기질이 적어서 절단면이 불룩하게 나오는 특성을 보인다. 종양은 하나의 결절이나 여러 개의 결절이 융합된 모습을 보일 수 있으며, 또한 주 병변 주변으로 작은 위성결절(satellite nodule)이 관찰되는 경우도 있다. 위성결절은 작은 크기로 주 병변과 연결되지 않고 떨어져 있으며, 대부분 주 병변 주위 2 cm 이내의 거리에서 관찰된다. 위성결절은 주 병변에서 파급된 것으로 생각되며, 종양의 재발과 관련이 있다.^{7,8}

간세포암종의 육안적 소견은 종양의 생물학적 행동양식 및 예후와 관련성을 보인다. 간세포암종이 저산소증의 종양 미세환경 및 암줄기세포의 발현이 많을수록 침윤성 성장 양식 및 불량한 예후를 보인다.⁹ 대한간암학회의 원발성 간암규약의 간세포암종의 육안적 분류는 다음과 같으며, 수술적 절제를 시행한 간세포암종에 적용하기 용이하다(Fig. 1).¹⁰ 경계불명료 결절형이나 팽창결절형이 다결절융합형이나 결절주위파급형에 비해 좋은 예후를 보인다.^{11,12}

1) 경계불명료 결절형(vaguely nodular type)

간세포암종과 주위 간조직의 경계가 불분명하고 피막을 형성하지 않는다.¹³ 주로 고분화(well differentiated)를 보이는

종양세포로 구성되어 있으며 종양세포가 주위 간조직으로 치환성으로 증식하는 특징이 있어 종양의 경계가 뚜렷하지 않다. 이러한 모양을 보이는 간세포암종은 대부분 크기가 2 cm 이하로 작으며, 초기 간세포암종(early HCC)의 가능성이 높다.

2) 팽창결절형(expanding nodular type)

간세포암종이 팽창성 증식을 하는 경우로 종양의 경계가 분명하며 종양 피막을 형성하는 경우가 많다. 종양의 변연부는 대부분의 경우 매끈하다.

3) 다결절융합형(multinodular confluent type)

여러 개의 결절이 서로 뭉쳐진 형태로 종양의 내부는 여러 개의 격벽에 의해 나누어진 경우가 많다. 종양의 변연부는 팽창성과 침습성의 복합된 성장 양식을 보일 수 있다.

4) 결절주위파급형(nodular with perinodular extension type)

간세포암종의 변연부의 일부(50% 미만)가 파급성 성장을 보이는 형태이다.

5) 침습형(infiltrative type)

간세포암종의 경계 부위가 침습성 성장으로 불규칙하며 대부분의 경우 피막 형성이 없다. 종양 변연부의 50% 이상에서 주변 조직으로 침윤하는 경우이다.

Fig. 1. Gross types of hepatocellular carcinoma. (A) Vaguely nodular type (arrows), (B) expanding nodular type, (C) multinodular confluent type, (D) nodular with a perinodular extension type, (E) infiltrative type, and (F) cirrhotomimetic type.

6) 기타 특수형(specific type)

드물게 특수형으로 돌출형(pedunculated type)과 유사경변형(cirrhotosimetic type)이 있다. 유사경변형 간세포암종은 육안으로 간경변증과 구별되기 어려울 정도로 무수히 많은 간병변의 결절이 간세포암종으로 대체된 경우이다.

2. 다발성 간세포암종: 간세포암종의 간내 전이(intrahepatic metastasis)와 다중심성 발생(multicentric occurrence)

간세포암종의 개수는 육안적으로 보이는 결절의 개수를 모두 세고, 2개 이상인 경우 다발성 간세포암종(multiple HCC)으로 정의하며 이에 따라 종양의 병기를 결정한다. 한 환자에서 여러 개의 간세포암종 결절이 발견될 경우, 그것이 하나의 간세포암종에서 간내 전이(intrahepatic metastasis)에 의해 여러 개의 결절이 생긴 것인지 또는 환자의 만성 간염 및 간경변증의 배경에서 다중심성 발생(multicentric occurrence)으로 새로운 간세포암종이 발생된 것인지에 대한 감별이 필요하다. 이를 감별하기 위한 병리학적 진단 기준은 다음 기술과 같으며, 보다 정확한 감별을 위해서는 분자유전학적 검색이 필요하다.

1) 간세포암종의 간내 전이(intrahepatic metastasis)

육안적으로 주 종양 주변에 작은 위성결절들이 관찰되거나 간문맥의 종양 혈전이 관찰되는 경우는 간내 전이를 시사한다. 현미경 관찰에서 여러 개의 결절이 대부분 비슷한 분화도 및 조직학적 소견을 보이며, 종양의 분화도는 대부분 중등도 분화(moderate differentiation) 및 저분화(poor differentiation)이다.

2) 간세포암종의 다중심성 발생(multicentric occurrence)

고분화(well differentiated) 간세포암종에서는 혈관침습에 의한 전이가 거의 발생되지 않으므로 2개 이상의 결절이 있는 경우, 이 중 한 개 이상의 결절에서 고분화 간세포암종의 소견을 보이는 결절이 있으면 간내 전이보다는 다중심성 발생으로 생각된다(Fig. 2). 고분화 간세포암종은 종양결절 전체가 고분화도의 소견을 보이는 조기 간세포암종이거나, 또는 “결절 내 결절(nodule in nodule)”의 소견을 보일 수 있다. 결절 내 결절은 흔히 외부 결절이 고분화이고 내부 결절이 중등도 및 저등도의 분화 소견을 보이며, 이는 간세포암종이 다단계 진행에 의해 발생됨을 뒷받침한다.¹⁴

Fig. 2. Multicentric occurrence of hepatocellular carcinoma (HCC) and “nodule and nodule” feature of HCC. (A) Schematic diagram of multiple HCCs favoring a multicentric occurrence. (B) The scan view of a “nodule in nodule” feature of HCC. The outer and inner nodules are indicated by the solid and dashed lines, respectively (hematoxylin and eosin stain [H&E], $\times 10$). (C) The outer nodule marked with an asterisk shows well differentiation, and the inner nodule (left upper) shows moderate differentiation, suggesting the progression of HCC (H&E, $\times 200$). WD, well differentiated; MD, moderately differentiated; PD, poorly differentiated.

3. 간세포암종의 분화도(differentiation grade)

최근 발표된 세계보건기구 소화기계 종양 분류 5판⁶에서는 간세포암종의 분화도를 고분화(well differentiated), 중등도 분화(moderately differentiated), 저분화(poorly differentiated)의 세 단계 분류로 제시하였다. 간세포암종의 분화도는 혈관 침윤 및 전이와 관계가 있으며, 독립적인 예후인자로 알려져 있다.¹⁵⁻¹⁷

대부분의 진행성 간세포암종에서는 2개 이상의 분화도를 보이는 경우가 많으며, 간세포암종의 예후는 가장 나쁜 분화도를 보이는 부분과 관련된다. 따라서 병리보고서의 종양의 분화도에는 가장 나쁜 분화도를 보이는 부분을 보고하거나, 주된 분화도(major differentiation)와 나쁜 분화도(worst differentiation)를 모두 보고하는 것이 권장된다.¹⁸ 간세포암종의 각 분화도 별 조직병리학적 소견은 다음과 같다(Fig. 3).

1) 고분화(well differentiation)

정상 간세포와 유사하고 핵은 정도의 이형성을 보이며, 세포질은 풍부하고 호산성(eosinophilic) 및 호염기성(basophilic)의 다양한 소견을 보인다. 1-2층의 얇은 기둥 모양(trabecular) 배열을 보이며 레티쿨린(reticulin)이 완전히 소실되지 않고 남아 있는 경우가 많아 정상 간조직과의 감별이 어렵다. 간혹 위선형(pseudoglandular)의 구조를 보이며 이것은 간세포암종으로 진단하는 데 도움이 된다. 단, 담즙정체를 보이는 경우 정상 간조직도 위선형 배열을 보일 수 있으므로 진단에 주의가 필요하다. 고분화 간세포암종의 진단에는 면역조직화학염색이 도움이 되며 이 부분은 조기 간세포암종에서 추가 기술되었다.

