

# 동맥경화증에서 T-세포 및 B-세포에 대한 *Porphyromonas gingivalis* 열충격 단백질의 항원 결정 부위 특이성 연구

박정규 · 김성조 · 최점일

부산대학교 치과대학 치주과학교실

## I. 서론

치주 질환은 심장혈관계 질환의 위험 요소 중 하나 일 수 있다<sup>5)</sup>. 이전의 연구에 의하면 주요 치주 질환 원인 균의 하나인 *Porphyromonas gingivalis*(*P. gingivalis*)가 혈관 내피 세포를 침투할 수 있다는 것이 확인되었다<sup>6)</sup>. 그러나 치주 질환이 어떤 기전에 의해 심장 혈관 질환을 일으킬 수 있는 지에 대한 생물학 적인 기전을 포함한 인과 관계 확립이 필요하다<sup>7,8)</sup>.

세균과 인간의 열충격 단백질(heat shock protein, hsp)사이의 높은 배열 상동성(sequence homology)을 고려할 때, 이 단백질이 동맥 경화증 환자에서 자가 면역 질환의 기전에 영향을 줄 것으로 생각된다<sup>9-12)</sup>. *Mycobacterial hsp65*나 인간의 *hsp 60*이 동맥경 화증에 관여한다고 생각된다<sup>13,14)</sup>. 이전의 연구에서 동맥 경화증에서 세균이나 인간 hsp에 대한 T-세포 면역 반응 특이성이 확인되었다<sup>14+16)</sup>.

*P. gingivalis*와 같은 치주 원인 균의 hsp에 의해 촉 발되는 숙주 면역 반응 체계가, 최근에 같은 계통의 포유류의 치은 결합조직이나 동맥 혈관 벽에서 유사 한 상호 작용을 하는 것으로 밝혀졌다<sup>17-19)</sup>. *P. gingivalis*가 혈관 내에 순환할 수 있고, 이것이 동맥 내 피세포에 침입하고, 이 세균의 hsp들이 T-lympho-

cyte, 대식세포, 단핵구 세포의 동맥 경화 병소로의 집락과 염증성 cytokine의 분비를 자극한다는 가설 을 세울 수 있다. 최근에 동맥 경화증에서 *P. gingi valis*가 면역학적 병인 과정에 관여할 수 있다는 증거 가 되는, *P. gingivalis*나 *P. gingivalis* hsp 에 대한 T- 세포 면역 반응 특이성이 확인되었다<sup>3,20)</sup>.

자가 면역 질환을 조절하는 면역 체계를 이해하기 위해 T-세포나 B-세포가 독점적으로 인지하는 감염 원인 균의 면역 우세 항원 결정 부위를 확인하는 것 이 필수적이다. 이 연구의 목적은 동맥 경화증 환자 에서 *P. gingivalis* hsp reactive T-cell line을 규명하 고, *P. gingivalis* hsp의 T-세포 및 B-세포 항원 결정 부 위를 확인하는 것이다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 연구 대상

동맥 경화증 환자는 병리학적 검사를 포함한 전신 적 질환에 대해 검사하였다. 동맥 경화증 환자는 부 산 대학교 병원의 지침에 따른 외과적 시술이 필요 한 환자로 선택하였다. 임상적으로 Helsinki principle에 따라 동맥 경화증 환자를 선택하였다. 대조군

으로는 전신적 질환 경력이 없는 임상적으로 건강한 사람들을 선택하였다.

## 2. Recombinant *P. gingivalis* hsp 60의 정제

*P. gingivalis* 381에서 추출한 GroEL gene<sup>21)</sup>은 일본 Okayama치과대학의 Yoji murayama교수로부터 양도받았다. *P. gingivalis* GroEL gene을 pGEX-4T-3 expression vector에 cloning하여 glutathione S-transferase-*P. gingivalis* GroEL fusion construct로 전환했다. Fusion construct는 HB-1142 cell에 형질 전환했고, 1M isopropyl  $\alpha$ -D-thiogalactoside(IPTG)를 첨가해서 단백질 발현을 유도했다. 세포를 수거하여 100 mM Triethanolamine-HCl, 170mM NaCl, 1% Triton X-100, 10mM dithiothreitol, pH 7.4용액에 재 부유시키고 sonication하였다. Phosphate-buffered saline + 1% Triton X-100으로 2번 세척한 glutathione Sepharose 4B beads(Pharmacia, Swenden) slurry를 각 tube에 첨가하고 배양하였다. 침전된 bead들을 phosphate buffered saline + 1% Triton X-100으로 조심스럽게 세척하고 재 부유하였다. Fusion protein은 elution buffer(10mM reduced glutathione in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0)로 처리하여 추출 정제하였다.

