

学位論文

「甲状腺乳頭がんにおける血球炎症性マーカーと
腫瘍微小環境の関連とその臨床的意義」

DM18033 横田 光央

北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程
臨床医科学群 外科学
指導教授 比企 直樹

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

要旨

リンパ球-単球比 (LMR) や好中球-リンパ球比 (NLR) などのいくつかの血球炎症性マーカーが長期転帰を予測することが報告されている。しかし、そのような全身性炎症反応の重要性は、甲状腺がんではまだ明らかになっていない。さらに、血球炎症性マーカーと腫瘍内へ動員された免疫細胞との関連は不明のままである。本研究では PTC における血球炎症性マーカーの臨床的影響について検討した。さらに腫瘍内部における TAM や MDSC, TIL の臨床的影響および血球炎症性マーカーとの関連について解析を行い、その臨床的意義を検討した。

当科で PTC と診断され根治手術を施行した 570 症例の血液検査データおよび臨床病理学的因子を後方視的に解析した。また、同コホート内における 162 症例の原発巣に対し抗 CD33 抗体, 抗 CD163 抗体, 抗 CD3 抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、陽性細胞密度と臨床病理学的因子との関連を解析した。

(1)PTC の術後再発と白血球分画および血球炎症性マーカーとの関係性

有意差があったものは好中球数 ($p=0.002$), 単球数 ($p<0.001$), NLR ($p=0.008$), LMR ($p<0.001$) であった。特に 10 年以内に再発した症例では有意に低い LMR 分布を示した。

(2)血球炎症性マーカーを含む臨床病理学的因子による予後解析

低い LMR ($p = 0.022$, HR = 2.92), pN1b, 高い ND, 高い Tg が独立した再発予測因子であった。術前 LMR 低値は、進行がんの PTC の再発リスク (RFS) と有意に関連していた ($p < 0.001$, $p = 0.035$)。LMR, Tg, および ND の組み合わせにおいて、すべて陽性を示した症例では著明に不良な長期予後 (RFS 46.9%, HR = 17.9) を示した。

(3)TAM, MDSC, TIL 細胞密度と末梢血単球数, LMR の関係性

CD163 陽性細胞密度は末梢血単球数 ($p=0.046$), LMR ($p=0.044$) とともに有意な関連が認められた。CD33, CD3 においては有意差が認められなかった。

(4)TAM, MDSC, TIL 細胞密度と臨床病理学的因子による予後解析

高い CD163 細胞密度 ($p = 0.023$, HR = 3.12) 低い LMR ($p = 0.005$, HR = 3.95), 年齢, pN1b, 高い Tg が独立した再発予測因子であった。

以上より、根治手術が施行された甲状腺乳頭癌患者において、術前 LMR 低値および高い原発巣 TAM 密度が再発を予測することを初めて報告した。特に、その重要性は進行がんで顕著であった。本研究結果は、さらなる末梢血中免疫担当細胞のプロファイルを解析することで、個別化医療への新規診断治療の基礎となりえる。

目次

	頁
1. 序論 -----	1
2. 対象と方法	
2-1. 対象患者 -----	2
2-2. 臨床病理学的因子 -----	2
2-3. 免疫組織化学染色 (IHC) -----	2
2-4. 統計学的解析 -----	3
3. 結果	
3-1. PTC の術後再発と白血球分画および血球炎症性マーカーとの関係性 ----	4
3-2. 血球炎症性マーカーを含む臨床病理学的因子による予後解析 -----	4
3-3. LMR と臨床病理学的因子との関連性 -----	4
3-4. TAM, MDSC, TIL 細胞密度と末梢血単球数, LMR の関係性 -----	5
3-5. TAM, MDSC, TIL 細胞密度と臨床病理学的因子による予後解析 -----	5
4. 考察 -----	6
5. 総括 -----	7
6. 引用文献 -----	8
7. 図表 -----	13

1. 序論

甲状腺乳頭がん (PTC) は、最も一般的なタイプの分化型甲状腺がん (DTC) であり、すべての甲状腺がんの少なくとも 94% を占める¹。PTC のほとんどの患者は 10 年の疾患特異的生存率が 90% を超える優れた予後を示すが、患者の約 10% は依然として再発や転移により治療に難渋する²。年齢、腫瘍サイズ、甲状腺外浸潤、大きなリンパ節転移などのいくつかの臨床的特徴が再発の高リスク因子として確立されており、再発を予測するために TNM 病期分類システムに採用されている²⁻⁶。しかしながら TNM 病期分類システムは、アブレーションまたは補助 I-131 放射性ヨウ素 (RAI) 療法を必要とする高リスク患者を選択するにはまだ不十分であるため、治療戦略を正確に決定するための有用なバイオマーカーが求められている。

近年、全身性炎症反応が甲状腺がんを含む複数の悪性腫瘍の予後不良に関与していることが多く報告されてきている⁷⁻¹¹。腫瘍の微小環境は、宿主側の炎症反応を歪め、腫瘍形成の促進に関与している。たとえば、循環単核細胞に由来する腫瘍関連マクロファージ (TAM) および骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) は、腫瘍の進行と転移を促進する上で重要な役割を果たし⁸、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) は、乳がんの複数のサブタイプにおける化学感受性とより良い長期生存に関連している¹²⁻¹⁸。また、末梢循環においてリンパ球-単球比 (LMR) や好中球-リンパ球比 (NLR) などのいくつかの血球炎症性マーカーが長期転帰を予測することが報告されている^{19, 20}。特に、LMR は TIL、循環 MDSC、および TAM の前駆単核細胞を表す可能性があり、高リスク患者の再発や治療反応性を予測する可能性を秘めている。DTC において NLR は生存率の低下を予測する可能性があるが、否定的な報告もあり^{9-11, 21, 22}、このような全身性炎症反応の重要性は、甲状腺がんではまだ明らかになっていない。さらに、血球炎症性マーカーと腫瘍内へ動員された免疫細胞との関連は不明のままである。したがって、本研究では PTC における血球炎症性マーカーの臨床的影響について検討した。さらに腫瘍内部における TAM や MDSC, TIL の臨床的影響および血球炎症性マーカーとの関連について解析を行い、その臨床的意義を検討した。

2. 対象と方法

2-1. 対象患者

2006年4月から2018年3月に北里大学病院一般外科および乳腺甲状腺外科でPTCと診断され治癒切除を受けた579例の患者を遡及的に評価した。その中で、術前CTスキャンによって遠隔転移の兆候がない、十分なサンプルデータを持つ570人の患者を対象とした。観察期間の中央値は63ヶ月であり、0.5~143ヶ月の範囲であった。さらに同コホート内における2006年4月から2010年3月までの162症例を対象として免疫組織化学染色(IHC)を行った。観察期間の中央値は146ヶ月であり、7~170ヶ月の範囲であった。

