2021年度湖南省科学技术奖提名公示内容

自然科学奖

**项目名称：**

天然免疫受体NKG2D及其配体分子在免疫应答中的作用研究

**提名意见：**

该项目由我校“省百人计划”专家邹义洲团队完成，邹教授以海外多年研究MICA成果为基础和起点，围绕NKG2D受体、配体等免疫分子，开展以NKG2D为中心的系统性研究，阐明了天然免疫受体NKG2D在免疫应答中的作用，具有重要的理论和临床应用价值。主要发现：（1）阐明了NKG2D受体活化机制 应用NKG2D受体报告细胞模型，揭示了MICA激活NKG2D分子通路的机制；（2）揭示了sMICA通过抑制NKG2D受体活化促进肿瘤免疫逃逸的机制 阐明了sMICA与免疫抑制的因果关系。应用临床样本证明了sMICA阻断NKG2D，从而抑制了免疫监视，降低了机体抗肿瘤免疫的作用；（3）制备双功能融合蛋白特异性诱导NK细胞靶向杀伤肿瘤细胞 双功能重组融合蛋白分子M-S可特异性诱导NK细胞靶向杀伤功能，具有重要的肿瘤免疫治疗应用前景；（4）关键技术的应用与相关科学发现: 邹教授团队制备了抗MICA单克隆抗体、开发了多态性基因DNA分型技术、应用免疫沉淀和蛋白质谱技术用未知抗体鉴定相应抗原。本项目获得3项国家自然科学基金、1项省科技计划重点项目、2项国家发明专利，获2014年中国侨联创新成果奖。经审阅，该项目申报材料内容属实，相关栏目符合填写要求，经公示，目前无异议。对照湖南省科学技术自然科学奖授奖条件，特提名申报2021年湖南省科学技术自然科学奖。

提名该项目为湖南省自然科学奖二等奖。

**项目简介：**

天然免疫受体NKG2D是早期在自然杀伤细胞(NK)发现的第二组活化性受体D, 主要在NK，CD8+T和γδT细胞膜表达。NKG2D受体与相应的配体分子(NKG2DL)结合后，启动适配器分子DAP10/ DAP12的ITAM磷酸化，招募下游的ZAP70/Syk等分子信号通路，引起核转录因子调节免疫细胞的细胞因子基因表达，发挥活化免疫细胞的生物学活性(图3-1)。但免疫细胞通常在其免疫抑制性受体(如KIR)的作用下处于免疫抑制状态(图3-1)。本项研究取得了: **(1)阐明了天然免疫受体活化及信号传导机制；(2)NKG2D受体被配体分子活化的特征；**(3)针对NKG2D受体活化，设计功能融合蛋白，实现了**特异性诱导免疫细胞靶向杀伤肿瘤细胞**的目标。阐明天然免疫受体NKG2D受体在免疫应答中的作用，具有重要的免疫学理论和临床转化应用价值。

图3-1 NKG2D受体报告细胞模型

本项目的主要工作和发现是：**1) 发现了**

**NKG2D受体的活化的分子机制:** 我们构建了NKG2D受体活化荧光报告细胞模型, 这是国际上唯一的用于研究NKG2D受体的细胞模型。应用它，我们揭示了MICA膜蛋白分子结合并激活NKG2D受体分子通路需要多个NKG2D受体聚集才可完成对靶细胞的杀伤(图3-2)；而可溶性配体分子(sMICA)虽然能够结合NKG2D受体，但不能引起NKG2D聚集，不仅不能活化NKG2D受体，而且sMICA还阻断了靶细胞膜型MICA对NKG2D的结合与活化(图3-2)；**2 ) 揭示了基于NKG2D受体分子通路的肿瘤免疫逃逸机制；**sMICA在临床肿瘤患者血液中浓度增高与肿瘤的发生发展和病程恶化存在相关性, 我们从实验水平阐明了sMICA与免疫抑制的因果关系。应用临床病例样本证明了sMICA阻碍天然免疫受体NKG2D的活化分子通路，抑制了机体抗肿瘤的免疫作用(图3-2)。 **3) 制备双功能融合蛋白特异性诱导NK细胞靶向杀伤肿瘤细胞:** 基于NKG2D受体活化机制，我们设计一种能够介导NK细胞靶向杀伤肿瘤细胞的双功能重组融合蛋白分子(M-S)。M-S的C端为anti-CD20 ScFv, N端为MICA分子胞外结构域，实验结果表明M-S可激活NK细胞靶向杀伤CD20+B淋巴瘤细胞；4)**关键技术的应用与相关科学发现:** 在本项目研究过程中，我们制备了抗MICA单克隆抗体，开发了多态性基因DNA分型技术，应用免疫沉淀技术用未知抗体捕获相应抗原，再用蛋白质谱分析鉴定了KRT1为新的移植抗原。

