

【13】

氏 名	じゃみやん つえんげるまー Jamiyan Tsengelmaa
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第778号
学位授与の日付	令和3年3月3日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 （病理診断学）
学位論文題目	CD68-and CD163-positive tumor-associated macrophages in triple negative cancer of the breast （トリプルネガティブ乳癌におけるCD68およびCD163陽性腫瘍関連 マクロファージの検討）
論文審査委員	（主査）教授 増 田 道 明 （副査）教授 矢 澤 卓 也 教授 入 澤 篤 志

論 文 内 容 の 要 旨

【Background】

Tumor-associated macrophages (TAMs) consisting of M1- and M2-like macrophages have recently been reported as an important factor in tumor growth and the progression of cancer. M1-like macrophages, characterized by CD68 expression, produce free radicals that can lead to DNA damage with the potential to contribute to tumoricidal activity. In contrast, M2-like macrophages, characterized by both CD68 and CD163 expression, are considered to promote tumor growth and metastasis by releasing chemokines, which are inflammatory growth factors. Previous studies confirmed that TAMs are associated with cancer survival in several organs. In breast cancer, several studies have demonstrated that TAMs are related to hormonal status, stage, lymph node (LN) status, and prognosis. However, little is known about the prognostic significance of localizations and densities of TAMs in triple negative cancer (TNC) of the breast with poor prognosis.

【Purpose】

The aim of this study was to assess the localizations and densities of TAMs of different subtypes in TNC and examine their clinicopathological features.

【Objective and Methods】

The study was based on 107 TNC cases resected at Dokkyo Medical University Hospital and

immunohistochemistry performed by using monoclonal antibodies to the pan-macrophage marker CD68 (CD68, clone PG-M1, Dako [Agilent], 1 : 50) and the M2 macrophage marker CD163 (CD163, clone 10D6, Novocastra [Leica], 1 : 50). The CD68+ and CD163+ macrophages were counted in the tumor stroma (TS) and tumor nest (TN) separately. The definition of TS in this study was the stromal tissue surrounding TN. TAMs in TN were defined as intraepithelial tumor-infiltrating macrophages. For statistical analyses, the numbers of positive cells were divided into lower and higher groups based on the cut-off point corresponding to the median value.

Spearman's Rho and χ^2 tests were used to compare CD68 and CD163 expression, patient attributes and tumor characteristics. Kaplan-Meier analysis and log-rank tests were used to illustrate differences in relapse-free survival (RFS) and overall survival (OS) of the patients according to CD163 and CD68 expression. Cox regression proportional hazards models were used to estimate hazard ratios (HR) for death from breast cancer according to CD68 and CD163 expression in both uni- and multivariate analysis. The present study was approved by the Ethics Committee of Dokkyo Medical University (Tochigi, Japan ; registration number : 28009) and was conducted according to the Declaration of Helsinki.

【Results】

- 1) CD68+ and CD163+ macrophages were detected in both the TS and TN of TNC for all 107 samples.
- 2) A high density of CD68+ TAMs in both TS and TN was significantly associated with larger tumor size ($p=0.036$; $p=0.004$). A high density of CD163+ TAMs in TN was also significantly related to larger tumor size ($p=0.002$), however, not in TS ($p=0.634$).
- 3) Moreover, a high density of CD163+ TAMs in both TS and TN were correlated with higher histological grade ($p<0.001$; $p=0.010$), higher recurrence rate ($p<0.001$; $p=0.004$), and higher breast cancer mortality ($p=0.004$; $p=0.012$).
- 4) Multivariate Cox regression analyses revealed that age of the patients and CD163+ TAMs in both the TS and TN were independent prognostic factors for RFS (HR=0.164, 95% CI 0.048–0.560, $p=0.004$; HR=9.059, 95% CI 1.160–70.76, $p=0.036$; HR=4.476, 95% CI 1.028–22.08, $p=0.046$) and OS (HR=0.095, 95% CI 0.024–0.374, $p=0.001$; HR=10.69, 95% CI 1.313–87.18, $p=0.027$; HR=5.017, 95% CI 1.065–23.64, $p=0.041$).
- 5) No correlation was found between the number of CD68+ cells or the CD163/CD68 ratio either in TS or TN, and clinicopathological features.