2) 중등도 분화(moderately differentiation)

헤마톡실린-에오신(H&E) 염색 소견에서 악성 종양의 소견이 뚜렷하며 두꺼운 기둥 모양 배열, 위선형 및 조밀한 배열을 보인다. 핵은 중등도의 이형성을 보이며 간혹 다핵(multinucleated)을 가지는 세포가 있을 수 있다. 세포질이 풍부하고 호산성 또는 호염기성의 다양한 소견을 보일 수 있다. 대부분 조직학적으로 간세포로의 분화가 뚜렷하다.

3) 저분화(poorly differentiation)

조직학적으로 저분화 암의 소견을 보이고 종양세포의 세포질은 거의 없거나 중등도이며 대부분 호염기성이다. 핵은 심한 다형성(pleomorphism)을 보이고 역형성 거대세포가 관찰될 수 있으며 세포분열이 자주 관찰될 수 있다. H&E 소견상 악성 종양의 소견은 뚜렷하나, 간세포로의 분화가 명확하지 않을 수 있다. 간세포로의 분화를 증명하는 데 도움이 되는 면역조직화학염색은 HepPar-1, Arginase-1, polyclonal CEA, CD10, AFP 등이 있다. 이 중 HepPar-1은 간세포암종의 75-85%, Arginase-1은 85-95%에서 양성을 보이며, 간세포암종이 고분화인 경우 HepPar-1이 잘 발현되고 저분화인 경우 Arginase-1이 더 민감도가 높다. Polyclonal CEA와 CD10은 간세포암종에서 담소관을 따라 발현(canalicular expression)하는 것이 특징이며 polyclonal CEA가 종양세포의 세포질에서 발현되는 경우는 담관암으로 분화하는 것을 의미하므로 해석에 주의가 필요하다.¹⁹ H&E 염색의 조직학적 소견과 간세포의 분화와 관련된 면역표지자의 발현이 부합되는 경우에만 간세포암종으로 진단해야 한다.

Fig. 3. Grade of differentiation and histopathology patterns of hepatocellular carcinoma (HCC). (A) Well differentiated (hematoxylin and eosin stain [H&E], ×200), (B) moderately differentiated (H&E, ×200), and (C) poorly differentiated HCC (H&E, ×200). (D) Trabecular pattern (H&E, ×100), (E) pseudoglandular (acinar) pattern (H&E, ×100) and (F) compact pattern (H&E, ×100).

4. 간세포암종의 혈관 침윤

간세포암종의 혈관 침윤은 절제 수술 또는 간이식 후 높은 재발률과 낮은 생존율과 연관되는 주요 예후인자이고, tumor-node-metastasis (TNM) 병기를 정하는 중요한 기준이므로 면밀한 병리학적 검색이 필요하다.^{17,20-22} 간세포암종의 혈관 침윤은 육안적 침윤과 현미경적 침윤을 모두 포함하며 간세포암종의 혈관 침윤은 종양의 내부가 아니라 종양의 피막이나 종양 주변 조직에서 검색해야 한다.^{21,23} 큰 혈관의 경우 평활근이나 탄성판의 존재가 혈관 침윤을 판단하는 데 도움이 되고,²⁴ CD34 및 α -smooth muscle actin (α -SMA)에 대한 면역조직화학염색을 수행하면 혈관내피세포 및 혈관벽의 평활근을 인지하는 데 도움이 된다.²⁵

종양의 크기가 5 cm 이상이거나 다발성으로 발생하는 경우, 침윤성으로 성장하거나 종양의 분화도가 좋지 않은 경우에 혈관 침윤의 빈도가 높다.²⁶ 육안적 혈관 침윤이 있는 경우, 혈관을 침윤한 종양세포의 양이 많고 빈도가 높은 경우에 예후가 더 불량하다.^{23,27-29} 본 연구팀의 최근 연구보고에서 종양 피막이나 종양 주변의 간조직에 생성된 미세혈관 침윤

(microvessel invasion)만을 보이는 경우는 문맥(portal vein)의 침윤까지 보이는 경우보다 좋은 예후를 보여, 향후 간세포암종의 혈관 침윤 정도에 대한 좀 더 세분화된 기준에 대한 합의가 필요하다(Fig. 4).²³

5. 조기 간세포암종(early HCC)

조기 간세포암종은 인체 간세포암종 발생의 가장 초기 단계의 종양으로 혈관 침윤 및 전이가 없고 매우 좋은 예후를 보여 치료 후 5년 생존율이 90% 이상이다.³⁰ 반면, 수술 4년 후의 재발률은 약 80%로 높게 보고되었는데, 이것은 간내 전이 보다는 다른 시기 다중심성 발생(metachronous multicentric occurrence)으로 생각된다.

조기 간세포암종은 육안적으로 경계 불명료 결절 형태로 관찰되며 대부분 크기가 2 cm 미만으로 작다.³¹ 종양피막을 형성하지 않고 경계가 불분명하며 육안적으로 종양의 경계를 확인하기 어려운 경우가 많다. 조직학적으로 고분화도를 보이고, 간세포를 닮은 종양세포가 1-2층으로 구성된 얇은 기둥모양 배열을 하며 주변 간조직을 치환하는 방식으로 증식하여

Fig. 4. Microscopic features of microvascular invasion in hepatocellular carcinoma (HCC). (A) Scan view of HCC with frequent microvascular invasion (hematoxylin and eosin stain [H&E], $\times 10$). Microvessel invasion in the tumor capsule is indicated by a solid arrow, and portal vein invasion is marked by blank arrows. (B) High power view showing microvessel invasion of HCC in a tumor capsule located close to the tumor (H&E, $\times 200$). (C, D) High power view showing portal vein invasion of HCC in the adjacent non-neoplastic liver (H&E, $\times 200$ and $\times 100$).

종양의 경계 부위가 불분명하게 보인다. 간혹 위선형의 구조를 보인다. 종양세포 핵의 이형성은 적으며, 세포질이 적어서 핵/세포질 비율이 높고, 주변 비종양성 간세포에 비해 세포밀도가 2배 이상 증가된 소견을 보인다.³² 초기 간세포암종의 40% 정도에서 지방증이 관찰되며^{31,33} 이러한 경우 핵/세포질 비율 및 세포밀도의 증가를 관찰하기 어려워 진단에 주의가 필요하다(Fig. 5). 초기 간세포암종의 진단에 중요한 병리학적 소견은 다음과 같다.

1) 종양세포의 기질 침윤(stromal invasion)

초기 간세포암종 내부에 남아있는 문맥역의 섬유성 조직 등에 종양세포가 침윤하는 소견이 초기 간세포암종을 진단하는 데 도움이 된다.³⁴ CK19 및 CK7에 대한 면역조직화학염색을 시행하여 소담관 반응(ductular reaction)이 소실된 것을 확인하면 종양세포의 기질 침윤과 주변의 염증반응에 의한 거짓침윤(pseudoinvasion)의 감별에 도움이 된다.³⁴

2) Glypican-3 (GPC-3), heat shock protein 70 (HSP70)

및 glutamine synthetase (GS)의 3종 면역조직화학염색

GPC-3, HSP70 및 GS의 3종 패넬에 대한 면역조직화학염색을 시행하여 이 중 2개 이상이 양성인 경우 초기 간세포암종을 지지하는 소견이며 특히 간생검 조직의 진단에 도움이 된다.³⁵ 이 3종 패넬을 이용한 면역표지자의 민감도 및 특이도

는 절제된 병변의 경우 72% 및 100%, 간생검 조직의 경우 53% 및 100%로 보고되었다.³⁶

3) 신생혈관 발생

간세포암종 발생과정에서 신생혈관이 형성되며, 조직학적으로는 굴모양혈관의 모세혈관화(sinusoidal capillarization) 및 담소관(bile ductule)과 짝을 이루지 않는 소동맥(unpaired artery, non-triadial artery)의 발생이 관찰된다.^{37,38} CD34 면역조직화학염색을 시행하면 정상 간조직의 굴모양혈관 내피세포는 음성반응을 보이는 반면, 모세혈관화가 일어난 부위와 신생 소동맥의 혈관내피세포는 양성반응을 보여 진단에 도움이 된다. 이러한 신생혈관 발생은 간세포암종의 다단계 발생과정에서 점진적으로 진행되는 소견으로, 전암병변인 고등급 이형성 결절(dysplastic nodule)부터 시작되어 초기 간세포암종을 거쳐 진행성 간세포암종에서 가장 높은 혈관 발생의 소견을 보이게 되므로 각 병변에서의 혈관 발생 정도를 비교하면 감별 진단에 도움을 받을 수 있다.^{37,38}

