

# 热激蛋白 gp96 免疫学功能及在主动免疫治疗肿瘤和传染病中的应用

徐亚星, 王赛锋, 张小俊, 孟颂东

中国科学院微生物研究所 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

徐亚星, 王赛锋, 张小俊, 等. 热激蛋白 gp96 免疫学功能及在主动免疫治疗肿瘤及传染病中的应用. 生物工程学报, 2012, 28(3): 261–266.

Xu YX, Wang SF, Zhang XJ, et al. Immune activity of heat shock protein gp96 and its application in active immunotherapy for tumor and infectious diseases. Chin J Biotech, 2012, 28(3): 261–266.

**摘 要:** 热激蛋白 gp96 可特异性结合来源于肿瘤和病毒的抗原肽, 与抗原呈递细胞表面 CD91 等受体作用进入胞内, 并在内质网中将结合的抗原通过抗原呈递链呈递给 MHC I 类分子, 激活特异性 T 细胞。同时, 与细胞表面 Toll 样受体 (TLR) TLR2、TLR4 等相互作用, 激活天然免疫。近期研究发现调节性 T 细胞 (Treg) 对 gp96 免疫功能有显著抑制作用, 随着对影响 gp96 免疫功能的免疫抑制机制的深入了解, 以及利用汉逊酵母表达有免疫活性的全长 gp96 蛋白体系的建立, gp96 将在治疗肿瘤及传染性疾病中发挥更大的作用。

**关键词:** gp96, T 细胞, 调节性 T 细胞, 肿瘤, 传染病

## Immune activity of heat shock protein gp96 and its application in active immunotherapy for tumor and infectious diseases

Yaxing Xu, Saifeng Wang, Xiaojun Zhang, and Songdong Meng

CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

**Abstract:** Heat-shock protein gp96 associates with antigenic peptides derived from tumor and virus. Exogenous gp96-peptide

**Received:** December 7, 2011; **Accepted:** January 6, 2012

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 30970146, 91029724, 81021003).

**Corresponding author:** Songdong Meng. Tel: +86-10-64807350; E-mail: mengsd@im.ac.cn

国家自然科学基金 (Nos. 30970146, 91029724, 81021003) 资助。

complexes are taken up by antigen-presenting cells through interaction with its receptor CD91 on the cell surface, and cross-present antigenic peptides to MHC class I molecules by a peptide relay line in the endoplasmic reticulum for specific T-cell activation. Meanwhile, gp96 has been shown to initiate innate immune responses through interaction with toll-like receptor 2 and toll-like receptor 4. Recent studies have shown a gp96-mediated immune balance between CTL and Tregs. With the further understanding of counteracting immunosuppressive mechanisms in gp96-induced cellular immune responses, and establishment of high level production of recombinant gp96 by the yeast, gp96 appears to be a promising candidate for designing effective therapeutic vaccines against tumor and infectious diseases.

**Keywords:** gp96, T cell, regulatory T cell (Treg), tumor, infectious diseases

热激蛋白 (Heat shock protein, HSP) 广泛存在于原核和真核生物中, 具有高度保守性。细胞在热激、缺氧、病毒感染等应激条件下热激蛋白表达显著升高。HSP 根据同源程度及分子量大小, 可以分为 HSP110、HSP90、HSP70、HSP60、HSP40、小分子 HSP 及泛素等多个亚家族。热激蛋白 gp96 是 HSP90 家族的成员, 在正常生理条件下定位于细胞内质网中, 与细胞质 HSP90 高度同源。热激蛋白作为分子伴侣, 参与新生肽的正确折叠和成熟。另外, 在天然免疫和适应性免疫中也发挥着重要作用<sup>[1]</sup>。

## 1 gp96 与多肽结合的结构特点

gp96 在进化过程中高度保守, 成熟的 gp96 蛋白由 3 个结构域组成: N 端结构域, 含有 ATP/药物结合区及结合抗原肽的区域; 中间结构域; C 端结构域含有二聚化区, 还有内质网定位信号 KDEL 模体<sup>[2]</sup>。

gp96 的 N 端有一个与 ATP 结合相关的结构域, 即盖状部分, 由 N1、N4 和 N5 组成。当 ATP 与 gp96 结合时, N1 螺旋会有 15 度的旋转位移, 使盖状区域由紧密状态转变为张开状态<sup>[2]</sup>。另外, 关于 gp96 是否存有 ATP 酶活性问题存在争议, 2007 年 Frey 等证明 gp96 具有 ATP 酶活性<sup>[3]</sup>。同

