

胸腺癌における免疫組織染色について  
—とくに分子標的薬関連蛋白発現の意義— (要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程  
外科系呼吸器外科学専攻

諸岡 宏明

修了年 2016 年

指導教員 村松 高

## 緒言

胸腺癌は頻度が低く<sup>1)</sup>、未知な部分が多い疾患であり、完全切除によるのみ予後が改善される<sup>2-4)</sup>。診断時には WHO 病期分類Ⅲ期以上の進行癌の場合が多く、手術適応は限られる<sup>1)</sup>。このような症例に対し不完全な手術、化学療法や放射線療法が行われるが、必ずしも有効でないのが現状である。また、現在様々な悪性腫瘍に対し、分子標的薬治療が一般化しつつあるが、胸腺癌に対して有効性が明らかなものは証明されていない。

そこで、他臓器で有効性が指摘されており、既に分子標的薬治療において効果が実証されている分子標的薬関連蛋白に対する免疫組織化学染色を行い、胸腺癌群と胸腺腫群 (type B3) の 2 群間での免疫染色の発現率、免疫反応陽性率、生存率の差を統計学的に検討した。

## 対象と方法

1983 年～2009 年の期間に日本大学医学部附属板橋病院呼吸器外科で胸腺腫瘍に対して摘出手術を施行し、病理学的に診断された胸腺癌群 8 例、胸腺腫群 (Type B3) 8 例を用いた。

すでに阻害薬が開発されている 6 つの分子標的薬関連蛋白である EGFR ; Epidermal Growth Factor Receptor、IGF1R ; Insulin-like Growth Factor1 Receptor、MET ; Hepatocyte Growth Factor Receptor (HGFR)、VEGFR ; Vascular Endothelial Growth Factor Receptor、KIT ; v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog、PPAR $\gamma$  ; Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  について免疫組織化学的手法を用いて各分子標的薬関連蛋白の発現性をしらべ、これらの蛋白の発現が、①胸腺癌の診断に有用か (診断因子)、②生命予後に関連する因子となりうるか (予後因子)、さらに③分子標的薬の選択の因子になりうるか (治療選択因子) を検討した。

それぞれの分子標的薬関連蛋白に対する抗体で染色され、免疫染色が陽性であった細胞を、光学顕微鏡の強拡大 ( $\times 400$ ) における 1 視野で計測し、計 10 視野で同様の計測を施行、すべての視野での免疫染色陽性細胞の総数を平均した。この値を「免疫染色が陽性の細胞がすべての腫瘍細胞中に占める割合」、すなわち発現率 (%) として定義した<sup>5)</sup>。

各分子標的薬関連蛋白の免疫反応の陽性・陰性の判断について、胸腺癌以

外その他臓器の癌腫での判定方法を以下に示す。

EGFR : 『EGFR 免疫染色が陽性の細胞が、すべての腫瘍細胞中において発現率 10%以上であった場合を EGFR 免疫反応陽性と判断<sup>6,7)</sup>。』

IGF1R : 『Allred 8-unit Scoring System を用いたスコア化判定を用いるもの。免疫染色が陽性の細胞の発現強度を Intensity Score (IS) として negative=0、weak=1、intermediate=2、Strong=3 とする。つぎに免疫染色が陽性の細胞の、すべての腫瘍細胞中での発現率を Proportion Score (PS) として 1%未満=1、1%~10%=2、11%~33%=3、34%~66%=4、67%~100%=5 とする。Total Score (TS) として IS と PS の和が 2~3 を Low、4~5 を Intermediate、6~8 を High と判定。High を IGF1R 免疫反応陽性と判断<sup>8,9)</sup>。』

MET : 『MET 免疫染色が陽性の細胞の、すべての腫瘍細胞中における発現率が、0%~30%未満のもの (little)、30%~60%未満のもの (slightly positive) を MET 免疫反応陰性とし、60%~80%未満のもの (positive)、80%以上のもの (strong positive) を MET 免疫反応陽性と判断<sup>10)</sup>。』

VEGFR : 『VEGFR 免疫染色が陽性の細胞が、すべての腫瘍細胞中において発現率 10%以上であった場合を VEGFR 免疫反応陽性と判断<sup>11,12)</sup>。』

KIT : 『KIT 免疫染色が陽性の細胞が、すべての腫瘍細胞中において発現率 10%以上であった場合を KIT 免疫反応陽性と判断<sup>6)</sup>。』

