様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成２５年９月３日現在

機関番号：15301
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2010 ～ 2012
課題番号：22590313
研究課題名（和文） 胸腺腫の組織発生の解析
研究課題名（英文） Analysis of the histogenesis of thymoma

研究代表者
高橋 聖之（TAKAHASHI KIYOSHI）
岡山大学・大学医保健学研究科・教授
研究者番号：90101815

研究成果の概要(和文):胸腺腫瘍を免疫組織学的に検討した。14 例の A 型胸腺腫は腫瘍細胞が pCK+/EMA-/vimentin(VM)-/claudin-1(CDN-1)+短紡錘形細胞であり、thy/TCDM, mDC は併存しなかった。化生型胸腺腫は A 型胸腺腫細胞の集団と、pCK-/VM+/EM+の線維芽細胞様化生細胞(FMEC)集団のモザイク構成であった。19 例の AB 型胸腺腫うち 14 例の A 様領域は FMEC より成っていたが、５例の A 様領域は本来の A 型胸腺腫の腫瘍細胞で、両者とも B 領域は未熟な皮質様領域であった。これら結果は、AB 型胸腺腫には A 型胸腺腫と未熟な B 領域とのモザイク腫瘍（通常型 AB 型胸腺腫）と、FMECs 集団と未熟な B 領域のモザイク腫瘍(化生性 AB 型胸腺腫)の2種類が存在し、後者が多数派であること示した B 型胸腺腫では、B1 型、B2 型で、thys/TCDMs が併存し、β5t が腫瘍細胞に陽性で、c-TEC 由来の腫瘍と考えられた。B3 型は thy/TCDM が出現する分化型と、出現しない低分化型があり、後者は胸腺癌に類似していた。胸腺癌と B3 型を比較すると、thy/TCDM とβ5t は B3 型に、c-Kit と CD5 は胸腺癌に発現していた。thys と TCDMs, β5t, c-Kit, および CD5 をマーカーにすることによって、B3 型と胸腺癌をほぼ正確に鑑別できた。

研究成果の概要(英文):We examined thymomas immunohitochemically. Type A thymoma (14 cases) were composed solely of pCK+/EMA-/VM)-/CDN-1+ shout spindle epithelial cells. Thy nor TCDM were not found at all. Metaplastic thymoma (1 case) was found to be mosaic of two different components, pCK+/VM-/EMA-/CDN-1+ tumor cells of type A thymoma and pCK-/VM+/EMA+/CDN-1- fibroblastoid metaplastic epithelial cells (FMECs). In the majority of type AB thymoma (14 of 19 cases), type A-like areas were composed of FMECs. In contrast, type A-like areas of remaining 5 cases were composed of type A thymoma cells. These findings indicate that there are two different subtypes in type AB thymoma, metaplastic type AB thymoma and conventional type AB thymoma. The presence of a considerable numbers of TCDM in types B thymomas and β5t-immunoreactivity of tumor cells indicates that type B thymomas are basically tumor of c-TECs. We also found that there are two subtypes of type B3 thymoma, the differentiated subtype containing TCDM and the anaplastic subutype lucking TCDM, although clinical between them remains unclear. We also found that type B3 thymoma are able to be distinguished from thymic carcinoma by proper use of markers such as thy/TCDM, β5t, c-Kit and/or CD5

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
総 計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：胸腺腫および胸腺癌
科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学
キーワード： 胸腺腫 免疫組織化学 組織発生

