

Heat Shock Protein 90 (HSP90) and Immune Regulation

Bo-Kyung Kim and So-Youn Woo*

Departments of Microbiology, School of Medicine, Ewha Womans University, Seoul, Korea

Heat shock protein 90 (HSP90) is involved in conformational and structural maturation of signalling molecules and transcription factors in immune reaction. HSP90 inhibitors induce immune modulation via anti-inflammatory effect, regulating humoral and cellular immune responses. Therefore, HSP90 inhibitors potentially useful target for the autoimmune disease and chronic inflammatory diseases.

Key Words: Heat shock protein 90 (HSP90), Anti-inflammatory, HSP90 inhibitor, IL-17, Act1

INTRODUCTION

최근 Heat shock protein 90 (HSP90) 억제제가 마우스를 사용한 폐혈증, 관절염, 포도막염, 다발성 경화증과 같은 염증 질환 모델에서 그 질병의 진행을 억제하는 것이 밝혀졌다. Heat shock protein 90이 결합하여 작용하는 단백은 면역반응에 관여하는 전사인자와 어댑터 등이다. 이 논문에서는 HSP90가 면역반응에 관여하는 일부 기전, 특히 IL-17이 관여하는 면역반응에서 HSP90의 작용기전에 대해 소개한다.

1. Heat shock protein 90 (HSP90)의 구조와 기능

Heat shock protein은 세포 내의 단백질의 folding과 운반에 관여하는 샤퍼론 분자이다. 이 중 HSP90는 90 kDa의 ATP-의존적인 분자 샤퍼론으로 다양한 신호전달분자와 전사인자의 단백구조의 성숙과 3차구조를 완성하는데 관여한다. 이때 결합하는 단백을 클라이언트 단백이라고 하고, 여기에는 다양한 종류의 종양유전자, 전사인자, 스테로이드 수용체 등이 있다 (1). 보통의 진핵세포에서

HSP90는 클라이언트와 결합하지 않는 상태로 존재하지만, 종양세포에서는 종양유전자와 결합한 활성화된 HSP90 많이 발견된다. 따라서 항암제의 개발에 있어서, 특정한 종양유전자를 억제하는 경로 이외에, 다양한 종양유전자를 클라이언트로 가지고 있는 HSP90의 억제제를 사용한 항암치료 타겟으로 EGFR, ERBB2, c-MET, PDGFR, IGFR, FGFR3, EML4-ALK 융합 단백, JAK-STAT 신호전달경로 등이 있다 (2).

HSP90는 정상조건에서 전사인자 클라이언트인 heat shock factor 1 (HSF1)과 결합하여 비활성화된 상태로 존재한다. 만일 세포가 스트레스를 받거나 HSP90 억제제를 사용하게 되면, HSF1은 활성화되어 HSP90과의 결합 상태를 해제하고, 삼중체를 형성하여 핵 안으로 이동한다. 그 결과 염증성 사이토카인의 생산을 억제하고, 항염증작용을 나타낸다. 또한 HSF1이 활성화되면 세포질에서 HSP70의 양이 증가한다. HSP70의 증가는 HSP90 억제제의 효과를 나타내기도 하지만, HSP70에 의한 NF-κB 경로가 억제되는 것도 보고되었다 (3). 다양한 종양유전자 가 HSP90의 클라이언트 단백으로 알려져 있기 때문에, HSP90 억제제가 항암작용을 나타내어 새로운 고형암 혹

Received: February 2, 2015 / Revised: February 6, 2015 / Accepted: February 17, 2015

*Corresponding author: So-Youn Woo. #207, Departments of Microbiology, School of Medicine, Ewha Womans University Seoul, 158-710, Korea.
Phone: +82-2-2650-5737, Fax: +82-2-2653-8891, e-mail: soyounwoo@ewha.ac.kr

**This work was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Science, ICT and Future Planning (2013R1A1A3A04006995).