PPAR $\gamma$  : 『免疫染色が陽性の細胞が、すべての腫瘍細胞中において発現率 5%以上であった場合 PPAR $\gamma$  免疫反応陽性と判断<sup>13-15)</sup>。』

以上のように各分子標的薬関連蛋白で免疫反応を陽性と判断する基準が様々であるため、当研究ではこれらの判定方法をすべて包含した判定を施行し、すべての生存率を検討することで最も良好な生命予後と関連する発現率、免疫反応陽性率を模索した。

各分子標的薬関連蛋白において Allred 8-unit Scoring System での免疫反応陽性陰性の判定を行った。さらに発現率 0%~100%までの範囲で、5%刻みで免疫反応を陽性と判断する発現率を計 20 段階に変化させていき、免疫反応陽性率および生存率の有意差を検討した。

2 群間での発現率、免疫反応陽性率、生存率の比較を統計学的に検討し P<0.05 を有意差ありとした。

## 結果

発現率についての検討では、PPAR $\gamma$ においてのみ有意差を認めた（表 1）。PPAR $\gamma$ の発現率は胸腺癌群で 22.50  $\pm$  21.88%、胸腺腫群では 0  $\pm$  0%であり、Mann-Whitney の U 検定において P = 0.001 と、胸腺癌群は胸腺腫群に比し発現率が有意に高率であった。

その他の項目（EGFR、IGF1R、MET、VEGFR、KIT）では発現率について 2 群間に有意差を認めなかった。

各分子標的薬関連蛋白の免疫反応陽性の有無についての検討では KIT において、発現率 5%~10%を免疫反応陽性とした場合、胸腺癌群は免疫反応陽性率 62.5%、胸腺腫群は免疫反応陽性率 0%であった。Fisher's exact probability test において KIT は P = 0.013 と胸腺癌群では胸腺腫群に比し免疫反応陽性率が有意に高率であった（表 2）。

PPAR $\gamma$ において、発現率 5%~20%を免疫反応陽性とした場合、胸腺癌群は免疫反応陽性率 62.5%、胸腺腫群は免疫反応陽性率 0%であり、Fisher's exact probability test において P = 0.013。また、発現率 25%~30%を免疫反応陽性とした場合は、胸腺癌群で免疫反応陽性率 50%、胸腺腫群で 0%であり、Fisher's exact probability test において P = 0.038 と双方の範囲で胸腺癌群は胸腺腫群に比し PPAR $\gamma$ 免疫反応陽性率が有意に高率であった（表 3）。

その他の項目（EGFR、IGF1R、MET、VEGFR）では免疫反応陽性率について 2 群間で有意差を認めなかった。

胸腺癌群における KIT 免疫反応陽性の有無での Kaplan-Meier 生存分析においては、log-rank test で P=0.342 と 2 群間の生存率に統計学的な有意差を認めなかった。（図 1）

胸腺癌群における PPAR $\gamma$ 免疫反応陽性の有無での Kaplan-Meier 生存分析においては、発現率 5%~20%を免疫反応陽性とした場合では、log-rank test で P=0.073 と 2 群間の生存率に統計学的な有意差を認めなかった（表 3）。

発現率 25%以上を免疫反応陽性とした場合では、PPAR $\gamma$ 陽性群で 5 年生存率 74.8%、PPAR $\gamma$ 陰性群で 3 年生存率が 49.8%であった。log-rank test で P=0.007 と 2 群間の生存率に統計学的な有意差を認め、PPAR $\gamma$ 陽性群の方が予後良好であることが示された。（表 3、図 2）。

以上、胸腺腫群と比較して胸腺癌群で免疫反応陽性率が有意に高率であり、良好な生命予後との関連を認めた分子標的薬関連蛋白は PPAR $\gamma$ のみであった。その他 5 つの分子標的薬関連蛋白（EGFR、IGF1R、MET、VEGFR、KIT）では

胸腺腫群と胸腺癌群では免疫反応の陽性の有無と生命予後に有意差を認めなかった。

## 結語

胸腺癌における6つの分子標的薬関連蛋白、EGFR、IGF1R、MET、VEGFR、KIT、PPAR $\gamma$ について免疫組織化学的手法を用いて各分子標的薬関連蛋白の発現を調査した。