１．研究開始当初の背景

ヒト胸腺腫は前縦隔に発生する胸線上皮細胞に由来する比較的稀な腫瘍であるが、腫瘍組織の多彩な形態と未熟リンパ球（胸腺細胞）などの随伴する雑多な非腫瘍成分の存在が組織型分に混乱をもたらし、その組織発生の理解を拒んで来た。歴史的に、胸腺腫分類はアメリカおよび日本などでは伝統的な形態学的分類が広く支持されてきた。このアメリカ学派を中心とした分類は､胸腺腫を形態により、リンパ球優位型、上皮優位型、リンパ・上皮混合型、紡錐細胞型の四つの基本型に分類するものである。この組織型分類は検者による再現性は高いものの、胸腺腫の臨床的悪性度との相関が低いという難点を抱えていた。一方ドイツ学派のMuller-Hermelinkらは､正常胸線が髄質と皮質より成り立っていることより、胸腺腫も基本的に髄質と皮質のコンビネーションで成り立っているとの考えに立脚し、胸腺腫をmedullary､cortical､mixedに分類し、その後さらに predominantly cortical と well differentiated thymic carcinoma を加えた。この分類は胸腺腫の悪性度とある程度相関するものの、検者による再現性が低く、腫瘍型の名称の生物学的な根拠があいまいであるなどの様々な難点を抱えていた。そこで､1999年にWHOは妥協的な分類法を提案した。胸腺腫を紡錐形細胞より成るA型と多角形型細胞より成るＢ型に基本分類し、混合型としてAB型､さらにＢ型を上皮細胞とリンパ球の存在比と上皮細胞の異型度から、B1, B2, B3に細分し、さらに明確な形態学的悪性所見を呈するC型（胸腺癌）加えた。このWHO分類は、純粋に形態学的分類とは言え、Muller-Hermelink らの分類をほぼ正確に踏襲している。即ち､A型がmedullary, AB型がmixed､B型は基本的にcorticalであり、B1型はpredominantly cortical､B2型はpure cortical､ B3型は well differentiated thymic carcinomaに相当する。このWHO分類は現在広く用いられるようになっているが、分類が煩雑で、命名法が臨床家の直感に訴え難い無意味なA,Bなどのアルファベットや数字を多用していることや、その基礎となっている Muller-Hermelink らの分類が科学的根拠に乏しいなどの批判がある。このように胸腺腫の腫瘍型分類も組織発生も未だ混沌としている。

２．研究の目的

科学的に妥当な胸腺腫の組織分類を作成するため､ヒト胸腺腫の組織発生を明らかにする。そのため、ヒト正常胸腺で髄質に特異的に分布する髄質樹状細胞(mDC)と､皮質に特異的に分布する胸腺皮質樹状マクロファージ(TCDM)を、それぞれ胸腺髄質と皮質の微小環境を示すパラメーターとして用いる新しい方法を採用する。具体的には多数例のWHO分類された胸腺腫でmDCとTCDMの組織分布を免疫組織学的に検討し、さらに新しく知られるようになった幾つかの髄質上皮特異抗原の分布も参考にする。

３．研究の方法

WHO分類された胸腺腫（A型11例, AB型19例、ＢⅠ型15例､Ｂ２型、Ｂ３型、化生型１例）および胸腺癌のホルマリン固定パラフィン帆毎切片を免疫組織学的に検索した。対照として正常ヒト胸腺および肺扁平上皮癌組織のホルマリン固定・パラフィン法毎切片を用い居た。使用した抗体はfascin、vimentin、各種cytokeratin抗体､S100B, EMA, HLA-DR, HAM56, lysozyme, ki-67, c-kit (CD117), p53, single strand DNA, Langerin, oculudin, CD1a, CD3, CD5, CD4, CD8, CD16, CD32, CD34, CD57, CD68, CD86, CD99, CD117 (c-kit)), CD205, CD208, CD209,　さらにこれら市販の抗体に加えて、胸腺皮質上皮に特異的なプロテアソームサブユニットβ5tのC末端合成ペプチドをウサギに免疫し、ポリクローナル抗体を作成して免疫組織学的にその分布を検討した。免疫組織化学的染色法としてEnvisionポリマー法による超高感度免疫染色を実施、さらに必要に応じて酵素抗体二重染色法や蛍光抗体二重染色法を実施した。