4) 레티쿨린 지지구조

정상 간조직에서는 레티쿨린 지지구조가 잘 유지되어 있는 반면 진행성 간세포암종에서는 레티쿨린 지지구조가 소실되므로 이를 확인하는 것이 진단에 도움이 된다. 그러나 초기 간세포암종과 같이 고분화도의 간세포암종에서는 레티쿨린

Fig. 5. Microscopic features of early hepatocellular carcinoma (HCC). (A) Scan view showing ill-defined lesion (indicated by arrows) with increased cell density and steatosis (hematoxylin and eosin stain [H&E], ×10). (B) Well differentiated HCC showing thin trabeculae (1 to 2 cell thickness) and mild atypia (H&E, ×400). (C) Stromal invasion of tumor cells (indicated by arrows) into the fibrous stroma (H&E, ×400). (D-G) Immunoprofile of early HCC showing the diffuse expression of glutamine synthetase (GS), focal and patch expression of glypican 3 (GPC3), and heat shock protein 70 (HSP70). Increased sinusoidal capillarization is detected by CD34 (immunohistochemical stain, ×200 and ×100).

지지구조가 유지되어 있거나 부분적인 소실만을 보이는 경우가 많아 해석에 주의가 필요하다.

6. 이형성 결절(dysplastic nodule): 전암병변

전암병변인 이형성 결절은 간경변증의 14-25%에서 발생된다. 주로 B형간염, C형간염, 알코올성 등의 간질환 환자에서 발생되며, 드물게는 간경변증이 없는 만성 간질환 환자에서도 발생될 수 있다.

육안 소견상 이형성결절은 대부분 1 cm 정도의 크기로, 주위 간조직과 색, 성상 등이 다르며 절단면이 불룩하게 나오는 특징이 있다. 병리조직학적 특성을 관찰하여 이형성의 정도에 따라 저등급(low grade)과 고등급(high grade) 이형성 결절로 나눈다.³⁹

저등급 이형성 결절은 주변 간경변증 결절에 비해 세포 밀도가 약 1.3배 증가하고 약간의 이형성을 보이는 간세포가 클론성 증식을 하며 재생결절과 비교하여 구조적 변화가 현저하지 않다. 고등급 이형성 결절은 중등도 이상의 이형성을 가지는 세포로 구성되고 구조적 이형성을 보이지만 고분화 간세포암종에는 미치지 못하는 정도이다. 세포밀도는 주변에 비해 1.3배에서 2배 정도 증가하고 작은 간세포 변화(small liver cell change)가 흔히 관찰된다.¹⁴ 고등급 이형성 결절은 분화가 매우 좋은 조기 간세포암종과 감별이 어려우며, 앞서 설명한 GPC-3, HSP70 및 GS의 3중 면역조직화학염색을 시행하거나 종양세포의 기질 침윤 및 혈관 발생 정도를 검색하면 감별에 도움이 된다.

7. 진행성 간세포암종(progressed HCC)

조기 간세포암종에 비하여 진행성 간세포암종은 다양한 분자유전학적 이질성을 보인다. 조기 간세포암종에서 진행성 간세포암종으로 순차적으로 진행하는 각 단계의 전사체를 분석한 연구보고에서 조기 간세포암종은 전사체 변화를 적게 보인 반면 진행성 간세포암종에서는 대규모의 전사체 변화 및 불량한 예후와 관련된 다양한 세포신호 경로의 활성화가 확인되었다.⁴⁰

소 간세포암종(small HCC)은 크기가 2 cm 미만의 작은 간세포암종으로 조기 간세포암종과 작은 크기의 소 진행성 간세포암종(small progressed HCC)을 모두 포함한다. 소 진행성 간세포암종은 크기는 작지만 이미 진행된 간세포암종의 병리학적 특성을 보인다. 육안 소견 상 결절의 경계가 분명하며, 약 50% 정도에서 종양괴사 형성을 보인다. 분화도는 대개 중등도이고 세포학적, 구조적 이형성이 뚜렷하므로 대부분 면역조직화학염색 등의 도움 없이 H&E 염색 소견만으로 진단이 가능하다.³¹ 혈관 침윤 및 간내 전이가 각각 27%, 10%로 보고되어 있어 간내 전이 및 혈관 침윤이 거의 발생되지 않는 조기

간세포암종과 대비된다.⁴¹

8. 진행성 간세포암종의 아형

최근 개정된 세계보건기구의 소화기계 종양 분류 5판에서는 간세포암종의 분자유전학적 특성에 근거하여 아형을 나누고 있으며, 간세포암종의 약 35%를 아형으로 분류할 수 있다.⁶ 간세포암종의 아형은 환자의 예후, 전이 양상, 항암제 치료반응 등과 관련되므로 생검이나 수술 조직에서 특정 아형의 조직학적 소견이 관찰되면 병리보고서에 기술하는 것이 권장된다. 불량한 예후를 보이는 아형은 거대기동형(macrotrabecular massive), 호중구-과도(neutrophil-rich), VETC 아형이며, 림프구-과도(lymphocyte-rich), 투명세포(clear cell) 아형 등은 상대적으로 좋은 예후를 보인다(Fig. 6).

1) 거대기동형 아형(macrotrabecular massive subtype)

거대기동형 아형의 발생 빈도는 10-20%로 종양 면적의 50% 이상에서 6-10층 이상의 종양세포로 이루어진 거대 기동을 형성하는 경우 진단할 수 있다.^{42,43} 대부분 분화가 좋지 않으며 혈관 침윤과 위성결절이 빈번하게 관찰된다. 임상적으로 B형간염 환자에서 발생이 높고, 혈청 AFP가 높은 특징이 있다.⁴² 분자유전학적으로 빈번한 *TP53* 돌연변이와 *FGF19* 증폭이 특징이고 신생혈관 형성과 관련된 유전자(*VEGFA*, *angiopoietin-2* [*ANGPT2*])가 과발현 되어 있다.⁴² 거대기동형 아형은 불량한 예후를 보이며 종양 면적의 30% 이상에서 거대기동을 형성하는 경우에도 불량한 예후와 관련이 있다.⁴⁴

2) 호중구-과도 아형(neutrophil-rich HCC subtype)

호중구-과도 아형은 매우 드물고(1% 미만) 종양세포가 granulocyte colony-stimulating factor를 생성하여 종양 내부에 과도한 호중구의 침윤이 일어나며, 간혹 종양세포가 육종과 유사한 모양을 보일 수 있다. 임상적으로는 혈중 백혈구 수치, C-반응단백(CRP) 및 IL-6가 증가되어 있어 감염 및 패혈증으로 오인될 수 있다. 이 아형은 예후가 불량한 것으로 보고되어 있다.

3) Vessels encapsulating tumor clusters (VETC) 아형

최근 간세포암종의 종양세포군집이 혈관 내피로 둘러싸인 특징을 보이는 VETC 아형이 공격적인 성장양식 및 불량한 예후를 보이는 것으로 보고되었으며, 발생 빈도는 약 19%이다.^{45,46} 간세포암종의 종양혈관은 모세혈관(capillary) 형과 굴모양혈관(sinusoid)의 형태를 보이는데, VETC 아형은 종양세포를 둘러싸는 굴모양혈관이 종양 면적의 55% 이상에서 보이는 경우로 CD34 면역조직화학염색이 진단에 도움이 된다.⁴⁷

Fig. 6. Microscopic images of the hepatocellular carcinoma subtypes. (A) Macrotrabecular massive subtype (hematoxylin and eosin stain [H&E], $\times 10$, $\times 100$ and $\times 200$), (B) vessels encapsulating tumor clusters subtype (H&E, $\times 10$ and $\times 400$, and immunohistochemical stain, $\times 400$), (C) scirrhous subtype (H&E, $\times 10$, $\times 100$, and $\times 400$), (D) steatohepatitic subtype (H&E, $\times 10$, $\times 200$, and $\times 400$), (E) lymphocyte-rich subtype (H&E, $\times 10$, $\times 200$, and $\times 400$), and (F) clear cell subtype (H&E, $\times 10$, $\times 200$, and $\times 400$). The endothelial cells encapsulating tumor cells are highlighted by immunohistochemical stain for CD34.