2-2. 臨床病理学的因子

臨床病理学的因子は、年齢、性別、腫瘍サイズ、リンパ節転移(pN)、転移リンパ節密度(Node Density; ND)、被膜外浸潤、腺内転移、慢性甲状腺炎、病理病期(UICC8th)、を調査した。血液データは術前のスクリーニング検査の一環として、手術前1か月以内に得られたものを用い、白血球分画を含む全血球数、好中球-リンパ球比(NLR)、リンパ球-単球比(LMR)、血小板-リンパ球比(PLR)、血清サイログロブリン(Tg)を調査した。本研究では、郭清されたリンパ節の総数に対する転移性リンパ節の数の比率を転移リンパ節密度(ND)と定義した。白血球分画を含む術前の血球数は、XN-9000(Sysmex, Hyogo, Japan)を使用したフローサイトメトリーによってカウントされた。NLR, LMR, PLRは、白血球(好中球, 単球, またはリンパ球)の数と血小板の数から計算した。術前のTgレベルは、cobas-8000(Roshe Diagnostics, Tokyo, Japan)を使用したECLIA法によって測定された。

2-3. 免疫組織化学染色(IHC)

免疫染色では、1次抗体は抗CD33マウスモノクローナル抗体(1:5, clone PWS44, Leica Biosystems), 抗CD163マウスモノクローナル抗体(1:500, clone 10D6, Leica Biosystems), 抗CD3マウスモノクローナル抗体(1:200, clone F7238, Dako)を用いて4°Cで一晩インキュベートした。2次抗体・標識にHistofine MAX-PO(M)キット(NICHIREI BIOSCIENCES, Inc, Tokyo, Japan)を加え、室温で30分インキュベートした。3,3'-ジアミノベンジジン基質(DAB)を色素原として1分間使用し発色させ、ヘマトキシリン対比染色を施行した。腫瘍内部の代表的な3カ所において、400倍視野でのCD33, CD163, CD3陽性細胞数および非腫瘍細胞数をカウント(ImageJ software)し陽性細胞密度を求め、臨床病理学的因子との関連を解析した。

本研究は、北里大学医学部の倫理委員会(IRB)の臨床研究ガイドラインに従って実施された。

2-4. 統計学的解析

統計学的解析では、名義変数にカイ二乗検定、連続変数には Mann-Whitney 検定を行った。臨床病理学的因子と追跡データは、10年無再発生存率（RFS）によって分析した。観察期間は手術日から算出した。連続変数は ROC 曲線を使用して、最適なカットオフ値を決定した。RFS は、Kaplan-Meier 法で推定し、log-rank 検定で有意差を検定した。単変量解析で予後因子となった因子をコックス比例ハザード回帰モデルで多変量解析を行った。多変数ロジスティック回帰分析によって、LMR と独立して相関する変数を決定した。p<0.05 は有意差ありと判定した。すべての統計分析は、JMP Pro14 (SAS Institute, Cary, NC) にて行った。

3. 結果

3-1. PTC の術後再発と白血球分画および血球炎症性マーカーとの関係性

術前の血液データより算出した血球炎症性マーカーの中央値はそれぞれ NLR 1.9 (0.7-33.9) , LMR 5.9 (1.3-15.9) , PLR 135 (42-799) であった.

Mann-Whitney 検定にて再発と白血球分画および血球炎症性マーカーとの関係性を解析した. 有意差があったものは好中球数 ($p=0.002$), 単球数 ($p<0.001$), NLR ($p=0.008$), LMR ($p<0.001$) であった. 特に 10 年以内に再発した症例では有意に低い LMR 分布を示したが, リンパ節または局所再発を示した症例と遠隔転移を示した症例の間では LMR 分布に有意差は認めなかった (Fig. 1).

3-2. 血球炎症性マーカーを含む臨床病理学的因子による予後解析

より詳細な予後解析を行うにあたり, 10 年無再発生存率 (RFS) に対する LMR の最適カットオフ値を ROC 曲線にて決定した. カットオフ 5.0 において AUC 0.683, 感度 63.3%, 特異度 68.8% であった (Fig. 1C). Kaplan-Meier 曲線を用いた予後

(RFS) の解析では, LMR5.0 未満の患者は対照群と比較して著しく予後不良であった (Fig 2). 単変量解析により, 男性, 腫瘍サイズ ($\geq 4\text{cm}$), pN1b, ND (≥ 0.36), 血清 Tg ($\geq 58 \text{ ng/mL}$), 総白血球 ($\geq 5900 /\mu\text{L}$), 好中球数 ($\geq 3600 /\mu\text{L}$), 単球数 ($\geq 260 /\mu\text{L}$), NLR (≥ 2.0), LMR (< 5.0) は, RFS の悪化と有意に関連していた. また末梢血リンパ球数の低下は, RFS の低下をわずかに予測していた ($p=0.068$) (Table 1). 多変量解析では, 低い LMR ($p = 0.022$, HR = 2.92), pN1b, 高い ND, 高い Tg が独立した再発予測因子であった (Table 2).

注目すべきことに, 術前 LMR 低値は, ステージ II および III の PTC の再発リスク (RFS) と有意に関連していた ($p < 0.001$, $p = 0.035$) (Fig 3). 次に, LMR, Tg, および ND の組み合わせによって患者を 3 つのグループに分けた: すべて陰性または 1 項目のみ陽性 (A), 2 項目が陽性 (B), および 3 つの項目すべて陽性 (C). 興味深いことに, C グループの患者は B (RFS 79.8%, HR = 8.00) および A (RFS 97.1%) よりも著明に不良な長期予後 (RFS 46.9%, HR = 17.9) を示した (Fig 4).

3-3. LMR と臨床病理学的因子との関連性

術前の低 LMR と相関のある臨床病理学的因子を評価した. 2 変量の解析では, 性別 (男性) と ND (≥ 0.36) は低い LMR と関係していた ($p=0.004$, $p=0.006$). 多変量ロジスティック回帰分析による解析では, LMR は他のどの臨床病理学的因子とも関連は認められなかった (Table 3).

3-4. TAM, MDSC, TIL 細胞密度と末梢血単球数, LMR の関係性

PTC 162 症例における免疫組織化学染色により, 抗 CD163 抗体, 抗 CD33 抗体, 抗 CD3 抗体を用いて TAM, MDSC, TIL の腫瘍内細胞密度を求め, 末梢血単球数および LMR との関係について解析した. CD163 陽性細胞密度は末梢血単球数 ($p=0.046$), LMR ($p=0.044$) とともに有意な関連が認められた (Fig. 5). CD33, CD3 においては有意差が認められなかった.

3-5. TAM, MDSC, TIL 細胞密度と臨床病理学的因子による予後解析

10 年無再発生存率 (RFS) に対する最適カットオフ値を ROC 曲線にて決定した. Kaplan-Meier 曲線を用いた予後 (RFS) の解析では, CD163 陽性細胞密度 0.25 以上の患者は対照群と比較して著しく予後不良であった (Fig. 6). 単変量解析により, pN1b, ND (≥ 0.36), 血清 Tg (≥ 58 ng/mL), LMR (< 5.0), CD163 陽性細胞密度は, 再発と有意に関連していた. CD33, CD3 においては有意差が認められなかった (Table 4). 多変量解析では, 高い CD163 細胞密度 ($p = 0.023$, HR = 3.12), 低い LMR ($p = 0.005$, HR = 3.95), 年齢, pN1b, 高い Tg が独立した再発予測因子であった (Table 5). また, 高い CD163 細胞密度は進行がん (stage III) の再発リスク (RFS) と有意に関連していた ($p=0.014$) (Fig. 7).