４．研究成果

（１）　**正常胸腺**：胸腺皮質には fascin 陽

性/HLA-DR 陰性の樹状形態を示す TCDM (thymic cortical dendritic macrophage)が規則正しく均等に分布しており、髄質には樹状形態に富む fascin 陽性/HLA-DR 陰性の mDC(髄質樹状細胞: medullary dendritic cell)が密に分布していた。c-TEC（皮質上皮細胞；thymic cortical epithelial cell）は cytokeratin (CK)陽性/HLA-DR 陽性/β５t 陽性、m-TEC（髄質上皮細胞；medullary epithelial cells)は cytokeratin (CK)陽性/HLA-DR 陽性/β５t 陰性、さらに claudin-1 が弱陽性であった。胸腺細胞（thymocytes; thy）は胸腺皮質のリンパ球で、CD1a 陽性/CD99 陽性の未熟リンパ球で胸腺皮質に特異的に存在した。これらの結果より、胸腺腫細胞の由来を検討するにあたり、細胞が発現している分化分子のみならず、これらの胸腺皮質ないし髄質の環境細胞の分布を検討する事も有用だと考えられた。TCDM は fascin とを、thy は CD99 を、mDC は HLA-DR を特異マーカーとして胸腺腫瘍における分布を検討した。

（２）胸腺腫

① A 型胸腺腫（type A thymoma）

従来より A 型胸腺腫は m-TEC 由来であるとする説がある。そこで A 型胸腺腫に髄質上皮の性質があるのか否かを検討した。髄質上皮にあり皮質上皮にない特徴として claudin-1 のごく弱い発現があるが、検討した全例の A 型胸腺腫はいずれも claudin-1 が強陽性であった。さらに腫瘍細胞周囲に髄質微小環境が形成されているか否かを検討するため、mDC の分布の有無を検討したが、全例で mDC は全く検出されなかった。興味深い事に mDC とは異なる未熟な HLA-DR 陽性/fascin 陰性の未熟 DC の均等な分布が証明されたがその意義に着いては不明である。また thy や TCDM も完全に陰性で、A 型胸腺腫は髄質ないし皮質由来の上皮とは異なった性質を示す上皮の腫瘍である事が判明した。A 型胸腺腫の腫瘍細胞は claudin-1 が例外無く強陽性であったが、これは髄質上皮の性質という解釈は成り立たない。なぜなら後述するように、B３型胸腺腫の一部や胸腺癌が claudin-1 が強陽性となることが判明し、これが髄質上皮としての性質を示すものではない事が明らかになったからである。さらに mDC の代わりに未熟な DC が分布していたことについては、A 型胸腺腫が皮質や髄質へ分化する以前の primitive な胸腺原基を構成する上皮細胞の性質をしめすのではないかと考察している。

② 化生型胸腺腫（metaplastic thymoma）:

さらに１例の metastatic thymoma を検索する機会を得た。この腫瘍は A 型胸腺腫の細胞集団と線維芽細胞様に化生した上皮細胞集団がモザイク状に入り組む A 型胸腺腫の稀なバリアントである。A 型部分は A 型胸腺腫とほぼ同一の細胞であったが、線維芽細胞様化生上皮細胞は pCK 陰性、VM 陽性、EMA 陽性であった。興味深い事に metastatic thymoman に非常に primitive な髄質と考えられる小領域が多発していたことである。この部分には mDC が高密度に分布 Thy も TCDM も上皮細胞は見られなかった。

③ AB 型胸腺腫（type AB thymoma）

一般に AB 型胸腺腫は A 型胸腺腫と B 型胸腺腫の混合腫瘍とされているが、今回の研究により、AB 型胸腺腫は独自の腫瘍型であり、A 領域の違いにより二つのサブタイプに分類されることが判明した。即ち、多数派（19 例中 14 例）は A 領域が metastatic thymoman でみられた pCK 陰性、VM 陽性、EMA 陽性, CDN-1 陰性の線維芽細胞様化生性上皮細胞より成っていたことである。このタイプを化生性 AB 型胸腺腫（metaplastic type AB thymoma）と呼ぶことにした。もう一方の少数派は 14 例中５例を占め、A 領域の構成細胞は短紡錘形で、pCK 陽性、VM 陰性、EMA 陰性、CDN-1 陽性で、A 型胸腺腫の腫瘍細胞とほぼ同一の細胞であった。そこでこのサブタイプを通常亜型 AB 型胸腺腫（conventional type AB thymoma）とした。

