

学位論文要旨

氏名 横田 光央



論文題目

「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」

指導教授承認印

比企直樹



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

氏名 横田 光央

【背景】

甲状腺乳頭がん（PTC）は、甲状腺がんの94%を占める最も一般的なタイプの分化型甲状腺がん（DTC）である。PTCのほとんどの患者は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。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いるが、再発高リスク患者を選択するには未だ不十分であり、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。

腫瘍微小環境は、宿主側の免疫反応を歪め、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、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。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。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。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。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の動員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。

【対象と方法】

2006年4月から2018年3月に当科でPTCと診断され根治手術を施行した579症例を後方視的に解析した。その内、遠隔転移の所見がない、血液検査データや手術検体が揃っている570人の患者を対象とした。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（UICC 8th）を含め、末梢血血液検査は白血球

画分を含む全血球数，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）を評価した。

また，同コホート内における2006年4月から2010年3月までの162例に対し免疫組織化学染色を行った。1次抗体は抗CD33抗体（1:5，clone PWS44，Leica Biosystems），抗CD163抗体（1:500，clone 10D6，Leica Biosystems），抗CD3抗体（1:200，clone F7238，Dako）を用いた。腫瘍内部の代表的な3カ所において，400倍視野での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。

【結果】

(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

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。

(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）に対する最適カットオフ値をROC曲線にて決定した。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（ $p=0.068$ ）。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。

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（ $p<0.001$ ， $p=0.035$ ）。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。

(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（ $p=0.004$ ， $p=0.006$ ）。多変数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。

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

PTC 163 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。CD33, CD3 においては有意差が認められなかった。

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

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。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。

【考察】

本研究では、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。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 TAM との関連を示す最初の報告である。

近年、好中球とリンパ球の比率 (NLR) が、甲状腺がんでも予後不良を予測することが報告された。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。 (*Thyroid, 2019*) 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。

循環血中の単球には、骨髄由来サプレッサー細胞 (MDSC) および腫瘍関連マクロファージ (TAM) が含まれる。TAM は 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。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。PTC においては、これまでに TAM 密度の増加と腫瘍径やリンパ節転移との相関や、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。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。

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。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画分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。

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。