



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학박사 학위논문

역형성 갑상선암과 전이성 분화 갑상선
암에서 면역세포 프로파일링

Immune profiling of anaplastic thyroid
carcinoma and metastatic differentiated
thyroid carcinoma

울산대학교 대학원
의학과
안종화

역형성 갑상선암과 전이성 분화 갑상선
암에서 면역세포 프로파일링

지도교수 김원구

이 논문을 의학박사학위 논문으로 제출함

2022년 8월

울산대학교대학원
의학과
안종화

안중화의 의학박사학위 논문을 인준함

심사위원 김원배 (인)

심사위원 송영기 (인)

심사위원 김원구 (인)

심사위원 송동은 (인)

심사위원 권혜미 (인)

울 산 대 학 교 대 학 원

2022년 8월

감사의 글

내분비내과를 전공하고자 선생님들께 처음 인사를 드린 것이 5년 전 이 무렵이었던 것 같습니다. R이라는 통계 프로그램을 처음 접하여 간단한 수식을 적는 것에도 몇 시간이 걸리고, 맑은 고딕체로 논문 초안을 적던 때가 떠오릅니다. 학회 경험과 연구 경험이 전무하던 저를 제자로 맞아 다양한 전인적인 가르침을 주신 선생님들께 진심으로 감사드립니다. 그동안 여러 연구들을 진행하면서 초록을 작성하여 학회에서 발표도 해보고, 연제상을 수상하고, 논문들도 완성할 수 있었습니다. 해외 학회에서는 최신 지견을 얻는 경험에 더하여 선생님들과 즐거운 추억도 쌓을 수 있었습니다. 코로나로 인해 여러 학회 활동과 모임이 중단되었을 때에도 그때의 행복한 기억과 값진 추억들을 떠올리며 지낼 수 있었습니다.

항상 제 미래를 응원해주시고, 넘치는 가르침 주신 송영기 선생님, 따뜻하고 세심한 가르침으로 이끌어 주신 김원배 선생님, 새로운 연구 방향을 제시해 주시고 아낌없는 조언을 주신 김태용 선생님, 연구를 포함하여 모든 어려움에 있어 귀중한 말씀 주시고 가족처럼 대해 주신 김원구 선생님, 다방면으로 연구를 가르쳐 주시고 언제나 필요한 조언을 주신 전민지 선생님께 감사드립니다. 연구 분석과 진행, 논문 작성에 있어 다방면으로 도와 주신 송동은 선생님, 논문 심사를 위해 조언과 격려를 주신 권혜미 선생님께 감사드립니다. 내분비내과 의사로서 성장할 수 있도록 많은 가르침 주신 서울아산병원 내분비내과 이기업, 박중열, 김민선, 고정민, 이우제, 고은희, 이승훈, 정창희, 김범준, 민세희 선생님께도 감사드립니다.

제 옆에 항상 함께 든든히 자리를 지켜주는 남편과 소중한 보물과도 같은 아들 준서에게도 감사의 마음을 전합니다.

2022년 6월

안 종 화

국 문 요 약

배경: 면역세포 프로파일링은 종양 내 미세환경을 반영하여 암의 진행을 예측하거나 치료의 표적을 선정하는데 중요하지만, 갑상선암에서 이에 대한 연구는 부족한 실정이다. 이에 갑상선암 중 치료가 어렵고, 치명률이 높은 역형성 갑상선암과 전이성 분화갑상선암(전이성 분화암)에서 림프구 대 단핵구 비율(LMR)과 형광 다중 면역조직화학 염색법(F-MIHC) 및 다중 분광 영상 시스템(MSI)을 이용하여 면역세포 프로파일링을 실시하였다.

연구방법: 1994년에서 2020년까지 서울아산병원에서 수술 혹은 조직검사를 시행한 18세 이상의 역형성 갑상선암과 전이성 분화암 환자를 대상으로 하였다. LMR 분석은 기저 전혈구계산이 가능한 역형성 갑상선암 환자 및 소라페닙 치료를 받는 방사성 요오드 치료에 반응하지 않는 진행성 분화암 환자들을 대상으로 하였으며, receiver operating characteristic 곡선 분석을 통해 LMR 4를 기준으로 낮은 LMR군과 높은 LMR군을 분류하였다. 조직의 면역세포 프로파일링은 조직 슬라이드의 검토를 통해 추가적인 조직 블록 제작하고, 분석이 가능한 환자들을 대상으로 F-MIHC와 MSI를 이용하여 진행되었다. F-MIHC가 한번에 최대 6가지의 항원을 검출할 수 있어, 1차는 프로그램된 세포사멸 리간드(PD-L1)를 포함하는 T 림프구를 중점으로 분석하였고, 2차는 T 림프구 및 대식세포 및 이와 관련한 세포들을 중점으로 분석하였다. PD-L1에 대한 지표로 tumor proportion score(TPS)와 combined positive score(CPS)를 이용하였고, PD-L1 양성과 강양성의 기준은 각각 1이상과 50이상, 1이상과 20 이상으로 정의하였다.

결과: 말초 혈액에서 역형성 갑상선암 환자 총 35명의 LMR을 분석한 결과, 낮은 LMR군에서 전체생존율의 중앙값이 3개월로 높은 LMR 군의 9.5개월에 비해 유의하게 낮았으며($p=0.004$), 전체사망률에 대한 단변량 분석에서 hazard ratio(HR) 3.04(95 % confidence interval (CI) 1.37-6.77,

$p=0.007$), 다변량 분석에서 HR 2.55(95% CI 1.08-6.00, $p=0.032$) 로 모두 유의하였다. 소라페닙 치료를 받는 방사성 요오드 치료에 반응하지 않는 진행성 분화암 환자 40명을 대상으로 한 분석에서도 낮은 LMR이 전체생존율 및 질병 무진행 생존에 유의한 감소 ($p=0.015$, $p=0.019$)를 보였으며, 전체사망률 및 질병의 진행에 대한 다변량 분석에서도 HR 2.64 (95% CI 1.04-6.72, $p=0.041$), 2.69 (95% CI 1.02-7.04, $p=0.045$) 로 모두 유의한 예후 인자로 확인되었다.

총 28명의 환자(역형성 갑상선암 16명, 전이성 분화암 12명)를 대상으로 한 PD-L1을 포함하는 1차 면역세포 프로파일링에서 PD-L1을 발현하는 종양세포를 비롯하여, 단위면적당(mm^2) 총 T 림프구, 세포독성 T 림프구, 조절 T 림프구 세포 수가 모두 역형성 갑상선암에서 전이성 분화암에 비해 유의하게 높았다(모든 $p<0.001$). 각각의 림프구에서 PD-1과 PD-L1의 발현을 세분화하여 비교하였을 때에도 역형성 갑상선암에서 그 수가 유의하게 높았다(모든 $p<0.001$). TPS, CPS에서 양성인 경우는 역형성 갑상선암에서 81%, 94%로 모두 음성으로 확인된 전이성 분화암과 큰 차이를 보였다. 총 19명의 환자(역형성 갑상선암 12명, 전이성 분화암 7명)를 대상으로 한 2차 면역세포 프로파일링에서도 총 T 림프구($p=0.006$), 자연살해세포($p=0.038$), 대식세포($p<0.001$), 골수유래 억제세포($p=0.003$), 수지상세포($p=0.002$) 모두 역형성 갑상선암에서 그 수가 유의하게 증가된 것이 확인되었다. 2차 분석에서 남녀 성별 및 말초 LMR에 따른 면역세포 프로파일을 분석하였는데, 여성에서 수지상세포의 수가 유의하게 높았으며($p=0.044$), 낮은 LMR 군에서 대식세포의 수가 유의하게 증가되어 있음이 확인되었다($p=0.012$).

결론: 말초혈액에서의 LMR 값은 역형성 갑상선암과 전이성 분화암에서 예후인자로 고려될 수 있다. 암조직에서 F-MIHC와 MSI를 이용한 면역 프로파일링을 통해 PD-L1의 발현 및 림프구 및 대식세포를 포함하는 면역세포들의 침윤이 역형성암에서 유의하게 높음을 확인하였고, 이를 통해 역형성암에서 암 면역을 표적으로 한 치료가 좀 더 효과적일 수 있음을

예측할 수 있다. 추가적인 면역 프로파일링을 통해 진행성 갑상선암의 새로운 치료 표적을 찾는 것이 필요하겠다.

중심단어: 역형성 갑상선암, 전이성 분화갑상선암, 림프구 대 단핵구 비율, 면역세포 프로파일링

차 례

감사의 글	i
국문요약	ii
차례	v
표목록	vii
그림목록	viii
서론	1
1. 갑상선암의 종류와 예후	1
2. 종양의 면역세포 프로파일링과 갑상선	3
3. 림프구 대 단핵구 비율	6
4. 형광 다중 면역조직화학 염색법과 다중 분광 영상 시스템 ...	9
5. 연구목적	9
연구대상 및 연구 방법	10
1. 연구대상	10
2. 연구방법	12
1) 림프구 대 단핵구 비율	12
2) 형광 다중 면역조직화학 염색법과 다중 분광 영상 시스템 분 석	15
3) 각 세포 및 용어의 정의	22
4) 유전자 변이에 따른 추가 분석	24
5) 통계학적 분석	25
결과	26

1. 림프구 대 단핵구 비율의 분석	26
1) 역형성 갑상선암	26
2) 소라페닙을 투약하는 방사성 요오드 치료에 반응하지 않는 진행성 분화암	32
2. 암조직에서 면역세포 프로파일링	41
1) 1차 분석	41
2) 2차 분석	49
고찰	58
결론	64
참고문헌	66
영문요약	75

표 목 록

표1. Fluorescent multiplex immunohistochemistry panel	17
표2. Definition of cells based on expression of cell surface molecules	23
표3. Baseline characteristics of patients with ATC	27
표4. Clinicopathological parameters based on LMR	29
표5. Cox proportional hazards model of all-cause mortality in patients with ATC	31
표6. Baseline characteristics of patients treated with sorafenib for progressive RAI-refractory DTC	33
표7. Clinicopathological parameters according to LMR	36
표8. Treatment efficacy in patients treated with sorafenib for progressive RAI-refractory DTC based on LMR	38
표9. Cox proportional hazards model of all-cause mortality in patients with RAI-refractory DTC	39
표10. Cox proportional hazards model of progression-free survival in patients with RAI-refractory DTC	40
표11. Baseline characteristics of patients with DTC and ATC (first analysis)	42
표12. Baseline characteristics of patients with DTC and ATC (second analysis)	50

그림 목록

그림1. Lymphocyte-to-monocyte ratio and anti-tumor immunity ...	8
그림2. 림프구 대 단핵구 비율의 cut-off 설정을 위한 ROC 분석 곡선	14
그림3. Representative multispectral image and expression of cell surface markers (first analysis)	19
그림4. Representative multispectral image and expression of cell surface markers (second analysis)	20
그림5. Representative images of PD-L1 expression assessed by conventional PD-L1 and fluorescence immunohistochemical staining	21
그림6. Overall survival (OS) according to the lymphocyte-to- monocyte ratio (LMR) in anaplastic thyroid carcinoma patients .	30
그림7. Prognosis based on lymphocyte-to-monocyte ratio (LMR) in patients with progressive radioiodine-refractory differentiated thyroid carcinoma treated with sorafenib	37
그림8. Comparison of numbers of tumor cells expressing PD-L1 based on pathological subtype	44
그림9. Comparison of numbers of total lymphocytes (A) and lymphocyte subtypes (B, C) between DTC and ATC	45
그림10. Differences in TPS and CPS according to pathological subtype	46
그림11. Comparison of numbers of tumor cells expressing PD-L1 based on genetic characteristics (A) and differences in TPS and CPS according to TERT promoter mutation (B)	48
그림12. Comparison of numbers of tumor cells and all negative cells based on pathological subtype	52

그림13. Comparison of numbers of T lymphocytes (A), natural killer cells (B), macrophages (C), Myeloid-derived suppressor cells (D) and dendritic cells (E) between DTC and ATC	53
그림14. Comparison of numbers of Tumor cells (A), T lymphocytes (B), natural killer cells (C), macrophages (D), Myeloid-derived suppressor cells (E) and dendritic cells (F) according to sex .	55
그림15. Comparison of numbers of T lymphocytes (A), macrophages (B) according to LMR.	57

서론

1. 갑상선암의 종류와 예후

갑상선암에는 약 85-90%이상으로 가장 많은 부분을 차지하는 유두암이 대표적이거나, 이외에도 여포암, 저분화암, 수질암, 역형성암 등이 존재한다. 유두암, 여포암, 저분화암은 분화 갑상선암에 속하며, 수질암과 역형성암은 별도로 구분된다¹⁾. 일반적으로 분화 갑상선암의 예후는 10년 생존율 90% 이상으로 매우 좋은 것으로 알려져 있으며, 병기가 동일할 경우, 유두암과 여포암의 예후는 유사하다²⁾. 그러나, 진행성 갑상선암에 속하는 원격전이를 동반한 분화 갑상선암(전이성 분화암)과 역형성 갑상선암의 경우에는 불량한 생존율과 낮은 치료 성적을 보인다³⁻⁶⁾. 특히, 역형성 갑상선 암은 전체 갑상선암의 약 2%정도의 해당되지만, 평균 생존기간이 5개월 이내이며, 1년 생존율이 20% 이하에 해당되는 치명적인 경과를 보인다^{3, 7)}.

(1) 전이성 분화암과 치료의 한계점

분화 갑상선암의 85% 이상은 수술 후 방사성 요오드 치료와 갑상선 자극 호르몬 억제치료를 통해 성공적으로 치료되며, 갑상선 이외 장기에 원격 전이를 동반하고 있더라도 방사성 요오드 치료에 반응하는 경우 비교적 양호한 예후를 보인다⁸⁾. 그러나, 약 5-10%정도는 방사성 요오드 치료에 반응하지 않는 암으로 진행하게 되고 이러한 경우에는 10년 생존율 10% 미만으로 예후가 불량하다^{9, 10)}. 방사성 요오드 치료에 반응하지 않는 전이성 분화암의 경우, 소라페닙과 레마티닙 등의 타이로신 키나아제 억제제들이 치료제로 사용된다^{11, 12)}. 소라페닙은 갑상선암의 성장에 중요한 역할을 하는 vascular endothelial growth factor (VEGF), RET, RAF, platelet derived growth factor beta를 표적으로 하는 멀티키나아제 억제제로, 이전 연구에서 유의한 질병무진행 생존기간의 연장을 보였다¹¹⁾. 그러나, 소라페닙을 포함한 멀티키나아제 억제제 들이 질병무진행

생존기간을 다소 연장시키긴 하였지만, 여전히 장기간의 치료 반응 유지 및 생존율 향상에는 한계를 가지고 있어 추가적인 치료제에 대한 연구가 필요한 실정이다¹¹⁻¹³⁾.

(2) 역형성 갑상선암과 치료적 한계점

역형성 갑상선암은 갑상선암 중 가장 불량한 예후를 보이는 암으로 수술 및 항암 방사선 동시치료, 고식적 항암치료 등 모든 가능한 치료를 동원해도 1년 생존율 20% 정도로 불량한 예후를 보인다¹⁴⁾. 성별, 나이, 종양의 크기, 수술의 범위, 원격전이 여부 등이 예후에 영향을 미치는 것으로 보고되며, 일반적으로 진단 시 식도 및 기도를 침범하여 제거가 어렵거나, 환자가 고령이면서 원격전이를 동반하고 있는 경우가 흔하다. 진단 시부터 다학제팀을 이루어 진료하는 것이 권고되고 있으며, 과거에는 수술 전, 후 방사선 치료 혹은 독소루비신을 포함하는 항암 방사선 동시치료 등을 시행했으나, 최근에는 렌바티닙과 같은 멀티키나아제 억제제, *BRAF*^{V600E}의 변이가 있는 경우 BRAF 억제제인 다브라페닙과 MEK 억제제인 트라메티닙의 복합 요법이나 펌브롤리주맵과 같은 면역항암제 등이 시도되고 있지만, 여전히 치료 반응이 낮고 생존율이 낮은 상태로 지속적인 치료제 개발이 필요한 상황이다¹⁴⁻¹⁸⁾.

2. 종양의 면역세포 프로파일링과 갑상선

숙주의 면역 반응은 종양의 진행과 억제에 중요한 역할을 한다는 것은 이미 많은 암종에서 확인되었다^{13, 19, 20}. 정상적인 면역세포는 암세포를 공격하여 증식하지 못하게 하는데, 암세포는 면역세포와의 상호작용을 통해 면역억제를 유발하는 면역관문을 활성화함으로써 면역 세포의 공격을 피해 증식한다²⁰⁻²². 따라서, 이러한 면역관문을 억제하는 여러가지 면역항암 치료제들이 개발되고, 이 중 하나가 면역관문 중 하나인 programmed cell death-1 (PD-1)에 대한 ligand인 PD ligand 1 (PD-L1)을 억제하는 약제로 다양한 고형암에서 우수한 항종양효과가 입증되어, 현재는 폐암, 간암, 대장암, 췌장암, 신장암 등 많은 주요 암종에서 주목받는 치료로 자리 잡았다^{20, 23-27}.

(1)PD-1/PD-L1 억제제의 치료 효과를 예측하는 바이오마커와 면역프로파일링

면역항암제의 원리가 암세포에 의해 비정상적으로 종료된 정상적인 면역기능을 회복시키는 것이기 때문에, 종양세포 내의 면역세포 혹은 면역관문의 발현에 대한 프로파일이 중요하다²⁸. 현재 다양한 고형암의 면역항암치료로 사용되는 PD-1/PD-L1 억제제의 경우, 종양 내의 PD-1/PD-L1의 발현 정도가 치료 효과를 예측하는데 중요한 것으로 밝혀져 있으며, tumor proportion score(TPS)와 combined positive score(CPS)가 PD-1/PD-L1의 발현 정도를 수치화하는데 대표적으로 이용된다^{24, 29}. TPS는 전체 종양 세포에서 PD-L1이 양성인 종양세포의 백분율이며, CPS는 전체 종양세포에서 PD-L1이 양성인 모든 세포의 백분율로 여러 고형암에서 두 수치 모두 1 이상일 경우 면역항암제에 효과가 있는 것으로 보고되나, 그 이상의 수치에서의 항암제에 대한 반응 차이는 일부 암에서만 예후와의 연관성이 보고되고 있다^{24, 25}. 이처럼, 면역항암제의 대상을 선정하고 치료 반응을 예측하는데 종양세포의 면역프로파일링이 점점 더 요구되고 있다.