VETC 아형은 혈관성 전이를 유발하며 특히 폐로 전이된 간세포암종에서 VETC 아형의 빈도가 높다.⁴⁸ VETC 아형은 상피간엽이행(epithelial to mesenchymal transition) 없이 전이를 일으키는 것으로 보고되었으며,⁴⁹ 최근 연구에서 안드로젠수용체(androgen receptor)의 발현이 낮은 상태에서는 ANGPT2에 의한 혈관 재형성이 발생되어 VETC에 의한 전이가 유발되는 반면 안드로젠수용체의 발현이 높은 상태에서는 Rac1에 의하여 lamellipodia가 형성되어 침습성 전이가 발생된다고 보고되었다.⁵⁰ VETC 아형은 VETC의 소견을 보이지 않는 간세포암종에 비하여 sorafenib 치료 효과가 더 좋은 것으로 알려져 있다.⁴⁶

VETC 아형의 15%에서 거대기둥형 아형이 관찰되는 한편 거대기둥형 아형의 36%에서 VETC 아형이 관찰되어, 혈관 관련 유전자군(gene signature)이 발현되는 간세포암종 그룹이 이러한 조직병리학적 특성을 보일 가능성이 있다.^{45,51}

4) 경화형 아형(scirrhous subtype)

경화형 간세포암종의 발생빈도는 약 4%로 섬유성 종양기질이 종양 면적의 50% 이상에서 관찰되는 특징을 보인다.^{42,52-54} 종양세포 군집의 외측 섬유성 기질에 맞닿은 쪽에 위치한 종양세포는 간 줄기세포와 비슷한 모습을 보이며, 관련 표지자(CK19, epithelial cell adhesion molecule [EpCAM] 등)를 발현한다. 반면 종양세포 군집의 내측에 위치한 종양세포는 조금 더 간세포를 닮은 분화된 모습을 보인다.^{52,53} 분자유전학적 특징은 *TSC1/TSC2* 변이와 transforming growth factor-beta (TGF- β) 신호 활성화이며, 간 줄기세포 연관 유전자(*KRT7*, *KRT19*, *THY1*, *CD133*) 및 상피간엽이행과 관련된 유전자(*VIM*, *SNAIL*, *SMAD3*, *TWIS*)의 활성화가 보고되었다.^{42,52} 이 아형의 예후는 다양하게 보고되어 있으나 5 cm 이상의 큰 종양의 경우 일반적인 간세포암종에 비해 예후가 불량한 것으로 보고되어 있다.⁵²

5) 섬유층판형 간세포암종(fibrolamellar carcinoma subtype)

섬유층판형은 발생 빈도 1%의 매우 드문 아형으로 25세 미만의 소아 및 젊은 성인에서 기저 간 질환이 없는 상태에서 발생하는 특징을 보이며, 주로 서양에서 발생하는 것으로 보고되어 있다.⁵⁵ 종양세포는 풍부한 호산성의 세포질과 뚜렷한 핵소체를 가지며, 섬유성 종양기질이 조밀하게 층판배열하는 특징을 보인다. 최근 섬유층판형 아형에서 *DNAJB1-PRKACA* 유전자 융합이 규명되었고, *PRKACA* 유전자 재배열을 형광제자리 부합법(fluorescence in situ hybridization, FISH) 검사로 확인하는 것이 이 아형을 확진하는 데 중요하다.⁵⁶⁻⁵⁸ 섬유층판형 간세포암종의 섬유성 종양기질에서는 경화형 간세포암

종과 비교하여 암 연관 섬유아세포(cancer associated fibroblast, CAF) 및 2형 대식세포 등의 침윤이 매우 적다.⁵⁹

섬유층판형 아형의 예후는 간경변증에서 발생한 일반적인 간세포암종에 비해 좋은 편이나, 간경변증이 없이 발생한 일반적인 간세포암종과는 비슷하다. 간세포암종에서 부분적으로 섬유층판형의 소견을 보이는 경우는 일반적인 간세포암종과 같은 임상병리학적 특성을 가지므로, 섬유층판형 간세포암종의 진단은 전체 종양이 이 아형의 특징적인 소견을 보이는 경우로 국한해야 한다.^{55,60}

6) 지방간염형 아형(steatohepatic subtype)

지방간염형 아형은 간세포암종의 5-20%를 차지하고 비알코올 지방간염이나 대사증후군이 있는 환자에서 발생률이 높다. 이 아형으로 진단된 환자의 비종양 간 조직에서는 지방간염이 자주 관찰된다. 병리학적으로 종양 내부에 지방 간염의 특징적인 소견인 지방증, 종양세포의 풍선양 변화, 염증 및 "닭장 철망 패턴"의 세포 주변 섬유화 등의 소견을 보이며, 대부분 분화가 좋은 종양세포로 구성된다.^{42,61-63} 주요 분자유전학적 변화는 IL-6/JAK/STAT 활성화로, JAK/STAT 신호 전달경로의 주요 조절인자인 IL-6의 상향 조절에 의한 CAF의 증식 및 CRP의 과발현을 보이며, 종양 기질에서 노화관련분비표현형(senescence associated secretory phenotype)의 발현이 증가한다.⁶¹ *CTNNB1*, *TERT*, *TP53* 돌연변이의 빈도는 다른 아형에 비해 매우 낮으며, 예후는 일반적인 간세포암종과 유사한 것으로 보고되었다.^{42,61}

7) 비염색 아형(chromophobe subtype)

비염색 아형의 발생빈도는 3% 정도로, 비염색성의 맑고 투명한 세포질을 갖는 종양세포가 특징적이다. 대부분의 종양세포는 이형성이 적은 단조로운 소견을 보이나 일부에서는 급격하게 심한 핵의 이형성을 보인다.⁶⁴ 텔로머레이즈 효소를 활용하지 않는 방식인 대안적 텔로미어 유지기전(alternative lengthening of telomere, ALT)이 특징적이므로 이 아형을 확진하기 위해서는 텔로미어 FISH 검사 등을 수행하여 ALT를 확인하는 것이 필요하다. 예후는 일반적인 간세포암종과 유사한 것으로 보고되었다.⁶⁴

8) 림프구-과도 아형(lymphocyte-rich subtype)

림프구-과도 아형의 발생 빈도는 1% 미만이며 종양 내부에 과도한 림프구 침윤이 특징으로 림프상피종 유사 간세포암종(lymphoepithelioma-like HCC)으로 불리기도 하였다.⁶⁵⁻⁶⁷ 분자유전학적 기전은 아직 밝혀지지 않았다. 림프상피종 유사 담관상피암종(lymphoepithelioma-like cholangiocarcinoma)과는 달리 Epstein-Barr virus 감염과 연관이 없으며, 현미부

수체 불안정성(microsatellite instability)과도 관련되지 않는 것으로 보고되었다.^{65,66} 이 아형은 programmed death receptor 1 (PD-1) 및 programmed death ligand 1 (PD-L1) 발현이 흔하게 관찰되어 면역세포의 침윤이 항암면역 역할을 하는 것으로 생각되며 예후는 좋은 것으로 보고되었다.^{65,68}

9) 투명세포 아형(clear cell subtype)

투명세포 아형의 발생빈도는 3-7%로, 종양의 80% 이상이 투명한 세포질을 가진 종양세포로 구성된 경우 진단할 수 있다. 종양세포의 투명한 세포질은 글리코겐의 축적에 의해 형성된 것이며, 간혹 지방증이 보일 수 있다.⁶⁹ 일반적인 간세포암종과 비교하였을 때 좋은 예후를 보이지만, 분자유전학적 기전에 대한 정보는 아직 부족하다.