时, N 端还包含有与多肽结合区, Vogen 等研究发现 gp96 N 端片段 N355 内有多肽的结合位点<sup>[4]</sup>, 这为其他研究所证实<sup>[5]</sup>。虽然有研究显示 gp96 的最小多肽结合位点在其 C 端<sup>[6]</sup>, 但没有得到进一步研究的证实。

gp96 的 C 端为二聚化区域, 双螺旋 C6 与二聚体中另一个亚基的对应结构相互作用并有效结合, 稳定了二聚体的结构, 在正常情况下 2 个亚基绕二聚体中心轴扭转为“V”字型构象。另外 C 端 Met-Met 模体和疏水残基构成了潜在的蛋白结合位点<sup>[2]</sup>。

## 2 gp96 参与抗原加工与呈递以及 T 细胞活化

gp96 由于具有结合多肽的能力, 因而在抗原加工与呈递中发挥重要作用。内源性或外源性抗原被细胞中蛋白酶体降解, 通过 TAP 分子进入内质网, 进而与 MHC (主要组织相容性复合物) I 类或 II 类分子结合, 供 CD8<sup>+</sup> T 或 CD4<sup>+</sup> T 细胞识别。有大量研究表明内质网中的 gp96 蛋白在这一过程中发挥重要作用, gp96 能结合进入内质网中的抗原肽并将结合的抗原呈递给 MHC I 类或 II 类分子<sup>[7-8]</sup>。最近的研究表明进入内质网的抗原肽经由 gp96 传递给钙网蛋白, 再经由 MHC

I 类分子提呈, 供 CD8<sup>+</sup> T 细胞识别, 激活 CTL (细胞毒性 T 细胞) 反应<sup>[9]</sup>。我们从 HBV (乙肝病毒) 感染的肝癌组织中分离纯化 gp96 蛋白, 通过 MALDI 质谱及 C18 反相高效液相色谱法分析与 gp96 结合的多肽抗原, 发现 gp96 结合来源于 HBV 核心蛋白的抗原多肽<sup>[10]</sup>, 该抗原多肽为 HLA-A11 (人类白细胞抗原, 即人类 MHC 分子) 限制性 T 细胞表位<sup>[11]</sup>, 为 gp96 参与抗原呈递提供了直接证据。

gp96 可结合细胞中产生的几乎所有抗原肽<sup>[12]</sup>, 将细胞中的 gp96 蛋白提取后免疫小鼠, 结合抗原肽的 gp96 可与抗原呈递细胞 (如 DC 细胞、巨噬细胞) 表面受体 CD91 等分子相互作用<sup>[13-15]</sup>, 被抗原呈递细胞内吞进入细胞, 从而将结合的抗原表位呈递给 MHC I 类分子或 II 类分子, 介导特异性 T 细胞免疫应答。

### 3 gp96 与 TLR (Toll 样受体) 相互作用介导天然免疫应答

除参与抗原呈递外, Randow 等研究提示 gp96 分子本身对于 Toll 样受体的独特的分子伴侣功能<sup>[16]</sup>。随后 Li 等的系列研究表明 gp96 作为 TLR 重要的分子伴侣, 在天然免疫中发挥重要作用。他们构建巨噬细胞中 gp96 敲除的小鼠, 发现在巨噬细胞表面检测不到 TLR 的表达, 但可以检测到其 mRNA, 并发现 TLR 蛋白滞留在内质网中。因此推断 gp96 在内质网中对 TLR 的正确折叠及运输到膜表面至关重要<sup>[17-18]</sup>。与野生型小鼠相比, 巨噬细胞中 gp96 敲除的小鼠对李斯特菌 *Listeria* 感染敏感, 说明小鼠丧失 TLR 介导的天然免疫功能。gp96 分子 N 端可与 TLR2、