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

은 혈액종양의 치료제로 소개되고 있다 (4). 그 외에도 HSP90은 항원제시, 림프구와 키포식세포의 활성화에 관여하고 있어 자가면역질환에서의 HSP90 억제제의 역할이 크게 대두되고 있다. 즉 동물실험 모델에서는 HSP90 억제제가 자가면역성 뇌척수염, 류마티스관절염, 전신성 홍반성루푸스의 진행을 억제하는 결과를 얻었다 (5).

세포 내 존재하는 HSP90 이외에도 분비형 HSP90이 관찰되었다. 분비형 HSP90은 중성구와 키포식세포가 증가하는 만성폐쇄성폐질환(chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 환자의 혈액에서 증가되어 있으며 (6), 이외에도 분비형 HSP90은 천식이나 COPD 환자의 기도의 변성에 관여하는 기전인 epithelial-mesenchymal transition (EMT)에도 관여하는 것으로 알려졌다 (7). 따라서 HSP90 억제제의 기능은 세포 내의 HSP90과 세포 외의 HSP90 모두에 적용되어야 할 것으로 생각된다.

2. HSP90와 항염증반응

HSP90 억제제에는 geldanamycin 유도체, resorcinol 유도체, 퓨린 유사체와 그 외 합성물질이 있다. HSP90 억제제 중 초기에 개발된 geldanamycin 계열의 약물(benzoquinone ansamycin)은 항암치료의 보조적인 역할을 위해 개발되었으나, 골수의 기능을 억제하고 중성구 감소를 유도한다는 효과 때문에 염증반응의 조절물질로 개발하는데 어려움이 있었다. 1세대 HSP90 억제제는 천연물이 geldanamycin의 구조와 유사한 약물로 개발되었으나, 그 이후에 약동학적으로 좀 더 최적화된 약물이 개발되었다. 즉, 수용성이 증가되고, 효소에 의해 덜 분해되며, 간과 위장관 독성이 적은 약물로 개발이 이루어지고 있다. 그러한 약물 중 하나로 17-allylamino-17-demethoxy-geldanamycin (17-AAG)은 HSP90와 결합하여 HSP90를 불활성화시켜, 클라이언트 단백의 분해가 증가되어 결국 클라이언트 단백이 관여하는 신호전달을 억제하게 된다. 따라서 17-AAG도 세포의 증식 억제 및 항염증작용을 나타낸다. 17-AAG는 부작용이 적고, 약동학적 효과가 좋아 임상시험에 사용하고 있다 (8). 동물실험에서는 LPS에 의해 유도된 포도막 염을 백혈구의 유착분자 감소 유도와, NF-κB, HIF-1-α와 같은 전사인자의 억제, VEGF, IL-1β, TNF-α 등의 염증성 사이토카인의 감소를 통한 기전으로 17-AAG가 억제하였다 (9).

또 다른 HSP90 억제제인 ganetespib (STA-9090, GIB)은 HSP90의 ATPase의 아미노기 말단에서 선택적으로 결합

한다. 따라서 GIB는 폐암, 유방암, 난소암 등에서 임상시험에 진행중이다 (10). 그러나 geldanamycin이 아닌 새로운 HSP90 억제제가 개발되고 그 중 하나인 Genetespib (10~100 mg/kg, i.v.)를 사용하였을 때 LPS로 유도한 폐 염증반응을 억제한다는 결과를 보였다. 즉, Genetespib은 골수 억제나 중성구감소증을 유발하지 않는 약물 용량에서 염증부위로의 중성구와 B림프구, NK세포와 같은 면역세포 침윤이 억제되고, 또한 염증성 사이토카인(IL-1β, IL-23, TNF-α, TGF-β)과 케모카인(IP-10, MCP-1, MIP-2, MIG, RANTES, KC), MMP9 등의 발현이 감소하는 것을 보였다 (11).

따라서 HSP90 억제제에 의한 항염증 효과가 LPS 등이 관여하는 선천면역반응 (12) 및 종양이 증식하는 미세환경에서는 어떠한 영향을 미칠 것인지에 대한 심도있는 연구가 추가되어야 할 것이다.