## 3. ELISA 방법을 이용하여 anti-*P. gingivalis* hsp 60 Ig G 항체 역가 측정

Microtiter plate(CovaLink plate, NUNC, Denmark)를 phosphate buffer로 희석한 hsp(10  $\mu$ g/ml)로 3번 coating하였다<sup>3,22,23)</sup>. Plate를 세척하고 혈액 표본을 첨가하여 배양하였다. Plate를 세척후 peroxidase-conjugated mouse anti-human IgG(H+L)(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)를 첨가하였다. 2시간 배양 후에 plate를 세척하고 tetramethylbenzidine(Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)를 첨가하여 배양하고, 0.18 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 첨가하여 반응을 종결시켰다. 450nm의 파장에서 광학 흡광도를 검사하였다. 대조군 혈청중의 하나를 ELISA unit 100으로 설정하고 다

른 대조군과 동맥 경화증 환자들의 혈청 IgG역가를 분석하였다. 대조군 역가의 평균 표준 편차의 3배를 초과할 경우 항체 역가가 상승한 것으로 판정하였다.

## 4. Western immunoblot

환자의 혈청을 이용하여 *P. gingivalis* hsp와 human hsp 60에 대한 Western immunoblot 양상을 분석하였다. recombinant *P. gingivalis* hsp 60이나 human hsp 60(StressGen Biotechnology, Victoria, BC, Canada)은 전기영동(SDS-PAGE)하여 nitrocellulose membrane에 electrotransfer하였다. 5% skin milk로 막을 blocking한 후, PBS buffer로 희석한 환자혈청(1:25)을 첨가하여, 2시간 배양하였다. 막을 세척하고 horseradish peroxidase-conjugated mouse anti-human IgG를 첨가하여 1시간동안 배양하였다. PBS-Tween으로 막을 세척한 후에, tetramethylbenzidine을 첨가하여 발색되게 하였다.

## 5. *P. gingivalis* heat shock protein-reactive T-cell line의 확립과 특성

수집된 atheroma병소를 collagenase(10  $\mu$ g/ml, Behringer-Manheim, Berlin, Germany)로 처리하여 단핵구 세포군을 추출하였다<sup>3,22,23)</sup>. 12 well 조직배양 plate를 사용하여, atheroma병소에서 추출한 단핵구 세포에 *P. gingivalis*와 antigen presenting cell(APC)을 첨가하여 배양하였다. 환자로부터 채취한 혈액에서 lymphocyte를 분리하여, mitomycin C로 처리한 후 APC로 사용하였다. 단핵구 세포와 lymphocyte는 Ficoll-Paque medium(Pharmacia, Upsala, Sweden)을 이용한 gradient cell separation technique을 이용하여 분리하였다. 2주간 배양후 T-세포는 1주간 휴지기를 주었으며, 그 후 T-세포 증식을 유도하기위해 신선한 mitomycin-treated APC와 *P. gingivalis*를 첨가하였다.

*P. gingivalis* hsp-reactive T-cell line은 *P. gingivalis* reactive T-cell line에서, T-세포를 자극하기위해 heat shock protein antigen(5  $\mu$ g/well in 12-well culture

plate)을 첨가하여 같은 방법으로 추출하였다. 배양 상층 액을 채취하여 cytokine 분석을 위해 -20°C에 보관하였다. T-cell line 특성을 규명하기 위하여, 세포를 Per-CP-conjugated mouse anti-human CD3과 FITC-conjugated mouse anti-human CD4 또는 PE-conjugated mouse anti-human CD8 monoclonal antibodies(PharMingen, San Diego, CA)로 2번 염색하였다. 각 T-cell line의 표현형 발현은 Epics Elite ESP(Coulter, Hialeah, FL)를 이용하여 flow cytometry로 검사하였다.

