

氏 名 うっちえ しすか
Ucche Sisca

学位の種類 博士 (薬科学)

学位記番号 富医薬博甲第 422 号

学位授与年月日 令和 5 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士後期課程
薬科学専攻

学位論文題目 GSTA4 governs melanoma cell resistance to anti-tumor immunity
(GSTA4 はメラノーマ細胞の抗腫瘍免疫応答に対する抵抗性を制御する)

論文審査委員

(主査) 教授 櫻井 宏明
(副査) 教授 宗 孝紀
(副査) 教授 早川 芳弘 (指導教員)

論 文 要 旨

論文題目 GSTA4 governs melanoma cell resistance to anti-tumor immunity
課程・専攻名 博士後期課程・薬科学専攻
氏名 : Ucche Sisca

Cancer immunotherapy, such as immune checkpoint blockade (ICB), has been successful for many types of cancer including melanoma; however, unresponsiveness to ICB remains as a major obstacle to realizing further clinical benefit. While the primary immune resistance of cancer cells might be caused by their low immunogenicity and/or expression of immune-suppressive phenotypes, an acquired immune resistance mechanism against cancer immune therapy has not been well understood. Among factors involved in cancer cells escaping from immune responses, an intrinsic defect in the IFN- γ response is considered as one of the major players allowing cancer cells to evade host immunity. In this study, I aim to understand an acquired resistance mechanism of melanoma cells to antigen-specific anti-tumor immunity.

Firstly, to understand the immunological status of tumor antigen-specific CD8⁺ T cells in the tumor microenvironment during tumor progression, we established a bioluminescence imaging model to monitor the interplay between occult immunogenic tumor and host anti-tumor immunity. Using mouse B16 melanoma cells expressing ovalbumin (OVA) and luciferase (B16OVA-luc2 cells), we monitored the status of B16OVA-luc2 melanoma cells in mice immunized with a model tumor antigen ovalbumin (OVA). We found that the cell growth was biphasic during tumor progression: initial progression, suppressed by a CD8⁺ T cell-dependent immune response, and thereafter showed secondary progression by escaping from host immunity in OVA-immunized mice¹.

We next generated cell lines after in vivo passage through distinct immunological conditions. B16OVA-luc2 tumors exposed to OVA-specific CD8⁺ T cell immunity in OVA-immunized B6 mice were isolated, and we established five variants (IMM1, 2, 5, 6, and 8 cell lines). For comparison, B16OVA-luc2 tumors from non-immunized naïve B6 mice or OVA-immunized IFN- γ -deficient mice were also isolated, and we established four variants, namely NIMM (1, 3, 4, 5) cell lines or GKO-IMM (1, 2, 3, 4) cell lines, respectively. To test the capacity of those different variants for immunogenicity, those cell lines were re-challenged in OVA-immunized B6 mice. In contrast to NIMM and GKO-IMM cell lines, IMM cell lines showed progressive growth in OVA-immunized mice upon re-challenge and specifically lost their OVA antigen expression. Furthermore, we found that IMM cell lines gained resistance to the IFN- γ -induced oxidative stress response. By subjecting those different cell lines to DNA microarray analysis, we found the expression of GSTA4 was highly up-regulated in the IMM cells compared to the parental or other control (NIMM or GKO-IMM) cell lines. To further determine the functional role of GSTA4 in protecting the IMM cells from oxidative stress, we established the B16OVA cell line overexpressing GSTA4 (GSTA4

OE) or IMM cell line knocking down GSTA4 (shGSTA4). GSTA OE cell lines showed resistance to the IFN- γ -induced-oxidative stress. In addition, shGSTA4 cell lines showed to be sensitive to IFN- γ -induced oxidative stress responses. In addition, the growth of GSTA4 OE cells was more aggressive than that of parental B16OVA cells in the OVA-immunized B6 mice. Furthermore, shGSTA4 cells reinvigorated the responsiveness to anti-PD-1 treatment in vivo. Importantly, melanoma patients with low GSTA4 expression were better responders and showed better progression-free survival rates to anti-PD-1 therapy².