图3-2 sMICA阻碍NK细胞杀伤靶细胞

本项目共获得3项国家自然科学基金和1项省科技计划重点项目,获2项国家发明专利，获2014年中国侨联创新成果奖。

**客观评价：**

本项目以天然免疫受体**NKG2D**与配体**MICA**的相互作用为线索开展肿瘤免疫的分子机制和应用研究，客观评价如下：

**1 原创性**：NKG2D受体是表达于NK细胞和T细胞表面感受器分子，自从1994年发现其相对应的配体MICA分子以来，NKG2D-MICA有关研究迅速升温，在抗感染免疫，自身免疫，移植免疫和肿瘤免疫等方向开展全方位的科学研究。本项目第一完成人于1999年作为访问学者受邀前往美国德州大学西南医学中心访问，从博士后做到该中心的助理教授、资深研究员，一直从事NKG2D-MICA研究，拥有扎实的研究基础，2012年全职回国组建研究团队，继续开展以NKG2D受体为中心的免疫学相关研究，主要原创性研究成果有：

1. 明确了MICA诱导NK细胞NKG2D受体活化杀伤靶细胞(附件24）
2. 发现配体MICA基因的多态性是机体抗病毒进化的结果（附件27）
3. 首次揭示HCC患者高浓度可溶性MICA抑制NK细胞免疫杀伤能力，是肿瘤免疫逃逸的重要机制(代表作5，附件5）
4. 为了精准研究NKG2D受体，国际上首次研制出了可视化的NKG2D受体报告细胞模型（代表作2，附件2）
5. 应用NKG2D受体报告细胞模型，证明了可溶性MICA是阻碍NKG2D受体活化，抑制免疫细胞杀伤活性的生物标志物
6. 制备基因工程双功能重组蛋白用于特异性诱导NK细胞靶向杀份肿瘤细胞(代表作2，附件2)。

**2 科学价值：**本项目发现了NKG2D受体的两项分子机制：**膜型MICA分子**结合并**聚集NKG2D受体**，从而活化NKG2D受体下游分子通路，引起免疫应答的生物学效应；**可溶性MICA分子**结合但**不能聚集NKG2D受体**，反而阻碍NKG2D受体的活化，抑制免疫应答。

基于上述发现**，**研究的关键问题是**：(1) 如何有效活化NKG2D受体，实现对特定靶细胞的杀伤**: 我们制备了一种双功能基因工程重组蛋白(MICA-antiCD20 ScFv), 重组蛋白的C端为基因工程单链抗体（靶向定位），N端为MICA胞外域结构，结合并诱导NK细胞对肿瘤细胞的靶向杀伤，为肿瘤的靶向免疫治疗提供了新的方案; **(2) 可溶性MICA(sMICA)是肿瘤免疫逃逸的重要因素:** 在恶性肿瘤患者血液中发现了高浓度可溶性MICA分子，而且这种高浓度sMICA血症与恶性肿瘤的预后恶化存在显著的相关性。本项目用NKG2D受体报告细胞模型和NKL细胞系在体外证明了sMICA是阻碍NKG2D受体活化的免疫分子，该项目研究为制定肿瘤免疫治疗方案提供了理论依据和开创了新的思路。