9. CK19 발현 간세포암종

간 줄기세포 표지자를 발현하는 간세포암종은 공격적 생물학적 성격을 갖거나 치료 저항성을 보여 예후가 불량한 것으로 보고되었으며, 최근 제시된 간세포암종의 분자유전학적 분류 중 “줄기세포 표현형(progenitor phenotype)”에 해당한다.⁷⁰⁻⁷³ 간 줄기세포 표지자에는 CK19, EpCAM, CD133, c-Kit 등이 있으나 그중 CK19이 다른 간 줄기세포 표지자와 동시 발현율이 가장 높고 간세포암종의 예후와 가장 밀접한 관련성을 보인다.^{72,74} CK19은 세포질에 존재하는 중간섬유(intermediate filament)를 구성하는 크기가 작은 케라틴 중

하나로, 간 줄기세포에서 발현되고 성숙한 간세포에서는 발현이 소실되나 담관세포에서는 계속 발현이 유지되는 특성을 보인다.⁷⁵

1) 임상병리학적 특성

CK19는 간세포암종의 4-35%에서 발현된다. 임상적으로는 B형간염 환자에서 빈도가 높고, 높은 혈청 AFP 수치 및 림프절 전이의 특성을 보인다. 조직학적으로는 종양피막의 형성이 적은 침윤성 성장을 하고 혈관 침윤이 빈번하다. 종양의 분화도는 나빠져 대부분 간세포를 닮은 종양세포로 구성되나 간혹 부분적으로 크기가 작고 핵/세포질의 비율이 높은 줄기세포를 닮은 종양세포로 구성되기도 한다. 전형적인 간세포암종에서는 섬유성 기질이 거의 없으나, CK19 발현 간세포암종에서는 부분적인 섬유성 기질의 형성이 자주 관찰된다(Fig. 7).⁷² 이에 비하여 종양 면적의 50% 이상에서 섬유성 종양기질이 관찰되는 경우는 경화성 간세포암종으로 진단한다.

CK19 발현 간세포암종에서 CK19은 대개 종양의 전체가 아닌 일부분에서 발현되며 절제조직에서 종양세포의 5% 이상, 생검조직에서는 1% 이상의 종양세포에서 발현하는 경우에 진단이 가능하다. CK19은 줄기세포를 닮은 종양세포 및 간세포를 닮은 종양세포 모두에서 발현될 수 있다. H&E 소견만으로는 CK19의 발현을 예측하기 어려우며 반드시 CK19에 대한 면역조직화학염색을 시행하여 확인해야 한다. 동일한 간세포암종 환자에서 시행한 생검 및 수술 절제조직에서의

Fig. 7. Hepatocellular carcinoma with CK19 expression (A) Scan view showing infiltrative growth without a tumor capsule and tumor-stromal fibrosis (hematoxylin and eosin stain [H&E], $\times 10$). (B) Moderately differentiated hepatocellular carcinoma (HCC) showing a trabecular pattern (H&E, $\times 40$). (C) Stromal fibrosis is noted between tumor cell nests (H&E, $\times 40$). (D) HCC is composed mainly of polygonal tumor cells with ample eosinophilic cytoplasm, suggesting hepatocyte differentiation (H&E, $\times 200$). (E) A minor portion of the tumor is composed of small round tumor cells with an increased N/C ratio, suggesting primitive features (H&E, $\times 200$). (F) Immunohistochemical staining for CK19 showing focal and patch expression in tumor cells (immunohistochemical stain, $\times 200$).

CK19 발현을 비교한 연구에서 절제조직을 기준으로 생검조직의 CK19 발현의 민감도, 특이도, 정확도는 각각 80%, 88%, 86%로 보고되었다.⁷⁶ 따라서 간세포암종 절제조직 및 생검조직에서 CK19의 발현을 확인하는 것이 환자의 예후 예측에 도움이 될 수 있다.

2) 분자병리학적 특성

CK19 발현 간세포암종에서는 TGF- β 신호전달 경로의 활성화, 상피간엽이행 관련 유전자 발현 증가와 함께 *VASP*, *TACSTD2*, *LAMB1*, *LAMC2*, *PDGFRA* 등 전이 및 세포 외 기질 관련 유전자의 발현 증가가 보고되었다.⁷⁴ 생체 외 연구 보고에서 간세포암종 종양세포에 CK19 유전자를 주입하면 종양세포의 침습력, 증식력 및 줄기세포능이 증가하였고 TGF- β 신호전달 경로의 활성화가 관찰되었다.⁷⁷ CK19 발현 간세포암종은 염색체 불안정성이 높고, 텔로미어 합성효소 활성 증가 및 TERT 발현 증가로 텔로미어의 길이가 길게 유지되어 있는 특성을 보이는데, 이는 종양세포의 생존력을 증가시켜 불량한 예후와 관련되는 것으로 알려져 있다.^{78,79}

CK19의 발현조절은 종양상피세포와 종양기질세포의 상호

신호전달 조절에 의하여 이루어진다. 본 연구팀은 섬유성 종양기질의 CAF에서 생성한 간세포 성장인자(hepatocyte growth factor)가 종양상피세포의 c-MET을 활성화하며, 이후 MET-ERK1/2-AP1 및 SP1 신호전달경로가 활성화되어 *KRT19*의 전사가 증가되고 세포분열과 운동성을 촉진하여 종양의 침윤성 성장을 유발하는 것을 보고한 바 있다.⁸⁰⁻⁸²

CK19 발현 간세포암종에서는 PD-L1 발현이 높으며, PD-L1 발현 간세포암종에서 간 줄기세포 표지자(EpCAM, SALL4 등)의 발현이 높은 것으로 보고되었다.^{68,83} 또한, CK19 및 SALL4 발현 간세포암종에서 종양 미세환경의 immune-high, immune-mid, immune-low의 차이에 따라 무병 생존 기간의 뚜렷한 차이가 보고되었다.⁸⁴ 이와 같이 CK19 발현 간세포암종의 종양면역미세환경의 이질성이 확인되었으며, 이를 타겟으로 하는 항암면역 치료 가능성이 제시되고 있다.

3) 예후 및 치료 반응

CK19 발현 간세포암종은 근치적 수술 후 재발 위험이 높다. CK19 발현 간세포암종의 약 80%에서 5년 내 종양의 재발이 보고되었고 이 중 1년 이내 재발은 47%였다.^{85,86} 반면

Fig. 8. Integrative molecular and pathological classification of hepatocellular carcinoma. IHC, immunohistochemistry; EMT, epithelial to mesenchymal transition; HBV, hepatitis B virus; AFP, alpha-fetoprotein; CRP, C-reactive protein; HCV, hepatitis C virus.

CK19 비발현 간세포암종은 Milan 기준을 넘는 환자라도 간이식 후 예후가 Milan 기준을 충족하는 환자나 비슷한 정도로 좋은 것이 보고되어, CK19의 발현 여부를 통해 간세포암종 환자의 간이식 기준을 확대 적용할 가능성이 제시되었다.^{87,88}

또한 CK19 발현 간세포암종은 항암 치료 또는 간동맥 화학색전술(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)이나 고주파 열치료술(radiofrequency ablation)을 포함하는 국소 치료에 저항성을 보인다. 본 연구팀의 연구에서 TACE 후 잔존 간세포암종은 간 줄기세포 표지자 발현 비율이 높았고, 색전술의 횡수가 증가할수록 간 줄기세포 표지자 및 저산소증 표지자의 발현률이 높았다.^{87,89} TACE 후 간세포암종의 종양기질에서 α -SMA, fibroblast activation protein 등의 발현이 증가되는 종양미세환경의 변화를 보였다.⁷⁶ 반면, CK19, EpCAM, CAIX에 대한 면역조직화학염색에서 모두 음성인 간세포암종은 TACE 후 종양 전체가 완전히 괴사되는 경향을 보였다.⁸⁷ 즉, TACE에 의하여 극도의 저산소증이 유발되면 CK19을 발현하지 않는 종양세포는 괴사되는 반면, CK19을 발현하는 종양세포는 생존하여 잔존 암을 형성하고 치료 저항성을 유발하는 것으로 생각된다.^{76,90}