(2) 진행성 갑상선암에서의 면역항암치료

갑상선은 높은 면역성을 나타내는 기관으로 면역학적 특성이 갑상선 암의 진행과 관계된다는 것이 알려져 있다¹³⁾. 이전 연구에서 림프구성 갑상선염이 갑상선 유두암의 좋은 예후와 관계된다고 보고되었고³⁰⁾, 역형성 갑상선암에서 종양 연관 대식세포의 침윤의 증가가 불량한 예후와 관계된다는 연구도 보고되었다^{31, 32)}. 이처럼, 갑상선암에서 면역계의 역할이 중요할 것으로 생각되면서 최근에는 갑상선 암에서도 면역항암의 일종인 PD-1/PD-L1 치료제를 투약하는 연구들이 진행되고 있고, 단일약제 뿐만 아니라 다른 항암제와의 병용에 대해서도 소규모 임상 보고들이 있다^{16, 33-35)}. 이렇듯 다양한 암에서 효과를 보이는 면역 항암제를 갑상선 암에서도 시도해보려는 노력이 있으나, 현재까지 갑상선암에서 면역세포의 특성에 대한 체계적인 연구가 진행되지 않아 이를 뒷받침할 만한 근거가 부족하였다.

(3) 갑상선암에서의 면역세포 및 면역 프로파일링의 필요성

면역항암제의 치료 반응을 예측하고, 면역항암제의 대상이 되는지 확인하기 위해 종양의 면역프로파일 확인은 중요하기 때문에, 이미 다른 고형암에서는 이에 대한 연구가 이루어지고 있다^{28, 36, 37)}. 그러나, 종양마다 면역항암제의 반응에 대한 기준이 다르고 획일화된 명확한 기준은 없다. 따라서, 갑상선암에서도 면역프로파일을 통해 갑상선암에 대한 특성을 확인하고 치료제의 선택과 반응을 예측할 수 있는 기준이 필요하다⁸⁾. 갑상선암에서 연구된 면역세포 중 대표적인 것은 종양 연관 대식세포로 역형성 갑상선암에서 특히 증가되어 있으며, 역형성 갑상선암 뿐만 아니라 분화 갑상선암에서도 불량한 예후와 관계가 있다^{31, 38, 39)}. T 림프구의 증가는 일반적으로 항종양 효과를 나타내나 갑상선암에서는 좋은 예후와 불량한 예후 모두 보고되어 있다^{40, 41)}. 종양 내 수지상 세포는 미성숙한 표현형을 나타내며 T 림프구를 완전히 활성화하지 못하는데 갑

상선에서는 드물지만 유두암에서 증가된 것이 보고되었다⁴²⁾. 골수유래 억제세포는 종양을 촉진하는 역할을 하며, 역형성 갑상선암에서 증가된 것이 보고되었다⁴³⁾. 자연살해세포는 두가지 표현형으로 구분되는데 CD56이 약하고 CD16이 강양성인 경우 세포독성 활성화를 통해 항종양 효과를 보이나, CD56이 강하고 CD16이 약한 경우에는 인터류킨-13을 분비하여 면역억제 작용을 한다. 진행성 갑상선 암에서 자연살해세포의 침투 및 PD-1의 발현이 높은 CD56 양성인 자연살해세포의 증가가 확인되었다⁴⁴⁾. 이처럼, 갑상선암에서의 면역세포에 대한 연구들이 일부 보고되어 있지만, 아직까지 갑상선암에서의 면역 프로파일 연구는 부족한 실정이다. 따라서, 갑상선암의 면역 프로파일을 확인하는 시도는 새로운 분자학적 치료 목표를 발굴하거나 면역 항암치료의 효과를 예측하는 데 중요한 것으로 생각된다.

3. 림프구 대 단핵구 비율

말초 혈액의 림프구와 단핵구의 비율(LMR)과 예후와의 연관성은 2012년 호치킨 림프종에서 처음 보고되었는데, Porrata 등은 476명의 호치킨 림프종에서 환자에서 LMR을 1.1을 기준으로 하였을 때, 낮은 LMR이 불량한 전체생존율과 질병무진행생존율과 유의한 연관이 있으며, LMR이 예후에 독립적인 인자임을 보여주었다⁴⁵⁾. 그 이후 폐암, 대장암, 췌장암 등 다양한 고형암에서도 말초 전혈구계산을 이용한 LMR을 바탕으로 낮은 LMR과의 불량한 전체생존율 및 질병무진행생존율과의 연관성을 보고하면서, LMR이 독립적인 예후 인자로 고려될 수 있음을 보여주었다⁴⁶⁻⁵⁰⁾. 이러한 기존 연구들에서 LMR은 숙주의 면역계를 나타내는 바이오마커로 고려된다. 정확한 기전은 아직 밝혀지지 않았지만, 말초 혈액의 림프구가 체액성, 세포성 면역반응을 통한 항종양효과를 나타내는 종양 내 림프구 (tumor-infiltrating lymphocyte, TIL)를 간접적으로 반영하는 것으로 추측되며, 반면, 단핵구는 성장인자 및 사이토카인들을 생산하여 혈관생성 및 항염증 효과를 통해 종양 성장을 촉진하는 종양 연관 대식세포 (tumor associated macrophage, TAM)을 반영하는 것으로 추측된다^{38, 49, 51-53)}. 해당 개념을 간략하게 수식화하면 다음과 같다.

$$LMR = \frac{\text{Lymphocytes in peripheral blood}}{\text{Monocytes in peripheral blood}}$$

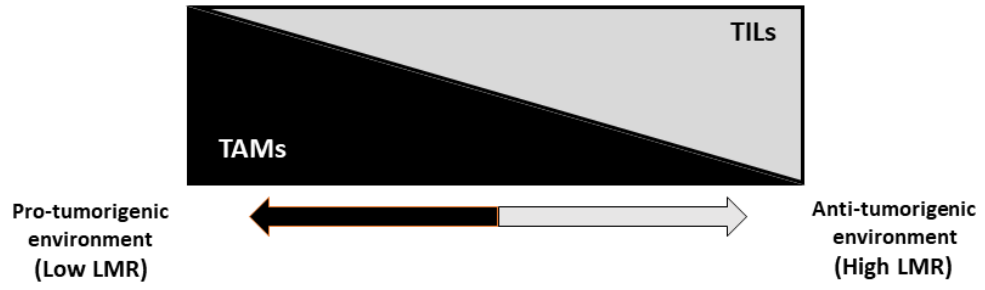
$$\approx \frac{\text{Tumor infiltrating lymphocytes (TILs): Antitumor effect}}{\text{Tumor-associated macrophages (TAMs): Accelerate tumor progression}}$$

이 수치와 종양 면역성의 상관관계를 그림1로 도식화하였다. 즉, LMR이 낮다는 것은 종양 성장이 촉진되는 환경을 의미하고, 반대로 높은 LMR은 종양 성장이 억제되는 환경을 의미한다.

이전 연구에서 갑상선 암 중 가장 예후가 불량한 역형성 갑상선암의 병

리조직을 분석하였을 때, 높은 종양 연관 대식세포의 침윤을 확인할 수 있었다^{31, 32)}. 또한, 분화 갑상선암 중 저분화암의 경우에도 대식세포 침윤이 높을 수록 피막 침범이 잦고, 생존율이 감소한다는 연구 결과가 있다⁵⁴⁾. 따라서, LMR이 갑상선암의 종양 내 미세환경을 간접적으로 예측하는데 도움이 될 수 있으며, 예후와 연관성이 있을 수 있기에 본 연구는 면역세포 프로파일링에 포함하여 LMR 분석을 진행하였다.

그림 1. Lymphocyte-to-monocyte ratio and anti-tumor immunity



4. 형광 다중 면역조직화학 염색법과 다중 분광 영상 시스템

형광 다중 면역조직화학 염색법(Fluorescent Multiplex Immunohistochemistry, F-MIHC)은 각기 다른 형광 표지자 항체를 이용하여 한 조직을 한 번에 여러 개의 표지자를 염색할 수 있게 해주는 방법이며, 다중 분광 영상 시스템(Multispectral Imaging, MSI)은 이러한 F-MIHC 조직을 서로 융합되지 않게 각각의 세포들로 분석할 수 있는 이미지로 만들어 관독할 수 있게 해주는 방법이다^{55, 56}). 형광 표지자 항체로 염색된 조직은 conventional IHC로 염색된 조직과의 비교를 통해 각각의 지표마다 cut-off 값을 설정하여 양성과 음성을 구분하게 된다. F-MIHC는 한 번에 최대 6가지의 세포 표면 단백질을 선택하여 분석할 수 있으며, 이러한 방법을 통해 적은 조직에서도 다양한 표지자를 동시에 확인할 수 있게 되어 암세포의 면역 프로파일을 분석하는 데 유용하다.

그러나, 현재까지 갑상선암에서 F-MIHC와 MSI를 이용한 면역 프로파일링은 시도된 적이 없다. 따라서, 본 연구에서는 F-MIHC와 MSI를 이용하여 갑상선암의 면역세포 프로파일링을 시행하였다.

5. 연구목적

말초 혈액 내 LMR 분석 및 F-MIHC와 MSI를 이용한 면역 프로파일링을 통해 치료 예후가 불량한 역형성 갑상선암과 전이성 분화암의 종양 내 미세환경을 확인한다.

연구대상 및 연구방법

1. 연구 대상

1994년부터 2020년까지 서울아산병원에서 갑상선 수술 혹은 조직검사를 시행한 18세 이상의 역형성 갑상성암 및 전이성 분화암 환자들을 대상으로 하였다. 연구는 말초 혈액에서의 LMR 분석과 조직을 이용한 면역세포 프로파일링으로 진행되었다. 본 연구는 서울아산병원 기관심사위원회의 승인을 받았다.

LMR 분석은 기저 전혈구계산(Complete blood cell count, CBC)이 있는 역형성암 환자와 소라페닙(Sorafenib) 치료를 받는 방사성 요오드 치료에 반응하지 않는 진행성 분화암 환자들을 나누어 분석하였다. 따라서, 전혈구계산이 없는 환자들은 제외되었고, 소라페닙 치료군의 경우에는 질병 무진행 기간(Progression free survival, PFS)을 확인하기 위해 영상 검사에서 적어도 한 가지이상의 측정 가능한 병변이 있는 환자들만 포함하였다.

조직을 이용한 면역세포 프로파일 분석은 조직검사 혹은 수술조직이 남아있는 환자들을 대상으로 하였고, 갑상선암 조직 혹은 갑상선 수술 부위에서의 재발 조직만을 포함하였고, 원격 전이 부위의 조직은 분석 대상에 포함하지 않았다. 경험이 많은 내분비 병리의사의 조직 슬라이드 검토를 통해 추가적인 조직 블록 제작 및 분석이 가능한 환자들을 분류하여 분석하였다. 면역세포 프로파일 분석은 두 차례로 진행되었는데, 1차 분석은 PD-1/PD-L1이 전체 조직에서 차지하는 비율이 이전 연구에서 면역항암제의 반응을 예측하는 바이오마커로 이용되고 있기 때문에 이와 관련하여 T 림프구를 중점으로 하여 PD-L1 양성 세포를 함께 확인하는 것으로 진행되었다. 2차 분석은 1차 분석에서 추가적으로 분석이 가능한

역형성 갑상선암 환자에 새롭게 조직이 이용가능한 역형성 갑상선암 환자를 추가하였고, 대조군인 전이성 분화암 환자들은 추가적인 조직 염색에 제한이 있어 1차와는 다르게 구성되었다. 2차 분석에서는 종양 면역환경을 반영하는 다른 면역세포들을 추가하였는데, 갑상선암에서 증가된 것으로 알려진 대식세포를 추가하였고, 분화 갑상선암과 구별되어 역형성 갑상선암에서 감소된 것으로 보고된 수지상세포⁴²⁾, 암세포 억제에 및 종양면역에서 중요하게 여겨지는 자연살해세포 및 종양성장을 촉진하는 것으로 보고되는 골수유래 억제세포를 중심으로 분석하였다¹⁰⁾. 또한, 2차 면역프로파일 분석 환자들을 대상으로 수술 혹은 조직검사 이전 가장 가까운 안정 시점의 전혈구계산에서 확인된 림프구 및 단핵구 수치를 계산하여 추가적인 분석에 이용하였다.

2. 연구 방법

1) 림프구 대 단핵구 비율

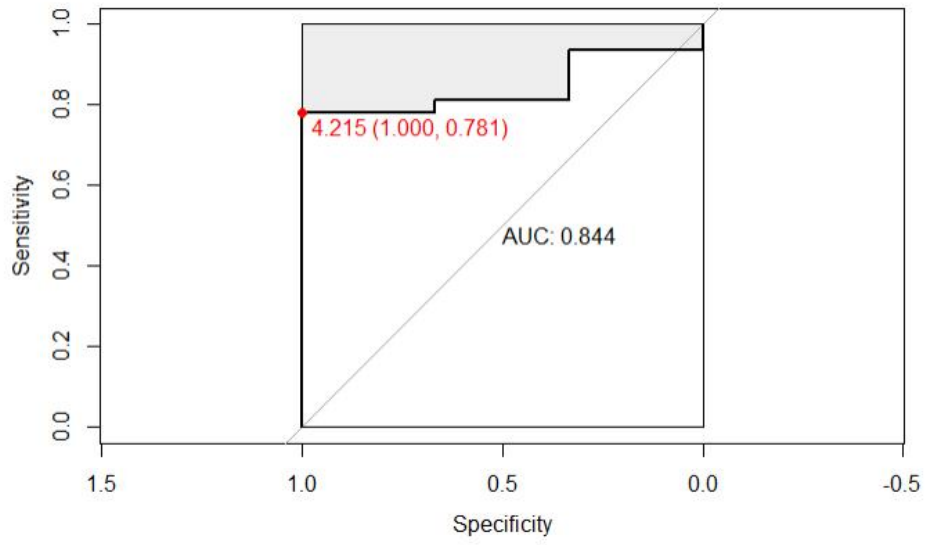
역형성 갑상선암 환자들의 경우 수술 및 조직검사 전, 후로 전혈구계산에 영향을 줄 수 있는 감염 등 상황을 배제하고, 안정화된 상태에서의 전혈구계산을 이용하였다. 전혈구계산에서 확인된 림프구 비율과 단핵구 비율을 근거로 하여 각 림프구 및 단핵구 수치를 계산하여 분석하였다. LMR의 cut-off를 설정하기 위해 그림2와 같이 receiver operating characteristic (ROC) 곡선 분석을 이용하였고, 그 결과 4가 기준 값으로 설정되었다. 일차 결과(primary outcome)는 환자들의 전체 생존율(overall survival)로 설정하였는데, 이는 진단 시점부터 모든 원인에 의한 사망 시점까지의 기간으로 정의하였다.

소라페닙 치료를 받는 방사성 요오드 치료에 반응하지 않는 진행성 분화암 환자들의 경우, 치료 시작일 이전 검사들 중 가장 근접한 일자에 안정화된 상태의 전혈구계산을 이용하였고, 림프구 비율 및 단핵구 비율을 근거로 하여 혈액에서의 림프구 및 단핵구 수치를 계산하여 분석하였다. LMR의 cut-off는 역형성 갑상선암에서 확인된 4를 기준으로 분석하였다. 일차 결과는 환자들의 전체 생존율과 질병 무진행생존으로 설정하였다. 전체 생존율은 소라페닙 치료의 시작일부터 모든 원인에 의한 사망 시점까지의 기간으로 정의하였고, 질병 무진행생존은 소라페닙 치료 시작일부터 질병의 진행이 확인된 시점까지의 기간으로 하였다. 질병의 치료 반응에 대한 정의는 Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) criteria v 1.1을 이용하였다⁵⁷⁾. 질병 반응율은 6개월 이상의 기간 동안 완전관해, 부분관해 또는 불변인 경우로 정의하였고, 질병 조절 기간은 완전관해, 부분관해 또는 불변인 기간으로 정의하였다. 치료 반응 평가에는 computed tomography 또는 magnetic resonance imaging이 이용되었다.

두 분석에서 갑상선암의 병기는 American Joint Committee의 암에 대한

tumor node metastasis (TNM) staging system을 기반으로 하였다⁵⁸⁾.

그림2. 림프구 대 단핵구 비율의 cut-off 설정을 위한 ROC 분석 곡선



2) 형광 다중 면역조직화학 염색법과 다중 분광 영상 시스템 분석

F-MIHC의 진행을 다음과 같이 시행되었다. 분석 가능한 종양 조직을 4 μ m 두께의 절편으로 만들어, F-MIHC를 위한 양전하 슬라이드로 전환하였다. F-MIHC는 Leica Bond Rx™ Automated Stainer (Leica Biosystems, Nussloch GmbH, Nussloch, Germany)을 이용하였다. 각 절편을 60° C에서 40분 동안 굽고, Leica Bond Dewax 용액(Cat #AR9222, Leica Biosystems)을 사용하여 탈파라핀화한 다음 Bond Epitope Retrieval 2(Cat #AR9640, Leica Biosystems)를 사용하여 30분 동안 항원을 retrieval했다. 그 다음, 절편에 순차적으로 일차와 이차항체를 붙인 뒤, tyramide signal amplification (TSA)의 공유결합을 통해 신호를 증폭시켰다. 이 반응에 이어 20분 동안 Bond Epitope Retrieval 1(Cat # AR9961, Leica Biosystems)을 사용하여 추가적인 항원 retrieval을 수행하여 1차 및 2차 항체를 제거했다. 각 절편을 6회 연속 염색한 다음 Spectral DAPI로 대조 염색하고 HIGHDEF® IHC fluoromount(Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY, USA)을 이용하여 봉입했다.

F-MIHC는 한 번에 7가지의 염색이 가능한데, 세포의 구별을 위한 핵염색인 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)가 필수적이기 때문에 이를 제외하면 한 번에 총 6가지의 세포 표면 단백질을 분석할 수 있다. 1차 패널에서는 CD4, CD8, PD-1, PD-L1, Foxp3, CK를 분석에 포함하였으며, 해당 염색에 대한 방법은 다음과 같다. 각 절편을 Opal Polaris 480 및 780 reagent Kit과 Opal 7-color Automation IHC Kit(AKOYA Biosciences, Marlborough, MA, USA)를 사용하여 염색하여, 관심 단백질의 발현을 다음과 같이 평가했다: cytokeratin (CK; diluted 1:300; Novus Biologicals LLC., Centennial, CO, USA), Opal 780 TSA Plus (diluted 1:25); Foxp3 (diluted 1:100; Abcam Plc., Cambridge, UK), Opal 690 TSA Plus (diluted 1:150); PD-L1 (diluted 1:300; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), Opal 620 TSA Plus (diluted 1:150);

PD-1 (diluted 1:500, Abcam), Opal 570 TSA Plus (diluted 1:150); CD8 (diluted 1:300; Bio-Rad AbD Serotec Ltd., Kidlington, UK), Opal 520 TSA Plus (diluted 1:150); CD4 (1:200, Abcam), Opal 480 TSA Plus (diluted 1:300). 다음 표1에 패널 정보를 정리하여 기술하였다. CK는 1차 분석과 동일하게 시행되었으며, CD3, CD11c, CD33, CD56, CD68을 1차 분석과 같이 각각의 TSA를 이용하여 염색하였다.