【Conclusion】

Our study demonstrated that infiltration of CD163+ TAMs, rather than CD68+, in both TS and TN was associated with poor prognosis in the TNC patients. This suggests that CD163+ TAMs may affect the prognosis of TNC by not only regulating the immune reaction by TAMs in TS, but also because of their direct influence on TN.

論文審査の結果の要旨

【論文概要】

腫瘍関連マクロファージ (tumor-associated macrophage ; TAM) はM1 (CD68陽性、CD163陰性) とM2 (CD68陽性、CD163陽性) に分類され、癌の形成に影響するとされる。一方、エストロゲン受容体 (ER)、プロゲステロン受容体 (PR) およびヒト上皮増殖因子受容体2 (HER2) がいずれも陰性のトリプルネガティブ乳癌は乳癌の4つの亜型の中で最も予後不良であるが、TAMの関わりは明らかになっていない。申請論文では、107例のトリプルネガティブ乳癌切除検体について、CD68とCD163の免疫組織化学染色を行い、腫瘍胞巣 (tumor nest ; TN) と腫瘍間質 (tumor stroma ; TS) におけるTAMの浸潤を定量的に検討し、臨床病理学的特徴や予後との関連を解析した。その結果、1) 全ての症例で、TNとTSのいずれにもTAMが浸潤しており、2) TNやTSにCD68陽性TAMが多い群と、TNにCD163陽性TAMが多い群は、それぞれ腫瘍径の増大を認め、3) TNやTSにCD163陽性TAMが多い群は、組織学的に高異型度で、再発率と死亡率も高く、4) 年齢、TNあるいはTSにおけるCD163陽性TAMの多寡は、無病再発と全生存のそれぞれ独立した予測因子であること等が明らかになった。これらの結果から、TAMはTNとTSのいずれの部位においてもトリプルネガティブ乳癌の形成に影響を及ぼしていることが示唆され、特にCD163陽性TAMは臨床病理学的特徴や予後に関連していると結論づけている。

【研究方法の妥当性】

申請論文の研究は、獨協医科大学倫理審査委員会の承認 (承認番号 : 28009) を得た上で、トリプルネガティブ乳癌の手術標本を用いて行ったものである。トリプルネガティブ乳癌の病理診断はコンセンサスの得られた方法で行われており、CD68とCD163の免疫組織化学も確立されたプロトコールが用いられ、免疫染色結果も国際的に認められた方法で評価されている。統計学的解析も、適切な対象群を設定して客観的に行われている。従って、本研究の方法は妥当であると判断される。

【研究結果の新奇性・独創性】

トリプルネガティブ乳癌の予後が不良であることは以前から知られていたが、TAMとの詳細な関連は明らかではなかった。申請論文では、トリプルネガティブ乳癌におけるTAMの浸潤についてCD68とCD163の免疫組織化学を用いて解析した。数多くの手術標本について病理学的にTNとTSに分けて検討し、TAMの浸潤がトリプルネガティブ乳癌の進展や予後に影響している可能性を初めて明らかにしている。この点において本研究は新奇性・独創性に優れた研究と評価できる。

【結論の妥当性】

多数の症例について、適切な対象群の設定の下、確立された実験手法と統計解析を用いて行われた研究であり、TNとTSにおけるTAMの浸潤の程度とトリプルネガティブ乳癌の臨床病理学的特徴や予後との関係について導き出された結論は、論理的に矛盾するものではなく、病理学、乳腺腫瘍学など関連領域における知見を踏まえても妥当である。

【当該分野における位置付け】

トリプルネガティブ乳癌の形成メカニズムを癌微小環境の観点から解明する一助となる研究であ

る。一方、乳癌のうち最も予後の悪いトリプルネガティブ乳癌を、TAM浸潤の部位と程度とを指標に層別化しようとする新たな試みとしても興味深いものであり、トリプルネガティブ乳癌の適切な治療選択を行うために役立つ有意義な研究と評価できる。

【申請者の研究能力】

申請者は、病理学や乳腺腫瘍学の理論を学び、作業仮説を立てて実験計画を立案し、適切に研究を遂行した上で、貴重な知見を得るに至っている。その成果は当該領域の国際学術誌に掲載されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって、博士(医学)の学位授与に相応しいと判定した。

(主論文公表誌)

Virchows Archiv

(477 : 767-775, 2020)