10. 간세포암종의 병리-분자유전학적 분류

지난 10여년 동안 대규모 분자유전학적 분석에 기반한 간세포

암종의 분자유전학적 분류들이 보고되었고, 최근 이를 기반으로 임상병리학적 소견을 종합분석하여 병리-분자유전학적 분류가 제시되었다(Fig. 8).^{1-5,42,91} 증식군(proliferation class)은 비증식군(non-proliferation class)에 비하여 예후가 불량하며, 병리학적으로 분화도가 나빠고 혈관 침윤이 빈번하게 관찰된다. 임상적으로 증식군에서는 혈청 AFP의 수치가 높고, 우리나라에서 호발하는 B형간염의 빈도가 높다. 반면 비증식군에서는 혈청 AFP의 수치는 높지 않고 음주, 만성 대사 질환 및 C형간염의 빈도가 높은 특성을 보인다.^{42,92} 불량한 예후를 보이는 것으로 알려진 간세포암종의 특수 아형인 거대기동형 아형(macrotrabecular massive subtype)과 줄기세포표현형(progenitor phenotype)은 증식군에 속하며, 특히 불량한 예후인자로 알려진 *FGF19* 증폭은 거대기동형 아형의 특징이다.⁴² 줄기세포 표현형(progenitor phenotype)은 CK19에 대한 면역조직화학염색을 시행하여 진단할 수 있으며, CK19 발현 간세포암종에서 기술한 바와 같다.

CTNNB1 변이 간세포암종은 비증식군에 속하며 세계보건기구에서 분류한 간세포암종의 특수 아형은 아니지만 최근 유전자 변이에 따른 병리학적 소견이 잘 규명되었으므로 추가 기술하고자 한다.

1) *CTNNB1* 변이 간세포암종

CTNNB1 돌연변이는 간세포암종의 약 26-40%에서 확인되

Fig. 9. *CTNNB1* mutated hepatocellular carcinoma (HCC). (A) Scan view showing expanding growth with a tumor capsule (hematoxylin and eosin stain [H&E], ×10). (B) Moderately differentiated HCC showing a thin trabecular pattern (H&E, ×100). (C) HCC showing an acinar pattern and cholestasis (H&E, ×400). (D) Immunohistochemical staining for β -catenin showing nuclear and cytoplasmic expression in tumor cells, suggesting a β -catenin mutation (immunohistochemical stain, ×400).

며 *TP53*, *TERT* 프로모터 돌연변이와는 별개로 간세포암종 발생에 중요한 역할을 한다.^{93,94} β -catenin은 WNT/ β -catenin 신호전달경로의 주요 신호 전달자로서 간의 생리학적 조절과 분포(zonation)에 중요한 역할을 한다. β -catenin의 인산화 위치에 돌연변이가 생기면 β -catenin이 분해되지 않고 안정화되어 핵내에 축적되며, 이는 하루 특정 유전자(glutamine synthetase, *cyclin-D1*, *VEGF-A*, *lect2*, *Axin-2* 등)의 활성화를 유발하고, 다양한 전사인자와 작용하여 종양세포의 증식과 생존을 증가시킨다.⁹²

CTNNB1 변이 간세포암종의 분자병리학적 특징은 다음과 같다. 종양의 크기가 비교적 크고, 종양의 피막이 잘 유지되어 있다. 대부분 종양세포는 간세포로의 분화가 뚜렷하고 분화도가 좋으며, 얇은 기동형과 위선형 구조가 흔히 관찰된다(Fig. 9). 담즙 이동의 조절장애가 유발되어 담즙 정체가 빈번히 관찰되며, 특히 담즙산 수송체 중 하나인 *SLCO1B3*가 상향조절되므로 자기공명영상의 조영제인 gadoxetic acid의 흡수를 증가시켜 간세포암종 진단에 도움이 된다.⁹⁵ 면역세포의 침윤이 적고 분자면역학적 분류상 “면역제외(immune excluded)”에 속한다. 면역조직화학염색에서 β -catenin의 핵 발현이나 glutamine synthetase의 미만성 세포질 발현이 진단에 도움이 된다.^{42,96} 예후는 증식군에 해당하는 아형에 비해 좋은 편이다.

결 론

간세포암종은 매우 다양한 분자유전학적 이질성을 가진다. 최근 10여년 동안 수행된 대규모 분자유전학적 분석 연구를 기반으로 한 간세포암종의 병리-분자유전학적 분류가 제시되었다. 최근 발간된 세계보건기구의 소화기계 종양 분류 최신 판에서는 병리-분자유전학적 특성에 따른 간세포암종의 아형 분류를 제시하였고, 현재 간세포암종의 약 35%를 아형으로 분류할 수 있다. 또한 간세포암종의 아형들은 절제 조직 외에만 생검조직에서도 병리학적 검색이 가능하므로 병리검사 보고서에 특정 아형에 대하여 기술함으로써 환자의 치료 전략 수립에 도움을 줄 수 있다.

간세포암종의 병리학적 예후인자는 종양의 크기, 개수, 분화도, 혈관 침윤, 간내 전이, 만성 간질환 여부, CK19 발현, 간세포암종의 아형, *FGF19* 증폭, 증식성 유전자 발현(proliferative gene expression profiling) 등이 있다. 이에 대한 면밀한 병리학적 검색 및 특수 검사를 시행하여, 그 결과를 병리보고서에 함께 기술하는 것이 권장된다.

앞으로 간세포암종의 조직병리학적 소견 및 분자유전학적 특성에 대한 종합적인 분석과 이에 기반한 새로운 간세포암종의 아형 발굴이 기대되며, 이는 간세포암종 환자의 맞춤 치료 개발 및 예후 개선에 도움이 될 수 있을 것으로 생각된다.

REFERENCES

1. Lee JS, Chu IS, Heo J, et al. Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling. *Hepatology* 2004;40:667-676.
2. Boyault S, Rickman DS, de Reyniès A, et al. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology* 2007;45:42-52.
3. Hoshida Y, Nijman SM, Kobayashi M, et al. Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2009;69:7385-7392.
4. Chiang DY, Villanueva A, Hoshida Y, et al. Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2008;68:6779-6788.
5. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive and integrative genomic characterization of hepatocellular carcinoma. *Cell* 2017;169:1327-1341.e23.
6. Torbenson MS, Ng IOL, Park YN, Roncalli M, Sakamoto M. Hepatocellular carcinoma. In: WHO Classification of Tumours Editorial Board, eds. Digestive system tumours. WHO classification of tumours series. 5th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2019;229-239.
7. Plessier A, Codes L, Consigny Y, et al. Underestimation of the influence of satellite nodules as a risk factor for post-transplantation recurrence in patients with small hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 2004;10(2 Suppl 1):S86-S90.
8. Burt AD, Alves V, Bedossa P, et al. Data set for the reporting of intrahepatic cholangiocarcinoma, perihilar cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma: recommendations from the International Collaboration on Cancer Reporting (ICCR). *Histopathology* 2018;73:369-385.
9. Rhee H, Chung T, Yoo JE, et al. Gross type of hepatocellular carcinoma reflects the tumor hypoxia, fibrosis, and stemness-related marker expression. *Hepatol Int* 2020;14:239-248.
10. Jang JY, Lee JS, Kim HJ, et al. The general rules for the study of primary liver cancer. *Journal of Liver Cancer. J Liver Cancer* 2017;17:19-44.
11. Hui AM, Takayama T, Sano K, et al. Predictive value of gross classification of hepatocellular carcinoma on recurrence and survival after hepatectomy. *J Hepatol* 2000;33:975-979.
12. Choi GH, Han DH, Kim DH, et al. Outcome after curative resection for a huge (>or=10 cm) hepatocellular carcinoma and prognostic significance of gross tumor classification. *Am J Surg* 2009;198:693-701.
13. Nakashima O, Sugihara S, Kage M, Kojiro M. Pathomorphologic characteristics of small hepatocellular carcinoma: a special reference to small hepatocellular carcinoma with indistinct margins. *Hepatology* 1995;22:101-105.
14. Park YN. Update on precursor and early lesions of hepatocellular carcinomas. *Arch Pathol Lab Med* 2011;135:704-715.
15. Zhou L, Rui JA, Wang SB, et al. Outcomes and prognostic factors of cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma after radical major hepatectomy. *World J Surg* 2007;31:1782-1787.
16. Lang H, Sotiropoulos GC, Brokalaki EI, et al. Survival and recurrence rates after resection for hepatocellular carcinoma in