Table 1. Fluorescent multiplex immunohistochemistry panel.

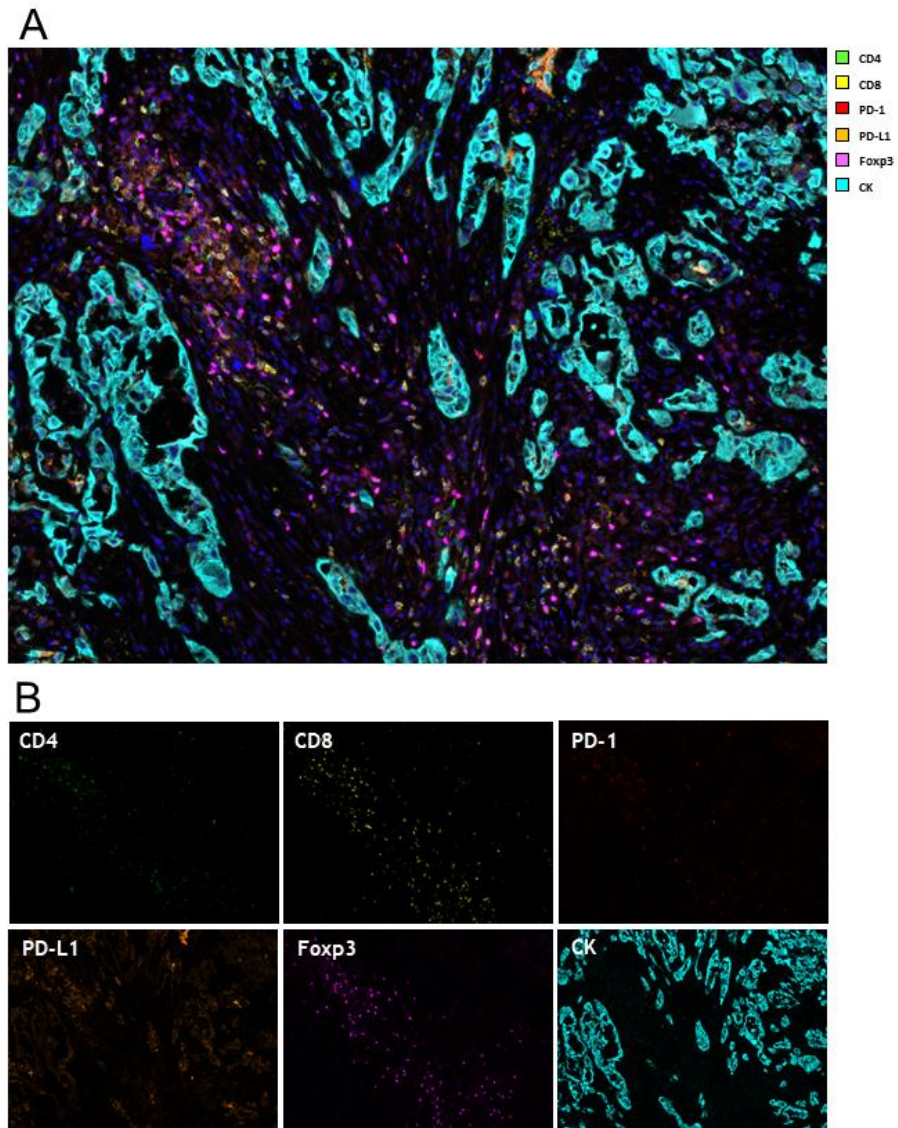
Antibody	Clone (Supplier)	Ab Titration	TSA	Titration
CD4	EPR6855 (Abcam)	1:200	Opal480	1:300
CD8	4B11 (AbD Serotec)	1:300	Opal520	1:150
PD-1	EPR4877 (Abcam)	1:500	Opal570	1:150
PD-L1	E1L3N [®] (CST)	1:300	Opal620	1:150
Foxp3	236A/E7 (Abcam)	1:100	Opal690	1:150
CK	AE-1/AE-3 (Novus)	1:300	Opal780	1:25
CD3	2GV6 (Ventana)	1:5	Opal480	1:150
CD11c	EP1347Y (Abcam)	1:500	Opal520	1:150
CD56	EP2567Y (Abcam)	1:500	Opal570	1:150
CD68	SP251 (Abcam)	1:300	Opal620	1:150
CD33	SP266 (Abcam)	1:100	Opal690	1:150

Abbreviations: Ab, antibody; CD, cluster of differentiation; CK; cytokeratin; Foxp3, forkhead box P3; PD-1, programmed cell death protein 1; PD-L1, programmed cell death-ligand 1; TSA, tyramide signal amplification.

F-MIHC 후, MSI의 분석은 다음과 같이 진행되었다. 이미지는 Vectra® Polaris Quantitative Pathology Imaging System (Akoya Biosciences, Marlborough, MA)를 이용하여 스캔하였으며, inForm 2.4.4 image analysis software (Akoya Biosciences, Marlborough, MA)와 Spotfire™ software (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA)을 사용하여 분석하였다. 각각의 표지자 마다 평균 5~10개의 관심영역(region of interest, ROI)에 대한 지정 및 분석은 경험이 많은 내분비 병리 전문의의 병리조직 검토를 통해 이루어졌으며, 세포의 구분은 nuclear DAPI 염색 패턴과 각 세포의 형태학적 특징을 기반으로 하였다. 종양 세포의 경우, CK와 PD-L1 양성은 핵 주위의 불규칙한 mesh 모양과 CK와 PD-L1에 대한 핵 주위 영역의 DAPI로 구분되는 세포질/막 영역을 기반으로 결정되었다. Foxp3에 대한 핵 양성 발현은 DAPI로 정의된 핵영역에서의 작고 규칙적인 원형 모양을 기반으로 결정되었다. TIL의 세포질은 상당히 다양할 수 있기 때문에, 핵 주위의 원형고리와 CD3, CD4, CD8, CD33, CD11c 및 PD-1에 대한 핵 주위 영역의 DAPI 정의 세포질/막 영역을 기반으로 결정했다. CD56과 CD68의 경우, 다소 불규칙한 원형 고리와 핵 주위 영역의 DAPI 정의 세포질/막 영역을 기반으로 결정했다. 앞선 그림3, 그림4, 그림5에서 MSI의 대표 이미지를 확인할 수 있다. 그림3A와 그림4A는 MSI로 6가지 세포 표면 단백질이 발현되는 전체 종양세포의 이미지를 보여주고, 그림3B, 그림4B는 F-MIHC로 염색된 각각의 세포 표면 마커를 보여준다.

PD-L1의 발현에 대해서 MSI를 통해 적절한 양성 cut-off값이 얻어졌는지 확인하기 위해, conventional IHC와 F-MIHC를 비교하였고, 일관적 결과를 확인하였다. 그림5는 이를 보여준다. 그림5의 A, C, E는 음성, 양성, 강양성의 세가지 단계의 대표적인 conventional IHC를 보여주며, B, D, F는 이에 대응하는 F-MIHC 이미지를 보여준다.

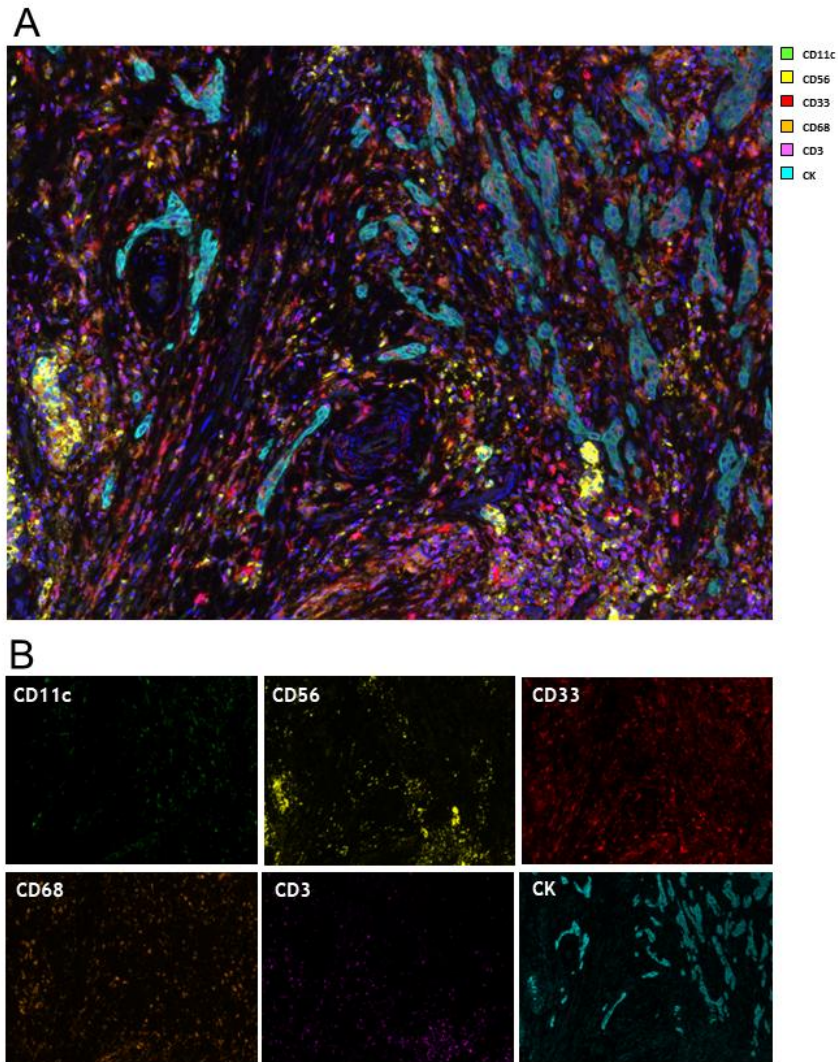
그림3. Representative multispectral image and expression of cell surface markers
(first analysis)



(A) Representative multispectral image.

(B) Cell surface markers, CD4, CD8, PD-1, PD-L1, Foxp3, and CK, detected by fluorescence immunohistochemical staining with different colors to rule out cross-reactivity and multispectral imaging.

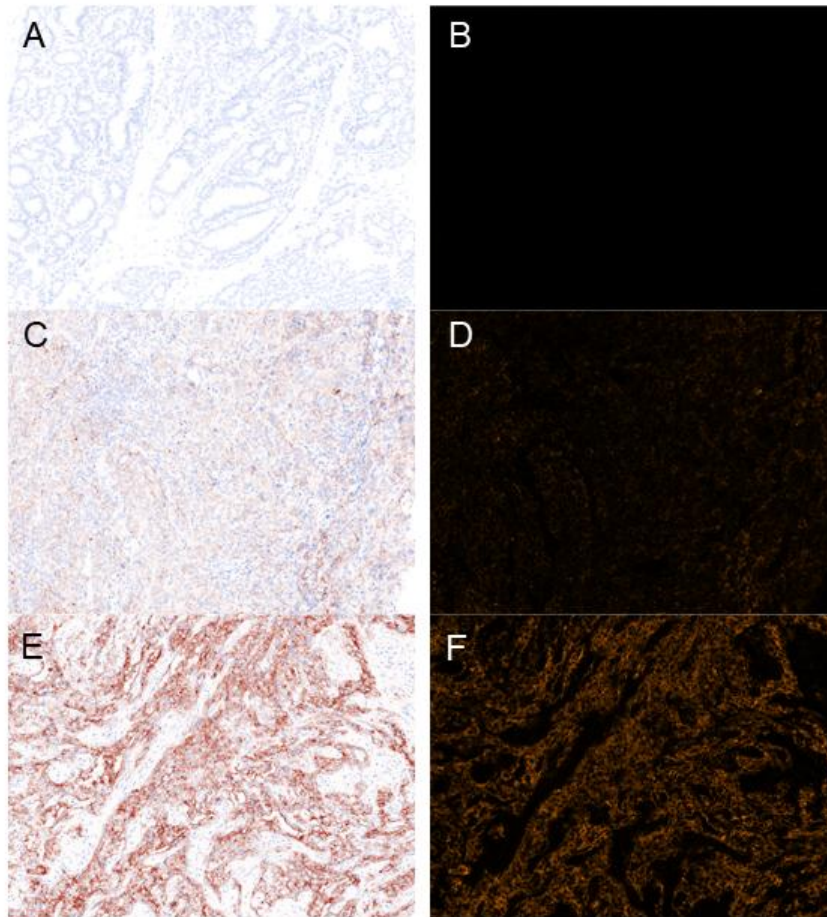
그림4. Representative multispectral image and expression of cell surface markers
(second analysis)



(A) Representative multispectral image.

(B) Cell surface markers, CD11c, CD56, CD33, CD68, CD3, and CK, detected by fluorescence immunohistochemical staining with different colors to rule out cross-reactivity and multispectral imaging.

그림5. Representative images of PD-L1 expression assessed by conventional PD-L1 and fluorescence immunohistochemical staining.



Images of PD-L1 expression assessed by conventional PD-L1 (A, C, E) and fluorescence (B, D, F) immunohistochemical staining. Expression of PD-L1 is absent in (A, B) differentiated thyroid carcinoma tissues, and 1% (C, D) and > 50% (E, F) in tissues from anaplastic thyroid carcinoma.

3) 각 세포 및 용어의 정의

(1) 1차 분석

CK 양성 세포를 종양세포로 정의하였고 CK가 음성이면서 CD4, CD8, Foxp3가 양성인 세포를 T 림프구로 정의하였다. CD8 양성 세포는 세포독성 T 림프구로, Foxp3 양성 세포는 조절 T 림프구로 정의하였다, 각각의 표지자의 양성인 세포를 mm²로 나누어 그 수를 비교하였다.

다른 고형암에서 PD-L1의 발현은 TPS와 CPS를 통해 평가된다. 본 연구에서 TPS와 CPS의 계산은 아래 수식을 이용하였다.

$$\text{TPS} = \frac{(\text{PD-L1}^+\text{CK}^+\text{cells})}{\text{CK}^+\text{cells}} \times 100$$
$$\text{CPS} = \frac{(\text{PD-L1}^+\text{CK}^+\text{cells})+(\text{PD-L1}^+\text{CD4}^+\text{cells})+(\text{PD-L1}^+\text{CD8}^+\text{cells})+(\text{PD-L1}^+\text{FOXP3}^+\text{cells})}{\text{CK}^+\text{cells}} \times 100$$

PD-L1 양성 및 강양성의 기준치는 TPS의 경우 1이상과 50이상으로 하였고, CPS에서는 1이상과 20이상으로 하였다^{24, 59}).

(2) 2차 분석

1차 분석때와 마찬가지로 CK 양성 세포를 종양 세포로, CK가 음성이면서 각 표지자가 양성인 경우 다음과 같이 정의하였다. CD3 양성 세포를 T 림프구로, CD56 양성 세포를 자연살해세포로, CD68 양성 세포를 대식세포로, CD33 양성 세포를 골수유래 억제세포(Myeloid-derived suppressor cell, MDSC)로, CD11c 양성 세포를 수지상세포로 정의하였다. 각 세포 표면 단백질에 따른 세포의 정의를 표2에 정리하였다.

ㄗ.2. Definition of cells based on expression of cell surface molecules

Cell surface molecules	Cell definition
CK+	Tumor cell
CK-and CD4+or CD8+or Foxp3+	T cell
CK- and Foxp3+	Regulatory T cell
CK-and CD8+	Cytotoxic T cell
CK- and CD3+	T cell
CK- and CD11c+	Dendritic cell
CK- and CD56+	Natural killer cell
CK- and CD68+	Macrophage
CK- and CD33+	Myeloid-derived suppressor cell

Abbreviations: CD, cluster of differentiation; CK; cytokeratin; Foxp3, forkhead box

P3

4) 유전자 변이에 따른 추가 분석

PD-L1을 포함하는 1차 분석 대상자에서 차세대 염기 분석법(next-generation sequencing)을 이용한 50가지 알려진 갑상선 관련 유전자 변이 분석을 시행하였다⁶⁰⁾. 차세대 염기 분석법의 진행은 다음과 같다. 우선 경험이 많은 내분비 병리 전문의가 참여하여 DNA 추출을 위한 조직 블록을 제작하였으며, 각 블록에서 2-5 μm 두께의 절편으로부터 게놈 DNA를 추출하였다. PicoGreen 및 Nanodrop (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 사용하여 추출한 DNA를 qualified하였고, Agilent SureSelect Target Enrichment 프로토콜 (버전 B.3, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)을 사용하여 exome capture libraries를 생성하였다. 이를 이용하여 captured DNA에서 정제된 최종 생성물을 qPCR Quantification Protocol Guide (Illumina, San Diego, USA)에 따라 정량화하였고, TapeStation DNA ScreenTap e(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 정성화하여 분석하였다. Sequencing을 위해서는 HiSeqTM 2500 플랫폼(Illumina, San Diego, USA)을 사용하였다. 위와 같이 수행된 유전자 검사 결과에서 *BRAF*^{V600E}과 *TERT* 프로모터 변이를 결과 이번 분석에 포함하였다.

5) 통계학적 분석

모든 데이터는 R software (R Foundation for Statistical Computing; www.R-project.org, Vienna, Austria)를 사용하여 통계적으로 분석되었다. 연속형 변수는 중앙값과 사분위수[IQR, interquartile range]로 나타냈고, 범주형 변수는 숫자(비율)로 나타냈다. 전혈구계산의 전, 후 분석의 비교에는 paired t-test를 사용하였고, LMR 비율의 적절한 cut-off의 계산을 위해 ROC 분석 및 area under the curve (AUC) value를 이용했다. 두 그룹의 비교에는 범주형 변수의 경우 Chi-squared test를 사용하였고, 연속형 변수에는 Wilcoxon rank-sum test 및 Mann Whitney U-test를 이용하였다. 생존 곡선은 Kaplan-Meier method를 사용하였고, log-rank test를 통해 통계적 유의성을 확인하였다. Cox proportional hazards model을 이용하여 위험도를 계산하였다. P 값을 two-sided로 고려하였고, p 값이 0.05 미만일 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주했다.