4. 考察

本研究では、一般検査より得られる白血球分画を利用して血球炎症性マーカーの臨床的影響を評価した。さらに腫瘍内部における TAM や MDSC, TIL の動員の臨床的影響およびリンパ球-単球比 (LMR) との関連について解析を行い、その臨床的意義を検討した。最初に、リンパ球-単球比 (LMR) および腫瘍関連マクロファージ (TAM) が PTC の術後再発と強く関連していることが示された。注目すべきことに、低い LMR と高い TAM 密度は、ステージ II および III の PTC の患者で特に予後不良因子であった。独立した予後予測因子である LMR, Tg, および ND の組み合わせは、再発の高リスク患者を抽出する有用な指標であった。低 LMR 群と高 LMR 群の間には TAM 密度に有意な差が認められた。検索できる範囲で、本研究は PTC における LMR の臨床的意義および LMR と TAM の関連を示す最初の報告である。

腫瘍関連免疫細胞が癌の進行に重要な役割を果たし^{8, 23, 24}、循環免疫細胞が複数の癌の長期予後に関与していることが示されている²⁵⁻³⁵。好中球-リンパ球比 (NLR) が、甲状腺がんの腫瘍サイズや予後 (RFS) 不良と関連する報告があるが、否定的な報告もあり結論は出ていない^{9, 11}。Ahn らは、低 LMR は、未分化甲状腺がん (ATC) において全死因死亡の独立した危険因子であると報告している³⁶。この報告は、組織型は異なるが、根治切除後 PTC 症例におけるわれわれの研究結果と同様の結果を示している。また我々の報告以降、低い LMR が PTC の RAI やソラフェニブに対する抵抗性を示す可能性や、腫瘍サイズやサイログロブリンレベルと同等の予後予測因子とする報告もあり³⁷⁻⁴⁰、LMR が術後の長期的な経過観察や補助療法を選択する有用なマーカーとなる可能性が示されてきている。

これまでに遺伝子変異 (BRAF, RAS, TERT プロモーターなど)、RET 染色体再配列、マイクロ RNA、またはプロテオームベースのバイオマーカーなどのさまざまな遺伝子変化および分子バイオマーカーが予後予測因子として報告されている⁴¹⁻⁴⁴。ただし、これらのバイオマーカーは高価であり、追加コストが発生する。一方、術前 LMR は、日常診療における術前血液検査の白血球分画から計算できる単純な検査にもかかわらず、長期予後に関する有力な情報が得られ、大きな利点となる。

循環血中の単球には、骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) および腫瘍関連マクロファージ (TAM) が含まれる。TAM はコロニー刺激因子 (CSF) 1 および CC モチーフ型ケモカイン受容体 (CCR) 2 依存的に腫瘍局所に浸潤し、T 細胞および NK 細胞の抗腫瘍活性を阻害することで免疫回避に寄与し、腫瘍細胞の成長、浸潤、転移に関与している⁴⁵⁻⁵⁰。また、腫瘍微小環境において PD-1 / PD-L1 の発現に影響を与えることも示されている⁵¹。ヒト癌において TAM のほとんどは、CSF-1 や IL-10 などの腫瘍由来分子刺激により、抗炎症性 M2 表現型に極性化される。CD163 (ヘモグロビ

ンスカベンジャー受容体) はマクロファージ上に発現し、M2 表現型のマーカーとして用いられている⁵²⁻⁵⁵。

PTC においては、TAM 密度の増加と腫瘍径やリンパ節転移との相関や^{56, 57}、甲状腺がん (分化がん、未分化がんを含む) の低い OS との関連が報告されている⁵⁸。これらの報告は、高い TAM 密度が PTC の低い RFS と関連することを示した本研究結果を裏付けている。本研究結果では初めて LMR と TAM の関連が示され、LMR が TAM による腫瘍関連免疫応答を反映している可能性が考えられた。今後、末梢血中免疫細胞プロファイルの詳細なサブタイプの分析を予定しており、TAM の末梢血中前駆細胞を同定することにより、診断・治療効果・再発予測等の新規診断治療のツールとなりえる。さらに免疫細胞プロファイルと RAI 不応性との関連も検証すべき重要なテーマである。

本研究の limitation としては、単施設での後方視的研究であること、症例数が少なく選択バイアスを引き起こす可能性があること、本研究成果における感度と特異度は十分に高いとはいえず、交絡因子の存在が十分に検討出来ていない可能性などが挙げられる。今後はそれらを踏まえ多施設共同での大規模な臨床研究によるエビデンスの構築が望まれる。

以上、われわれは、根治手術が施行された甲状腺乳頭がん患者において、術前 LMR 低値および高い原発巣 TAM 密度が再発を予測することを初めて報告した。特に、その重要性は進行がんで顕著であった。本研究結果は、さらなる末梢血中免疫担当細胞のプロファイルを解析することで、個別化医療への新規診断治療の基礎となりえる。

5. 総括

以上、われわれは、根治手術が施行された甲状腺乳頭がん患者において、術前 LMR 低値および高い原発巣 TAM 密度が再発を予測することを初めて報告した。特に、その重要性は進行がんで顕著であった。本研究結果は、さらなる末梢血中免疫担当細胞のプロファイルを解析することで、個別化医療への新規診断治療の基礎となりえる。

6. 引用文献

1. Sherman SI. Thyroid carcinoma. *Lancet*. 2003;361:501-11.
2. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2016;26:1-133.
3. Hay ID, Bergstralh EJ, Goellner JR, Ebersold JR, Grant CS. Predicting outcome in papillary thyroid carcinoma: development of a reliable prognostic scoring system in a cohort of 1779 patients surgically treated at one institution during 1940 through 1989. *Surgery*. 1993;114:1050-7; discussion 7-8.
4. Hay ID, Grant CS, Taylor WF, McConahey WM. Ipsilateral lobectomy versus bilateral lobar resection in papillary thyroid carcinoma: a retrospective analysis of surgical outcome using a novel prognostic scoring system. *Surgery*. 1987;102:1088-95.
5. Noguchi S, Murakami N, Kawamoto H. Classification of papillary cancer of the thyroid based on prognosis. *World J Surg*. 1994;18:552-7; discussion 8.
6. Sugitani I, Kasai N, Fujimoto Y, Yanagisawa A. A novel classification system for patients with PTC: addition of the new variables of large (3 cm or greater) nodal metastases and reclassification during the follow-up period. *Surgery*. 2004;135:139-48.
7. Jiang K, Lei J, Li C, Shu K, Li W, Zhang Y, et al. Comparison of the prognostic values of selected inflammation based scores in patients with medullary thyroid carcinoma: A pilot study. *J Surg Oncol*. 2017;116:281-7.
8. Kato H, Watanabe M. Myeloid-Derived Suppressor Cells and Therapeutic Strategies in Cancer. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:159269.
9. Kim JY, Park T, Jeong SH, Jeong CY, Ju YT, Lee YJ, et al. Prognostic importance of baseline neutrophil to lymphocyte ratio in patients with advanced papillary thyroid carcinomas. *Endocrine*. 2014;46:526-31.
10. Lang BH, Ng CP, Au KB, Wong KP, Wong KK, Wan KY. Does preoperative neutrophil lymphocyte ratio predict risk of recurrence and occult central nodal metastasis in papillary thyroid carcinoma? *World J Surg*. 2014;38:2605-12.
11. Ozmen S, Timur O, Calik I, Altinkaynak K, Simsek E, Gozcu H, et al. Neutrophil-lymphocyte ratio (NLR) and platelet-lymphocyte ratio (PLR) may be superior to C-reactive protein (CRP) for predicting the occurrence of differentiated thyroid cancer. *Endocr Regul*. 2017;51:131-6.
12. Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Lederer B, Heppner BI, Weber KE, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol*. 2018;19:40-50.