- noncirrhotic livers. *J Am Coll Surg* 2007;205:27-36.
17. Jonas S, Bechstein WO, Steinmüller T, et al. Vascular invasion and histopathologic grading determine outcome after liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Hepatology* 2001;33:1080-1086.
18. Han DH, Choi GH, Kim KS, et al. Prognostic significance of the worst grade in hepatocellular carcinoma with heterogeneous histologic grades of differentiation. *J Gastroenterol Hepatol* 2013;28:1384-1390.
19. Sciarra A, Park YN, Sempoux C. Updates in the diagnosis of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma. *Hum Pathol* 2020;96:48-55.
20. Tsai TJ, Chau GY, Lui WY, et al. Clinical significance of microscopic tumor venous invasion in patients with resectable hepatocellular carcinoma. *Surgery* 2000;127:603-608.
21. Rodríguez-Perálvarez M, Luong TV, Andreana L, Meyer T, Dhillon AP, Burroughs AK. A systematic review of microvascular invasion in hepatocellular carcinoma: diagnostic and prognostic variability. *Ann Surg Oncol* 2013;20:325-339.
22. Amin MB, Edge SB, Greene F, et al. *AJCC cancer staging manual*. 8th ed. New York: Springer, 2017.
23. Kang I, Jang M, Lee JG, et al. Subclassification of microscopic vascular invasion in hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 2020 Jan 14. [Epub ahead of print]
24. Fan L, Mac MT, Frishberg DP, et al. Interobserver and intra-observer variability in evaluating vascular invasion in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2010;25:1556-1561.
25. Cong WM, Bu H, Chen J, et al. Practice guidelines for the pathological diagnosis of primary liver cancer: 2015 update. *World J Gastroenterol* 2016;22:9279-9287.
26. Kim BK, Han KH, Park YN, et al. Prediction of microvascular invasion before curative resection of hepatocellular carcinoma. *J Surg Oncol* 2008;97:246-252.
27. Park S, Choi S, Cho YA, et al. Evaluation of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8th edition staging system for hepatocellular carcinoma in 1,008 patients with curative resection. *Cancer Res Treat* 2020;52:1145-1152.
28. Roayaie S, Blume IN, Thung SN, et al. A system of classifying microvascular invasion to predict outcome after resection in patients with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2009;137:850-855.
29. Feng LH, Dong H, Lau WY, et al. Novel microvascular invasion-based prognostic nomograms to predict survival outcomes in patients after R0 resection for hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2017;143:293-303.
30. Takayama T, Makuuchi M, Hirohashi S, et al. Early hepatocellular carcinoma as an entity with a high rate of surgical cure. *Hepatology* 1998;28:1241-1246.
31. The International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia. Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: a report of the international consensus group for hepatocellular neoplasia. *Hepatology* 2009;49:658-664.
32. Kojiro M. Pathological evolution of early hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2002;62 Suppl 1:43-47.
33. Kutami R, Nakashima Y, Nakashima O, Shiota K, Kojiro M. Pathomorphologic study on the mechanism of fatty change in small hepatocellular carcinoma of humans. *J Hepatol* 2000;33:282-289.
34. Park YN, Kojiro M, Di Tommaso L, et al. Ductular reaction is helpful in defining early stromal invasion, small hepatocellular carcinomas, and dysplastic nodules. *Cancer* 2007;109:915-923.
35. Di Tommaso L, Franchi G, Park YN, et al. Diagnostic value of HSP70, glypican 3, and glutamine synthetase in hepatocellular nodules in cirrhosis. *Hepatology* 2007;45:725-734.
36. Di Tommaso L, Destro A, Seok JY, et al. The application of markers (HSP70 GPC3 and GS) in liver biopsies is useful for detection of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2009;50:746-754.
37. Park YN, Yang CP, Fernandez GJ, Cubukcu O, Thung SN, Theise ND. Neovascularization and sinusoidal "capillarization" in dysplastic nodules of the liver. *Am J Surg Pathol* 1998;22:656-662.
38. Roncalli M, Roz E, Coggi G, et al. The vascular profile of regenerative and dysplastic nodules of the cirrhotic liver: implications for diagnosis and classification. *Hepatology* 1999;30:1174-1178.
39. International Working Party. Terminology of nodular hepatocellular lesions. *Hepatology* 1995;22:983-993.
40. Marquardt JU, Seo D, Andersen JB, et al. Sequential transcriptome analysis of human liver cancer indicates late stage acquisition of malignant traits. *J Hepatol* 2014;60:346-353.
41. Kojiro M, Nakashima O. Histopathologic evaluation of hepatocellular carcinoma with special reference to small early stage tumors. *Semin Liver Dis* 1999;19:287-296.
42. Calderaro J, Couchy G, Imbeaud S, et al. Histological subtypes of hepatocellular carcinoma are related to gene mutations and molecular tumour classification. *J Hepatol* 2017;67:727-738.
43. Ziol M, Poté N, Amadeo G, et al. Macrotrabecular-massive hepatocellular carcinoma: a distinctive histological subtype with clinical relevance. *Hepatology* 2018;68:103-112.
44. Calderaro J, Ziol M, Paradis V, Zucman-Rossi J. Molecular and histological correlations in liver cancer. *J Hepatol* 2019;71:616-630.
45. Renne SL, Woo HY, Allegra S, et al. Vessels encapsulating tumor clusters (VETC) is a powerful predictor of aggressive hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2020;71:183-195.
46. Fang JH, Xu L, Shang LR, et al. Vessels that encapsulate tumor clusters (VETC) pattern is a predictor of sorafenib benefit in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2019;70:824-839.
47. Zhang Q, Wu J, Bai X, Liang T. Evaluation of intra-tumoral vascularization in hepatocellular carcinomas. *Front Med (Lausanne)* 2020;7:584250.
48. Woo HY, Rhee H, Yoo JE, et al. Lung and lymph node metastases from hepatocellular carcinoma: comparison of pathological aspects. *Liver Int* 2021 Sep 7. [Epub ahead of print]
49. Fang JH, Zhou HC, Zhang C, et al. A novel vascular pattern promotes metastasis of hepatocellular carcinoma in an epithelial-mesenchymal transition-independent manner. *Hepatology* 2015;62:452-465.
50. Zhou HC, Liu CX, Pan WD, et al. Dual and opposing roles of the androgen receptor in VETC-dependent and invasion-dependent metastasis of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2021;75:900-911.
51. Villa E, Critelli R, Lei B, et al. Neoangiogenesis-related genes are hallmarks of fast-growing hepatocellular carcinomas and worst