결 과

1. 림프구 대 단핵구 비율의 분석

1) 역형성 갑상선암

(1) 환자들의 기저 특성

역형성 갑상선암의 LMR 분석에는 총 35명의 환자들이 포함되었고, 표3에 전체 환자들의 기저특성을 정리하였다. 나이의 중앙값은 68세, 여성의 비율은 68.6%였다. 종양 크기의 중앙값은 4.5cm였으며, 림프절 전이가 82.9%에서 동반되었고, 원격전이는 45.7%에서 확인되었다. Tumor Node Metastasis (TNM) 병기의 IVB와 IVC에 해당되는 환자가 각각 51.4%, 45.7% 였다. 환자들의 생존기간의 중앙값은 4.3개월이었다. 수술 혹은 조직검사 전 기저 LMR의 중앙값은 2.9였으며, 추적 LMR의 중앙값은 3.8 이었는데, 두 군 간의 paired t-test를 시행한 결과, p 값이 0.52로 유의한 차이는 없었다.

3.3. Baseline characteristics of patients with ATC

	Total (n = 35)
Age at diagnosis (years)	68 [60.5–75.0]
Sex	
Men	11 (31.4%)
Women	24 (68.6%)
Tumor size	4.5 [3.7–6.5]
T	
T1	1 (2.9%)
T2	2 (5.7%)
T3	3 (8.6%)
T4	29 (82.9%)
N	
N0	6 (17.1%)
N1	29 (82.9%)
M	
M0	19 (54.3%)
M1	16 (45.7%)
TNM Stage	
Stage IV A	1 (2.9%)
Stage IV B	18 (51.4%)
Stage IV C	16 (45.7%)
Baseline lymphocyte-to-monocyte ratio	2.9 [2.4–4.4]
Survival duration (months)	4.3 [2.4–8.9]
Treatment	
Palliative therapy	20 (57.1%)
Multimodal therapy	15 (42.9%)

Abbreviations: ATC, anaplastic thyroid carcinoma; TNM stage, tumor node metastasis stage according to the 8th TNM staging system.

(2) LMR에 따른 그룹 간 비교

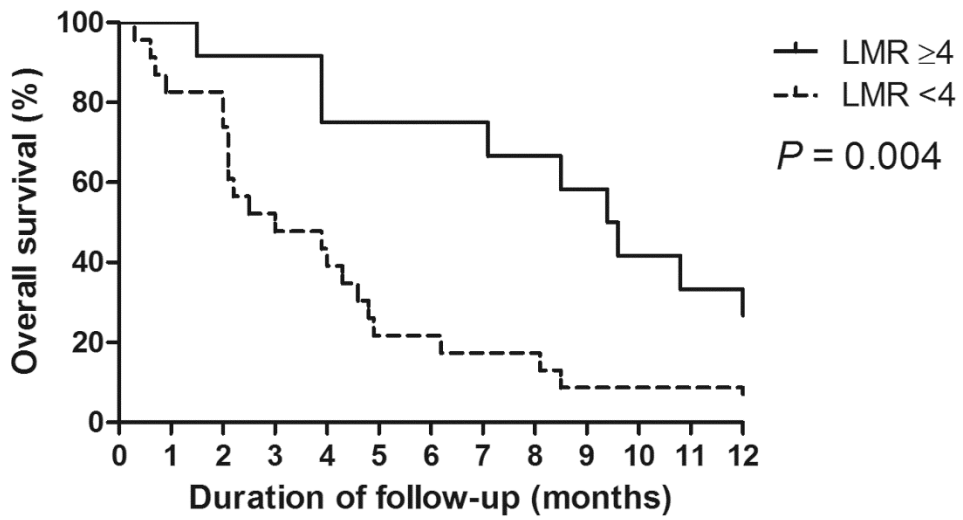
낮은 LMR 군과 높은 LMR 군의 기저특성을 표4에 정리하였다. 낮은 LMR 군에서 유의하게 림프절 전이가 많았으며, 이 외 두 군 간의 나이, 성별, 크기, 치료에 따른 통계학적 차이는 없었다. 전체 생존율은 그림6와 같이 두 군 간의 유의한 차이를 보였다($p=0.004$). 낮은 LMR 군의 생존율의 중앙값은 3개월이었으며, 높은 LMR 군은 9.5개월이었다. 역형성 갑상선암의 전체 사망률에 대해 시행한 단변량 분석에서 낮은 LMR은 위험비(Hazard ratio, HR) 3.04 (95 % confidence interval (CI) 1.37-6.77, $p=0.007$)로 유의하였고, 함께 유의성을 보인 성별, 크기, 원격전이를 포함하여 시행한 다변량 분석에서도 HR 2.55 (95% CI 1.08-6.00, $P = 0.032$)로 유의하였다(표5).

㉔ 4. Clinicopathological parameters based on LMR

	Total (n = 35)		<i>p</i> -value
	Low LMR (n = 23)	High LMR (n = 12)	
Age at diagnosis (years)	68.0 [58.0–75.0]	68.5 [66.0–78.5]	0.339
<55 years	5 (21.7)	0 (0.0)	0.217
≥55 years	18 (78.3)	12 (100)	
Sex			1.000
Men	7 (30.4)	4 (33.3)	
Women	16 (69.6)	8 (66.7)	
Tumor size (cm)	5.0 [4.0–6.9]	3.9 [3.4–4.8]	0.062
≤4 cm	9 (39.1)	8 (66.7)	0.234
>4 cm	14 (60.9)	4 (33.3)	
Lymph node metastasis			0.021
No	1 (4.3)	5 (41.7)	
Yes	22 (95.7)	7 (58.3)	
Distant metastasis			0.481
No	11 (47.8)	8 (66.7)	
Yes	12 (52.2)	4 (33.3)	
Baseline lymphocytes (μL)	1813 [1541–2023]	2082 [1855–2368]	0.023
Baseline monocytes (μL)	730 [514–828]	386 [295–504]	<0.001
Treatment			1.000
Palliative therapy	13 (56.5)	7 (58.3)	
Multimodal therapy	10 (43.5)	5 (41.7)	

Abbreviations: LMR, lymphocyte-to-monocyte ratio

그림6. Overall survival (OS) according to the lymphocyte-to-monocyte ratio (LMR) in anaplastic thyroid carcinoma patients



The solid line represents the OS rate of the high LMR group (≥ 4) (n=12, 34%), while the dotted line represents the OS rate of the low LMR group (< 4) (n= 23, 66%).

Figure 5. Cox proportional hazards model of all-cause mortality in patients with ATC

Covariate	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	HR (95% CI)	<i>p</i> -value	HR (95% CI)	<i>p</i> -value
LMR (<4)	3.04 (1.37–6.77)	0.007	2.55 (1.08–6.00)	0.032
Age (≥55)	0.83 (0.32–2.16)	0.700		
Sex (male)	2.16 (1.05–4.47)	0.038	1.04 (0.45–2.43)	0.927
Tumor size (>4 cm)	2.55 (1.23–5.29)	0.012	1.82 (0.79–4.19)	0.161
Lymph node metastasis	1.75 (0.66–4.61)	0.259		
Distant metastasis	2.16 (1.05–4.47)	0.038	1.92 (0.86–4.27)	0.111
Multimodal treatment	0.980 (0.49–1.98)	0.954		

Abbreviations: ATC, anaplastic thyroid carcinoma; LMR, lymphocyte-to-monocyte ratio; HR, hazard ratio; CI, confidence interval

2) 소라페닙을 투약하는 방사성 요오드 치료에 반응하지 않는 진행성 분화암

(1) 환자들의 기저특성

소라페닙을 투약하는 방사성 요오드 치료에 반응하지 않는 진행성 분화암의 LMR 분석에는 총 40명의 환자들이 포함되었으며, 표6에 환자들의 기저특성을 정리하였다. 환자들의 나이의 중앙값은 65세였으며, 68%가 여성이었다. 75%가 유두암이었으며, 가장 흔한 원격전이 장기는 폐였다. 진단시부터 소라페닙 투약까지 기간의 중앙값은 10년이었으며, 모든 환자들은 과거에 방사성 요오드 치료를 받았고, 누적 용량의 중위값은 12GBq이었다.

㉔6. Baseline characteristics of patients treated with sorafenib for progressive RAI-refractory DTC

	Total (n = 40)
Age at initiation of sorafenib (years)	65.4 [60.2-72.9]
Sex	
Male	13 (32.5)
Female	27 (67.5)
Pathology	
PTC	30 (75.0)
FTC	6 (15.0)
PDTC	4 (10.0)
Time from diagnosis (years)	10.0 [3.7-16.0]
Previous treatment	
RAI therapy	40 (100)
External beam radiation therapy	15 (37.5)
Radiofrequency ablation	3 (7.5)
Systemic chemotherapy	1 (2.5)
Resection of metastatic tumor	5 (12.5)
Cumulative RAI dose (GBq)	12.0 [5.5-19.2]
Definition of RAI refractoriness*	
At least one target lesion without RAI uptake	34 (85.0)
RAI uptake but progressive target lesions	2 (5.0)
Disease progression even with RAI therapy or cumulative RAI \geq 22.3 GBq	7 (17.5)
Metastatic lesion sites	
Lung	38 (95.0)
LNs	17 (42.5)
Bone	15 (37.5)
Pleura	4 (10.0)
Liver	1 (2.5)
Head and neck (including operation bed)	10 (25.0)
Others (adrenal, kidney, pancreas)	4 (10.0)

Baseline LMR

3.9 [2.4 -6.1]

Abbreviations: PTC, papillary thyroid carcinoma; FTC, follicular thyroid carcinoma; PDTC, poorly differentiated thyroid carcinoma; RAI, radioactive iodine; LNs, lymph nodes, LMR, lymphocyte-to-monocyte ratio

*Three patients had double features of RAI refractoriness

(2) LMR에 따른 그룹 간 비교

LMR에 따른 기저특성을 표7에 정리하였다. 나이, 성별, 암의 종류, 누적 방사선량, 증상, 소라페닙 유지용량 및 렌바티닙 전환 등 주요 인자에서 두 군 간의 유의한 차이는 없었다. 전체생존율과 질병 무진행 생존을 낮은 LMR 군과 높은 LMR 군으로 나누어 분석하였을 때 두 군간 유의한 차이가 확인되었다(그림7). 전체생존율의 중앙값은 낮은 LMR 군에서 24개월, 높은 LMR 군은 중앙값에 도달하지 않았다($p=0.0153$). 질병 무진행 생존의 중앙값은 낮은 LMR 군에서 10개월, 높은 LMR 군에서 29개월이었다($p=0.0187$).

LMR에 따른 질병 반응률은 낮은 LMR 군에서 68%, 높은 LMR 군에서 89%로 높은 LMR 군에서 더 좋은 경향을 보였으나, 통계적으로 유의하지는 않았다(표8). 낮은 LMR 군에서 53%, 높은 LMR 군에서 89%가 6개월 이상의 질병 조절 기간을 보였다.

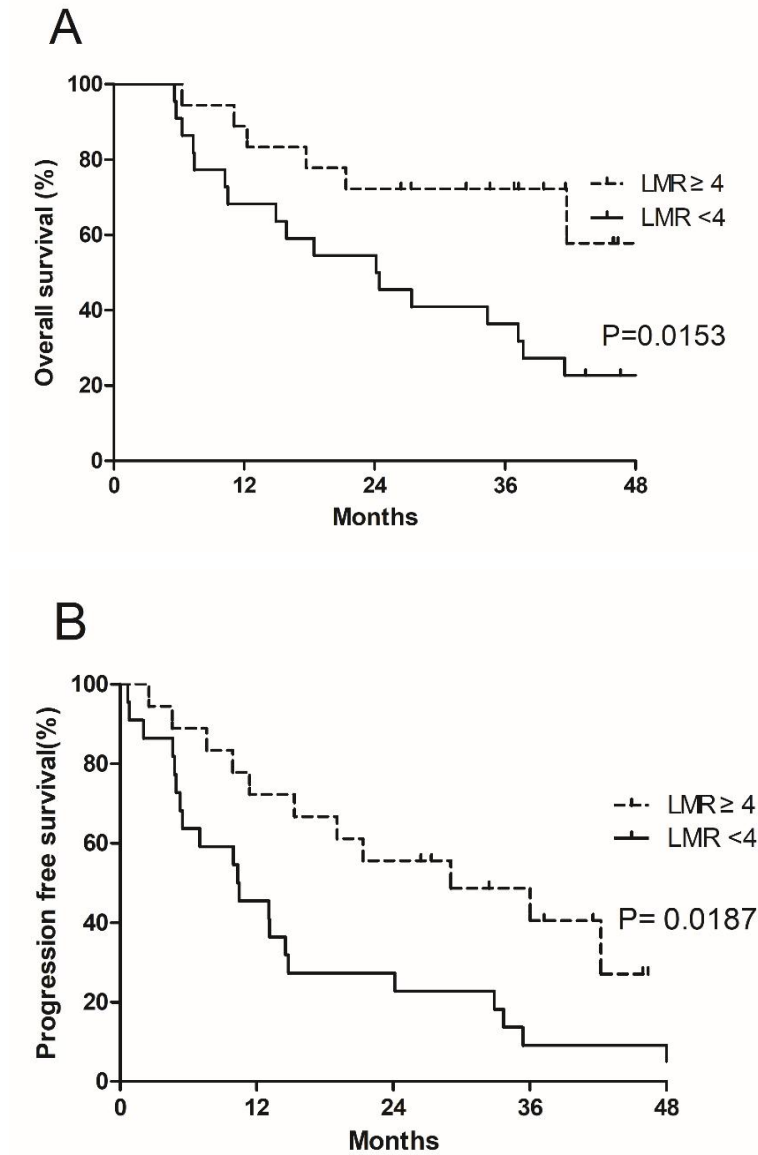
전체 사망률에 대해 시행한 단변량 분석에서 낮은 LMR은 HR 2.98 (95% CI 1.18-7.52, $p=0.021$)로 유의하였고, 전체 사망률에 대한 주요 예후 인자로 알려진 성별, 종양 크기, 항암제, 증상 중 단변량 분석에서 유의하게 나온 암 연관 증상을 포함하여 시행한 다변량 분석에서도 HR 2.64 (95% CI 1.04-6.72, $p=0.041$)로 유의하였다(표9). 질병의 진행과 관련하여서도 단변량, 다변량 분석을 진행하였고, 낮은 LMR군은 단변량에서 HR 2.37 (95% CI 1.13-5.00, $P = 0.023$), 다변량에서 HR 2.69 (95% CI 1.02-7.04, $p=0.045$)로 유의한 예후 인자로 확인되었다(표10).

㉟7. Clinicopathological parameters according to LMR

	Total (n = 40)		<i>p</i> -value
	Low LMR (n = 22)	High LMR (n = 18)	
Age at diagnosis (years)	70.0 [60.0–74.4]	64.0 [60.5–70.4]	0.251
Sex			0.111
Male	10 (45.5)	3 (16.7)	
Female	12 (54.5)	15 (83.3)	
Pathology			0.108
PTC	19 (86.4)	11 (61.1)	
FTC	1 (4.5)	5 (27.8)	
PDTC	2 (9.1)	2 (11.1)	
Cancer-related symptoms			
Yes	12 (54.5)	4 (22.2)	0.080
Metastatic lesion sites			0.446
Lung only	5 (22.7)	7 (38.9)	
Sorafenib maintenance dose			0.168
< 600 mg	4 (18.2)	0	
≥600 mg	18 (81.8)	18 (100)	
Change to lenvatinib after progression			
Yes	7 (31.8)	5 (27.8)	1.000
Cumulative RAI dose (GBq)	350 [200–540]	200 [150–400]	0.411
Baseline lymphocytes (/μL)	1275 [986–1,670]	2125 [1,986–2,713]	< 0.001
Baseline monocytes (/μL)	523 [428–689]	362 [301–435]	0.002

Abbreviations: LMR, lymphocyte-to-monocyte ratio, PTC, papillary thyroid carcinoma, FTC, follicular thyroid carcinoma, PDTC, poorly differentiated thyroid carcinoma, RAI, radioactive iodine

그림 7. Prognosis based on lymphocyte-to-monocyte ratio (LMR) in patients with progressive radioiodine-refractory differentiated thyroid carcinoma treated with sorafenib. (A) Overall survival (OS) based on LMR. (B) Progression-free survival (PFS) based on the LMR in these patients.



ㄨ8. Treatment efficacy in patients treated with sorafenib for progressive RAI-refractory DTC based on LMR

	Low LMR (n = 22)	High LMR (n = 18)	<i>p</i>-value
Disease response			0.916
CR	0	0	
PR	4 (18.2)	4 (22.2)	
SD (≥ 6 months)	11 (50.0)	12 (66.7)	
Disease control rate	15 (68.2)	16 (88.9)	
Disease control duration			0.104
< 6 months	8 (36.4)	2 (11.1)	
6-24 months	8 (36.4)	6 (33.3)	
≥ 24 months	6 (27.2)	10 (55.6)	
Disease control (PR or SD) ≥ 6 months	14 (53.6)	16 (88.9)	

Abbreviations: RAI, radioactive iodine, DTC, differentiated thyroid carcinoma, LMR, lymphocyte-to-monocyte ratio, CR, complete response, PR, partial response, SD, stable disease

Figure 9. Cox proportional hazards model of all-cause mortality in patients with RAI-refractory DTC

Covariate	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	HR (95% CI)	<i>p</i>-value	HR (95% CI)	<i>p</i>-value
LMR (<4)	2.98 (1.18–7.52)	0.021	2.64 (1.04–6.72)	0.041
Male sex	0.86 (0.36–2.09)	0.746		
Tumor size (>4 cm)	1.83(0.67–4.94)	1.186		
Sorafenib only (no change to lenvatinib)	2.34(0.86–6.33)	0.094		
Sorafenib maintenance dose (<600 mg)	1.72 (0.58–5.12)	0.975		
Metastasis to other organs (except lung-only)	1.35 (0.53–3.43)	0.632		
Cancer-related symptoms	2.86 (1.25–6.55)	0.013	2.58 (1.10–6.05)	0.030

Abbreviations: RAI, radioactive iodine, DTC, differentiated thyroid carcinoma, LMR, lymphocyte-to-monocyte ratio, HR, hazard ratio, CI, confidence interval

Figure 10. Cox proportional hazards model of progression-free survival in patients with RAI-refractory DTC

Covariate	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	HR (95% CI)	<i>p</i> -value	HR (95% CI)	<i>p</i> -value
LMR (<4)	2.37 (1.13–5.00)	0.023	2.69 (1.02–7.04)	0.045
Male sex	0.76 (0.35–1.65)	0.489		
Tumor size (>4 cm)	1.03(0.39–2.73)	0.068		
Sorafenib maintenance dose (<600 mg)	3.72 (1.22–11.31)	0.021	0.93 (0.3–2.89)	0.903
Metastasis to other organs (except lung-only)	1.62(0.70–3.77)	0.262		
Cancer-related symptoms	2.75(1.34–5.66)	0.006	2.59 (1.1–6.11)	0.030

Abbreviations: RAI, radioactive iodine, DTC, differentiated thyroid carcinoma, LMR, lymphocyte-to-monocyte ratio, HR, hazard ratio, CI, confidence interval

2. 암조직에서 면역세포 프로파일링

1) 1차 분석: PD-L1을 포함한 T 림프구의 분석

(1) 환자들의 기저 특성

병리 조직 검체의 검토를 통해 총 28명의 환자들이 면역세포 프로파일링에 포함되었다. 이 중 12명은 전이성 분화암, 16명은 역형성 갑상선암 환자였다. 역형성 갑상선암 환자들 중 5명은 *de novo* 역형성 갑상선암 환자였고, 11명은 갑상선 유두암에서 변화하거나 함께 확인된 경우였으며, 여포암과 관계된 환자는 없었다. 표11에 환자들의 기저 특성을 정리하였다. 나이 중앙값은 59세였으며, 역형성암 환자들의 나이가 유의하게 높았다. 남성의 비율을 54%였으며, 두 군의 유의한 차이는 없었다. 두 군 모두 폐가 가장 흔한 전이 부위였다. 전이성 분화암 환자들 중 병리 검체에서 림프구성 갑상선염을 보인 환자는 없었고, 역형성 갑상선암에서는 두 명에서 림프구성 갑상선염 소견이 확인되었다. 전체 환자의 60%에서 *BRAF*^{V600E}와 *TERT* 프로모터 변이가 확인되었다. 갑상선암으로 사망한 환자는 총 19명(68%)이었는데, 이들 중 역형성 갑상선암 환자가 15명에 해당하여, 1명을 제외하고는 모두 사망하였다.