Collectively, these studies show how to identify the immunological status of tumor antigen-specific CD8⁺ T cells in the tumor microenvironment during tumor progression and highlight a novel mechanism whereby cancer cells escape from host immunity by acquiring resistance to oxidative stress responses through the upregulation of GSTA4.

参考文献：

1. Mojic, M., Shitaoka, K., Ohshima, C., Uche, S., Lyu, F., Hamana, H., Tahara, H., Kishi, H., & Hayakawa, Y. (2021). NKG2D defines tumor-reacting effector CD8⁺ T cells within tumor microenvironment. *Cancer science*, *112*(9), 3484–3490. <https://doi.org/10.1111/cas.15050>
2. Uche, S., Yokoyama, S., Mojic, M., Oki, K., Ohshima, C., Tsuihiji, H., Takasaki, I., Tahara, H., & Hayakawa, Y. (2023). GSTA4 governs melanoma immune resistance and metastasis. *Molecular cancer research : MCR*, *21*(1), 76–85. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-22-0369>

学位論文審査の要旨

報告番号	富医薬博甲第 号 富医薬博乙第 号	氏 名	Ucche Sisca
審査委員	職 名 (主査) 教 授 (副査) 教 授 (副査) 教 授	氏 名 櫻井 宏明 宗 孝紀 早川 芳弘	
(論文題目) (英語の場合は和訳, 日本語の場合は英訳を付記すること。英語(訳)は, 最初の文字のみを大文字で表記し, 他は小文字で表記すること(ただし, 学名等を除く。)) GSTA4 governs melanoma cell resistance to anti-tumor immunity (GSTA4 はメラノーマ細胞の抗腫瘍免疫応答に対する抵抗性を制御する)		(判定) 合格	
(論文審査の要旨) (2 頁以内) <p>一般的にがん細胞は正常細胞と比べて可塑性が高く、不均一な細胞集団であるため、化学療法剤や分子標的治療薬、放射線療法などの治療に対してがん細胞が抵抗性を獲得することや、転移能の獲得による悪性化進展が見られる。一方、がんの発症の過程において、生体防御機構である免疫応答による監視（免疫監視）を回避する能力を有するがん細胞の選択が起きる事は、「がん免疫エディティング」の概念として広く知られており、この過程においてもがん細胞自身が抗腫瘍免疫応答に対して抵抗性（耐性、不応答性）を獲得することが推察される。実際にこれまでの研究から、がん抗原特異的な免疫応答に対して、がん細胞はがん抗原そのものや、抗原提示分子（MHC）の発現低下、宿主免疫T細胞の疲弊や抑制性免疫細胞の誘導など、様々な要因によって免疫監視から逃避することが指摘されている。しかしながら、がん細胞がどのような分子メカニズムによって免疫応答からの排除に対して抵抗性を獲得するのか、その詳細については明らかでなく重要な研究課題である。</p> <p>これらを背景として、申請者は本論文において、マウスメラノーマ細胞を宿主免疫応答に曝露し、免疫監視を逃避したバリエーション細胞株を新たに樹立し、この免疫逃避バリエーション細胞の免疫エフェクター分子であるIFN-γに対する応答性、ならびに遺伝子発現解析を行なうことにより、抗腫瘍免疫応答に抵抗性を獲得するための重要な分子としてグルタチオン-S-トランスフェラーゼ A4 (GSTA4) を同定した。さらにこの細胞内の酸化ストレス応答に関わる分子であるGSTA4の過剰発現が、メラノーマ細胞の免疫応答に対する抵抗性と遠隔臓器への転移能を獲得するために重要であることを<i>in vitro</i>と<i>in vivo</i>の実験系を用いて明らかにした。</p> <p>申請者は、まず、マウスのメラノーマB16細胞に抗原分子として卵白アルブミン(OVA)を強制発現させたB16OVA細胞株を、OVAで免疫して抗腫瘍免疫応答を亢進させた宿主となるC57BL/6 (B6)マウスに接種した。このOVA免疫マウスでは接種したB16OVA細胞に対してCD8⁺ T細胞とIFN-γ依存性に腫瘍増殖の抑制が認められたが、最終的に移植したがん細胞はこれら抗原特異的宿主免疫応答を逃避して腫瘍増大を示した。この免疫逃避した腫</p>			