13. Salgado R, Loi S. Tumour infiltrating lymphocytes in breast cancer: increasing clinical relevance. *Lancet Oncol.* 2018;19:3-5.
14. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Müller BM, Komor M, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28:105-13.
15. Denkert C, von Minckwitz G, Brase JC, Sinn BV, Gade S, Kronenwett R, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without carboplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary breast cancers. *J Clin Oncol.* 2015;33:983-91.
16. Kovács A, Stenmark Tullberg A, Werner Rönnerman E, Holmberg E, Hartman L, Sjöström M, et al. Effect of Radiotherapy After Breast-Conserving Surgery Depending on the Presence of Tumor-Infiltrating Lymphocytes: A Long-Term Follow-Up of the SweBCG91RT Randomized Trial. *J Clin Oncol.* 2019;37:1179-87.
17. Loi S, Drubay D, Adams S, Pruneri G, Francis PA, Lacroix-Triki M, et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Prognosis: A Pooled Individual Patient Analysis of Early-Stage Triple-Negative Breast Cancers. *J Clin Oncol.* 2019;37:559-69.
18. Loi S, Sirtaine N, Piette F, Salgado R, Viale G, Van Eenoo F, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *J Clin Oncol.* 2013;31:860-7.
19. Nishijima TF, Muss HB, Shachar SS, Tamura K, Takamatsu Y. Prognostic value of lymphocyte-to-monocyte ratio in patients with solid tumors: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev.* 2015;41:971-8.
20. Templeton AJ, McNamara MG, Šeruga B, Vera-Badillo FE, Aneja P, Ocaña A, et al. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106:dju124.
21. Kocer D, Karakukcu C, Karaman H, Gokay F, Bayram F. May the neutrophil/lymphocyte ratio be a predictor in the differentiation of different thyroid disorders? *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16:3875-9.
22. Liu JF, Ba L, Lv H, Lv D, Du JT, Jing XM, et al. Association between neutrophil-to-lymphocyte ratio and differentiated thyroid cancer: a meta-analysis. *Sci Rep.* 2016;6:38551.
23. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002;420:860-7.
24. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144:646-74.
25. Bruckner HW, Lavin PT, Plaxe SC, Storch JA, Livstone EM. Absolute granulocyte, lymphocyte, and monocyte counts. Useful determinants of prognosis for patients with metastatic cancer of the stomach. *Jama.* 1982;247:1004-6.
26. Elias EG, Leuchten JM, Buda BS, Brown SD. Prognostic value of initial mononucleated cell

- percentages in patients with epidermoid carcinoma of the head and neck. *Am J Surg*. 1986;152:487-90.
27. Ishizuka M, Oyama Y, Abe A, Kubota K. Combination of platelet count and neutrophil to lymphocyte ratio is a useful predictor of postoperative survival in patients undergoing surgery for gastric cancer. *J Surg Oncol*. 2014;110:935-41.
 28. Lee S, Oh SY, Kim SH, Lee JH, Kim MC, Kim KH, et al. Prognostic significance of neutrophil lymphocyte ratio and platelet lymphocyte ratio in advanced gastric cancer patients treated with FOLFOX chemotherapy. *BMC Cancer*. 2013;13:350.
 29. Nakayama Y, Gotohda N, Shibasaki H, Nomura S, Kinoshita T, Hayashi R. Usefulness of the neutrophil/lymphocyte ratio measured preoperatively as a predictor of peritoneal metastasis in patients with advanced gastric cancer. *Surg Today*. 2014;44:2146-52.
 30. Sajadieh A, Mouridsen MR, Selmer C, Intzilakis T, Nielsen OW, Haugaard SB. Monocyte number associated with incident cancer and mortality in middle-aged and elderly community-dwelling Danes. *Eur J Cancer*. 2011;47:2015-22.
 31. Sasaki A, Iwashita Y, Shibata K, Matsumoto T, Ohta M, Kitano S. Prognostic value of preoperative peripheral blood monocyte count in patients with hepatocellular carcinoma. *Surgery*. 2006;139:755-64.
 32. Schmidt H, Bastholt L, Geertsen P, Christensen IJ, Larsen S, Gehl J, et al. Elevated neutrophil and monocyte counts in peripheral blood are associated with poor survival in patients with metastatic melanoma: a prognostic model. *Br J Cancer*. 2005;93:273-8.
 33. Shimada H, Takiguchi N, Kainuma O, Soda H, Ikeda A, Cho A, et al. High preoperative neutrophil-lymphocyte ratio predicts poor survival in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2010;13:170-6.
 34. Stotz M, Pichler M, Absenger G, Szkandera J, Armingier F, Schaberl-Moser R, et al. The preoperative lymphocyte to monocyte ratio predicts clinical outcome in patients with stage III colon cancer. *Br J Cancer*. 2014;110:435-40.
 35. Walsh SR, Cook EJ, Goulder F, Justin TA, Keeling NJ. Neutrophil-lymphocyte ratio as a prognostic factor in colorectal cancer. *J Surg Oncol*. 2005;91:181-4.
 36. Ahn J, Song E, Oh HS, Song DE, Kim WG, Kim TY, et al. Low Lymphocyte-to-Monocyte Ratios Are Associated with Poor Overall Survival in Anaplastic Thyroid Carcinoma Patients. *Thyroid*. 2019;29:824-9.
 37. Zhou C, Duan D, Liu S. Predictive Value of a Prognostic Model Based on Lymphocyte-to-Monocyte Ratio Before Radioiodine Therapy for Recurrence of Papillary Thyroid Carcinoma. *Technol Cancer Res Treat*. 2021;20:15330338211027910.
 38. Ahn J, Song E, Kim WG, Kim TY, Kim WB, Shong YK, et al. Prognostic role of the lymphocyte-to-monocyte ratio for clinical outcomes of patients with progressive radioiodine-refractory differentiated thyroid carcinoma treated by sorafenib. *Clin Endocrinol (Oxf)*.