Table 11. Baseline characteristics of patients with DTC and ATC (first analysis).

	Total (n = 28)	DTC (n = 12)	ATC (n = 16)	p-value
Age	59 (28–89)	48 (28–68)	66 (40–89)	0.015
Male sex	15 (54)	8 (67)	7 (44)	0.412
Site				
Thyroid	26 (93)	12 (100)	14 (88)	
Trachea, operation bed	2 (7)	0	2 (12)	
Lymphocytic thyroiditis	2 (7)	0	2 (12)	
Distant metastasis	26 (93)	12 (100)	14 (88)	
Genetic mutations				
<i>BRAF</i> ^{V600E} mutation	15 (60)	9 (75)	6 (38)	0.113
<i>TERT</i> promoter mutation	15 (60)	4 (33)	11 (69)	0.140
Both	9 (32)	4 (33)	5 (31)	0.999
Disease-specific death	19 (68)	4 (33)	15 (94)	0.003

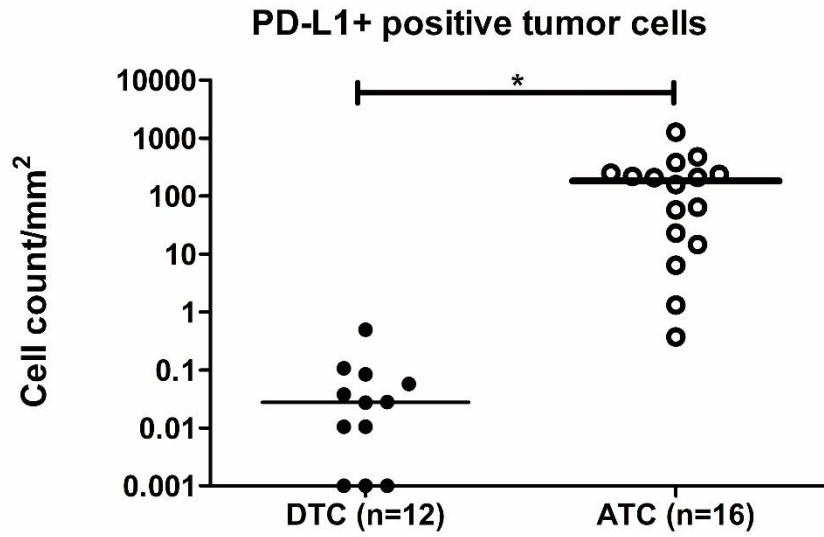
Abbreviations: ATC, anaplastic thyroid carcinoma; DTC, differentiated thyroid carcinoma; TERT, telomerase reverse transcriptase.

(2) 면역세포 프로파일링

전이성 분화암과 역형성 갑상선암의 면역세포 발현에 대한 결과가 그림7과 그림8에 도식화되어있다. PD-L1을 발현하는 종양세포를 비교하였을 때 역형성 갑상선암에서 유의하게 높은 발현이 확인되었다(그림8, 중앙값 mm²당 183.5 대 0.03, $p < 0.001$). 전체 T 림프구 수 역시 역형성 갑상선암에서 mm²당 중앙값 1138로 전이성 분화암의 84.05에 비해 유의하게 높았다 (그림 9A, $p < 0.001$). CD8 양성인 세포독성 T 림프구와 FoxP3 양성인 조절 T 림프구로 구분하여 비교하였을 때에도 역형성 갑상선암과 전이성 분화암에서 각각 370.7 대 19.0, 263.8 대 14.2로 유의한 차이가 확인되었다(그림9B-C, $p < 0.001$). 또한, 각각의 림프구에서 PD-1과 PD-L1의 발현을 세분화하여 비교하였을 때에도 전이성 분화암에 비해 역형성 갑상선암에서 그 수가 유의하게 높은 것이 확인되었으며, 단지 세포독성 T 림프구의 PD-1에서만 통계적 유의성이 없었다(그림9 A-C, $p < 0.001$).

면역 항암제의 치료 반응을 예측하는 바이오마커로 이용되는 TPS, CPS 점수 측면에서도 전이성 분화암은 양성 소견이 없는 반면, 역형성 갑상선암의 경우, TPS에서는 81%, CPS에서는 94%에서 양성 소견이 확인되었고, 6%와 44%에서는 각각 강양성을 보였다(그림10, both $p < 0.001$).

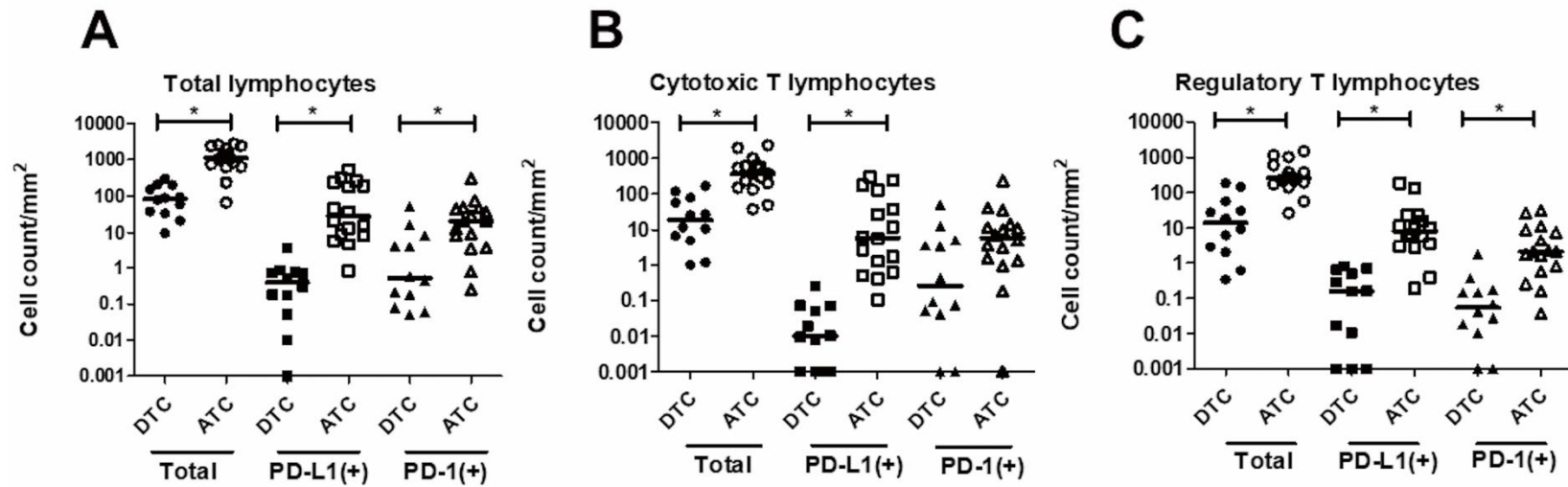
그림8. Comparison of numbers of tumor cells expressing PD-L1 based on pathological subtype.



The Y axis is transformed into a logarithm; 0 is expressed as 0.001. Bold lines, medians. (* $p < 0.05$; Mann Whitney U tests.)

Abbreviations: ATC, anaplastic thyroid carcinoma; DTC, differentiated thyroid carcinoma; PD-L1, programmed cell death-ligand 1.

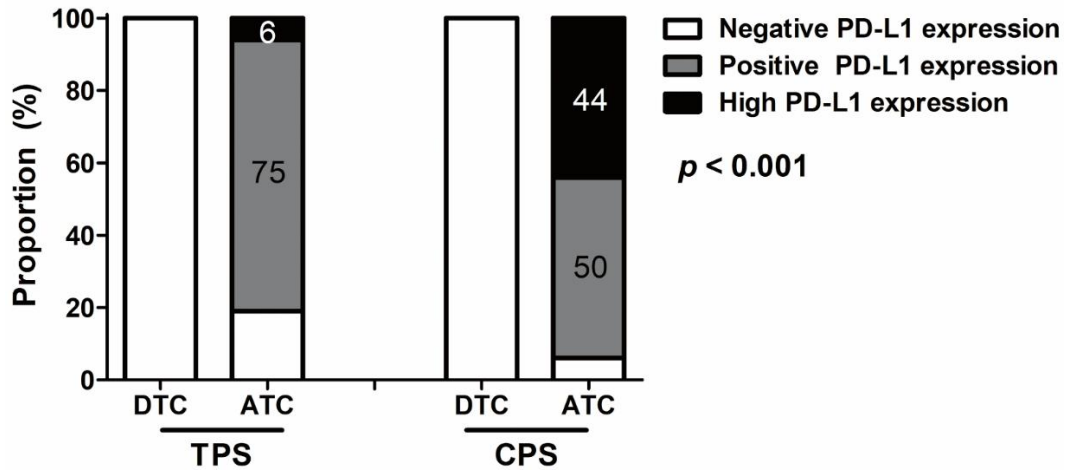
그림9. Comparison of numbers of total lymphocytes (A) and lymphocyte subtypes (B, C) between DTC and ATC.



The y-axis is transformed to a logarithm; 0 is expressed as 0.001. Bold lines, medians. (* $p < 0.05$; Mann-Whitney U tests.)

Abbreviations: ATC, anaplastic thyroid carcinoma; CD8, cluster of differentiation 8; DTC, differentiated thyroid carcinoma; Foxp3, forkhead box P3; PD-1, programmed cell death protein 1; PD-L1, programmed cell death-ligand 1.

그림 10. Differences in TPS and CPS according to pathological subtype

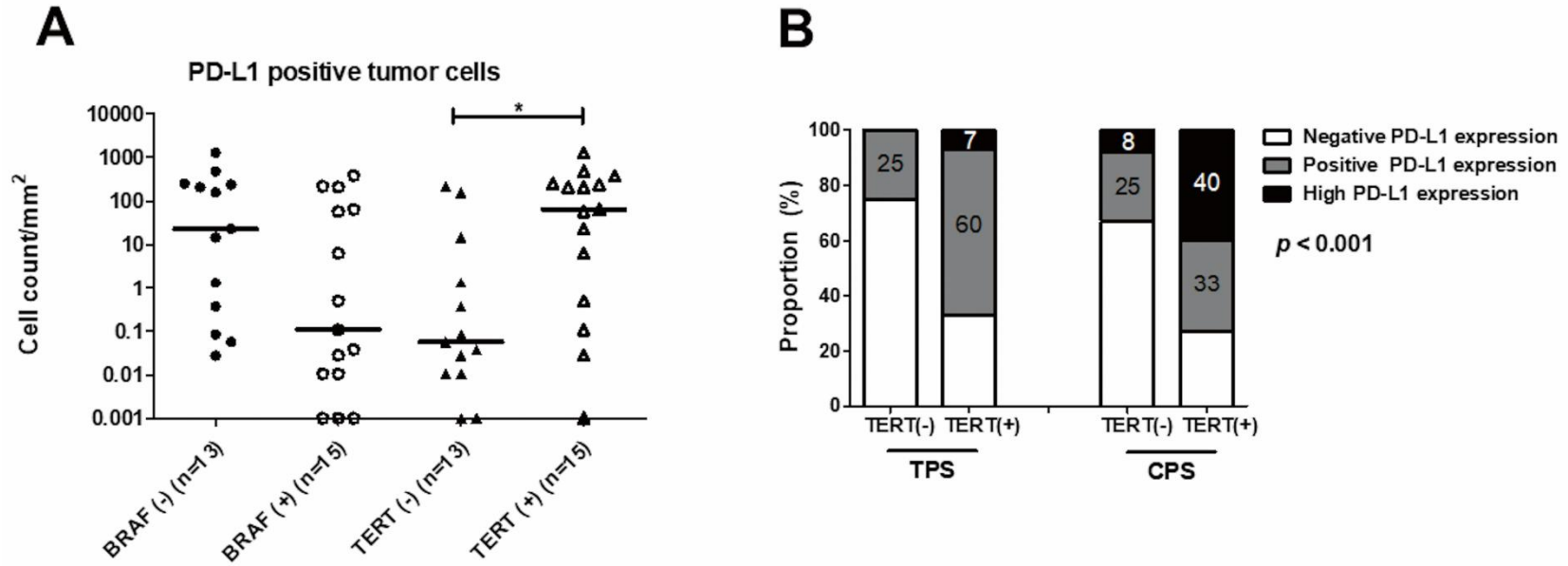


Abbreviations: ATC, anaplastic thyroid carcinoma; CPS, combined positive score; DTC, differentiated thyroid carcinoma; PD-L1, programmed cell death-ligand 1; TPS, tumor proportion score.

(3) 유전자 변이에 따른 PD-L1 발현의 차이

유전자 변이에 따라 PD-L1을 발현하는 종양 세포를 비교하였을 때, *BRAF*^{V600E} 유전자의 발현 여부와는 유의한 차이가 없었으나, *TERT* 프로모터 변이가 있는 경우에는 유의하게 높은 발현을 보였다(그림11A, *TERT* (+) 64.2 대 *TERT* (-) 0.06, $p < 0.001$). TPS, CPS 점수 측면에서도 *TERT* 프로모터 변이가 있는 경우, TPS에서는 67%, CPS에서는 73%에서 양성 소견이 확인되었고, 7%와 40%에서는 각각 강양성을 보였다(그림11B, $p < 0.001$).

그림11. Comparison of numbers of tumor cells expressing PD-L1 based on genetic characteristics (A) and differences in TPS and CPS according to *TERT* promoter mutation (B).



Abbreviations: CPS, combined positive score; PD-L1, programmed cell death-ligand 1; TPS, tumor proportion score.

2) 2차 분석: 대식세포와 기타 면역세포를 포함하는 분석

(1) 환자들의 기저특성

총 19명의 환자가 분석에 포함되었다. 1차 분석에 포함된 환자 중 추가적인 조직 염색이 불가능한 역형성 갑상선암 환자 6명이 제외되었고, 추가적으로 조직 이용가능한 환자 2명이 새롭게 추가되어 총 12명의 역형성 갑상선암 환자가 분석에 포함되었으며, 1차 분석에 포함되었던 전이성 분화암 환자들은 추가적인 조직 염색이 불가능하여, 2차 분석에서는 7명의 전이성 분화암 환자들이 대조군으로 새롭게 추가되었다. 나이의 중앙값은 61세였으며, 47.4%가 남성이었고 나이와 성별에서 두 군 간의 유의한 차이는 없었다. 분석에 이용된 조직 중 원발 갑상선 부위가 15건(78.9%)였으며, 4건(21.1%)는 이전 수술 부위에 재발한 조직이었다. 역형성 갑상선암의 50%에서는 원격전이를 동반하였으며, 역형성 갑상선암과 전이성 분화암 모두에서 가장 흔한 전이 부위는 폐였다. LMR 4미만에 해당되는 환자는 전이성 분화암에서는 28.6%인 것에 비해, 역형성 갑상선암에서 91.7%로 높았다. 유전자 변이 분석에서 역형성 갑상선암의 66.7%에서 TERT 유전자 변이가 있었으나, 새롭게 추가된 전이성 분화암에서는 유전자 변이 분석이 1명에서만 시행되었기에 두 군 간의 비교는 제한적이다. 환자들은 분석 당시 모두 사망한 상태로 전체 생존기간의 중앙값은 4.1개월로 역형성 갑상선암이 전이성 분화암에 비해 유의하게 짧았다(표12).

Table 12. Baseline characteristics of patients with DTC and ATC (second analysis).