3. HSP90와 체액성 면역반응

일반적으로 자가면역질환의 병인에는 자가항체의 증가가 동반된다. 실험적으로 유도한 표피박리증 모델(experimental epidermolysis bullosa acquisita, EBA)는 표피가 박리되어 수포가 생기는 만성염증질환으로, 이것은 표피와 진피의 경계에 존재하는 type VII 콜라겐의 non-collagen domain 1에 대한 자가항체의 증가를 동반한다 (13). 사람에서는 이와 유사한 물집유사천포창(bullous pemphigoid)은 type XVII collagen에 대한 항체가 생성되며, 피부와 혈액에 HSP90의 발현이 증가되는 것이 관찰되어 HSP90가 병인에 중요한 역할을 담당할 것으로 생각되어, HSP90를 타겟으로 가능성 있는 치료제의 후보로 생각되고 있다 (14). 즉, HSP90 억제제가 물집유사천포창의 병인에 중요한 역할을 할 것으로 생각되는 IL-8의 분비를 억제하는 것을 배양한 각질세포를 사용한 실험에서 확인하였다 (15). 마우스 전신성홍반성낭창(systemic lupus erythematosus, SLE) 모델에서는 HSP90 억제제를 치치한 경우 혈액에서 항-dsDNA의 항체가 감소하는 것을 확인하였다 (5).

사람의 말초혈액을 사용한 실험에서는 geldanamycin 유도체인 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG)가 농도의존적으로 활성화된 B 림프구의 증식 및 IgG의 생산을 억제하는 것을 확인할 수 있었으며, 실험적으로 EBA를 유도하기 위해 마우스에 type VII 콜라겐을 투여하여 자가면역반응을 유도한 마우스에서 17-DMAG를 전처치하면 혈청의 IL-10은 증가하고,

IFN- γ 는 감소하는 것을 확인하였다. 또한 type VII 콜라겐에 대한 자가항체의 농도도 감소한다 (16).

HSP90 억제제가 조절 B 림프구에 미치는 영향은 아직 분명하지 않다. 조절 B 림프구는 CD19+CD1d^{hi}CD5+와 CD19+CD10+ 세포에 해당하며, 사람과 마우스에서 세포 매개면역반응과 염증반응을 IL-10을 매개로 억제하는 것으로 알려졌다 (17).

4. HSP90와 T 림프구 매개 면역반응

HSP90 억제제는 림프구 증식 혹은 분화 억제 효과를 나타낸다. 즉, 자가항원을 면역하여 얻은 마우스의 림프질에서 T 림프구를 분리하여 자가항원으로 재차 자극하면 HSP90 억제제를 사용하는 경우 증식이 감소하는 것을 확인할 수 있다 (18). 또한 HSP90 억제제를 사용하면 CD4+ T 림프구 중, Th1 혹은 Th17로의 분화가 억제된다 (19). 그 외에, 마우스의 염증성 장질환 모델에서 HSP90 억제제를 사용하면 조절 T 림프구의 기능이 증가되어 장 염증을 감소시킨다 (20).