- 2020;92:71-6.
39. Kim K, Pak K, Kim IJ, Kim M, Kim BH, Lee BJ, et al. Lymphocyte-to-monocyte ratio prior to radioiodine ablation in low- and intermediate-risk, papillary thyroid cancer. *Endocrine*. 2020;70:364-71.
 40. Song L, Zhu J, Li Z, Wei T, Gong R, Lei J. The prognostic value of the lymphocyte-to-monocyte ratio for high-risk papillary thyroid carcinoma. *Cancer Manag Res*. 2019;11:8451-62.
 41. Abdullah MI, Junit SM, Ng KL, Jayapalan JJ, Karikalan B, Hashim OH. Papillary Thyroid Cancer: Genetic Alterations and Molecular Biomarker Investigations. *Int J Med Sci*. 2019;16:450-60.
 42. Acquaviva G, Visani M, Repaci A, Rhoden KJ, de Biase D, Pession A, et al. Molecular pathology of thyroid tumours of follicular cells: a review of genetic alterations and their clinicopathological relevance. *Histopathology*. 2018;72:6-31.
 43. Papathomas TG, Nosé V. New and Emerging Biomarkers in Endocrine Pathology. *Adv Anat Pathol*. 2019;26:198-209.
 44. Pstrağ N, Ziemnicka K, Bluysen H, Wesoly J. Thyroid cancers of follicular origin in a genomic light: in-depth overview of common and unique molecular marker candidates. *Mol Cancer*. 2018;17:116.
 45. Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity*. 2014;41:49-61.
 46. Liverani C, Mercatali L, Spadazzi C, La Manna F, De Vita A, Riva N, et al. CSF-1 blockade impairs breast cancer osteoclastogenic potential in co-culture systems. *Bone*. 2014;66:214-22.
 47. Ding J, Guo C, Hu P, Chen J, Liu Q, Wu X, et al. CSF1 is involved in breast cancer progression through inducing monocyte differentiation and homing. *Int J Oncol*. 2016;49:2064-74.
 48. Fang WB, Yao M, Brummer G, Acevedo D, Alhakamy N, Berkland C, et al. Targeted gene silencing of CCL2 inhibits triple negative breast cancer progression by blocking cancer stem cell renewal and M2 macrophage recruitment. *Oncotarget*. 2016;7:49349-67.
 49. Franklin RA, Liao W, Sarkar A, Kim MV, Bivona MR, Liu K, et al. The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages. *Science*. 2014;344:921-5.
 50. Nakatsumi H, Matsumoto M, Nakayama KI. Noncanonical Pathway for Regulation of CCL2 Expression by an mTORC1-FOXK1 Axis Promotes Recruitment of Tumor-Associated Macrophages. *Cell Rep*. 2017;21:2471-86.
 51. Santoni M, Romagnoli E, Saladino T, Foghini L, Guarino S, Capponi M, et al. Triple negative breast cancer: Key role of Tumor-Associated Macrophages in regulating the activity of anti-PD-1/PD-L1 agents. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2018;1869:78-84.
 52. Takeya M, Komohara Y. Role of tumor-associated macrophages in human malignancies:

- friend or foe? *Pathol Int.* 2016;66:491-505.
53. Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature.* 2001;409:198-201.
 54. Komohara Y, Ohnishi K, Kuratsu J, Takeya M. Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. *J Pathol.* 2008;216:15-24.
 55. Komohara Y, Jinushi M, Takeya M. Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors. *Cancer Sci.* 2014;105:1-8.
 56. Kim S, Cho SW, Min HS, Kim KM, Yeom GJ, Kim EY, et al. The expression of tumor-associated macrophages in papillary thyroid carcinoma. *Endocrinol Metab (Seoul).* 2013;28:192-8.
 57. Qing W, Fang WY, Ye L, Shen LY, Zhang XF, Fei XC, et al. Density of tumor-associated macrophages correlates with lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *Thyroid.* 2012;22:905-10.
 58. Ryder M, Ghossein RA, Ricarte-Filho JC, Knauf JA, Fagin JA. Increased density of tumor-associated macrophages is associated with decreased survival in advanced thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2008;15:1069-74.

7. 図表

Figure 1.

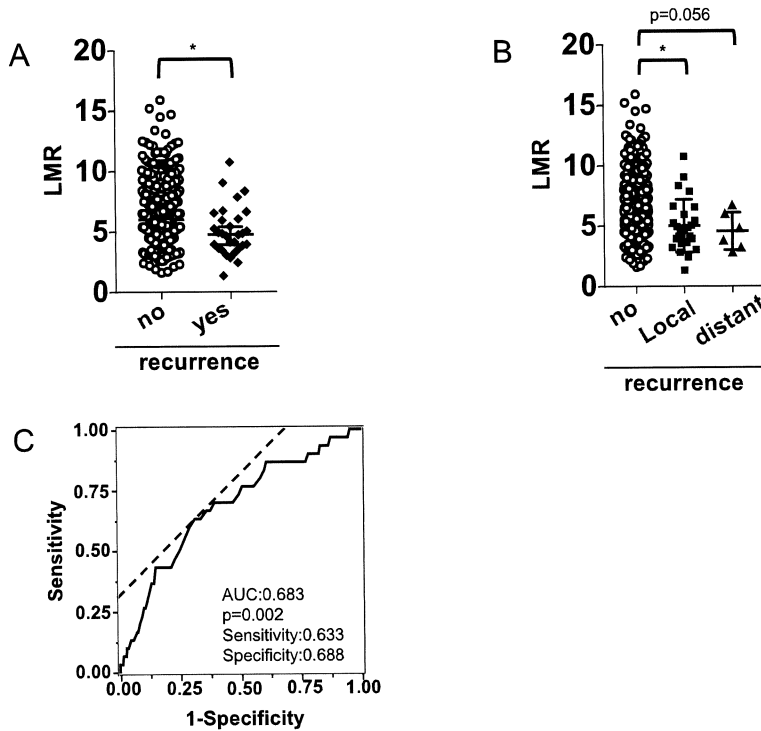


Figure 1. Low LMR is significantly associated with disease recurrence in curatively resected PTC.

(A) Scatter plots of LMR according to the presence or absence of recurrence. Mean LMR (\pm SD) in patients with recurrence and that without recurrence are 4.99 ± 2.05 and 6.37 ± 2.32 , respectively (* $p=0.002$).

(B) Scatter plots of LMR taking recurrence pattern (lymph node or local recurrence (local) and distant metastasis (distant)). Mean LMR (\pm SD) in patients with lymph node or local recurrence and that with distant recurrence are 5.10 ± 2.17 and 4.55 ± 1.56 , respectively (* $p=0.009$).

(C) Receiver operating characteristic (ROC) curve of LMR taking recurrence into account. Cut-off value 5.0 predicted recurrence with high sensitivity and high specificity with high AUC (the area under the ROC curve) in PTC patients.

Figure 2.

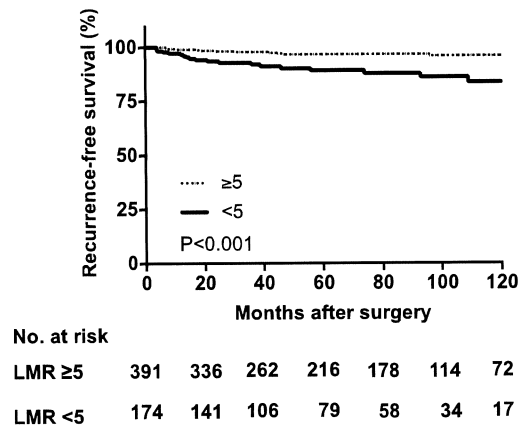


Figure 2. Kaplan-Meier curves of 10-year RFS in 570 patients with curatively resected PTC according to LMR ($p < 0.001$). P value was determined using a log-rank test.