瘍を*in vitro*で培養することで、免疫逃避バリエーションと細胞株を樹立した。これら免疫逃避バリエーション細胞株と比較するため、非免疫マウス、ならびにOVA免疫IFN- γ 欠損マウスからも同様に腫瘍からバリエーション細胞株を樹立した。これら異なる宿主免疫環境を経験したバリエーション細胞株の*in vitro*におけるIFN- γ への応答性を比較したところ、OVA免疫B6マウスから樹立した免疫逃避バリエーション細胞株のみがIFN- γ で誘導される細胞増殖抑制作用や酸化ストレス応答に対して抵抗性を示した。またこれら異なる宿主免疫環境を経験したバリエーション細胞株の遺伝子発現をDNAマイクロアレイ法により解析した結果、特にIFN- γ 応答に対して抵抗性を示した免疫逃避バリエーションIMM細胞株において、最も発現が上昇した遺伝子として細胞内の酸化ストレス応答に関わる分子であるGSTA4を見出した。さらに、免疫逃避メラノーマ細胞バリエーションIMM細胞株におけるGSTA4の過剰発現とIFN- γ 応答抵抗性の関係を明らかにするため、GSTA4のshRNA導入による発現抑制細胞、またはGSTA4過剰発現細胞株を作成して*in vitro*におけるIFN- γ 応答性について検討した。これらの検討の結果、GSTA4の発現上昇が悪性黒色腫細胞の免疫応答に対する抵抗性の獲得に重要な因子であることを見出した。またGSTA4を高発現する免疫抵抗性のIMM細胞株は、マウスを用いた実験モデルにおいて免疫チェックポイント阻害剤である抗PD-1抗体による治療やOVAによるワクチン療法に対して不応答であったが、それらのGSTA4ノックダウン細胞株では、ともに抗腫瘍効果が認められた。さらにヒトメラノーマ細胞株でのGSTA4発現とそれらの*in vitro*におけるIFN- γ への応答性に相関があること、またヒト臨床データの再解析によってGSTA4遺伝子発現が高いメラノーマ患者においては免疫チェックポイント阻害剤での治療後の予後が悪いことが示唆された。

以上、申請者は本論文において、メラノーマ細胞の免疫応答に対する抵抗性を獲得するためにGSTA4が重要であることを明らかにした。本研究結果は、今後 GSTA4をターゲットとした新たながん治療法の開発や、他のがん腫における免疫抵抗性に関わるメカニズムの理解へと繋がる可能性がある重要な発見であると評価できる。主査及び副査は、申請者 Ucche Sisca 氏の本学位論文の内容を精査するとともに面接審査を行い、Ucche Sisca 氏が博士（薬科学）の学位を受けるに十分に値すると判断した。

(学位論文のもとになる論文 著者名, 論文題目, 掲載誌名, 巻, 最初の頁と最後の頁, 年を記載)

1. Mojic, M., Shitaoka, K., Ohshima, C., Ucche, S., Lyu, F., Hamana, H., Tahara, H., Kishi, H., & Hayakawa, Y. (2021). NKG2D defines tumor-reacting effector CD8⁺ T cells within tumor microenvironment. *Cancer Science*, 112(9), 3484–3490.
2. Ucche, S., Yokoyama, S., Mojic, M., Oki, K., Ohshima, C., Tsuihiji, H., Takasaki, I., Tahara, H., & Hayakawa, Y. (2022). GSTA4 governs melanoma immune resistance and metastasis. *Molecular Cancer Research*, 3;21(1):76-85