

# YTHDF1 and YTHDF2 are associated with better patient survival and an inflamed tumor-immune microenvironment in non-small-cell lung cancer

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2022-03-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 土屋, 一夫 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/00004106">http://hdl.handle.net/10271/00004106</a>

博士（医学） 土屋 一夫

論文題目

YTHDF1 and YTHDF2 are associated with better patient survival and an inflamed tumor-immune microenvironment in non-small-cell lung cancer

（YTHDF1 および YTHDF2 は、非小細胞肺癌患者における生存率の向上および腫瘍-免疫微小環境の炎症と関連している）

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

DNA やヒストンが修飾を受けるエピゲノムと同様に、近年の生物学的な発見として DNA の転写産物である RNA が修飾を受けるエピトランスクリプトームが注目を集めている。中でも RNA のメチル化である N6-メチルアデノシン (m6A) がもっとも研究されており、その修飾に関わるタンパク質は 26 種類ほど知られている。YTH ドメインファミリー (YTHDF) タンパク質は、m6A を認識する RNA 結合タンパク質であり、m6A RNA 修飾を介して様々な生物学的プロセスを制御する。YTHDF1 は、翻訳開始因子やリボソームと相互に作用して、タンパク質合成を積極的に促進し、YTHDF2 は m6A を認識し、標的 mRNA の転写産物の安定性を低下させることが知られている。しかし、これらの分子が非小細胞肺癌の病態にどのように関連するかは、依然として完全には解明されていない。本研究では、まず非小細胞肺癌切除標本を用いて、YTHDF1 および YTHDF2 の発現と腫瘍・免疫微小環境との関連を検証し、臨床的意義を検討した。次に、肺癌細胞株における YTHDF1 および YTHDF2 の発現抑制の効果を、PD-L1 の変化および免疫に関連する遺伝子の発現への影響という観点から検討した。

〔材料ならびに方法〕

非小細胞肺癌の切除検体の組織マイクロアレイを作成し、YTHDF1 抗体および YTHDF2 抗体を用いて免疫組織化学的にタンパク質発現レベルを評価した (n = 603)。これらの属性と患者特性および予後との関係を解析した。また、腫瘍巣とその周囲の間質における腫瘍浸潤リンパ球として、4 つのリンパ球サブセット (PD-1+, CD8+, Foxp3+, CD45RO+) を別々に評価し、YTHDF1 および YTHDF2 の発現との関連を調べた。さらに、YTHDF1 および YTHDF2 を発現抑制した肺癌細胞株 (PC9, A549, H1299) で、細胞増殖能、遊走能、アポトーシスを解析し、加えて、nCounter 解析を用いた遺伝子発現パネルで差別的遺伝子発現解析を行った。これらの結果から絞り込んだ差別的発現遺伝子のうち、YTHDF1 および YTHDF2 の発現抑制による PD-L1 の発現変化をウェスタンブロッティングで確認した。さらにこれらの細胞株を用い、インターフェロン  $\gamma$  刺激下での PD-L1 の発現をフローサイトメトリーで評価した。本研究は浜松医科大学の臨床研究倫理委員会で承認され実施された (承認番号 #20-011)。

〔結果〕

免疫染色で評価した YTHDF1 および YTHDF2 の発現強度は、非腫瘍部よりも腫瘍部で高かった。また、YTHDF1 および YTHDF2 の発現状況と患者背景の比較を行うと YTHDF1、YTHDF2 とともに、進行した病期の腫瘍では早期の病期の腫瘍に比べて発現が少なかった。また YTHDF1 と YTHDF2 の発現は、無再発生存の独立した予後因子となった (YTHDF1、ハザード比: 0.745、95%信頼区間: 0.562-0.984; YTHDF2、ハザード比: 0.683、95%信頼区間: 0.503-0.928)。間質における腫瘍浸潤リンパ球は、4つのリンパ球サブセットのほとんどで、YTHDF1 および YTHDF2 が高発現している腫瘍の周囲の間質で有意に高かった。培養細胞を用いた実験では、YTHDF1 および YTHDF2 の発現抑制が肺がん細胞株の細胞増殖能を抑制した。また YTHDF1 および YTHDF2 の発現抑制は、PC9 および H1299 細胞においてはアポトーシス細胞数を増加させた。さらに遺伝子発現パネルを用いた差別的発現遺伝子解析の結果から、YTHDF1 および YTHDF2 を発現抑制すると、*PD-L1* 発現が上昇し、複数の免疫関連遺伝子が増加することを発見した。さらに YTHDF1 および YTHDF2 の発現抑制により増加する PD-L1 は、インターフェロン $\gamma$  の刺激によっても発現が上昇した。

#### [考察]

他の研究で、腫瘍特異的変異抗原が YTHDF1 によって制御されており、大腸がんの YTHDF1 欠損マウスでは抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の抗腫瘍反応が上昇することが報告されている。我々の研究では対照的に、YTHDF1 高発現群と YTHDF2 高発現群の腫瘍浸潤リンパ球の CD8 陽性細胞を含めたほぼすべてのサブセットが、腫瘍関連間質において高いことを示した。この違いは、がん腫により RNA 結合タンパク質の標的遺伝子が異なることで説明できるかもしれない。さらに、PD-L1 の発現が YTHDF1 および YTHDF2 を発現抑制した肺がん細胞株で上昇していた。これらの結果は、腫瘍浸潤リンパ球の高発現と共抑制分子である PD-L1 の発現の低下が、YTHDF1 および YTHDF2 高発現の非小細胞肺がんにおける予後改善に影響を与えた可能性について新しい示唆を与えた。我々の研究にはいくつかの限界がある。第一に、我々の細胞培養実験は、腫瘍の微小環境を再現することができず、生体内の観察を正確に反映していない可能性がある。第二に、この研究では、基盤となる分子メカニズム、特に m6A RNA 修飾との関連については精査しておらず、*PD-L1* や免疫関連分子が m6A を介した YTHDF1 および YTHDF2 の直接の標的遺伝子であるのか検証できていない。YTHDF1 および YTHDF2 の発現変化による腫瘍の微小環境関連遺伝子の転写物およびタンパク質の m6A を介した制御についてはさらなる研究を行う余地がある。

#### [結論]

YTHDF1 と YTHDF2 の高発現は、非小細胞肺がん患者の良好な予後、腫瘍浸潤リンパ球の高発現、および PD-L1 の発現抑制と関連していることが示された。YTHDF1 および YTHDF2 は、肺がんにおける腫瘍免疫微小環境に関連する新規の予後予測および薬剤のターゲットとなる可能性がある。