HSP90은 또한 항원제시기능을 향상시킨다. HSP90과 같은 분자 샤페론은 종양항원과 결합하기 때문에, 종양에 대한 백신 개발에서 주요한 타겟이 될 수 있다. 즉, HSP90이 항원전달자(antigen carrier)로 작용하여 자신과 결합한 단백항원을 목표가 되는 항원제시세포에 전달하고, 세포 내 섭취(endocytosis)를 활성화하여 항원전달기전에 관여한다. 이렇게 전달된 항원은 잘 알려진 class II MHC 경로를 통해 표면에 발현되거나, 혹은 항원 교차제시(cross-presentation)을 통해 제1형 MHC 분자에 결합하여 세포 표면에 발현된다. HSP90과 결합한 항원이 항원제시세포 표면의 어떤 수용체를 통하여 세포 내 섭취가 일어나는지에 대한 연구는 스캐빈저 수용체의 한 종류인 SREC-I를 통해 일어나는 것으로 알려졌다 (21). 즉, HSP90-펩티드 복합체는 항원제시세포의 SREC-I와 결합하고, 세포 내로 들어가 Rho GTPase에 의해 조절되는 GPI-anchored-protein-enriched endosomal compartment (GEEC) 경로를 통해 filopodia를 형성한다. 그 결과로 HSP90-펩티드 복합체는 제2형 MHC 분자와 결합하여 항원제시가 이루어지는 것이다 (22). 따라서, 항원제시기능을 향상시킨다는 결과에 대해서는 종양항원을 사용한 면역백신의 개발과 관련하여 HSP90 억제제의 역할에 대한 추가적인 연구와 종양면역반응이 이루어지는 미세환경에 대한 연구가 좀 더 이루어져야 할 것으로 생각한다.

5. HSP90와 IL-17 신호전달과의 관계

Th17 세포에서 분비되는 사이토카인은 IL-17A, IL-17F, IL-22로, 점막 및 다양한 조직에서 세균 및 진균에 대한 염증반응을 증가시킨다 (23). 특히 IL-17과 IL-22는 피부에서 각질형성세포의 증식과 만성 염증을 특징으로 하는 건선과 같은 염증성 피부질환의 병인과 관련이 있어, 건선 환자의 피부 조직에서 IL-17과 IL-22의 증가가 관찰된다 (24). 이런 의미에서, IL-17에 대한 항체를 사용하여 건선치료에 사용하려는 시도도 이루어지고 있다.

IL-17의 신호전달은 IL-17 수용체인 IL-17RA와 IL-17RC의 heterodimer에 의해 이루어지고, 어댑터 단백인 Act1이 신호전달에 관여한다 (25). Act1이 IL-17 수용체에 결합하면, TNFR-associated factor (TRAF) 6의 K63을 통한 유비퀴틴 분자와의 결합이 일어나고, TAK1 및 IkappaB 복합체를 활성화하여 NF-kappaB의 활성화가 일어난다 (26). 따라서 Act1이 결핍되면 IL-17을 매개로 하는 마우스 천식이나 뇌염의 모델에서 염증반응이 지연되어 나타난다. 이 Act1 분자 역시 HSP90의 클라이언트로, 건선의 발생과 관련된 Act1 분자의 SNP (rs33980500; SNP-D10N)로 보고된 Act1-D10N의 경우는 HSP90과 결합하지 않고 또 IL-17 수용체를 경유한 신호전달도 일어나지 않아, IL-17에 의해 증가되는 IL6, Cxcl1, Csf2 등의 증가가 관찰되지 않았다. 그러나, Act1 결핍마우스에서는 Th17에 의한 면역반응이 오히려 증가하여 IL-17과 IL-22의 증가가 일어나고, 이것은 IL-22에 대한 중화항체를 사용하여 억제된다. 또한 Act1 결핍마우스에서의 이러한 효과는 T 림프구 특이적으로 일어나, 마치 Act1이 Th17의 분화를 조절하는 음성조절인자로 작용하는 것처럼 생각되었다 (27). 또한, 추가적인 연구를 통하여 밝혀진 것은 사람의 경우에 Act1-D10N에 대한 변이가 alternative splicing에 의한 Act1-D10N 뿐 아니라 Act1-D19N도 동시에 존재하는데 단지 Act1-D19N의 경우는 아미노말단에 9개의 웹티드가 추가적으로 존재하고, Act1-D10N과는 달리 HSP90과 결합하여 그 결과 IL-17에 의한 신호전달이 일어난다. 이 두 isoform의 서로 다른 특징 중 하나는 Act1^{D10N/D10N}을 가진 사람에 있어 세포의 종류에 따라 이 두 가지 Act1 변이 단백의 발현 정도가 다르다는 것이다. 즉, 섬유아세포에서는 Act1-D19N 형태가 발현되어 IL-17 신호 전달이 일부 일어나지만, T 림프구에서는 Act1-D19N이 거의 발현하지 않고 Act1-D10N이 주로 발현하여 IL-17에 의한 신호전달

의 조절이 일어나지 않고, IL-17과 IL-22의 증가가 일어난다 (28).

CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

세포 내의 분자의 3차 구조를 유지하는 샤페론 중 하나인 HSP90은 그것과 결합하는 단백이 종양유전자, 전사인자, 또는 면역활성화 신호전달의 어댑터 단백이기 때문에, HSP90의 활성을 억제하는 약물에 의한 항암 효과를 유도하거나 혹은 면역반응의 조절물질로 주목받고 있다. HSP90의 억제 효과는 항염증반응을 유도하고, 세포증식을 억제하지만, 또한 항원전달을 억제할 수 있기 때문에 종양의 증식이 일어나는 세포미세환경에서의 포괄적인 조절인자로서의 기능이 더욱 연구되어야 할 것이다. 면역조절인자로서의 기능 역시, HSP90이 증가되는 조건과 클라이언트 단백의 표현형에 따라 다양한 반응이 나타날 수 있어, 더욱 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Taipale M, Jarosz DF, Lindquist S. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11:515-28.
- 2) Laederich MB, Degnun CR, Lunstrum GP, Holden P, Horton WA. Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) is a strong heat shock protein 90 (Hsp90) client: implications for therapeutic manipulation. *J Biol Chem* 2011;286:19597-604.
- 3) de Jong PR, Schadenberg AW, Jansen NJ, Prakken BJ. Hsp70 and cardiac surgery: molecular chaperone and inflammatory regulator with compartmentalized effects. *Cell Stress Chaperones* 2009;14:117-31.
- 4) Garcia-Carbonero R, Carnero A, Paz-Ares L. Inhibition of HSP90 molecular chaperones: moving into the clinic. *Lancet Oncol* 2013;14:e358-69.
- 5) Shimp SK 3rd, Chafin CB, Regna NL, Hammond SE, Read MA, Caudell DL, et al. Heat shock protein 90 inhibition by 17-DMAG lessens disease in the MRL/lpr mouse model of systemic lupus erythematosus. *Cell Mol Immunol* 2012;9:255-66.
- 6) Hacker S, Lambers C, Hoetzenrecker K, Pollreisz A, Aigner C, Lichtenauer M, et al. Elevated HSP27, HSP70 and HSP90 alpha in chronic obstructive pulmonary disease: markers for immune activation and tissue destruction. *Clin Lab* 2009;55:31-40.
- 7) Hance MW, Dole K, Gopal U, Bohonowich JE, Jezierska-Drutel A, Neumann CA, et al. Secreted Hsp90 is a novel regulator of the epithelial to mesenchymal transition (EMT) in prostate cancer. *J Biol Chem* 2012;287:37732-44.
- 8) Neckers L, Neckers K. Heat-shock protein 90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. *Expert Opin Emerg Drugs* 2002;7:277-88.
- 9) Poulaki V, Iliaki E, Mitsiades N, Mitsiades CS, Paulus YN, Bula DV, et al. Inhibition of Hsp90 attenuates inflammation in endotoxin-induced uveitis. *FASEB J* 2007;21:2113-23.
- 10) Ying W, Du Z, Sun L, Foley KP, Proia DA, Blackman RK, et al. Ganetespib, a unique triazolone-containing Hsp90 inhibitor, exhibits potent antitumor activity and a superior safety profile for cancer therapy. *Mol Cancer Ther* 2012;11:475-84.
- 11) Lilja A, Weeden CE, McArthur K, Nguyen T, Donald A, Wong ZX, et al. HSP90 Inhibition Suppresses Lipopolysaccharide-Induced Lung Inflammation *In Vivo*. *PLoS One* 2015;10: e0114975.
- 12) Jin HS, Park JK, Jo EK. Toll-like Receptors and NOD-like Receptors in Innate Immune Defense during Pathogenic Infection. *J Bacteriol Virol* 2014;44:215-25.
- 13) Woodley DT, Burgeson RE, Lunstrum G, Bruckner-Tuderman L, Reese MJ, Briggaman RA. Epidermolysis bullosa acquisita antigen is the globular carboxyl terminus of type VII procollagen. *J Clin Invest* 1988;81:683-7.
- 14) Tukaj S, Kleszczyński K, Vafia K, Groth S, Meyersburg D, Trzonkowski P, et al. Aberrant expression and secretion of heat shock protein 90 in patients with bullous pemphigoid. *PLoS One* 2013;8:e70496.
- 15) Tukaj S, Grüner D, Zillikens D, Kasperkiewicz M. Hsp90 blockade modulates bullous pemphigoid IgG-induced IL-8 production by keratinocytes. *Cell Stress Chaperones* 2014;19: 887-94.
- 16) Tukaj S, Tiburzy B, Manz R, de Castro Marques A, Orosz A, Ludwig RJ, et al. Immunomodulatory effects of heat shock protein 90 inhibition on humoral immune responses. *Exp Dermatol* 2014;23:585-90.
- 17) Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol* 2012;30:221-41.
- 18) Kasperkiewicz M, Müller R, Manz R, Magens M, Hammers CM, Somlai C, et al. Heat-shock protein 90 inhibition in