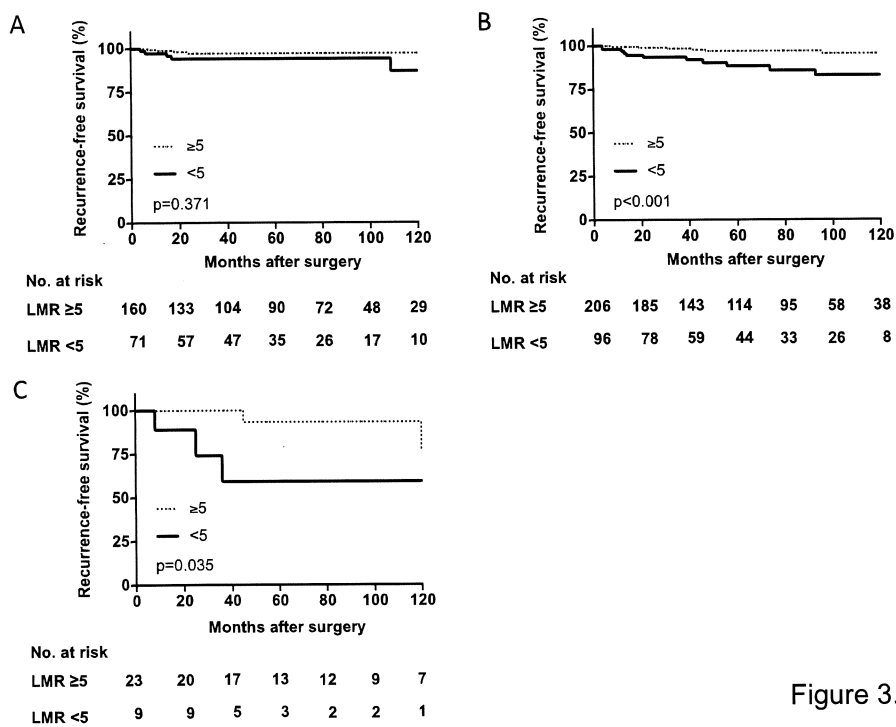


Figure 3.

Figure 3. Low LMR predicts recurrence particularly in advanced UICC stages. Kaplan-Meier curves of 10-year RFS in patients with stage I (A), stage II (B), and stage III (C).

Figure 4.

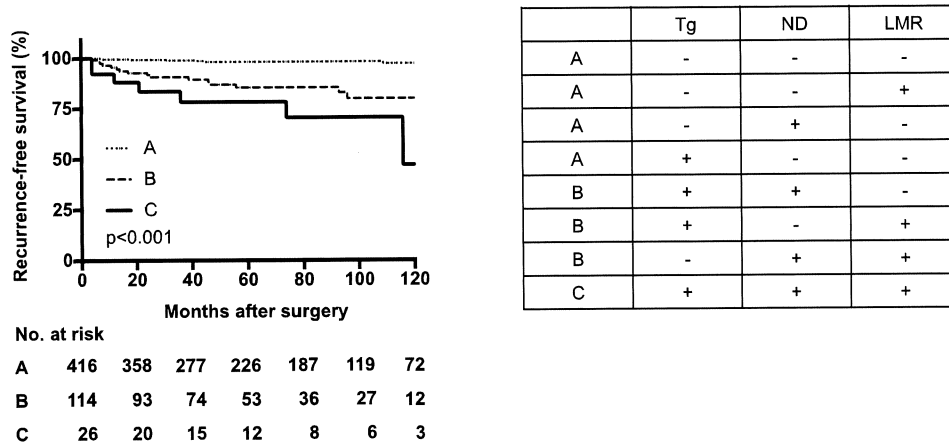


Figure 4. Combination of LMR, Tg, and ND enriches high risk patients for recurrence. Kaplan-Meier curves of 10-year RFS in patients with (A) positive for either zero or one factor (10-year RFS=97.1%), (B) positive for two factors (10-year RFS=79.8%), and (C) positive for all three factors (10-year RFS 46.9%).

Figure 5.

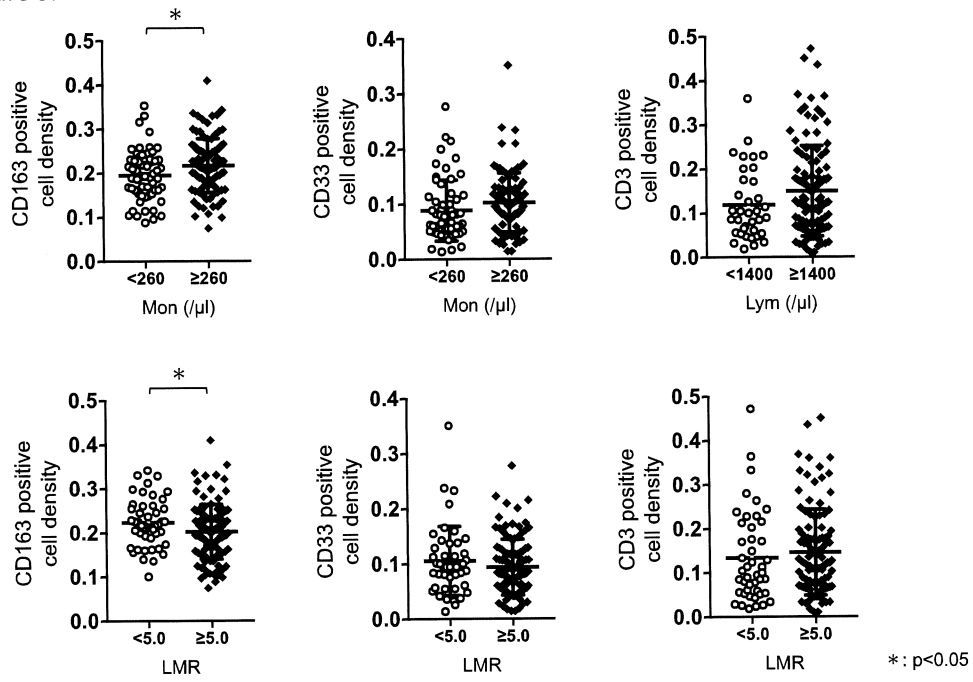


Figure 5. High CD163 positive cell density is significantly associated with monocyte count (* $p=0.046$) and LMR (* $p=0.045$) in PTC patient.

Figure 6.