Metaplastic thymoma は thymoma の稀な亜型とされているが、腫瘍性上皮細胞の線維芽細胞様化生は稀どころか頻繁に起きており、それが A 型胸腺腫では稀であるが、AB 型胸腺腫では高頻度にみられることより、皮質領域の存在と深くかかわっていることが推定された。B 領域も正常胸腺皮質や B1 型胸腺腫とは大きく異なっていた。B 領域、即ち皮質様領域の上皮細胞は規則的なネットワークを構成する正常胸腺や B１型胸腺腫とはことなり、不規則不揃いで細胞質突起がつくるネットワーク

も粗雑で、本来なら規則的に分布する TCDM も少数で、小型、樹状形態に乏しかった。即ち、AB 型胸腺腫の B 領域は未成熟な胸腺皮質領域を模倣したものと推定される。以上より AB 型胸腺腫は決して単なる A 型胸腺腫と B 型胸腺腫の混合腫瘍ではなく、独自の腫瘍型でしかも腫瘍系としてヘテロなものであると解釈された。

④ B 型胸腺腫(type B thymomas)

楕円形ないし多角形の腫瘍細胞と種々の程度に胸腺細胞が随伴する腫瘍を B 型胸腺腫と呼んでいるが、腫瘍細胞と胸腺細胞の比が 1:2 以下のものを B1 型、1:2 から 2:1 までのものを B2 型、2:1 以上のものを B3 型としている。

❶ B1,B2 型胸腺腫 (type B1, B2 thymoma)

この二つの B 型胸腺腫は胸腺オルガノイドとして本質的に差がなかった。すなわち、両者とも良く発達した皮質様領域と、正常と比べてかなり小さい髄質様領域から成っていた。B1 型は皮質様領域が主であるが、髄質様領域も良く発達しており、皮質様領域には c-TEC に酷似する腫瘍細胞が存在し、その細胞質突起がネットワークを構成し、その間に多数の thy と均等に分布する大型樹状の TCDM が分布しており、髄質様領域には mDC の密な集族が確認された。髄質様領域には m-TEC の上皮細胞が少数分布しハッサル小体も確認された。B2 型では皮質様領域が大部分を占め、髄質様領域が狭く少ないなど点が異なるのみで、本質的な違いはなかった。

❷ B3 型胸腺腫 (type B3 thymoma)

17 例の B3 型胸腺腫を検討した。TCEC の分布より、基本的に c-TEC の腫瘍であることが確認された。今回の研究では、さらに B3 型胸腺腫が TECE の出現頻度によって 2 亜型に細分される事が判った。即ち、17 例中 11 例は腫瘍細胞に比較的多数の TCEC が随伴する分化亜型 (differentiated subtype), 6 例は TCEC が乏しい未分化亜型(anaplastic subype)とした。それぞれを胸腺悪性マーカーに注目して比較検討すると、分化亜型は B1,B2 型胸腺腫に近く、未分化型は胸腺癌に類似する事が確認された。即ち、未分化亜型は分化亜型に比べて c-kit や CD1、p53 の発現が有意に高く、さらに c-TEC の分化マーカーである TPSβ5 の発現が有意に低いことが確認された。即ち、未分化亜型は腫瘍細胞周囲に胸腺皮質の微小環境を保つ能力を殆ど喪失した胸腺癌に近い亜型と考えられるのである。この未分化亜型が分化亜型と比較して予後が有意に悪く、このような細分類が臨床的に有用であるかどうかは不明である。今後さらなる症例の蓄積で予後の比較を行って行きたい。

⑤ 胸腺癌 (thymic carcinoma)