TLR4 等相互作用, 激活巨噬细胞和 DC 细胞并刺激细胞因子的分泌, 增强 TLR 介导的天然免疫与获得性免疫<sup>[19-20]</sup>。

### 4 gp96 免疫功能的优化

自上世纪 90 年代末美国开始尝试将 gp96 自体免疫治疗技术用于治疗人类恶性肿瘤, 至今已针对肾细胞癌、结直肠癌、黑色素瘤、胰腺癌、神经胶质瘤等多种肿瘤开展免疫治疗, 相继在美国、欧盟、俄罗斯等国开展多中心临床试验, 发现 gp96 免疫治疗安全性很高, 从未观察到严重的毒副作用。同时, gp96 免疫可有效激活患者肿瘤特异性 T 细胞免疫应答, 显著提高早期肿瘤患者的生存期<sup>[21-22]</sup>。目前 gp96 自体疫苗在美国已经被 FDA 批准治疗黑色素瘤、肾癌和神经胶质瘤孤儿药, 在欧盟被 EMEA 批准为治疗肾癌及神经胶质瘤的孤儿药, 并于 2008 年在俄罗斯获批上市治疗肾癌。

热激蛋白 gp96 作为免疫活性分子可有效激活 T 细胞免疫应答, 但临床试验中对肿瘤的治疗效果却相对有限, 提示肿瘤免疫耐受机制可能发挥作用。鉴于 gp96 免疫学功能很大程度上依赖于 T 细胞的激活, 我们对影响 gp96 活化 T 细胞的因素进行了系统研究, 发现调节性 T 细胞 (Treg) 对 gp96 介导的特异性 T 细胞活化有明显的抑制作用, 揭示 gp96 调控 CTL 与 Treg 之间的平衡<sup>[23]</sup>。在此基础上我们利用抗 CD25 抗体清除 Treg, 可以显著提高 gp96 介导的肿瘤特异性的 T 细胞免疫应答及抗肿瘤免疫活性<sup>[24]</sup>。以上研究表明通过靶向 Treg 等免疫负调控因素可有效提高 gp96 的免疫学功能, 这为设计更有效的 gp96 疫

苗和制定联合免疫策略提供了依据。

## 5 gp96 在治疗传染性疾病中的应用

大量研究表明, gp96 与肿瘤抗原如 Her-2<sup>[25]</sup>, 或病毒抗原如 HPV、HBV、HIV 等<sup>[26-29]</sup> 体外组装成 gp96-抗原复合物, 可有效激活抗原特异性 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞, 在抗肿瘤和传染性疾病中发挥重要免疫学作用。然而, 目前用于治疗肿瘤的 gp96 疫苗均为从患者肿瘤组织中提取, 利用大肠杆菌表达的 gp96 蛋白容易形成多聚体而降解, 且内毒素很难去除<sup>[20,23,26]</sup>, 因此进一步研究 gp96 免疫学功能及研发 gp96 抗传染病的治疗性疫苗都需要建立体外大量制备 gp96 蛋白的方法。我们首次利用汉逊酵母表达全长 gp96 蛋白, 表达的重组蛋白与天然提取的 gp96 蛋白在与抗原的结合特性及蛋白结构方面非常相似, 同时, 重组蛋白具有与天然蛋白相似的免疫学功能, 可有效激活 HBV 特异性 T 细胞, 而大肠杆菌表达的蛋白则不能有效激活病毒特异性 T 细胞<sup>[30]</sup>。我们进一步将乙肝抗原 (HBsAg 和 HBcAg) 与 gp96 体外组装制备乙肝治疗性疫苗, 利用 HBV 转基因小鼠模型研究 gp96 佐剂疫苗激活乙肝特异性 T 细胞免疫和对病毒的抑制。小鼠试验表明, gp96 佐剂疫苗大幅降低 Treg 的数量, 可有效打破免疫耐受, 激活 HBV 特异性 T 细胞, 小鼠免疫 5~8 周后血清中的 HBV S 抗原降低 50% 以上, 病毒 DNA 拷贝数下降 1 000 倍以上, 肝脏细胞中病毒清除率达到 90%~95%, 表明 gp96 治疗性疫苗免疫能有效清除病毒<sup>[31-32]</sup>。这为研发新型乙肝治疗性疫苗提供了依据。