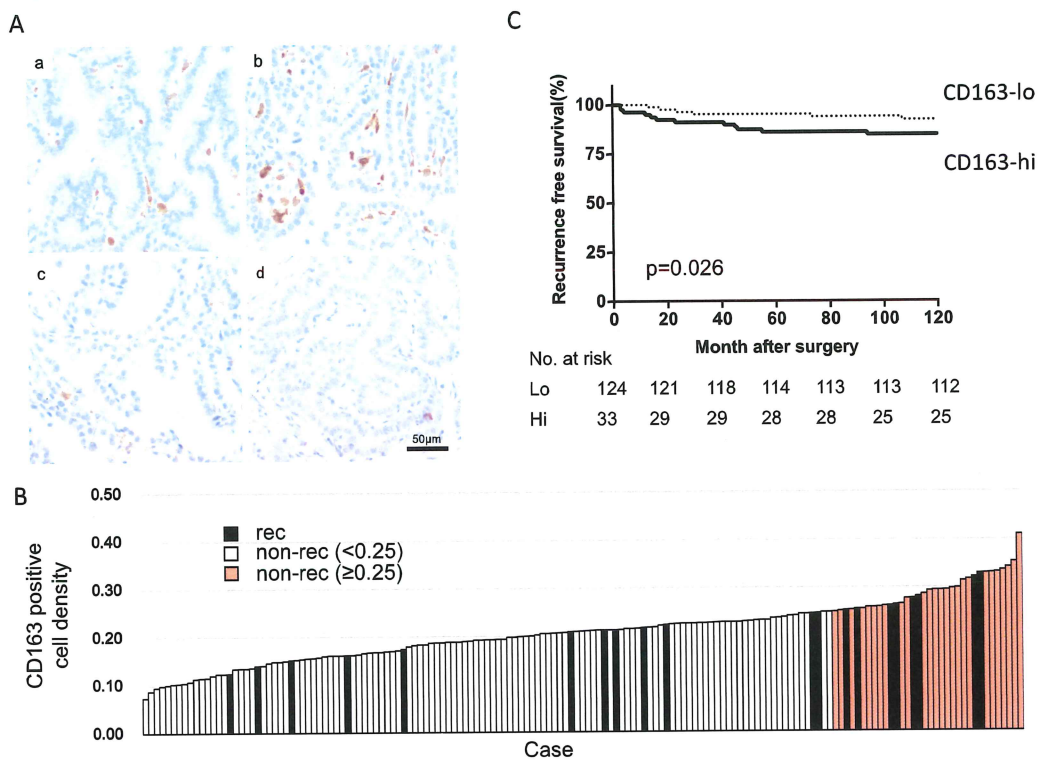


Figure 6. Immunohistochemical staining of CD163 was performed to analyze recruitment of tumor-associated macrophages (TAMs) into primary tumor. (A) Infiltrated TAMs were calculated and scored by the number of CD163⁺ cells/total non-tumor cells under 400x magnification. (A) Representative images of infiltrated CD163⁺ cells. (a, b) High density (≥ 0.25) of CD163⁺ cells, (c, d) Low density (< 0.25) of CD163⁺ cells. Bar, 50 μ m. (B) Distribution of infiltrated CD163⁺ cell scores in patients with PTC recurrence taking recurrence into account. rec, patients who had recurrence(s); non-rec, patients who did not exhibited recurrence. (C) Kaplan-Meier curves of 10-year RFS in 162 patients with curatively resected PTC according to infiltrated CD163⁺ cell number ($p=0.026$). A p value was determined using a log-rank test.

Figure 7.

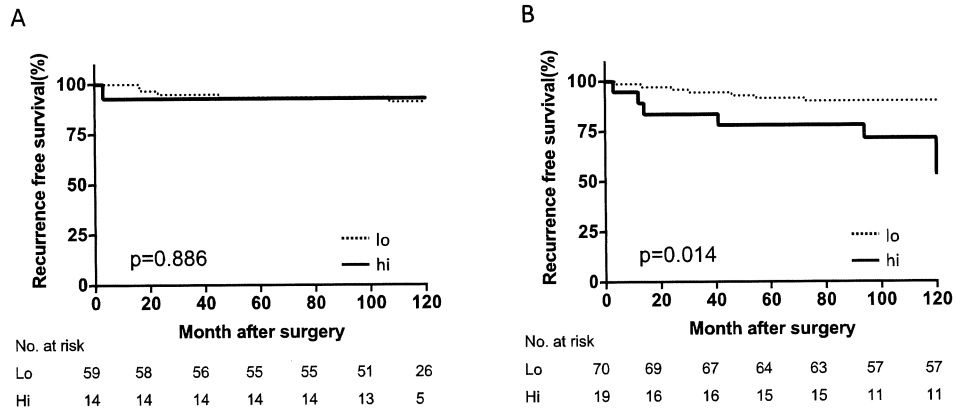


Figure 7. High CD163 positive cell density predicts recurrence particularly in advanced UICC stages. Kaplan-Meier curves of 10-year RFS in patients with stage I (A) and stage II + III (B).

Table 1. Patient characteristics and 10-year RFS in 570 patients with PTC

Variables	No. of patients (%)	10-year RFS (%)	Univariable	
			HR(95%CI)	p*
Age (years)				0.329
	<55	231 (41)	94.7	1.00
	≥55	339 (59)	90.6	1.44 (0.69-3.18)
Gender				0.009
	Female	424 (74)	95.1	1.00
	Male	146 (26)	83.8	2.59 (1.29-5.19)
Tumor size (cm)				0.001
	≤2	347 (61)	95.2	1.00
	>2, ≤4	160 (28)	91.0	2.64 (1.13-6.26)
	≥4	62 (11)	80.6	5.07 (2.01-12.6)
pN				<0.001
	0	158 (28)	96.4	1.00
	1a	249 (45)	96.7	2.71 (0.68-18.00)
	1b	151 (27)	81.6	11.44 (3.35-71.56)
Node density (ND)				<0.001
	<0.36	407 (73)	95.5	1.00
	≥0.36	152 (27)	80.8	4.12 (2.04-8.48)
Extra-thyroidal extension				0.031
	no	486 (88)	92.9	1.00
	yes	69 (12)	88.2	2.38 (1.02-5.57)
Multifocality				0.335
	no	214 (39)	93.9	1.00
	yes	339 (61)	91.9	1.48 (0.67-3.57)
Stage (UICC 8th)				0.153
	I	231 (41)	94.4	1.00
	II	302 (53)	91.5	1.42 (0.63-3.18)
	III	32 (6)	71.6	4.04 (1.24-11.72)
	IVA	1		
Tg (ng/ml)				<0.001
	<58	329 (58)	96.4	1.00
	≥58	234 (42)	86.4	5.84 (2.55-15.73)
Chronic thyroiditis				0.294
	no	437 (77)	92.7	1.00
	yes	133 (23)	90.5	1.50 (0.68-3.10)
WBC (μl)				0.002
	<5900	322 (56)	95.6	1.00
	≥5900	248 (44)	87.4	3.02 (1.47-6.68)
Neut (μl)				0.001
	<3600	339 (60)	95.8	1.00
	≥3600	226 (40)	86.9	3.25 (1.555-7.25)
Eos (μl)				0.103
	<102	228 (40)	94.7	1.00
	≥102	337 (60)	90.8	1.90 (0.88-4.55)
Bas (μl)				0.426
	<33	324 (57)	91.4	1.00
	≥33	241 (43)	94.2	0.73 (0.31-1.55)
Mon (μl)				<0.001
	<260	212 (38)	98.5	1.00
	≥260	353 (62)	88.3	6.08 (2.15-25.50)
Lym (μl)				0.068
	<1400	140 (26)	87.7	1.00
	≥1400	425 (74)	94.1	0.49 (0.24-1.05)
NLR				0.010
	<2	286 (51)	95.6	1.00
	≥2	279 (49)	88.9	2.64 (1.24-6.09)
LMR				<0.001
	<5	174 (31)	83.8	1.00
	≥5	391 (69)	96.0	0.26 (0.12-0.55)
PLR				0.700
	<180	449 (79)	92.8	1.00
	≥180	116 (21)	91.3	1.18 (0.46-2.62)

*Cox's proportional hazard model.