- autoimmunity to type VII collagen: evidence that nonmalignant plasma cells are not therapeutic targets. *Blood* 2011;117:6135-42.
- 19) Tukaj S, Zillikens D, Kasperkiewicz M. Inhibitory effects of heat shock protein 90 blockade on proinflammatory human Th1 and Th17 cell subpopulations. *J Inflamm (Lond)* 2014; 11:10.
 - 20) Collins CB, Aherne CM, Yeckes A, Pound K, Eltzschig HK, Jedlicka P, *et al.* Inhibition of N-terminal ATPase on HSP90 attenuates colitis through enhanced Treg function. *Mucosal Immunol* 2013;6:960-71.
 - 21) Gong J, Zhu B, Murshid A, Adachi H, Song B, Lee A, *et al.* T cell activation by heat shock protein 70 vaccine requires TLR signaling and scavenger receptor expressed by endothelial cells-1. *J Immunol* 2009;183:3092-8.
 - 22) Murshid A, Gong J, Calderwood SK. Hsp90-peptide complexes stimulate antigen presentation through the class II pathway after binding scavenger receptor SREC-I. *Immunobiology* 2014;219:924-31.
 - 23) Conti HR, Shen F, Nayyar N, Stocum E, Sun JN, Lindemann MJ, *et al.* Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med* 2009;206:299-311.
 - 24) Chan JR, Blumenschein W, Murphy E, Diveu C, Wiekowski M, Abbondanzo S, *et al.* IL-23 stimulates epidermal hyperplasia via TNF and IL-20R2-dependent mechanisms with implications for psoriasis pathogenesis. *J Exp Med* 2006;203: 2577-87.
 - 25) Qian Y, Liu C, Hartupee J, Altuntas CZ, Gulen MF, Jane-Wit D, *et al.* The adaptor Act1 is required for interleukin 17-dependent signaling associated with autoimmune and inflammatory disease. *Nat Immunol* 2007;8:247-56.
 - 26) Schwandner R, Yamaguchi K, Cao Z. Requirement of tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6 in interleukin 17 signal transduction. *J Exp Med* 2000;191:1233-40.
 - 27) Wang C, Wu L, Bulek K, Martin BN, Zepp JA, Kang Z, *et al.* The psoriasis-associated D10N variant of the adaptor Act1 with impaired regulation by the molecular chaperone hsp90. *Nat Immunol* 2013;14:72-81.
 - 28) Wu L, Wang C, Boisson B, Misra S, Rayman P, Finke JH, *et al.* The differential regulation of human ACT1 isoforms by Hsp90 in IL-17 signaling. *J Immunol* 2014;193:1590-9.