今回の検討では胸腺腫群に比して、胸腺癌群で免疫反応陽性率が有意に高率であった分子標的薬関連蛋白はKITとPPAR $\gamma$ であった。また、胸腺癌群においてPPAR $\gamma$ 免疫反応陽性例は陰性例に対して有意に生命予後の延長を認めた。

胸腺癌は胸腺腫に比しKIT免疫反応陽性率が高いとの報告があり<sup>16,17)</sup>、胸腺癌の診断の一助となる可能性が示唆されている。本研究でも免疫反応陽性率について有意差を得られたことから、KIT免疫反応陽性の有無は胸腺癌と胸腺腫を鑑別するために有用な診断因子になりうる可能性が示唆された。

PPAR $\gamma$ は核内受容体の一種で脂肪細胞分化や抗炎症活動の調節、癌細胞の成長の抑制仲介を含む多様な生物学的を持ち、内因性および外因性の各種PPAR $\gamma$ リガンドはアゴニストとして乳癌、結腸癌、肺癌細胞などで抗腫瘍効果を表すとされている<sup>18,19)</sup>。胸腺におけるPPAR $\gamma$ の発現について検討した報告はほとんどなく<sup>7)</sup>、PPAR $\gamma$ と生命予後の関連についての報告は皆無である。本研究においては胸腺癌群で胸腺腫群に比しPPAR $\gamma$ の発現率、免疫反応陽性率、生存率のすべてで有意差が得られた。PPAR $\gamma$ 免疫反応陽性の有無は胸腺癌と胸腺腫を鑑別するための有用な診断因子となりうる可能性が示唆された。

肺癌、腎細胞癌、大腸癌、舌癌では、外因性PPAR $\gamma$ リガンドの抗腫瘍効果が証明されている<sup>13-15,19-21)</sup>。すなわち、PPAR $\gamma$ が高発現している癌腫は予後良好を意味する。本研究でもPPAR $\gamma$ の発現が予後良好となる予後因子、胸腺癌に対する分子標的薬の治療選択因子になりうる可能性が示唆された。

引用文献

1. Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris CC. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. IARC Press, Lyon 2004.
2. 近藤 和, 門田 康. 胸腺上皮性腫瘍の全国アンケート報告. 日本呼吸器外科学会雑誌 2001.09;15:633-42.
3. Suster S, Rosai J. Thymic carcinoma. A clinicopathologic study of 60 cases. Cancer 1991;67:1025-32.
4. Liu H-C, Hsu W-H, Chen Y-J, et al. Primary thymic carcinoma. The Annals of Thoracic Surgery 2002;73:1076-81.
5. Papadaki I, Mylona E, Giannopoulou I, Markaki S, Keramopoulos A, Nakopoulou L. PPAR $\gamma$  expression in breast cancer: clinical value and correlation with ER $\beta$ . Histopathology 2005;46:37-42.
6. Yoh K, Nishiwaki Y, Ishii G, et al. Mutational status of EGFR and KIT in thymoma and thymic carcinoma. Lung Cancer 2008;62:316-20.
7. Omatsu M, Kunimura T, Mikogami T, et al. Immunohistochemical analysis of thymic carcinoma focusing on the possibility of molecular targeted and hormonal therapies. General Thoracic and Cardiovascular Surgery 2012;60:803-10.
8. Ouban A, Muraca P, Yeatman T, Coppola D. Expression and distribution of insulin-like growth factor-1 receptor in human carcinomas. Human Pathology 2003;34:803-8.
9. Hellowell GO, Turner GDH, Davies DR, Poulson R, Brewster SF, Macaulay VM. Expression of the Type 1 Insulin-like Growth Factor Receptor Is Up-Regulated in Primary Prostate Cancer and Commonly Persists in Metastatic Disease. Cancer Research 2002;62:2942-50.
10. Tabuchi Y, Nakamura T, Ohno M, Usami M. Immunohistochemical Expression of c-Met (HGF Receptor) in Colorectal Cancer Lesions. Bulletin of health sciences Kobe 1998;14:43-8.
11. Kinoshita J, Kitamura K, Kabashima A, Saeki H, Tanaka S, Sugimachi K. Clinical significance of vascular endothelial growth factor - C (VEGF - C) in breast cancer. Breast Cancer Research and Treatment 2001;66:159-64.