- survival. Results from a prospective study. *Gut* 2016;65:861-869.
52. Seok JY, Na DC, Woo HG, et al. A fibrous stromal component in hepatocellular carcinoma reveals a cholangiocarcinoma-like gene expression trait and epithelial-mesenchymal transition. *Hepatology* 2012;55:1776-1786.
53. Matsuura S, Aishima S, Taguchi K, et al. 'Scirrhous' type hepatocellular carcinomas: a special reference to expression of cytokeratin 7 and hepatocyte paraffin 1. *Histopathology* 2005;47:382-390.
54. Kurogi M, Nakashima O, Miyaaki H, Fujimoto M, Kojiro M. Clinicopathological study of scirrhous hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21:1470-1477.
55. Chagas AL, Kikuchi L, Herman P, et al. Clinical and pathological evaluation of fibrolamellar hepatocellular carcinoma: a single center study of 21 cases. *Clinics (Sao Paulo)* 2015;70:207-213.
56. Honeyman JN, Simon EP, Robine N, et al. Detection of a recurrent DNAJB1-PRKACA chimeric transcript in fibrolamellar hepatocellular carcinoma. *Science* 2014;343:1010-1014.
57. Graham RP, Jin L, Knutson DL, et al. DNAJB1-PRKACA is specific for fibrolamellar carcinoma. *Mod Pathol* 2015;28:822-829.
58. Griffith OL, Griffith M, Krysiak K, et al. A genomic case study of mixed fibrolamellar hepatocellular carcinoma. *Ann Oncol* 2016;27:1148-1154.
59. Kim YJ, Rhee H, Yoo JE, et al. Tumour epithelial and stromal characteristics of hepatocellular carcinomas with abundant fibrous stroma: fibrolamellar versus scirrhous hepatocellular carcinoma. *Histopathology* 2017;71:217-226.
60. Malouf GG, Brugières L, Le Deley MC, et al. Pure and mixed fibrolamellar hepatocellular carcinomas differ in natural history and prognosis after complete surgical resection. *Cancer* 2012;118:4981-4990.
61. Lee JS, Yoo JE, Kim H, et al. Tumor stroma with senescence-associated secretory phenotype in steatohepatic hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2017;12:e0171922.
62. Salomao M, Remotti H, Vaughan R, Siegel AB, Lefkowitz JH, Moreira RK. The steatohepatic variant of hepatocellular carcinoma and its association with underlying steatohepatitis. *Hum Pathol* 2012;43:737-746.
63. Salomao M, Yu WM, Brown RS Jr, Emond JC, Lefkowitz JH. Steatohepatic hepatocellular carcinoma (SH-HCC): a distinctive histological variant of HCC in hepatitis C virus-related cirrhosis with associated NAFLD/NASH. *Am J Surg Pathol* 2010;34:1630-1636.
64. Wood LD, Heaphy CM, Daniel HD, et al. Chromophobe hepatocellular carcinoma with abrupt anaplasia: a proposal for a new subtype of hepatocellular carcinoma with unique morphological and molecular features. *Mod Pathol* 2013;26:1586-1593.
65. Chan AW, Tong JH, Pan Y, et al. Lymphoepithelioma-like hepatocellular carcinoma: an uncommon variant of hepatocellular carcinoma with favorable outcome. *Am J Surg Pathol* 2015;39:304-312.
66. Sia D, Jiao Y, Martinez-Quetglas I, et al. Identification of an immune-specific class of hepatocellular carcinoma, based on molecular features. *Gastroenterology* 2017;153:812-826.
67. Torbenson MS. Morphologic subtypes of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol Clin North Am* 2017;46:365-391.
68. Calderaro J, Rousseau B, Amadeo G, et al. Programmed death ligand 1 expression in hepatocellular carcinoma: relationship With clinical and pathological features. *Hepatology* 2016;64:2038-2046.
69. Li T, Fan J, Qin LX, et al. Risk factors, prognosis, and management of early and late intrahepatic recurrence after resection of primary clear cell carcinoma of the liver. *Ann Surg Oncol* 2011;18:1955-1963.
70. Lee JS, Heo J, Libbrecht L, et al. A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. *Nat Med* 2006;12:410-416.
71. Ji J, Wang XW. Clinical implications of cancer stem cell biology in hepatocellular carcinoma. *Semin Oncol* 2012;39:461-472.
72. Kim H, Choi GH, Na DC, et al. Human hepatocellular carcinomas with "stemness"-related marker expression: keratin 19 expression and a poor prognosis. *Hepatology* 2011;54:1707-1717.
73. Oishi N, Yamashita T, Kaneko S. Molecular biology of liver cancer stem cells. *Liver Cancer* 2014;3:71-84.
74. Govaere O, Komuta M, Berkers J, et al. Keratin 19: a key role player in the invasion of human hepatocellular carcinomas. *Gut* 2014;63:674-685.
75. Roskams T. Liver stem cells and their implication in hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Oncogene* 2006;25:3818-3822.
76. Nahm JH, Rhee H, Kim H, et al. Increased expression of stemness markers and altered tumor stroma in hepatocellular carcinoma under TACE-induced hypoxia: a biopsy and resection matched study. *Oncotarget* 2017;8:99359-99371.
77. Kawai T, Yasuchika K, Ishii T, et al. Keratin 19, a cancer stem cell marker in human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2015;21:3081-3091.
78. Kim H, Yoo JE, Cho JY, et al. Telomere length, TERT and shelterin complex proteins in hepatocellular carcinomas expressing "stemness"-related markers. *J Hepatol* 2013;59:746-752.
79. Oh BK, Kim H, Park YN, et al. High telomerase activity and long telomeres in advanced hepatocellular carcinomas with poor prognosis. *Lab Invest* 2008;88:144-152.
80. Rhee H, Kim HY, Choi JH, et al. Keratin 19 expression in hepatocellular carcinoma is regulated by fibroblast-derived HGF via a MET-ERK1/2-AP1 and SP1 axis. *Cancer Res* 2018;78:1619-1631.
81. Boccaccio C, Comoglio PM. Invasive growth: a MET-driven genetic programme for cancer and stem cells. *Nat Rev Cancer* 2006;6:637-645.
82. Lau EY, Lo J, Cheng BY, et al. Cancer-associated fibroblasts regulate tumor-initiating cell plasticity in hepatocellular carcinoma through c-Met/FRA1/HEY1 signaling. *Cell Rep* 2016;15:1175-1189.
83. Nishida N, Sakai K, Morita M, et al. Association between genetic and immunological background of hepatocellular carcinoma and expression of programmed cell death-1. *Liver Cancer* 2020;9:426-439.
84. Kurebayashi Y, Ojima H, Tsujikawa H, et al. Landscape of immune microenvironment in hepatocellular carcinoma and its additional impact on histological and molecular classification. *Hepatology* 2018;68:1025-1041.
85. Lee JI, Lee JW, Kim JM, Kim JK, Chung HJ, Kim YS. Prognosis of hepatocellular carcinoma expressing cytokeratin 19: compar-

- ison with other liver cancers. *World J Gastroenterol* 2012;18:4751-4757.
86. Zhuo JY, Lu D, Tan WY, Zheng SS, Shen YQ, Xu X. CK19-positive hepatocellular carcinoma is a characteristic subtype. *J Cancer* 2020;11:5069-5077.
87. Rhee H, Nahm JH, Kim H, et al. Poor outcome of hepatocellular carcinoma with stemness marker under hypoxia: resistance to transarterial chemoembolization. *Mod Pathol* 2016;29:1038-1049.
88. Miltiados O, Sia D, Hoshida Y, et al. Progenitor cell markers predict outcome of patients with hepatocellular carcinoma beyond Milan criteria undergoing liver transplantation. *J Hepatol* 2015;63:1368-1377.
89. Lai JP, Conley A, Knudsen BS, Guindi M. Hypoxia after transarterial chemoembolization may trigger a progenitor cell phenotype in hepatocellular carcinoma. *Histopathology* 2015;67:442-450.
90. Ueshima E, Nishiofuku H, Takaki H, et al. Hepatic artery embolization induces the local overexpression of transforming growth factor β 1 in a rat hepatoma model. *Liver Cancer* 2020;9:63-72.
91. Hoshida Y, Toffanin S, Lachenmayer A, Villanueva A, Minguez B, Llovet JM. Molecular classification and novel targets in hepatocellular carcinoma: recent advancements. *Semin Liver Dis* 2010;30:35-51.
92. Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault JC, Llovet JM. Genetic landscape and biomarkers of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2015;149:1226-1239.e4.
93. Monga SP. β -catenin signaling and roles in liver homeostasis, injury, and tumorigenesis. *Gastroenterology* 2015;148:1294-1310.
94. Gougelet A, Torre C, Veber P, et al. T-cell factor 4 and β -catenin chromatin occupancies pattern zonal liver metabolism in mice. *Hepatology* 2014;59:2344-2357.
95. Ueno A, Masugi Y, Yamazaki K, et al. OATP1B3 expression is strongly associated with Wnt/ β -catenin signalling and represents the transporter of gadoteric acid in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2014;61:1080-1087.
96. Audard V, Grimmer G, Elie C, et al. Cholestasis is a marker for hepatocellular carcinomas displaying beta-catenin mutations. *J Pathol* 2007;212:345-352.