18 例の胸腺原発の扁平上皮癌を検索した。比較検討のため、12 例の肺原発扁平上皮癌と前述の 17 例の B３型胸腺腫と比較した。まず、B3 型胸腺腫と胸腺癌の鑑別であるが、胸腺癌の症例で TCEC が出現している症例は皆無であったのに対し、B3 型胸腺腫では 17 例中 11 例で比較的多数の TCEC の随伴がみられた。次に TPS-β5t は胸腺癌で全例陰性であった。それに対して B3 型胸腺腫は全例で陽性であったが、B3 型胸腺腫では未分化亜型で発現が弱い傾向にあるものの全例で陽性であった。肺扁平上皮癌も全例で TPS-β5t 陰性であった。胸腺癌マーカーでは c-kit は胸腺癌で 16 症例、肺癌で 2 症例、B3 型胸腺腫では未分化亜型の 3 例が陽性となった。CD5 では、胸腺癌は 18 症例中 12 症例が陽性、肺癌は全例陰性、B3 型胸腺腫では未分化亜型の 1 症例のみ強陽性であった。胸腺癌と B3 型胸腺腫あるいは肺扁平上皮癌との鑑別に有用なものは、TCEC の随伴の有無、TPS-β5t の発現の有無、c-kit と CD5 の発現の有無などである。組織学的に B3 型と胸腺癌を鑑別するには、まず TCEC の有無を検討する。すなわち thy ないし TCDM のどちらかが相当数分布すれば B3 型胸腺腫である。両者とも陰性の場合は胸腺 TPS-β5t の発現の有無を検討する。これが明確に陽性である場合は B3 型胸腺腫である。陰性ないしは弱陽性の場合はさらも c-Kit と CD5 の発現を検討する。どちらかないし両者が強陽性である場合は胸腺癌、いずれも陰性の場合は肺扁平上皮癌などの転移ないしは肺からの浸潤を考えるというフローチャートが有効である。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1 Atsushi Hayashi, Takumi Fumon, Yukari Miki, Hiaki Sato, Tadashi Yoshino, Kiyoshi Takahashi
The evaluation of immunohistochemical

markers and thymic cortical microenvironmental cells in distinguishing thymic carcinoma from type B3 thymoma or lung squamous cell carcinoma
Jouranl of Clinical and Experimental Hematology 2013 in press　査読有り

〔学会発表〕（計 18 件）

1 Yukari Miki, Atsushi Hayashi, Kiyoshi Takahashi:The Immunohistochemical studies on the type AB thymoma. 3rd international Thymic Malignancy Interest Group Annual Meeting. (Fukuoka) 2012.11.25-26

2 Atsushi Hayashi, Yukari Miki, Kiyoshi Takahashi. The Immunohistochemical distinction of thymic carcinoma from lung squamous cell carcinoma and type B3 thymoma. 3rd international Thymic Malignancy Interest Group Annual Meeting
(Fukuoka) 2012.11.25-26

3 林　敦志、高橋聖之、三木友香理、普門拓己：胸腺癌および肺扁平上皮癌における免疫組織学的検討　第 52 回日本リンパ網内系学会総会 2012 年 6 月 14-16 日　福島

4 高橋聖之、三木友香理、林　敦志:免疫プロテアソームβ5tの正常胸腺と胸腺腫における分布　第 22 回日本樹状細胞研究会（福島）2012 年 6 月 15 日

5 三木友香理、普門拓己、林　敦志、高橋聖之：AB型胸腺腫の免疫組織化学的検討 第31回日本胸腺研究会 2012年2月4日　埼玉

6 普門拓己、林　敦志、三木友香理、高橋聖之:B3 型胸腺腫のsubtype分類の試みとその意義についての検討:第二報 第 31 回日本胸腺研究会 2012 年 2 月 4 日　埼玉