**3 同行评价: 针对sMICA在肿瘤免疫逃逸和活化NKG2D受体以增强免疫应答中的作用**，国际学术界广为关注，本项目研究的代表作被他人SCI论文引用的部分摘录如下：

**(1)**. 2021年，Chen等在CELLULAR & MOLECULAR IMMUNOLOGY（IF=11.53）上发表题为“Innate lymphocytes: pathogenesis and therapeutic targets of liver diseases and cancer”的论文(引文1): **引用代表作1**, 高度评价“HCC肿瘤细胞产生的高浓度sMICA阻碍NKG2D受体活化，是为了肿瘤细胞逃逸NK的细胞毒作用。”

**(2).** 2020年，Mantovani, S等在CANCERS（IF=6.639）上发表题为“Natural Killer Cell Responses in Hepatocellular Carcinoma: Implications for Novel Immunotherape utic Approaches”的论文（引文2）。**引用代表作2, 确认“NKG2D配体的游离可溶性形式可阻断NKG2D分子通路的激活，是肿瘤免疫逃逸的重要机制之一”**

**(3).** 2021年，Toledo-Stuardo, K等在FRONTIERS IN IMMUNOLOGY（IF=7.561）上发表题为“Major Histocompatibility Complex Class I-Related Chain A (MICA) Allelic Variants Associate With Susceptibility and Prognosis of Gastric Cancer.”的论文（引文3）。引用代表作4，分析胃癌患者血清中可溶性MICA的浓度后认为: MICA等位基因的变体可能与可溶性MICA的形成相关。

**(4)**. 2012年，Kahraman, A等在LIVER INTERNATIONAL（IF=5.828）上发表题为“Role of stress-induced NKG2D ligands in liver diseases”的论文（引文6），引用代表作5）：对论文的主要研究数据进行了转述“Zou及其同事近期发表的研究表明可溶性MICA的形成可能与肝移植后胆管铸形有关，作者回顾性评估了133例原发性肝移植受者和88例健康志愿者血清中可溶性MICA，发现37.6%的终末期肝病患者血清中可溶性MICA显著高于健康人，这种MICA与胆管铸形综合征（BCS）发生的风险密切相关；进一步分析发现患者进行肝移植体内可溶性MICA浓度降低后，发生BCS的几率也相应降低(10.5vs.38.7%)。而且各组间BCS发生率与可溶性MICA的动态变化也密切相关，此外还发现38%的患者在肝移植后体内可溶性MICA恢复至正常水平。”，在肝病方面的研究具有重要的影响力。

**(5).** 科学家基于sMICA分子在肿瘤免疫逃逸方面的作用，设计了一种抗MICA单克隆抗体应用于抗肿瘤治疗，其目的是用抗体结合靶细胞膜型MICA分子，抑制MICA分子的水解，稳定MICA靶抗原，当前的I期和II期临床试验证明注射抗MICA抗体使血液中sMICA分泌明显减少，而且增强免疫细胞对肿瘤细胞杀伤的敏感性(参考文献doi:10.1126/science.aao0505)。

**(6)** 当前解除免疫抑制是非常热门的肿瘤免疫治疗方法，如抗PD-1、PD-L1、CTLA-4等单克隆抗体治疗癌症，但有效率仅30%，这属于松开刹车的一种治疗方法，本项目中双功能重组蛋白（M-S）是一种直接活化免疫细胞并完成对肿瘤靶细胞的杀伤作用，是一种积极的免疫治疗方法，为实现松“刹车”和积极主动的靶向联合肿瘤免疫治疗，提供了重要的应用前景(代表作2，附件2)。