## 6 展望

热激蛋白 gp96 作为新型免疫活性分子和潜在疫苗佐剂, 可同时激活天然免疫和获得性免疫应答, 直接参与抗原交叉呈递, 是目前唯一用于临床治疗的天然佐剂分子, 已经用于多种肿瘤治疗, 自身免疫原性很低, 安全可靠, 对早期肿瘤患者疗效显著。同时, 由于 gp96 最大的特点是将外源抗原交叉呈递给 MHC I 类分子进而激活 CD8<sup>+</sup> T 细胞, 因此在传染性治疗中具有很大的应用前景。随着对影响 gp96 免疫功能的免疫抑制机制/因素的进一步深入研究和了解, 以及对蛋白体外表达系统的完善, gp96 将在治疗肿瘤及传染性疾病中发挥更大的作用。

## REFERENCES

- [1] Meng SD, Gao F, Tien P. Role of heat shock protein-peptide complexes on tumor and infectious diseases immunity. *Chin J Biotech*, 2000, 16(4): 425-428.  
孟颂东, 高福, 田波. 热休克蛋白-多肽复合物在肿瘤和传染性免疫中的作用. *生物工程学报*, 2000, 16(4): 425-428.
- [2] Dollins DE, Warren JJ, Immormino RM, et al. Structures of GRP94-nucleotide complexes reveal mechanistic differences between the hsp90 chaperones. *Mol Cell*, 2007, 28(1): 41-56.
- [3] Frey S, Leskova A, Reinstein J, et al. The ATPase cycle of the endoplasmic chaperone Grp94. *J Biol Chem*, 2007, 282(49): 35612-35620.
- [4] Vogen S, Gidalevitz T, Biswas C, et al. Radicicol-sensitive peptide binding to the N-terminal portion of GRP94. *J Biol Chem*, 2002, 277(43): 40742-40750.
- [5] Gidalevitz T, Biswas C, Ding H, et al. Identification of the N-terminal peptide binding site of glucose-regulated protein 94. *J Biol Chem*, 2004,

- 279(16): 16543–16552.
- [6] Linderroth NA, Popowicz A, Sastry S. Identification of the peptide-binding site in the heat shock chaperone/tumor rejection antigen gp96 (Grp94). *J Biol Chem*, 2000, 275(8): 5472–5477.
- [7] Srivastava PK, Udono H, Blachere NE, et al. Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming. *Immunogenetics*, 1994, 39(2): 93–98.
- [8] Ishii T, Udono H, Yamano T, et al. Isolation of MHC class I-restricted tumor antigen peptide and its precursors associated with heat shock proteins hsp70, hsp90, and gp96. *J Immunol*, 1999, 162(3): 1303–1309.
- [9] Kropp LE, Garg M, Binder RJ. Ovalbumin-derived precursor peptides are transferred sequentially from gp96 and calreticulin to MHC class I in the endoplasmic reticulum. *J Immunol*, 2010, 184(10): 5619–5627.
- [10] Meng SD, Gao T, Gao GF, et al. HBV-specific peptide associated with heat-shock protein gp96. *Lancet*, 2001, 357(9255): 528–529.
- [11] Meng SD, Song J, Rao ZH, et al. Three-step purification of gp96 from human liver tumor tissues suitable for isolation of gp96-bound peptides. *J Immunol Methods*, 2002, 264(1/2): 29–35.
- [12] Demine R, Walden P. Testing the role of gp96 as peptide chaperone in antigen processing. *J Biol Chem*, 2005, 280(18): 17573–17578.
- [13] Binder RJ, Srivastava PK. Essential role of CD91 in re-presentation of gp96-chaperoned peptides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(16): 6128–6133.
- [14] Robert J, Ramanayake T, Maniero GD, et al. Phylogenetic conservation of glycoprotein 96 ability to interact with CD91 and facilitate antigen cross-presentation. *J Immunol*, 2008, 180(5): 3176–3182.
- [15] Pawaria S, Binder RJ. CD91-dependent programming of T-helper cell responses following heat shock protein immunization. *Nat Commun*, 2011, doi: 10.1038/ncomms1524.
- [16] Randow F, Seed B. Endoplasmic reticulum chaperone gp96 is required for innate immunity but not cell viability. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(10): 891–896.
- [17] Yang Y, Liu B, Dai J, et al. Heat shock protein gp96 is a master chaperone for toll-like receptors and is important in the innate function of macrophages. *Immunity*, 2007, 26(2): 215–226.
- [18] Liu B, Yang Y, Qiu ZJ, et al. Folding of Toll-like receptors by the HSP90 paralogue gp96 requires a substrate-specific cochaperone. *Nat Commun*, 2010, doi: 10.1038/ncomms1070.
- [19] Akutsu Y, Matsubara H, Urashima T, et al. Combination of direct intratumoral administration of dendritic cells and irradiation induces strong systemic antitumor effect mediated by GRP94/gp96 against squamous cell carcinoma in mice. *Int J Oncol*, 2007, 31(3): 509–515.
- [20] Warger T, Hilf N, Rechtsteiner G, et al. Interaction of TLR2 and TLR4 ligands with the N-terminal domain of gp96 amplifies innate and adaptive immune responses. *J Biol Chem*, 2006, 281(32): 22545–22553.
- [21] Wood CG, Mulders P. Vitespen: a preclinical and clinical review. *Future Oncol*, 2009, 5(6): 763–774.
- [22] Randazzo M, Terness P, Opelz G, et al. Active specific immunotherapy of human cancers with the heat shock protein gp96 - revisited. *Int J Cancer*, 2011, doi: 10.1002/ijc.27332.
- [23] Liu Z, Li X, Qiu L, et al. Treg suppress CTL responses upon immunization with HSP gp96. *Eur J Immunol*, 2009, 39(11): 3110–3120.
- [24] Yan X, Zhang X, Wang Y, et al. Regulatory T-cell depletion synergizes with gp96-mediated cellular responses and antitumor activity. *Cancer Immunol Immunother*, 2011, 60(12): 1763–1774.
- [25] Pakravan N, Soleimanjahi H, Hassan ZM. gp96 C-terminal improves Her2/neu DNA vaccine. *J Gene Med*, 2010, 12(4): 345–353.
- [26] Bolhassani A, Zahedifard F, Taghikhani M, et al. Enhanced immunogenicity of HPV16E7 accompanied by gp96 as an adjuvant in two vaccination strategies. *Vaccine*, 2008, 26(26): 279–286.