	Total (n = 19)	DTC (n = 7)	ATC (n = 12)	p- value
Age	61[54.5 – 70.5]	55 [51 – 63.5]	65 [58 – 78]	0.162
Male sex	9 (47.4)	2 (28.6)	7 (58.3)	0.437
Site				0.976
Thyroid	15 (78.9)	5 (71.4)	10 (83.3)	
Trachea, operation bed	4 (21.1)	2 (28.6)	2 (16.7)	
Distant metastasis	13 (68.4)	7 (100)	6 (50)	
LMR (<4)	13 (68.4)	2 (28.6)	11 (91.7)	0.004
Genetic mutation				
No test	8 (42.1)	6 (85.8)	2 (16.7)	
<i>BRAF</i> ^{V600E} mutation	3 (15.8)	0	3 (25.0)	
<i>TERT</i> promotor mutation	9 (47.4)	1 (14.3)	8 (66.7)	
Both	3 (15.8)	0	3 (25.0)	
Overall survival duration (month)	5.2 [3.5 – 20.8]	35.3 [20.8 – 80.8]	4.1 [2.8 – 5.6]	<0.001

Abbreviations: ATC, anaplastic thyroid carcinoma; DTC, differentiated thyroid carcinoma; LMR, lymphocyte-to-monocyte ratio

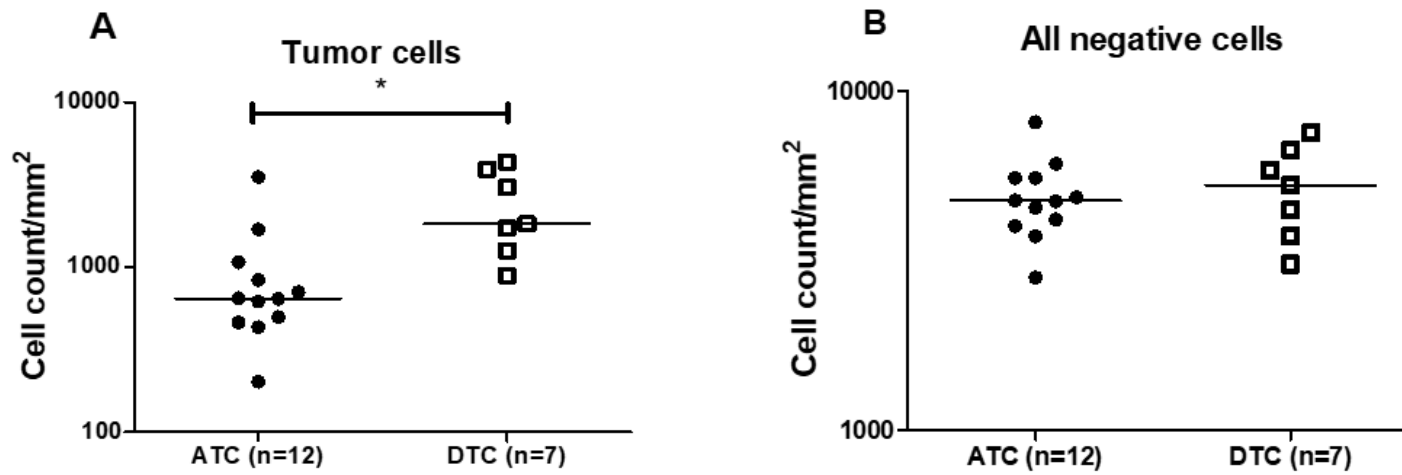
(2) 면역세포 프로파일링

전이성 분화암과 역형성 갑상선암의 면역세포 발현에 대한 결과가 그림 12, 그림13에 도식화되어있다. 종양 세포의 수는 역형성 갑상선암에 비해 전이성 분화암에서 mm²당 중앙값 644 대 1828로 증가되어 있었으며 ($p<0.001$), 표지자가 모두 음성인 세포는 두 군에서 유의한 차이가 없었다(그림12 A-B). 그림13의 A-E는 각각의 세포 수를 비교한 그래프로, 이전 연구와 유사하게 역형성 갑상선암에서 총 T 림프구 수가 mm²당 중앙값 579로 전이성 분화암 74에 비해 유의하게 증가된 것이 확인되었다(그림 13A, $p<0.006$). 역형성 갑상선암과 전이성 분화암에서 각각 자연살해세포는 mm²당 중앙값 108 대 11로 유의한 차이를 보였다(그림 13B, $p=0.038$). 대식세포는 mm²당 중앙값 733 대 113 로 역형성 갑상선암에서 유의하게 증가되어 있었다(그림 13C, $p<0.001$). 골수유래 억제세포 역시 mm²당 중앙값 336 대 16로 역형성 갑상선암에서 유의하게 증가되어 있었다(그림 13D $p=0.003$). 수지상세포의 경우에도 mm²당 중앙값 103 대 3으로, 역형성 갑상선암에서 그 수가 유의하게 증가된 것이 확인되었다(그림 13E, $p<0.002$).

남녀 성별에 따른 면역세포 프로파일링을 추가적으로 분석하였을 때, 종양세포, 총 T 림프구, 자연살해세포, 대식세포, 골수유래 억제세포에서는 두 군간 유의한 차이가 없었으나(그림 14A-E), 수지상세포는 mm²당 중앙값 107 대 13 로 유의한 차이를 보였다(그림 14F, $p=0.044$).

2차 분석 환자에서는 말초혈액의 LMR결과를 바탕으로 총 림프구 수와 대식세포 수를 비교하였다. 총 림프구 수는 LMR 4미만의 낮은 LMR 군과 LMR 4이상의 높은 LMR 군간 유의한 차이가 없었으나(그림 15A), 대식세포 수는 낮은 LMR 군에서 mm²당 중앙값 706 대 높은 LMR 군에서 149 로 유의하게 증가되어 있었다(그림 15B, $p=0.012$)

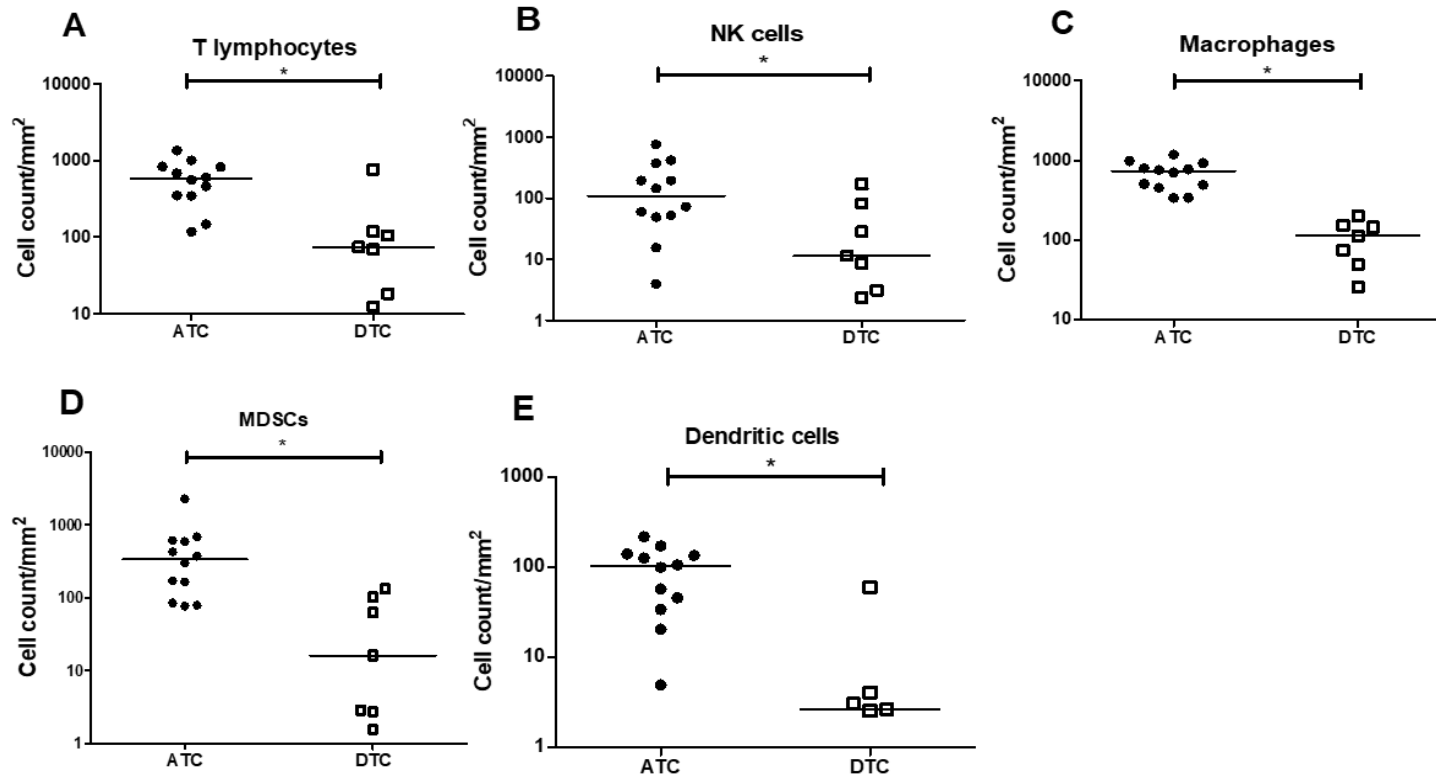
그림12. Comparison of numbers of tumor cells and all negative cells based on pathological subtype.



The Y axis is transformed into a logarithm; 0 is expressed as 0.001. Bold lines, medians. (* $p < 0.05$; Mann Whitney U tests.)

Abbreviations: ATC, anaplastic thyroid carcinoma; DTC, differentiated thyroid carcinoma

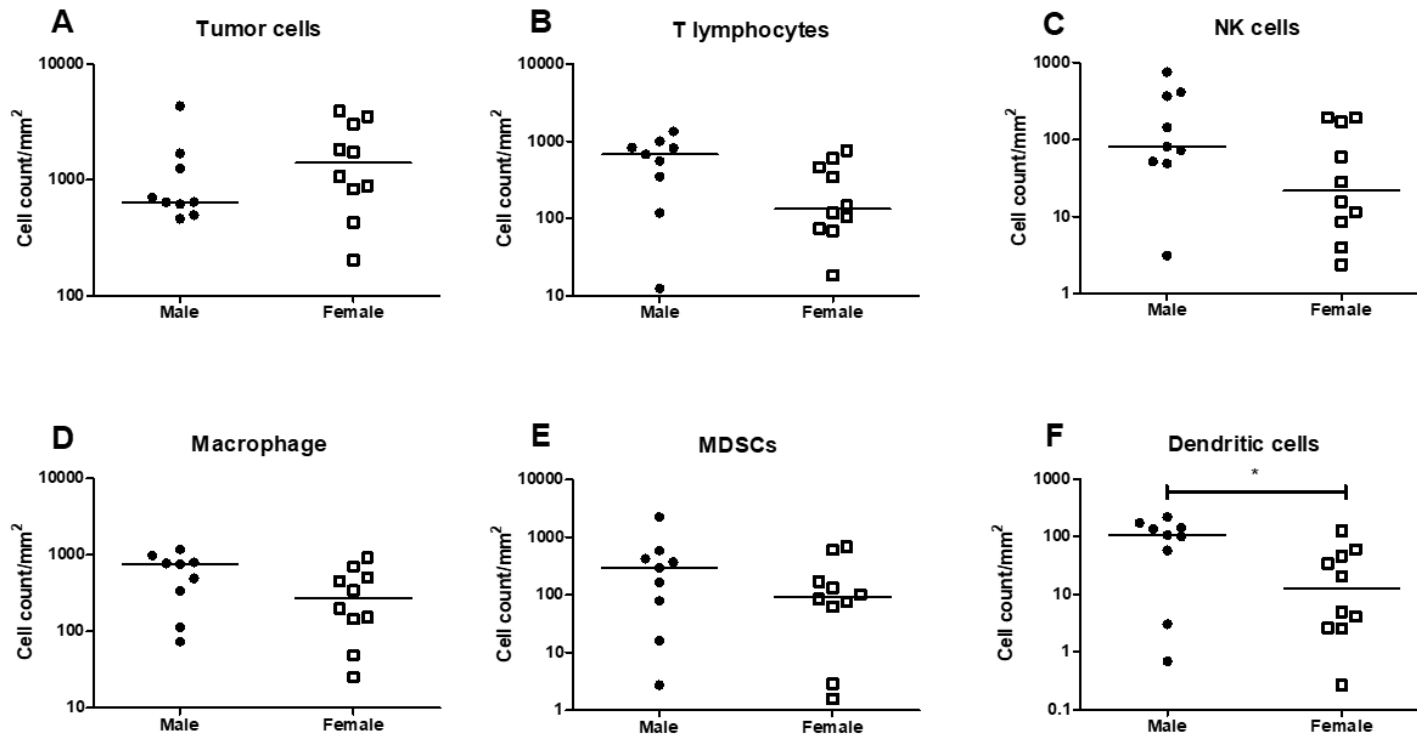
그림 13. Comparison of numbers of T lymphocytes (A), natural killer cells (B), macrophages (C), Myeloid-derived suppressor cells (D) and dendritic cells (E) between DTC and ATC.



The Y axis is transformed into a logarithm; 0 is expressed as 0.001. Bold lines, medians. (* $p < 0.05$; Mann Whitney U tests.)

Abbreviations: ATC, anaplastic thyroid carcinoma; DTC, differentiated thyroid carcinoma; NK, natural killer; MDSC, Myeloid-derived suppressor cell

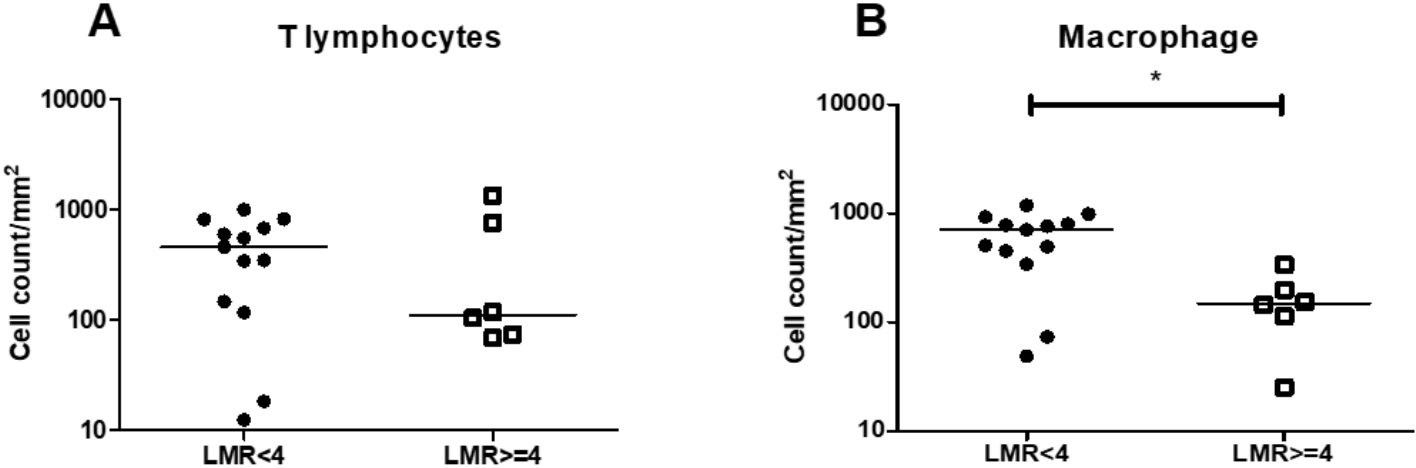
그림 14. Comparison of numbers of Tumor cells (A), T lymphocytes (B), natural killer cells (C), macrophages (D), Myeloid-derived suppressor cells (E) and dendritic cells (F) according to sex.



The Y axis is transformed into a logarithm; 0 is expressed as 0.001. Bold lines, medians. (* $p < 0.05$; Mann Whitney U tests.)

Abbreviations: NK, natural killer; MDSC, Myeloid-derived suppressor cell

그림 15. Comparison of numbers of T lymphocytes (A), macrophages (B) according to LMR.



고찰

본 연구는 역형성 갑상선암과 전이성 분화암의 면역학적 특성을 분석하고자 수행되었으며, 말초 혈액에서의 LMR과 실제적인 조직에서의 면역세포 프로파일링으로 분석이 진행되었다. 연구 결과, 역형성 갑상선암에서 낮은 LMR이 유의하게 전체생존을 감소를 보였으며, 성별, 종양 크기, 원격전이를 보정한 후에도 통계적으로 유의한 예후 인자로 확인되었다. 이는 소라페닙 투약을 받는 방사성 요오드 치료에 반응하지 않는 진행성 전이성 분화암 환자에서도 유사한 결과를 보였는데, 전체생존률 및 질병무진행 생존률 모두에서 말초 혈액 내 LMR 값이 예후와 통계적으로 유의한 연관이 있었다. F-MIHC 및 MSI를 통한 면역세포 프로파일링에서는 총 T 림프구수 뿐만 아니라, 세포독성 T 림프구, 조절 T 림프구 모두 역형성 갑상선암에서 유의하게 증가되어 있었고, 이는 PD-1/PD-L1 양성 세포를 분류하여 분석하였을 때에도 동일하였다. 면역항암제의 치료반응 예측에 이용되는 TPS, CPS 점수 역시 역형성 갑상선암에서 유의하게 높았다. 이후, 후속으로 시행된 면역세포 프로파일링에서도 역형성 갑상선암에서 자연살해세포, 대식세포, 골수유래 억제세포, 수지상세포 모두 역형성 갑상선암에서 유의하게 높았다. 요약하면, 말초 혈액에서의 LMR이 갑상선암의 예후와 연관을 보였으며, 종양 내 미세환경, 특히 조직 내 면역세포의 구성이 갑상선암의 종류에 따라 차이를 보이는 것을 새로운 분석 기법을 통해 확인되었다.

숙주의 면역기능은 종양세포의 파괴와 성장에 중요한 역할을 한다¹⁹⁾. 이전 연구들에 따르면 림프구들과 종양 침윤 림프구들은 종양을 억제하는 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 절대적인 림프구의 감소는 종양에 대한 면역 반응을 불충분하게 만든다^{51, 61-63)}. 반면에 증가된 단핵구 수는 혈액암 및 일부 고형암에서 불량한 예후와 연관이 있음이 보고되어 왔는데, 단핵구에서 유래되는 것으로 고려되는 종양 연관 대식세포 역시

불량한 예후와 연관된 것으로 고려된다^{38, 64-67)}. 말초 혈액을 통해 계산한 LMR은 간접적으로 항종양 효과를 가진 것으로 고려되는 종양 침윤 림프구 수와 종양의 진행을 촉진할 것으로 알려진 종양 연관 대식세포 수를 반영하는 것으로 해석되는데⁴⁹⁾, 실제 낮은 LMR이 불량한 예후와 관계가 있음이 본 연구를 통해 확인되었다. 아직까지 LMR이 종양 내 미세환경을 반영한 다는 것은 증명되지 않았지만, 이전 연구에서 증가된 종양 연관 대식세포가 역형성 갑상선암의 불량한 전체생존률과 관계가 있음이 보고되었고^{31, 32)}, 본 연구에서도 낮은 LMR군에서 종양 내 대식세포가 유의하게 증가되어 있음이 확인되었다. 다만, 총 림프구 수에서는 유의한 차이가 없었고, 역형성 갑상선암에서 낮은 LMR이 91.7%로 유의하게 많았기 때문에 역형성 갑상선암의 특징일 가능성도 배제하기 어렵다. 다만, 본 연구 결과가 LMR에 대한 가설을 일부 뒷받침해 줄 수 있겠다.