综上所述，本项目研究对天然免疫受体NKG2D的生物功能的研究成果为解决临床肿瘤免疫治疗提供了重要的免疫理论依据和应用前景，具有重要的医学意义。

**代表作及论文目录：**

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 序号 | 论文Doi号 | 成果名称 | 成果来源/杂志名称 | JCR 分区 | 本单位作者/完成人及排序 | 获得时间/论文年月卷期页 | 备注 |
| 1 | 10.14336/AD.2019.1017.  | Tumor-Derived Soluble MICA Obstructs the NKG2D Pathway to Restrain NK Cytotoxicity  | Aging and Disease  | Q1  | Qizhi Luo,1Weiguang Luo,2Quan Zhu,3Huiyun Peng,5Rongjiao Liu,6Min Xie,7Shili Li1,8Ming Li,9 Yizhou Zou,11  | 2020，11(1):118-128 |  |
| 2 | 10.1002/eji.201847550.  | NK cell-mediated anti-leukemia cytotoxicity is enhanced using a NKG2D ligand MICA and anti-CD20 scfv chimeric protein | European Journal of Immunology | Q2 | YizhouZou,1WeiguangLuo,2JingGuo,3QizhiLuo,4 | 2018，48:1750-1763 |  |
| 3 | 10.1155/2017/8679841.  | Analysis of Sera of Recipients with Allograft Rejection Indicates That Keratin1 Is the Target of Anti-Endothelial Antibodies | Journal of Immunology Research | Q3 | Xuli Guo,1Juan Hu,2Weiguang Luo,3Qizhi Luo,4Jing Guo,5Fang Tian,6Yizhou Zou,8 | 2017, 2017:8679841 |  |
| 4 | 10.1186/1471-2172-13-62 | Elevation of soluble major histocompatibility complex class I related chain A protein in malignant and infectious diseases in Chinese patients | BMC Immunol | Q3 | Xiaoxin JiangJu-Fang HuangZhi Huo Qiuqui Zhang Yan JiangXiaoping WuYanwen LiGuanmin JiangLeping Zeng Xiao-Xin YanPingYuRenxian Cao | 2012,13 |  |
| 5 | 10.1016/j.trim.2009.06.003 | High levels of soluble Major Histocompatibility Complex class I related chain A (MICA) are associated with biliary castsyndrome after liver transplantation | TRANSPLANT IMMUNOLOGY | Q3 | [Y Zou](https://xueshu.baidu.com/s?wd=author:(Y Zou) &tn=SE_baiduxueshu_c1gjeupa&ie=utf-8&sc_f_para=sc_hilight=person" \t "https://xueshu.baidu.com/usercenter/paper/_blank)，[X Yang](https://xueshu.baidu.com/s?wd=author:(X Yang) &tn=SE_baiduxueshu_c1gjeupa&ie=utf-8&sc_f_para=sc_hilight=person" \t "https://xueshu.baidu.com/usercenter/paper/_blank)，[X Jiang](https://xueshu.baidu.com/s?wd=author:(X Jiang) &tn=SE_baiduxueshu_c1gjeupa&ie=utf-8&sc_f_para=sc_hilight=person" \t "https://xueshu.baidu.com/usercenter/paper/_blank)，[H Wang](https://xueshu.baidu.com/s?wd=author:(H Wang) &tn=SE_baiduxueshu_c1gjeupa&ie=utf-8&sc_f_para=sc_hilight=person" \t "https://xueshu.baidu.com/usercenter/paper/_blank)，[Q Hao](https://xueshu.baidu.com/s?wd=author:(Q Hao) &tn=SE_baiduxueshu_c1gjeupa&ie=utf-8&sc_f_para=sc_hilight=person" \t "https://xueshu.baidu.com/usercenter/paper/_blank)，[L Yu](https://xueshu.baidu.com/s?wd=author:(L Yu) &tn=SE_baiduxueshu_c1gjeupa&ie=utf-8&sc_f_para=sc_hilight=person" \t "https://xueshu.baidu.com/usercenter/paper/_blank)，[Y Ping](https://xueshu.baidu.com/s?wd=author:(Y Ping) &tn=SE_baiduxueshu_c1gjeupa&ie=utf-8&sc_f_para=sc_hilight=person" \t "https://xueshu.baidu.com/usercenter/paper/_blank) | 2009, 21(4):210-214 |  |
| 6 | 10.1002/jmv.24752.  | Cytokine response to Hantaan virus infection in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome | Journal of Immunology Research | Q3 | Jing Guo,1Xuli Guo,2Yong Wang,3Fang Tian,4Weiguang Luo,5Yizhou Zou,6 | 2017, 89(7): 1139-1145. |  |
| 7 | 10.1111/iji.12338. | The association between MICA/MICB polymorphism and respiratory syncytial virus infection in children | International Journal of Immunogenetics | Q4 | Q.Luo,1X. Guo,2W. Luo,4F. Tian,5P. Yu,6Y. Zou,7 | 2017，44(6):328-336 |  |
| 8 | 10.3969/j.issn.1000-484X.2017.10.015 | 抗主要组织相容性相关蛋白MICA/B的单克隆抗体制备及应用 | 中国免疫学杂志 |  | [田芳](https://xueshu.baidu.com/s?wd=author:(%E7%94%B0%E8%8A%B3) &tn=SE_baiduxueshu_c1gjeupa&ie=utf-8&sc_f_para=sc_hilight=person" \t "https://xueshu.baidu.com/usercenter/paper/_blank)，[罗伟光](https://xueshu.baidu.com/s?wd=author:(%E7%BD%97%E4%BC%9F%E5%85%89) &tn=SE_baiduxueshu_c1gjeupa&ie=utf-8&sc_f_para=sc_hilight=person" \t "https://xueshu.baidu.com/usercenter/paper/_blank)，[郭旭丽](https://xueshu.baidu.com/s?wd=author:(%E9%83%AD%E6%97%AD%E4%B8%BD) &tn=SE_baiduxueshu_c1gjeupa&ie=utf-8&sc_f_para=sc_hilight=person" \t "https://xueshu.baidu.com/usercenter/paper/_blank)，[郭靖](https://xueshu.baidu.com/s?wd=author:(%E9%83%AD%E9%9D%96) &tn=SE_baiduxueshu_c1gjeupa&ie=utf-8&sc_f_para=sc_hilight=person" \t "https://xueshu.baidu.com/usercenter/paper/_blank)，[罗奇志](https://xueshu.baidu.com/s?wd=author:(%E7%BD%97%E5%A5%87%E5%BF%97) &tn=SE_baiduxueshu_c1gjeupa&ie=utf-8&sc_f_para=sc_hilight=person" \t "https://xueshu.baidu.com/usercenter/paper/_blank)，[王慧鹏](https://xueshu.baidu.com/s?wd=author:(%E7%8E%8B%E6%85%A7%E9%B9%8F) &tn=SE_baiduxueshu_c1gjeupa&ie=utf-8&sc_f_para=sc_hilight=person" \t "https://xueshu.baidu.com/usercenter/paper/_blank)，[邹义洲](https://xueshu.baidu.com/s?wd=author:(%E9%82%B9%E4%B9%89%E6%B4%B2) &tn=SE_baiduxueshu_c1gjeupa&ie=utf-8&sc_f_para=sc_hilight=person" \t "https://xueshu.baidu.com/usercenter/paper/_blank) | 2017(10): 1514-1519 |  |