12. Akagi K, Ikeda Y, Miyazaki M, et al. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression in human colorectal cancer tissues. *Br J Cancer* 2000;83:887-91.
13. Theocharis S, Kanelli H, Politi E, et al. Expression of peroxisome proliferator activated receptor-gamma in non-small cell lung carcinoma: correlation with histological type and grade. *Lung Cancer* 2002;36:249-55.
14. Theocharis S, Giaginis C, Parasi A, et al. Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  in Colon Cancer: Correlation with Histopathological Parameters, Cell Cycle-Related Molecules, and Patients' Survival. *Digestive Diseases and Sciences* 2007;52:2305-11.
15. Theocharis S, Klijanienko J, Giaginis C, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  in mobile tongue squamous cell carcinoma: associations with clinicopathological parameters and patients survival. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2011;137:251-9.
16. Pan CC, Chen PC, Chiang H. KIT (CD117) is frequently overexpressed in thymic carcinomas but is absent in thymomas. *J Pathol* 2004;202:375-81.
17. Nakagawa K, Matsuno Y, Kunitoh H, Maeshima A, Asamura H, Tsuchiya R. Immunohistochemical KIT (CD117) expression in thymic epithelial tumors. *Chest* 2005;128:140-4.
18. Morrison RF, Farmer SR. Role of PPAR $\gamma$  in regulating a cascade expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, p18(INK4c) and p21(Waf1/Cip1), during adipogenesis. *J Biol Chem* 1999;274:17088-97.
19. Chang T-H, Szabo E. Induction of Differentiation and Apoptosis by Ligands of Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Research* 2000;60:1129-38.
20. Inoue K-i, Kawahito Y, Tsubouchi Y, et al. Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  in Renal Cell Carcinoma and Growth Inhibition by Its Agonists. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001;287:727-32.
21. Fukuoka T, Yashiro M, Kinoshita H, et al. Prostaglandin d synthase is a potential novel therapeutic agent for the treatment of gastric carcinomas expressing PPAR $\gamma$ . *International Journal of Cancer* 2015;137:1235-44.

表 1 各分子標的薬関連蛋白の発現率の結果一覧

Markers	Thymic carcinoma, %	Thymoma Type B3, %	P value
EGFR	51.25 ± 25.87	56.25 ± 35.03	0.237
IGF1R	57.50 ± 20.53	37.50 ± 29.52	0.103
MET	61.25 ± 21.00	25.00 ± 24.49	0.797
VEGFR	0 ± 0	0 ± 0	無し
KIT	30.00 ± 36.25	0.25 ± 0.70	0.050
PPAR $\gamma$	22.50 ± 21.88	0 ± 0	0.001

PPAR  $\gamma$  では、胸腺癌群では胸腺腫群に比し発現率が有意に高率であった。

\* EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor、IGF1R: Insulin-like Growth Factor1 Receptor、MET: Hepatocyte Growth Factor Receptor (HGFR)、VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor、KIT: v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog、PPAR $\gamma$ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$



表 2 KIT における 2 群間の免疫反応陽性の比較

KIT	胸腺癌群 (陽性症例数)	胸腺腫群 (陽性症例数)	P 値
Allred 8-unit Scoring System	3	0	0.1
発現率			
5%	5	0	0.013
10%	5	0	0.013
15%	3	0	0.100
20%	3	0	0.100
25%	3	0	0.100
30%	3	0	0.100
35%	3	0	0.100
40%	3	0	0.100
45%	3	0	0.100
50%	3	0	0.100
55%	3	0	0.100
60%	3	0	0.100
65%	3	0	0.100
70%	3	0	0.100
75%	1	0	0.500
80%	1	0	0.500
85%	0	0	-
90%	0	0	-
95%	0	0	-
100%	0	0	-