이번 연구에서 시행된 면역세포 프로파일링에서는 역형성 갑상선암에서 우리가 LMR을 통해 기대하였던 대식세포의 증가뿐만 아니라 T 림프구를 비롯하여 자연살해세포, 골수유래 억제세포, 수지상세포들도 모두 증가된 것이 확인되었다. 역형성 갑상선암에서 종양 연관 대식세포가 특이적으로 증가되어 있으면, 불량한 예후와 관계되어 있음이 이미 보고되었으며, 본 연구의 결과와 일치한다^{31, 32)}, 골수유래 억제세포의 경우, 일반적으로 면역 반응 억제를 유도하는 것으로 고려되는데, 이전 연구에 따르면 정상인과 갑상선암의 혈액을 통해 검사를 시행하였을 때, 갑상선암 환자에서 골수유래 억제세포의 농도가 유의하게 높았으며, 특히 진행된 갑상선암과 역형성 갑상선암에서 그 수의 유의한 증가를 보였음이 보고되었다⁴³⁾. 이전 연구에서 보고된 바와 같이 면역억제작용을 보이는 CD56 양성인 자연살해세포와 미성숙 표현형으로 고려되는 수지상세포도 역형성암에서 증가된 것으로 확인되었다. 이처럼 각종 면역세포의 증가 소견이 역형성 갑상선암에서 확인되었는데 이에 대해서는 정확한 기전이 밝혀지지 않는으나, 과도한 사이토카인의 생산 등을 포함하는 면역탈진

상태로 추측된다⁴⁴⁾. 최근에는 자연살해세포의 기능을 회복시키는 것을 기반으로 하는 면역항암치료가 역형성 갑상선암에서 효과를 보일 수 있음이 실험 단계에서 보고되고 있다^{68, 69)}. 이전 연구에서 Giannini 등은 총 T 림프구 수가 증가되어 있는 경우를 역형성암 유사 형질로 정의하였는데, “hot pathway” 라고 명명되는 면역관문 억제 중개물질의 과도한 발현에 따르는 탈진된 T 림프구가 증가되는 것으로 보고하였다⁷⁰⁾. 본 연구에서 확인된 증가된 T 림프구 및 PD-L1의 발현을 고려하였을 때, 적절한 PD-L1 억제제를 통한 T 림프구의 재생을 유도하게 된다면 ATC 치료에 도움이 될 수 있을 것으로 생각된다.

이전에도 일부 연구에서 역형성 갑상선암의 PD-1/PD-L1 경로를 평가하고자 하는 시도가 있었다. Chintakuntlawar 등은 역형성 갑상선암에서 높은 PD-1/PD-L1의 발현이 낮은 전체생존율과 연관이 있음을 보고했다⁷¹⁾. Bastman 등은 진행성 갑상선암의 면역 프로파일을 역전사 효소-중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction), 유세포 분석(flow cytometry), 면역화학염색으로 시행하였는데, 역형성 갑상선암 환자에서 PD-L1의 발현이 높음을 보고하였다⁷²⁾. 안 등은 면역화학염색을 통해 407명의 원발성 갑상선암 환자들의 조직에서 PD-L1 발현을 확인하였는데, 분화 갑상선암에서 6-7%, 역형성 갑상선암에서 22%로 PD-L1 발현이 뚜렷하게 차이가 나는 것을 확인하였다⁷³⁾. 본 연구에서도 이전 연구와 유사하게 역형성 갑상선암에서의 PD-1/PD-L1 발현이 높은 것을 입증했으며, 추가적으로 면역항암제에 대한 치료 반응을 예측하는 데에 이용되는 TPS와 CPS 점수를 계산하여 비교하였다. 다만, 아직까지 역형성 갑상선암에서 PD-L1 억제제의 투약 효과에 대해서는 정립되지 않았다. PD-L1 억제제인 펨브롤리주맙과 항암제를 함께 투약하는 2상 연구의 경우, 총 3명의 역형성 갑상선암 환자를 대상으로 하였을 때 의미있는 임상적 효과가 없었다⁷⁴⁾. 반면, 역형성 갑상선암의 쥐를 이용한 동물 실험에서 *BRAF*^{V600E} 변이 억제제(PLX4720)와 PD-1/PD-L1 억제제의 투약이 시

너지 효과를 나타내는 보고가 있고³³⁾, *BRAF*^{V600E} 양성 환자에서 베무라페닙에 이어 니볼루맙을 투약하여 효과적으로 치료를 진행한 사례도 있다³⁴⁾. Iyer 등은 렌마티닙, 다브라페닙 혹은 트라메티닙 등을 투약하던 역형성 갑상선암 환자들에서 펌브롤리주맙을 추가하여 7개월의 전체 생존기간을 연장했음을 보고하였다¹⁶⁾. 최근에는 6명의 역형성 갑상선암 환자와 2명의 저분화 갑상선암을 대상으로 렌마티닙에 펌브롤리주맙을 투약한 연구 결과가 보고되었는데, 역형성 갑상선암 환자의 66%에 해당되는 4명에서 완전 관해를 보였으며, 저분화 갑상선암 환자 2명은 모두 부분 관해를 보였다³⁵⁾. 전체적으로 질병 무진행 생존은 17.75개월이었으며, 역형성 갑상선암 환자에서도 16.5개월의 질병 무진행 생존기간을 보여주었는데, TPS가 50% 이상인 경우 좋은 반응을 보였다. 역형성 갑상선암의 낮은 유병률로 실제 면역항암의 효과를 확인하는데 추가적인 연구와 시간이 필요하겠으나, 본 연구에서의 면역프로파일 결과가 향후, 면역항암치료를 하는 근거로 이용될 수 있겠다.

갑상선암의 예후와 관련한 유전자 변이가 여러 연구들에서 보고되었으며, *BRAF*^{V600E}과 *TERT* 프로모터 변이는 가장 대표적인 갑상선암의 예후와 관련한 변이로 알려져 있다^{60, 75-77)}. 면역 프로파일링의 1차 분석 시, *BRAF*^{V600E} 변이와 PD-L1 발현과는 상관관계가 없었는데, 이는 이전의 연구와 일치한다⁷²⁾. 반면, *TERT* 프로모터 변이 유무에 따라, PD-L1 양성 세포의 수와 TPS, CPS 수치가 유의한 차이를 보인 점은 이전 보고와 차이가 있는데, 이는 포함된 대상자가 이전 연구에서는 주로 초기 단계의 원발성 갑상선암인 반면, 본 연구에서는 진행성 갑상선암을 대상으로 했기 때문일 수 있다⁷³⁾. 아직까지 유전적 돌연변이와 PD-L1 발현과의 연관성은 입증되지 않은 상태이며, 그 기전은 불명확하다. 따라서 본 연구 결과의 해석에 있어서도 주의가 필요한데, 이는 *TERT* 프로모터 변이가 약 30% 정도였던 전이성 분화암에 비해 역형성 갑상선암에서는 그 발현이 약 70%로 높았기 때문에 *TERT* 프로모터 변이의 특성보다는 역형성 갑상

선암의 특성이 반영되었을 가능성이 있기 때문이다. 유전자 변이와 면역 세포 발현과의 상관관계에 대해서는 추가 보완 연구가 필요하겠다.

갑상선암은 성별에 따른 차이를 보이는 암으로 여성에서 유병률이 높고, 남성에서 예후가 불량한 것으로 알려져 있다⁷⁸⁾. 갑상선암에서 주로 보이는 발생률의 차이는 주로 어린이, 사춘기에 높다가 연령이 증가할수록 줄어들어, 폐경 이후 고령에서는 점차 비슷해지는 양상을 보여, 호르몬의 영향이 있을 것으로 추측된다⁷⁹⁾. 성별에 따른 호르몬의 차이는 면역 체계에도 영향을 줄 수 있는데, 에스트로겐과 테스토스테론이 면역 체계에 미치는 영향을 연구하여 남녀 성별에 따른 암의 차이를 분석하고자 하는 여러 시도들이 있었다⁸⁰⁾. 이전 보고에 따르면 에스트로겐은 주로 인터페론 감마 및 자연살해세포의 활성도를 증가시키고⁸¹⁾, 수지상세포의 분화를 촉진시키는 것으로 알려져 있다^{82, 83)}. 반대로, 테스토스테론은 일반적으로 면역억제 작용을 통해 자연살해세포의 활성도와 대식세포의 toll-like receptor 4를 감소시키는 것으로 알려져 있다^{84, 85)}. 본 연구에서는 수지상 세포만이 성별에 따른 유의한 차이를 보였는데, 에스트로겐에 의한 영향으로 고려하기에는 연구에 포함된 환자들의 연령 중앙값 61세로 고령의 남성 및 대다수가 폐경 후 여성인 점을 고려하면, 성호르몬과의 연관성을 보기에 제한이 있을 수 있겠다. 이에 대해서는 넓은 연령층에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

종양 내 미세환경을 분석하는 것은 종양-숙주 상호작용을 밝히는 기초 단계로 새로운 치료법의 개발로 이어질 수 있는 중요한 과정이다^{21, 22)}. 암의 면역학적 형질은 다양한 면역세포의 존재 유무에 따라 구별될 수 있고, 그러한 구별은 면역항암제의 대상을 찾는 데 이용될 수 있다^{70, 86)}. 과거에는 microarray, bulk RNA sequencing, fluorescence-based flow cytometry 등으로 면역프로파일을 확인하고자 하였으나, 이러한 전통적인 접근에는 많은 양의 샘플이 요구되며, 검출 신호가 중복되는 등의 한

계점이 있었다²⁸⁾. Single-cell RNA sequencing, cytometry by time of flight, multiplex IHC와 같은 최신 분석 기법이 도입되면서 전통적 한계점이 극복되었고, 이들을 조합하여 다면적인 종양의 면역프로파일링이 가능하게 되었다^{28, 87)}. 본 연구에서 이용한 F-MIHC와 MSI는 단백질 단계의 분석으로 같은 조직에서 여러 개의 표적을 분석할 수 있게 해줌으로써 종양세포의 면역프로파일링을 위한 도구로 검증되고 있다⁵⁵⁾. 아직까지는 한 번에 6개의 표적을 확인할 수 있어 본 연구에서는 1차 분석에서 PD-L1에 초점을 맞춘 림프구 중점의 분석을 시행하였고, 2차 분석에서는 대식세포 및 자연살해세포를 포함하는 면역세포 분석을 시행하였다. 이처럼 평가하고자 하는 면역세포가 많아도 2~3개의 상대적으로 적은 조직 절편을 통해 분석이 수행될 수 있기 때문에, 암세포의 면역프로파일링에 있어 가치 있는 분석방법이라 생각된다.

본 연구는 몇 가지 제한점을 가지고 있다. 첫째, 후향적 단일 기관 연구이기 때문에 선택 편향이 개입될 수 있다. 둘째, 역형성 갑상선암의 낮은 유병률로 연구에 포함된 대상자 수가 적어 통계 검정력이 약할 수 있다. 셋째, LMR의 경우 다양한 환경에서 전혈구계산이 변화될 수 있고 모든 환자에서 일정한 간격으로 시행된 것은 아니었기 때문에 채혈 시점에 따른 변동성을 배제할 수 없다. 넷째, 면역프로파일이 가능한 조직에 제한이 있었기 때문에 LMR과 면역프로파일을 직접적으로 연계하여 분석하는 데에 한계가 있었다. 다섯째, 면역 프로파일의 결과와 예후와의 연관성을 확인하지 못하였다. 그러나, 지금까지 갑상선암의 면역프로파일에 대한 연구가 거의 없기 때문에, 치명율이 높은 역형성 갑상선암 및 전이성 분화암과 같은 진행성 갑상선암에서의 추가적인 예후인자의 가능성은 보이는 LMR과 적은 조직에서 다양한 표적 세포를 확인할 수 있는 F-MIHC 및 MSI를 통해 구별되는 면역프로파일을 확인했다는 데에 큰 의미를 지닌다.

결론

본 연구에서는 진행성 갑상선암의 종양내 면역환경을 말초혈액과 종양 조직을 이용하여 확인하고자 하였다. 말초혈액에서의 LMR 값은 역형성 갑상선암과 전이성 분화암에서 모두 유의한 예후인자로 확인되었는데, 전혈구계산은 비교적 간편하게 시행될 수 있는 검사이기 때문에 향후 전향적 연구를 통해 그 가치를 확인해 볼 필요가 있겠다. 최신 분석 기법인 F-MIHC와 MSI를 이용한 조직의 면역프로파일링을 통해 림프구 및 대식세포를 포함한 각종 면역세포의 침윤이 전이성 분화암에 비해 역형성 갑상선암에서 유의하게 증가되어 있음을 보여주었다. 1차 분석을 통해 PD-L1의 발현이 역형성 갑상선암에서 두드러져 있음이 확인되었고, 이는 향후 역형성 갑상선암에서 면역항암치료가 좀 더 효과적일 수 있음을 보여준다. 2차 분석을 통해 확인된 역형성 갑상선암에서의 대식세포, 골수 유래 억제세포, 수지상세포, 자연살해세포의 증가 또한 지친 면역세포의 가능성을 보여주어 면역세포의 기능 회복을 목표로 하는 치료제의 개발에 대한 근거가 될 수 있겠다. 분석에 이용된 F-MIHC와 MSI는 비교적 적은 조직만으로도 다양한 세포를 한 번에 확인할 수 있는 분석법으로 추가적인 면역프로파일링 연구에 적극적으로 활용해볼 수 있을 것으로 생각되며, 더 많은 환자들을 포함하는 전향적인 연구를 통해 치명율이 높은 진행성 갑상선암의 새로운 치료 표적을 찾는 노력이 지속적으로 필요 하겠다.

사사 (Acknowledgement)

본 연구에 포함된 연구 결과 중 일부는 본인의 박사 과정 중 수행되어 아래에 해당되는 SCIE 저널에 투고되어 게재되었다는 사실을 밝힙니다.

1. Ahn J, Song E, Oh HS, Song DE, Kim WG, Kim TY, Kim WB, Shong YK, Jeon MJ. Low lymphocyte-to-monocyte ratios are associated with poor overall survival in anaplastic thyroid carcinoma patients. *Thyroid*. 2019;29(6):824-829
2. Ahn J, Song E, Kim WG, Kim TY, Kim WB, Shong YK, Jeon MJ. 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(1):71-76
3. Ahn J, Jin M, Song E, Ryu YM, Song DE, Kim SY, Kim TY, Kim WB, Shong YK, Jeon MJ, Kim WG. Immune profiling of advanced thyroid cancers using fluorescent multiplex immunohistochemistry. *Thyroid*. 2021 Jan;31(1):61-67.

참 고 문 헌

1. 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 : official journal of the American Thyroid Association*. 2016;26(1):1-133.
2. Busaidy NL, Cabanillas ME, Jottr. Differentiated thyroid cancer: management of patients with radioiodine nonresponsive disease. 2012;2012.
3. Kebebew E, Greenspan FS, Clark OH, Woeber KA, McMillan A. Anaplastic thyroid carcinoma. Treatment outcome and prognostic factors. *Cancer*. 2005;103(7):1330-5.
4. Viola D, Valerio L, Molinaro E, Agate L, Bottici V, Biagini A, et al. Treatment of advanced thyroid cancer with targeted therapies: ten years of experience. *Endocrine-related cancer*. 2016;23(4):R185-205.
5. Schlumberger MJ. Papillary and follicular thyroid carcinoma. *The New England journal of medicine*. 1998;338(5):297-306.
6. Kim TY, Kim WG, Kim WB, Shong YK. Current status and future perspectives in differentiated thyroid cancer. *Endocrinology and metabolism (Seoul, Korea)*. 2014;29(3):217-25.
7. Nagaiah G, Hossain A, Mooney CJ, Parmentier J, Remick SC. Anaplastic thyroid cancer: a review of epidemiology, pathogenesis, and treatment. *Journal of oncology*. 2011;2011:542358.
8. Menicali E, Guzzetti M, Morelli S, Moretti S, Puxeddu E. Immune Landscape of Thyroid Cancers: New Insights. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;11:637826-.
9. Durante C, Haddy N, Baudin E, Leboulleux S, Hartl D, Travagli JP, et al. Long-term outcome of 444 patients with distant metastases from papillary and follicular thyroid carcinoma: benefits and limits of radioiodine therapy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006;91(8):2892-9.
10. Guarino V, Castellone MD, Avilla E, Melillo RM. Thyroid cancer and inflammation. *Molecular and cellular endocrinology*. 2010;321(1):94-102.

11. Brose MS, Nutting CM, Jarzab B, Elisei R, Siena S, Bastholt L, et al. Sorafenib in radioactive iodine-refractory, locally advanced or metastatic differentiated thyroid cancer: a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet* (London, England). 2014;384(9940):319-28.
12. Schlumberger M, Tahara M, Wirth LJ, Robinson B, Brose MS, Elisei R, et al. Lenvatinib versus placebo in radioiodine-refractory thyroid cancer. *The New England journal of medicine*. 2015;372(7):621-30.
13. French JD, Bible K, Spitzweg C, Haugen BR, Ryder M. Leveraging the immune system to treat advanced thyroid cancers. *The lancet Diabetes & endocrinology*. 2017;5(6):469-81.
14. Smallridge RC, Ain KB, Asa SL, Bible KC, Brierley JD, Burman KD, et al. American Thyroid Association Guidelines for Management of Patients with Anaplastic Thyroid Cancer. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2012;22(11):1104-39.
15. C. IP, Ramona D, Renata F, L. BN, A. HM, Mark Z, et al. Real-World Experience with Targeted Therapy for the Treatment of Anaplastic Thyroid Carcinoma. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2018;28(1):79-87.
16. Iyer PC, Dadu R, Gule-Monroe M, Busaidy NL, Ferrarotto R, Habra MA, et al. Salvage pembrolizumab added to kinase inhibitor therapy for the treatment of anaplastic thyroid carcinoma. *Journal for immunotherapy of cancer*. 2018;6(1):68.
17. Subbiah V, Kreitman RJ, Wainberg ZA, Cho JY, Schellens JHM, Soria J-C, et al. Efficacy of dabrafenib (D) and trametinib (T) in patients (pts) with BRAF V600E-mutated anaplastic thyroid cancer (ATC). 2017;35(15_suppl):6023-.
18. Bible KC, Foote RL, Smallridge RC. Toward improved outcomes in patients with anaplastic thyroid cancer. *Oncology* (Williston Park, NY). 2012;26(4):398, 401, 6.
19. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;140(6):883-99.
20. Ribas A, Wolchok JD. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science* (New York, NY). 2018;359(6382):1350-5.
21. Ribas A. Adaptive Immune Resistance: How Cancer Protects from Immune Attack. *Cancer discovery*. 2015;5(9):915-9.

22. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature reviews Cancer*. 2012;12(4):252-64.
23. Manson G, Norwood J, Marabelle A, Kohrt H, Houot R. Biomarkers associated with checkpoint inhibitors. *Annals of Oncology*. 2016;27(7):1199-206.
24. Kulangara K, Zhang N, Corigliano E, Guerrero L, Waldroup S, Jaiswal D, et al. Clinical Utility of the Combined Positive Score for Programmed Death Ligand-1 Expression and the Approval of Pembrolizumab for Treatment of Gastric Cancer. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2019;143(3):330-7.
25. Mok TSK, Wu YL, Kudaba I, Kowalski DM, Cho BC, Turna HZ, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. *Lancet (London, England)*. 2019;393(10183):1819-30.
26. Feng M, Xiong G, Cao Z, Yang G, Zheng S, Song X, et al. PD-1/PD-L1 and immunotherapy for pancreatic cancer. 2017;407:57-65.
27. Massari F, Santoni M, Ciccarese C, Santini D, Alfieri S, Martignoni G, et al. PD-1 blockade therapy in renal cell carcinoma: current studies and future promises. 2015;41(2):114-21.
28. Chuah S, Chew VJJ. High-dimensional immune-profiling in cancer: implications for immunotherapy. 2020;8(1).
29. Lopes G, Wu Y-L, Kudaba I, Kowalski D, Cho BC, Castro G, et al. Pembrolizumab (pembro) versus platinum-based chemotherapy (chemo) as first-line therapy for advanced/metastatic NSCLC with a PD-L1 tumor proportion score (TPS) \geq 1%: Open-label, phase 3 KEYNOTE-042 study. 2018;36(18_suppl):LBA4-LBA.
30. Song E, Jeon MJ, Park S, Kim M, Oh HS, Song DE, et al. Influence of coexistent Hashimoto's thyroiditis on the extent of cervical lymph node dissection and prognosis in papillary thyroid carcinoma. *Clinical endocrinology*. 2018;88(1):123-8.
31. Caillou B, Talbot M, Weyemi U, Pioche-Durieu C, Al Ghuzlan A, Bidart JM, et al. Tumor-associated macrophages (TAMs) form an interconnected cellular supportive network in anaplastic thyroid carcinoma. *PLoS One*. 2011;6(7):e22567.

32. Kim DI, Kim E, Kim YA, Cho SW, Lim JA, Park YJ. Macrophage Densities Correlated with CXC Chemokine Receptor 4 Expression and Related with Poor Survival in Anaplastic Thyroid Cancer. *Endocrinology and metabolism (Seoul, Korea)*. 2016;31(3):469-75.
33. Gunda V, Gigliotti B, Ndishabandi D, Ashry T, McCarthy M, Zhou Z, et al. Combinations of BRAF inhibitor and anti-PD-1/PD-L1 antibody improve survival and tumour immunity in an immunocompetent model of orthotopic murine anaplastic thyroid cancer. *British journal of cancer*. 2018;119(10):1223-32.
34. Kollipara R, Schneider B, Radovich M, Babu S, Kiel PJ. Exceptional Response with Immunotherapy in a Patient with Anaplastic Thyroid Cancer. *The oncologist*. 2017;22(10):1149-51.
35. Dierks C, Seufert J, Aumann K, Ruf J, Klein C, Kiefer S, et al. Combination of lenvatinib and pembrolizumab is an effective treatment option for anaplastic and poorly differentiated thyroid carcinoma. 2021;31(7):1076-85.
36. Lazarus J, Maj T, Smith JJ, Lanfranca MP, Rao A, D'Angelica MI, et al. Spatial and phenotypic immune profiling of metastatic colon cancer. 2018;3(22).
37. Varn FS, Tafe LJ, Amos CI, Cheng CJO. Computational immune profiling in lung adenocarcinoma reveals reproducible prognostic associations with implications for immunotherapy. 2018;7(6):e1431084.
38. Chanmee T, Ontong P, Konno K, Itano N. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers*. 2014;6(3):1670-90.
39. Fang W, Ye L, Shen L, Cai J, Huang F, Wei Q, et al. Tumor-associated macrophages promote the metastatic potential of thyroid papillary cancer by releasing CXCL8. *Carcinogenesis*. 2014;35(8):1780-7.
40. Cunha LL, Morari EC, Guihen AC, Razolli D, Gerhard R, Nonogaki S, et al. Infiltration of a mixture of immune cells may be related to good prognosis in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Clinical endocrinology*. 2012;77(6):918-25.
41. French JD, Weber ZJ, Fretwell DL, Said S, Klopper JP, Haugen BR. Tumor-associated lymphocytes and increased FoxP3+ regulatory T cell frequency correlate with more aggressive papillary thyroid cancer. *The*

- Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2010;95(5):2325-33.
42. Scarpino S, Stoppacciaro A, Ballerini F, Marchesi M, Prat M, Stella MC, et al. Papillary carcinoma of the thyroid: hepatocyte growth factor (HGF) stimulates tumor cells to release chemokines active in recruiting dendritic cells. 2000;156(3):831-7.
 43. Suzuki S, Shibata M, Gonda K, Kanke Y, Ashizawa M, Ujiie D, et al. Immunosuppression involving increased myeloid-derived suppressor cell levels, systemic inflammation and hypoalbuminemia are present in patients with anaplastic thyroid cancer. *Mol Clin Oncol*. 2013;1(6):959-64.
 44. Yin M, Di G, Bian M. Dysfunction of natural killer cells mediated by PD-1 and Tim-3 pathway in anaplastic thyroid cancer. *International Immunopharmacology*. 2018;64:333-9.
 45. Porrata LF, Ristow K, Colgan JP, Habermann TM, Witzig TE, Inwards DJ, et al. Peripheral blood lymphocyte/monocyte ratio at diagnosis and survival in classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*. 2012;97(2):262-9.
 46. Hu RJ, Ma JY, Hu G. Lymphocyte-to-monocyte ratio in pancreatic cancer: Prognostic significance and meta-analysis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2018;481:142-6.
 47. Li W, Ma G, Wu Q, Deng Y, Liu Y, Wang J. Prognostic value of lymphocyte-to-monocyte ratio among Asian lung cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(66):110606-13.
 48. Lin ZX, Ruan DY, Li Y, Wu DH, Ma XK, Chen J, et al. Lymphocyte-to-monocyte ratio predicts survival of patients with hepatocellular carcinoma after curative resection. *World journal of gastroenterology*. 2015;21(38):10898-906.
 49. 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 treatment reviews*. 2015;41(10):971-8.
 50. Ozawa T, Ishihara S, Kawai K, Kazama S, Yamaguchi H, Sunami E, et al. Impact of a lymphocyte to monocyte ratio in stage IV colorectal cancer. *The Journal of surgical research*. 2015;199(2):386-92.
 51. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Muller BM, Komor M, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response

- to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(1):105-13.
52. Pages F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molidor R, et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2005;353(25):2654-66.
 53. Man YG, Stojadinovic A, Mason J, Avital I, Bilchik A, Bruecher B, et al. Tumor-infiltrating immune cells promoting tumor invasion and metastasis: existing theories. *Journal of Cancer*. 2013;4(1):84-95.
 54. 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. *Endocrine-related cancer*. 2008;15(4):1069-74.
 55. Parra ER, Uraoka N, Jiang M, Cook P, Gibbons D, Forget MA, et al. Validation of multiplex immunofluorescence panels using multispectral microscopy for immune-profiling of formalin-fixed and paraffin-embedded human tumor tissues. *Scientific reports*. 2017;7(1):13380.
 56. Mezheyeuski A, Bergsland CH, Backman M, Djureinovic D, Sjoblom T, Bruun J, et al. Multispectral imaging for quantitative and compartment-specific immune infiltrates reveals distinct immune profiles that classify lung cancer patients. *The Journal of pathology*. 2018;244(4):421-31.
 57. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). 2009;45(2):228-47.
 58. Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, et al. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8 ed. New York: Springer International Publishing; 2017.
 59. Burtneess B, Harrington KJ, Greil R, Soulieres D, Tahara M, de Castro G, Jr, et al. Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet (London, England)*. 2019;394(10212):1915-28.
 60. Song E, Song DE, Ahn J, Kim TY, Kim WB, Shong YK, et al. Genetic profile of advanced thyroid cancers in relation to distant metastasis. *Endocrine-related cancer*. 2020. doi: 10.1530/erc-19-0452.

61. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):436-44.
62. Huh JW, Lee JH, Kim HR. Prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes for patients with colorectal cancer. *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960)*. 2012;147(4):366-72.
63. Stotz M, Pichler M, Absenger G, Szkandera J, Arminger F, Schaberl-Moser R, et al. The preoperative lymphocyte to monocyte ratio predicts clinical outcome in patients with stage III colon cancer. *British journal of cancer*. 2014;110(2):435-40.
64. Lee YY, Choi CH, Sung CO, Do IG, Huh S, Song T, et al. Prognostic value of pre-treatment circulating monocyte count in patients with cervical cancer: comparison with SCC-Ag level. *Gynecologic oncology*. 2012;124(1):92-7.
65. Koh YW, Shin SJ, Park C, Yoon DH, Suh C, Huh J. Absolute monocyte count predicts overall survival in mantle cell lymphomas: correlation with tumour-associated macrophages. *Hematological oncology*. 2014;32(4):178-86.
66. Steidl C, Lee T, Shah SP, Farinha P, Han G, Nayar T, et al. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *The New England journal of medicine*. 2010;362(10):875-85.
67. Tsutsui S, Yasuda K, Suzuki K, Tahara K, Higashi H, Era S. Macrophage infiltration and its prognostic implications in breast cancer: the relationship with VEGF expression and microvessel density. *Oncology reports*. 2005;14(2):425-31.
68. Wennerberg E, Pfefferle A, Ekblad L, Yoshimoto Y, Kremer V, Kaminsky VO, et al. Human Anaplastic Thyroid Carcinoma Cells Are Sensitive to NK Cell-Mediated Lysis via ULBP2/5/6 and Chemoattract NK Cells. *Clinical Cancer Research*. 2014;20(22):5733-44.
69. Zhu L, Li XJ, Kalimuthu S, Gangadaran P, Lee HW, Oh JM, et al. Natural Killer Cell (NK-92MI)-Based Therapy for Pulmonary Metastasis of Anaplastic Thyroid Cancer in a Nude Mouse Model. 2017;8.
70. Giannini R, Moretti S, Ugolini C, Macerola E, Menicali E, Nucci N, et al. Immune Profiling of Thyroid Carcinomas Suggests the Existence of Two Major Phenotypes: An ATC-Like and a PDTC-Like. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2019;104(8):3557-75.

71. Chintakuntlawar AV, Rumilla KM, Smith CY, Jenkins SM, Foote RL, Kasperbauer JL, et al. Expression of PD-1 and PD-L1 in Anaplastic Thyroid Cancer Patients Treated With Multimodal Therapy: Results From a Retrospective Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2017;102(6):1943-50.
72. Bastman JJ, Serracino HS, Zhu Y, Koenig MR, Mateescu V, Sams SB, et al. Tumor-Infiltrating T Cells and the PD-1 Checkpoint Pathway in Advanced Differentiated and Anaplastic Thyroid Cancer. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2016;101(7):2863-73.
73. Ahn S, Kim TH, Kim SW, Ki CS, Jang HW, Kim JS, et al. Comprehensive screening for PD-L1 expression in thyroid cancer. *Endocrine-related cancer*. 2017;24(2):97-106.
74. Chintakuntlawar AV, Yin J, Foote RL, Kasperbauer JL, Rivera M, Asmus E, et al. A Phase 2 Study of Pembrolizumab Combined with Chemoradiotherapy as Initial Treatment for Anaplastic Thyroid Cancer. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2019;29(11):1615-22.
75. Melo M, da Rocha AG, Vinagre J, Batista R, Peixoto J, Tavares C, et al. TERT promoter mutations are a major indicator of poor outcome in differentiated thyroid carcinomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2014;99(5):E754-65.
76. Melo M, Gaspar da Rocha A, Batista R, Vinagre J, Martins MJ, Costa G, et al. TERT, BRAF, and NRAS in Primary Thyroid Cancer and Metastatic Disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2017;102(6):1898-907.
77. Kim TH, Park YJ, Lim JA, Ahn HY, Lee EK, Lee YJ, et al. The association of the BRAF(V600E) mutation with prognostic factors and poor clinical outcome in papillary thyroid cancer: a meta-analysis. *Cancer*. 2012;118(7):1764-73.
78. Sex Differences in Differentiated Thyroid Cancer. 2022;32(3):224-35.
79. Kilfoy BA, Devesa SS, Ward MH, Zhang Y, Rosenberg PS, Holford TR, et al. Gender is an age-specific effect modifier for papillary cancers of the thyroid gland. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(4):1092-100.
80. Klein SL, Flanagan KLJNRI. Sex differences in immune responses. 2016;16(10):626-38.

81. Nakaya M, Tachibana H, Yamada KJB, biotechnology,, biochemistry. Effect of estrogens on the interferon- γ producing cell population of mouse splenocytes. 2006;70(1):47-53.
82. Paharkova-Vatchkova V, Maldonado R, Kovats SJToI. Estrogen preferentially promotes the differentiation of CD11c+ CD11bintermediate dendritic cells from bone marrow precursors. 2004;172(3):1426-36.
83. Kovats SJH, behavior. Estrogen receptors regulate an inflammatory pathway of dendritic cell differentiation: mechanisms and implications for immunity. 2012;62(3):254-62.
84. Leimgruber C, Quintar AA, García LN, Petiti JP, De Paul AL, Maldonado CAJJoep. Testosterone abrogates TLR4 activation in prostate smooth muscle cells contributing to the preservation of a differentiated phenotype. 2013;228(7):1551-60.
85. Rettew JA, Huet-Hudson YM, Marriott IJBor. Testosterone reduces macrophage expression in the mouse of toll-like receptor 4, a trigger for inflammation and innate immunity. 2008;78(3):432-7.
86. Teng MW, Ngiow SF, Ribas A, Smyth MJ. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. Cancer research. 2015;75(11):2139-45.
87. Zhong R, Zhang Y, Chen D, Cao S, Han B, Zhong HJCI, Immunotherapy. Single-cell RNA sequencing reveals cellular and molecular immune profile in a Pembrolizumab-responsive PD-L1-negative lung cancer patient. 2021;70(8):2261-74.

영 문 요 약

Background: Analysis of the tumor microenvironment is a fundamental step in uncovering the details of tumor-host interactions that can lead to the development of novel therapies. Advanced thyroid cancers, including differentiated thyroid carcinoma (DTC) with distant metastasis, poorly differentiated thyroid carcinoma, and anaplastic thyroid carcinoma (ATC), are associated with poor clinical outcomes and limited treatment options. This study aimed to determine the immune profiles of advanced thyroid cancers using the lymphocyte-to-monocyte ratio (LMR) and fluorescent multiplex immunohistochemistry (F-MIHC) and multispectral imaging (MSI).

Method: We included patients aged over 18 years old who had pathologically confirmed diagnoses of DTC with distant metastasis or ATC between 1994 and 2020, at the Asan Medical Center, Seoul, Korea. We retrospectively analyzed patients with ATC or progressive radioactive iodine-refractory (RAIR) DTC who were treated by sorafenib with available baseline complete blood cell count (CBC) data. By ROC analysis, we sub-classified the patients into two groups: the low LMR group with $LMR < 4$ and the high LMR group with $LMR \geq 4$. We assessed the response rate, progression-free survival (PFS), and overall survival (OS) according to the LMR.

To analysis of immune profiling, we included patients who could make additional tissue blocks through review of tissue slides by endocrinology pathologist. The samples were assessed using F-MIHC and MSI with antibodies against the cell surface molecules, cluster of differentiation (CD) 4, CD8, programmed cell death (PD-1), PD ligand 1 (PD-L1), forkhead box protein (Foxp)3, and cytokeratin (CK) for first analysis and CD3, CD11c, CD56, CD68, CD33 for second analysis. The expression of PD-L1 was evaluated using tumor proportion (TPS) and combined positive (CPS) scores.

Results: Among 35 patients with ATC, the OS curves were significantly different based on the LMR values, and the median OS of the low and high LMR groups was

3.0 and 9.5 months, respectively ($p=0.004$). In multivariate analysis, low LMR was also an independent risk factor for all-cause mortality in patients with ATC (HR, 2.55; 95% confidence interval (CI): 1.08-6.00, $p=0.032$) after adjusting for sex, tumor size and distant metastasis status. In 40 patients with progressive RAIR DTC, low LMR was associated with poor response rate and shorter disease control duration with sorafenib. The PFS curves differed significantly based on the LMR values and the median PFS of the low and high LMR groups ($p=0.019$). The OS curves also differed significantly based on the LMR. The median OS of the low LMR group was 24.3 months and that of the high LMR group was not reached until the end of observation period ($p=0.015$). In multivariate analysis, low LMR was an independent risk factor for all-cause mortality in patients with progressive RAIR DTC (hazard ratio [HR], 2.64; 95% confidence interval [CI]: 1.04–6.72, $p=0.041$).

In first analysis of immune profiling including PD-L1, total 28 patients (16 ATC, 12 DTC) were included. Significantly more PD-L1-positive tumor cells (CK+PD-L1+) per mm² were found in ATC than in DTC samples (183.5 vs. 0.03, $p<0.001$). Lymphocyte infiltration was significantly increased in ATC compared with DTC with significantly more PD-L1 or PD-1-positive lymphocytes in ATC than in DTC samples. Notably, TPS and CPS indicated that PD-L1 expression was negative in all DTC samples but positive in 81% and 94% of ATC samples, respectively. In second analysis of immune profiling including macrophage, total 19 patients (12 ATC, 7 DTC) were included. Significantly more T lymphocytes ($p=0.006$), natural killer cells ($p=0.038$), macrophage ($p<0.001$), myeloid-derived suppressor cells ($p=0.003$) and dendritic cells ($p=0.002$) were found in ATC than in DTC samples. There was no significant difference of immune cell according to sex, except dendritic cell. Dendritic cell was significantly increased in female compared with male (107 vs. 13, $p=0.044$). More macrophages were found significantly in low LMR than in high LMR (706 vs. 149, $p=0.012$), whereas lymphocyte was no significantly different according to LMR.

Conclusion: Low LMR is associated with poor survival in patients with ATC and progressive RAIR DTC. LMR could be a simple and stable prognostic biomarker

reflecting host immunity in patients with progressive thyroid carcinoma. Immune profiling revealed significant differences between advanced DTC and ATC, particularly in terms of PD-L1 expression and lymphocyte infiltration. Therefore, immune profiling using F-MIHC and MSI can provide invaluable information regarding tumor microenvironments, which could help select candidates for immunotherapy and create new targeted treatments for thyroid cancer.

Key words: anaplastic thyroid carcinoma, metastatic differentiated thyroid carcinoma, lymphocyte-to-monocyte ratio, immune profiling