**主要完成人情况：**

**邹义洲：**长期从事天然免疫受体NKG2D及其配体分子的功能与免疫性疾病相关研究，回国后主攻NKG2D信号传导机制，提出了本研究基本思路和研究方法。主持本项目相关国家自然科学基金3项和省重点项目1项，获2014年中国侨联创新成果奖1项、国家发明专利2项；阐明了NKG2D受体活化的分子机制及其影响因素；从基础和临床两方面揭示了可溶性NKG2D配体分子(sMICA)介导肿瘤免疫逃逸的机制；发现了NKG2D受体最重要的配体分子在器官移植排斥反应中起着重要作用。为代表作2和5的第一作者，论文1/3/6/7/8的通讯作者（附件1/2/3/5/6/7/8）。投入本研究的工作量占本人工作量的80%。

**罗奇志：**提出并参与了本项目所有重要科学发现的研究思路、研究内容和技术路线，发现了sMICA与天然免疫受体NKG2D结合后可阻断NKG2D下游信号通路，抑制NK细胞的活化，降低了机体抗肿瘤免疫的作用，介导HCC免疫逃逸；对本项目的重要科学发现2做出了创造性贡献，为代表作1和论文7的第一作者（附件1/7），代表作2/3和论文8的共同作者（附件2/3/8，论文8）。投入本研究的工作量占本人工作量的70%。