KIT において発現率 5～10% の範囲で胸腺癌群は胸腺腫群に比し KIT 免疫反応が有意に陽性であった。

この範囲での Kaplan-Meier 生存分析においては  $P = 0.342$  と生存率について有意差を得られなかった。

\*KIT : v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog

表 3 PPAR $\gamma$  における 2 群間の免疫反応陽性の比較

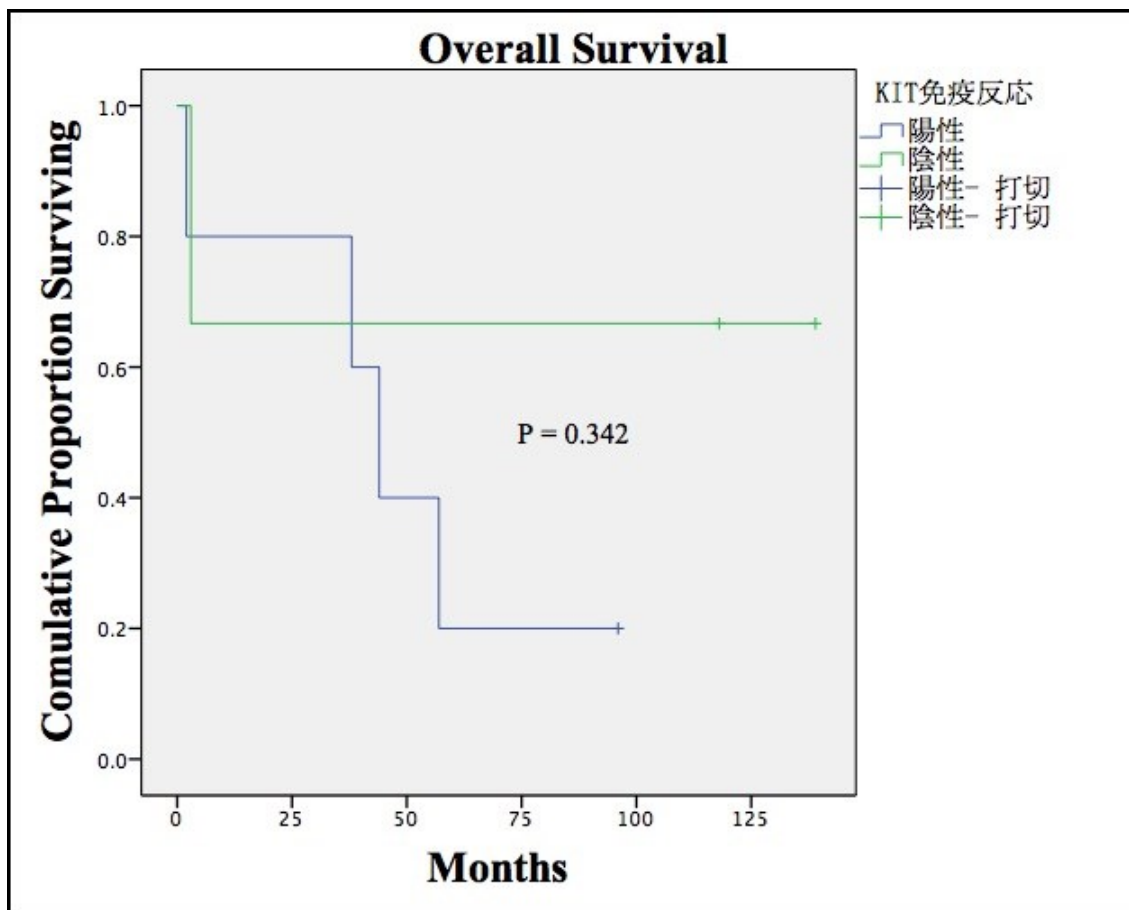
PPAR	胸腺癌群 (陽性症例数)	胸腺腫群 (陽性症例数)	P 値
Allred 8-unit Scoring System	0	0	0.5
発現率			
5%	5	0	<b>0.013</b>
10%	5	0	<b>0.013</b>
15%	5	0	<b>0.013</b>
20%	5	0	<b>0.013</b>
25%	4	0	<b>0.038</b>
30%	4	0	<b>0.038</b>
35%	2	0	0.233
40%	2	0	0.233
45%	1	0	0.500
50%	1	0	0.500
55%	1	0	0.500
60%	1	0	0.500
65%	0	0	-
70%	0	0	-
75%	0	0	-
80%	0	0	-
85%	0	0	-
90%	0	0	-
95%	0	0	-
100%	0	0	-