7 林　敦志、普門拓己、三木友香理、高橋聖之：胸腺癌における免疫染色の検討－肺癌との比較　第 31 回日本胸腺研究会 2012 年 2 月 4 日　埼玉

8 Yukari Miki, Takumi Fumon, Atsushi Hayashi, Kiyoshi Takahashi : Type AB thymoma is not a mixed tumor of type A and type B thymomas but a distinctive type of thymoma. 14th World Conference on Lung Cancer. 2011.7.3-7. Amsterdam (Netherlands)

9 Takumi Fumon, Yukari Miki, Atsushi Hayashi, Kiyoshi Takahashi: Type B3 thymoma can be subclassified into differentiated, intermediate, and anaplastic subtypes. 14th World Conference on Lung Cancer. 2011.7.3-7. Amsterdam (Netherlands)

10 Atsushi Hayashi, Takumi Fumon, Yukari Miki, Kiyoshi Takahashi: Useful immunohistochemical and functional markers in distinguishing thymic carcinomas from thymomas and/or squamous cell carcinomas. 14th World Conference on Lung Cancer. 2011.7.3-7. Amsterdam (Netherlands)

11 三木友香理、普門拓己、佐藤妃映、高橋聖之：ABの型胸腺腫はA型胸腺腫とB型胸腺腫混合腫瘍ではない　第 100 回日本病理学会総会 2011 年 4 月 28 日　横浜

12 普門拓己、三木友香理、佐藤妃映、高橋聖之：B3 型胸腺腫のsubtype分類の試みと胸腺癌との比較　第 100 回日本病理学会総会　2011 年 4 月 28 日　横浜

13 三木友香理、祇園由佳、森本可奈、普門拓己、林敦志、高橋聖之： AB型胸腺腫はA型胸腺腫とB型胸腺腫の混合腫瘍ではない 第 30 回日本胸腺研究会　2011 年 2 月 5 日 長崎

14 普門拓己、林　敦志、三木友香理、祇園由佳、森本可奈、高橋聖之：B3 型胸腺腫のsubtype分類の試みと胸腺癌との比較 第30回日本胸腺研究会 2011年2月5日　長崎

15 森本可奈、祇園由佳、普門拓己、三木友香理、林　敦志、佐藤妃映、高橋聖之
ヒト胸腺のアポトーシス処理細胞である胸腺皮質樹状マクロファージ（TCDM）の形態学的観察　第 42 回日本臨床分子形態学会総会　三島（静岡）2010 年 9 月 25 日

16 Kiyoshi Takahashi, Hiaki Sato, Yukari Miki, Kana Morimoto, Yuka Gion, Takumi

Fumon
Thymic cortical dendritic macrophages; A novel type of thymus-specific macrophages that are scavengers of apoptotic thymocytes. 第１４回国際免疫学会議 2010年8月22日 神戸国際会議場

17 祇園由佳、森本可奈、普門拓巳、林　敦志、三木友香理、佐藤妃映、高橋聖之
B1,B2 型胸腺腫における胸腺皮質樹状マクロファージの性状　第 20 回 日本樹状細胞研究会 2010 年 6 月 18 日 新潟

18 高橋聖之: 樹状細胞とマクロファージからみた胸腺腫 第 99 回日本病理学会総会 2010 年 4 月 29 日　東京

６．研究組織

(1)研究代表者
高橋　聖之(TAKAHASHI KIYOSHI)
岡山大学・大学医保健学研究科・教授
研究者番号:90101815

(2)研究分担者
三木　友香理(MIKI YUKARI)
香川県立保健医療大学・保健医療学部・助教
研究者番号：70397876

(3)研究協力者
佐藤妃映(SATO HIAKI)
岡山大学・大学院保健学研究科・助教
研究者番号:70362960

祇園由佳(GION YUKA)
岡山大学・大学院保健学研究科・大学院生

森本可奈(MORIMOTO KANA)
岡山大学・大学院保健学研究科・大学院生

普門拓己(FUMON TAKUMI)
岡山大学・大学院保健学研究科・大学院生

林　敦志(HAYASHI ATSUSHI)
岡山大学・大学院保健学研究科・大学院生