**郭旭丽：**博士研究生期间跟随导师从事天然免疫受体NKG2D及其配体分子的功能学与免疫性疾病的相关的研究，同时应用免疫沉淀与蛋白质质谱技术分析鉴定新的内皮细胞移植抗原，是本项目重要科学发现2和4的研究方法、研究内容和技术路线的实施者，直接参与了重要科学发现2和4的实验过程和实验操作。是代表作3的第一作者，论文6/7/8的参与者（附件3/6/7/8）。投入本研究的工作量占本人工作量的65%。

**郭靖：**从2013年攻读博士学位期间，跟随导师从事天然免疫受体NKG2D及其配体分子的功能学与免疫性疾病的相关研究，建立了多抗原悬液芯片检测方法，一次试验可同时对微量样本中多种细胞因子进行定量检测，参与了本项目所有重要科学发现的部分研究，为论文6的第一作者，代表作2/3和论文8的参与者（附件2/3/6/8）。投入本研究的工作量占本人工作量的60%。

**严小新：**本项目重要科学发现2的研究方法、研究内容和技术路线的实施者，直接参与了重要科学发现2的实验过程，发现血清sMICA水平可能为诊断一些恶性肿瘤生物标记物，具有重要的临床应用价值，sMICA有助于临床上对肝细胞癌等多种肿瘤进行分期，且血液中sMICA的浓度与肿瘤恶性程度呈正相关，sMICA还有助于对多种感染性疾病的诊断，但sMICA与肿瘤临床病理学分化程度无直接关联。为代表作4的第一作者，代表作5的参与者（附件4/5），投入本研究的工作量占本人工作量的50%。

**主要完成单位情况：**

本项目几乎所有的研究都依托中南大学平台完成，中南大学基础医学院给我们提供了进行免疫学、分子生物学等平台，我们利用该平台进行了Western blot、流式细胞术、免疫荧光、基因分析、PCR、动物实验等，得出了本项目所有重要科学发现中的结论。

**主要完成人合作关系说明：**

1. 邹义洲 项目第一完成人，一直从事天然免疫受体NKG2D及其配体和抗体等分子在功能学及免疫性疾病中的研究，统筹本项目所有研究内容。
2. 罗奇志 主要负责研究天然免疫受体NKG2D信号通路的活化、血清sMICA与肝细胞癌免疫逃逸的关系、与邹义洲合作研发了PCR-SBT基因分型技术并应用于MICA基因的分型。合作时间：2012.1-2019.12，合作论文5篇（代表作1/2/3，论文7/8），共同立项1项。
3. 郭旭丽 主要负责应用免疫沉淀与蛋白质质谱技术分析鉴定新的内皮细胞移植抗原，参与MICA等位基因型别的鉴定、抗MICA单克隆抗体的制备、悬液芯片技术检测多种细胞因子等工作。合作时间：2014.9-2017.6，合作论文4篇（代表作3，论文6/7/8）。
4. 郭靖 主要负责研究并建立了多抗原悬液芯片检测方法，参与研究NKG2D信号通路的活化与NK细胞杀伤肝细胞癌之间的关系，参与研究利用未知抗体捕获内皮细胞抗原。合作时间：2013.10-2019.12，合作论文4篇（代表作2/3，论文6/8）。
5. 严小新 主要负责研究天然免疫受体NKG2D的可溶性配体（sMICA）与恶性肿瘤和感染性疾病之间的关系，兼顾研究sMICA与肝移植患者术后BCS综合征之间的关系。合作时间：2009.1-2017.12，无合作论文（代表作4未出现第一完成人名字），但所做实验是与第一完成人共同完成。

**本项目提及的其他知识产权清单：**

1 一种测试NK细胞活化的受体信号通路NKG2D荧光报告系统的构建方法及应用，第一权利人，发明专利，编号：ZL201610274268.3，授权公告日：2019.6.18

2 一种与移植排斥相关的内皮细胞抗原及其应用、试剂盒，第一权利人，发明专利，编号：201610926894.6，授权公告日：2020.1.8