- 3362–3370.
- [27] Li HT, Zhou MH, Han JL, et al. Generation of murine CTL by a hepatitis B virus-specific peptide and evaluation of the adjuvant effect of heat shock protein glycoprotein 96 and its terminal fragments. *J Immunol*, 2005, 174(1): 195–204.
- [28] SenGupta D, Norris PJ, Suscovich TJ, et al. Heat shock protein-mediated cross-presentation of exogenous HIV antigen on HLA class I and class II. *J Immunol*, 2004, 173(3): 1987–1993.
- [29] Gong XY, Gai WW, Xu JQ, et al. Glycoprotein 96-mediated presentation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific human leukocyte antigen class I-restricted peptide and humoral immune responses to HIV-1 p24. *Clin Vaccine Immunol*, 2009, 16(11): 1595–1600.
- [30] Li Y, Song HL, Li J, et al. Hansenula polymorpha expressed heat shock protein gp96 exerts potent T cell activation activity as an adjuvant. *J Biotechnol*, 2011, 151(4): 343–349.
- [31] Wang SF, Qiu LP, Liu GZ, et al. Heat shock protein gp96 enhances humoral and T cell responses, decreases Treg frequency and potentiates the anti-HBV activity in BALB/c and transgenic mice. *Vaccine*, 2011, 29(37): 6342–6351.
- [32] Wang YZ, Wang SF, Zhang XJ, et al. Enhancement of cellular and humoral immune responses of HBV DNA vaccine by HSP70 and gp96. *Chin J Biotech*, 2011, 27(5): 790–798.
- 王彦中, 王赛锋, 张小俊, 等. 热休克蛋白 HSP70 和 gp96 增强乙肝 DNA 疫苗的细胞和体液免疫应答. *生物工程学报*, 2011, 27(5): 790–798.



### 《生物工程学报》创刊以来全部论文数据库上网

为提高期刊的显示度, 加强对历史文档的整理、保护和利用, 更好地为科研人员提供信息服务, 《生物工程学报》对 1985 年创刊以来的全部论文进行了数字化制作, 建成了回溯文档全文数据库。检索或浏览我刊已发表的论文请从我刊首页 (<http://journals.im.ac.cn/cjbcn>) “过刊检索”进入, 可以按照题目、关键词、年卷期、作者、单位等信息检索, 欢迎浏览下载。