PPAR $\gamma$  において発現率 5~30%の範囲で胸腺癌群は胸腺腫群に比し PPAR $\gamma$  免疫反応が有意に陽性であった。

とくに 25%~30%の範囲での Kaplan-Meier 生存分析においては P = 0.007 と胸腺癌群は胸腺腫群に比し生存率の有意な延長を認めた。

\*PPAR $\gamma$  : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$

図1 胸腺癌群でのKIT免疫反応陽性の有無に関するKaplan-Meier生存分析

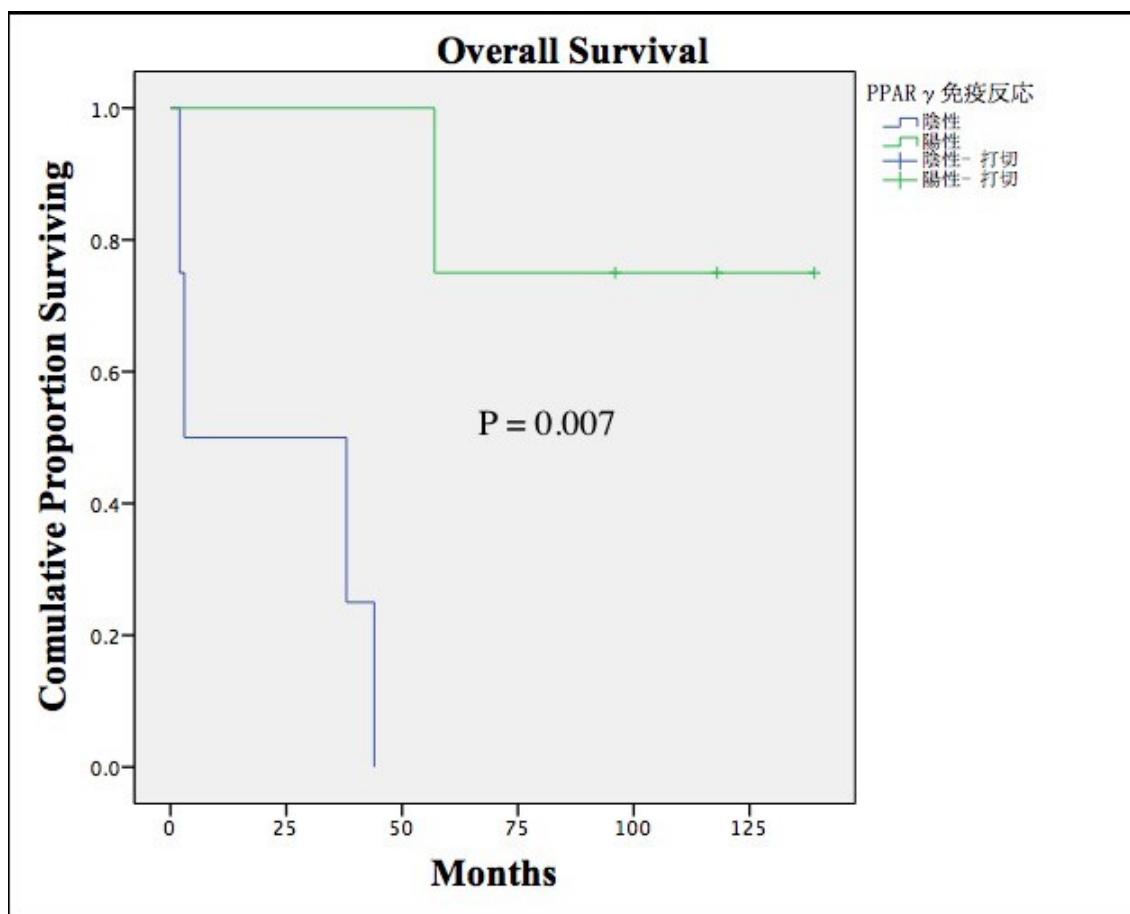


KITの発現率が5%以上を陽性とした場合、KIT免疫反応陽性群の5年生存率は20.0%、KIT免疫反応陰性群の5年生存率は66.0%であった。

log-rank testにおける両群の比較では $P = 0.342$ と両群の生存率に有意差を認めなかった。

\*KIT : v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog

図2 胸腺癌群でのPPAR $\gamma$ 免疫反応陽性の有無に関するKaplan-Meier生存分析



PPAR $\gamma$ の発現率が25%以上を陽性とした場合、PPAR $\gamma$ 免疫反応陽性群で5年生存率74.8%、PPAR $\gamma$ 免疫反応陰性群で3年生存率が49.8%であった。

log-rank testにおける両群の比較ではP = 0.007と両群の生存率に有意差を認めた。

\* PPAR $\gamma$  : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$