Abbreviations: HR, hazard ratio; ND, node density, ratio between number of metastatic nodes and total number of lymph nodes harvested; WBC, white blood cells; Neut, neutrophil; Eos, eosinophil; Bas, basophil; Mon, monocyte; Lym, lymphocyte; Tg, thyroglobulin; NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio; LMR, lymphocyte-to-monocyte ratio; PLR, platelet-to-lymphocyte ratio;

Table 2. Multivariable prognostic analysis in patients with PTC

Variables	Multivariable		
		HR(95%CI)	p*
LMR			0.022
	<5	2.92 (1.14-7.48)	
	≥5		
Gender	Female	1.00	0.109
	Male	1.97 (0.86-4.51)	
Tumor size (cm)	≤2	1.00	0.955
	>2,≤4	0.93 (0.34-2.66)	
	≥4	0.84 (0.26-2.71)	
pN	0	1.00	<0.001
	1a	1.09 (0.19-6.22)	
	1b	7.40 (1.38-39.61)	
ND	<0.36	1.00	0.011
	≥0.36	3.02 (1.25-7.26)	
Extra-thyroidal extension	no	1.00	0.464
	yes	0.66 (0.22-1.94)	
Tg (ng/ml)	<58	1.00	<0.001
	≥58	5.28 (1.85-15.06)	
NLR	<2	1.00	0.800
	≥2	1.13 (0.43-2.95)	

*Cox's proportional hazard model.

Table 3. Correlation of LMR with clinicopathological variables

Variables	LMR (cut off 5)					Multivariable	
	high (n=391)		low (n=174)		p*	OR (95%CI)	p**
	n	%	n	%			
Age (years)							0.591
	≥55	236	70.2	100	29.8	1.00	
	<55	155	67.7	74	32.3	1.11 (0.59-0.75)	
Gender							0.083
	Female	304	72.6	115	27.4	1.00	
	Male	87	59.6	59	40.4	1.47 (0.95-2.27)	
Tumor size (cm)							0.284
	≤2	247	71.4	99	28.6	1.00	
	>2,≤4	102	65.0	55	35.0	1.45 (0.91-2.32)	
	≥4	42	68.9	19	31.1	1.15 (0.54-2.43)	
pN							0.078
	0	117	75.0	39	25.0	1.00	
	1a	159	64.4	88	35.6	1.71 (0.99-2.94)	
	1b	109	72.2	42	27.8	1.08 (0.57-2.03)	
ND							0.153
	≥0.36	91	60.7	59	39.3	1.00	
	<0.36	295	72.8	110	27.2	0.71 (0.44-1.13)	
Extra-thyroidal extension							0.774
	no	148	69.8	64	30.2	1.00	
	yes	238	70.0	102	30.0	0.93 (0.60-1.45)	
Multifocality							0.141
	no	142	66.7	71	33.3	1.00	
	yes	241	71.7	95	28.3	0.73 (0.48-1.11)	
Stage (UICC 8th)							
	I	160	70.2	68	29.8	0.765	NA
	II	204	68.0	96	32.0		
	III	23	71.9	9	28.1		
	IVA	1	100.0	0	0.0		
	IVB						
Tg (ng/ml)							0.762
	≥58	158	68.1	74	31.9	1.00	
	<58	231	70.4	97	29.6	0.93 (0.61-1.42)	
Chronic thyroiditis							0.746
	no	299	68.9	135	31.1	1.00	
	yes	92	70.2	39	29.8	0.92 (0.58-1.46)	

* χ^2 test. **Multivariable logistic regression analysis.

Abbreviations: NA, not assessed; OR, odds ratio.

Table 4. Patient characteristics and 10-year RFS in 162 patients with PTC taking account immune cell markers

Variables	No. of patients (%)	10-year RFS (%)	Univariable	
			HR(95%CI)	p*
Age (years)				0.344
	<55	58 (36)	86.4	1.00
	≥55	104 (64)	93.0	1.18 (0.84-1.67)
Gender				0.069
	Female	119 (73)	91.5	1.00
	Male	43 (27)	81.0	1.39 (0.98-1.97)
Tumor size (cm)				0.157
	≤4	139 (86)	90.5	1.00
	>4	23 (14)	78.3	2.08 (0.76-5.73)
pN				0.007
	0,1a	100 (63)	93.9	1.00
	1b	58 (37)	79.3	3.54 (1.41-8.88)
Node density (ND)				0.008
	<0.36	125 (80)	91.9	1.00
	≥0.36	32 (20)	74.2	3.32 (1.36-8.09)
Extra-thyroidal extension				0.133
	no	141 (90)	89.2	1.00
	yes	15 (10)	80.0	2.33 (0.77-7.05)
Multifocality				0.199
	no	58 (36)	93.0	1.00
	yes	102 (64)	87.2	2.07 (0.68-6.30)
Stage (UICC 8th)				0.220
	I	73 (45)	91.7	1.00
	II	78 (48)	85.7	1.98 (0.72-5.45)
	III	11 (7)	90.9	3.11 (0.77-12.49)
Tg (ng/ml)				0.025
	<58	80 (49)	94.9	1.00
	≥58	82 (51)	82.9	3.17 (1.15-8.75)
Chronic thyroiditis				0.337
	no	126 (78)	90.4	1.00
	yes	36 (22)	82.9	1.60 (0.61-4.16)
LMR				0.012
	<5	49 (30)	77.1	1.00
	≥5	113 (70)	93.8	0.32 (0.13-0.78)
CD163 positive cell density				0.032
	<0.25	124 (79)	90.3	1.00
	≥0.25	33 (21)	81.2	2.67 (1.08-6.58)
CD33 positive cell density				0.453
	<0.04	16 (10)	87.5	1.00
	≥0.04	138 (90)	88.3	0.62 (0.18-2.14)
CD3 positive cell density				0.445
	<0.07	39 (26)	84.5	1.00
	≥0.07	111 (1)	87.9	0.70 (0.27-1.76)

*Cox's proportional hazard model.

Abbreviations: HR, hazard ratio; ND, node density, ratio between number of metastatic nodes and total number of lymph nodes harvested; WBC, white blood cells; Neut, neutrophil; Eos, eosinophil; Bas, basophil; Mon, monocyte; Lym, lymphocyte; Tg, thyroglobulin; LMR, lymphocyte-to-monocyte ratio;

Table 5. Multivariable prognostic analysis in patients with PTC taking account immune cell markers

Variables	Multivariable		p*
		HR(95%CI)	
CD163 cell density			0.023
	<0.25	1.00	
	≥0.25	3.12 (1.17-8.32)	
LMR			0.005
	<5	3.95 (1.14-7.48)	
	≥5	1.00	
Age (years)			0.048
	<55	1.00	
	≥55	3.05 (1.01-9.23)	
Tumor size (cm)			0.052
	≤4	1.00	
	>4	0.67 (0.21-2.22)	
pN			0.006
	0,1a	1.00	
	1b	4.79 (1.58-14.54)	
ND			0.078
	<0.36	1.00	
	≥0.36	2.42 (0.91-6.44)	
Tg (ng/ml)			0.033
	<58	1.00	
	≥58	3.54 (1.11-11.32)	

Bold indicates prognostic independence of CD163 and LMR as new prognostic predictors.

*Cox's proportional hazard model.