## 6. T-세포 증식 분석

항체 특이성 T-세포 증식을 평가하기 위하여, 각 T-cell line에서 채득한 *P. gingivalis* hsp reactive T-세포를 3단계의 *P. gingivalis* hsp antigen 농도(0.1, 1, 10  $\mu$ g/well)에서 배양하였다<sup>22)</sup>. 항원 특이성을 평가하기 위해, 대조군 항원으로 *Mycobacterium tuberculosis* hsp 65(Lionex GmH, Braunschweig, Germany)를 같은 방법으로 첨가하였다. 각 well에 3mitomycin C로 처리한 antigen presenting cell을 첨가하였다. 72시간 배양한 후, <sup>3</sup>H-thymidine(1  $\mu$ Ci/well)을 첨가하고, radioactivity 분석을 위해 24시간 배양하였다.

## 7. Cytokine 농도 결정

94-well plate(Corning, Corning, NY)를 4°C에서 하룻밤동안, sodium carbonate buffer로 희석한 mouse anti-human IFN- $\gamma$ , IL-4 또는 IL-10(PharMingen, San Diego, CA, 4  $\mu$ g/ml)으로 coating하였다<sup>3,22,23)</sup>. PBS/Tween으로 3회 세척한 후, well은 PBS + 10% fetal bovine serum(PBS/FBS)로 block한 후에 PBS/Tween으로 3회 세척하였다. 각 표본과 standard recombinant human IFN- $\gamma$ , IL-4 또는 IL-10(PharMingen, San Diego, CA)과 PBS/FBS + 0.05% Tween20(PBS/FBS/Tween)으로 희석된 PBS를 양성 또는 음성 대조군으로 첨가하여 3시간 배양하였다. Plate를 세척한 후에 biotinylated mouse anti-human IFN- $\gamma$ , IL-4 또는 IL-10(PharMingen, San Diego, CA,

2  $\mu$ g/ml in PBS/FBS/Tween)을 첨가하고 실온에서 1시간 배양하였다. PBA/Tween으로 4회 세척후, hydroperoxidase conjugated streptavidin(PharMingen, San Diego, CA)을 첨가하고 배양하였다. Plate를 세척하고, o-phenylenediamine(1 mg/ml in 0.1 M citrate buffer, pH 4.5)을 첨가하고, 20분간 배양하였다. 그 후 4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 광학 흡광도는 490 nm 파장에서 측정하였다. 표준 cytokine의 광학 흡광도는 희석농도에 맞게 배분한 후, 비교하여 각 표본의 cytokine 농도를 결정하였다.

## 8. Synthetic peptide

*P. gingivalis* GroEL의 모든 amino acid sequence를 spanning한 총 108 decapeptide를, F moc chemistry에 기초한 제조사의 지시서에 따라서, Epitope-Scanning Kit(Chiron Mimotopes, Clayton, Victoria, Australia)를 이용하여 합성하였다. Peptide들은 5개의 amino acid residues가 겹치게 계획되었다. 합성 충실도는 양성(PLAQ) 또는 음성(GLAG) 대조 peptide를 동시에 합성하고, 또한 후에 monoclonal antibody를 첨가하여, 결합되는 것을 검사함으로써 확인하였다.

## 9. T-세포 항원 결정 부위 mapping

합성 peptide의 항원 결정 부위 특이성을 확인하기 위해, *P. gingivalis* hsp-specific T-cell line에서  $1 \times 10^5$  T 세포를 synthetic peptide(0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l)의 양을 증가시키면서  $1 \times 10^6$  APC와 함께 자극하였다. Plate는 5% CO<sub>2</sub> 가슴배양기에서 37°C에 배양하였다. 48시간 배양 후, 세포에 <sup>3</sup>H-thymidine(1  $\mu$ Ci/well)을 첨가한 후, 6시간 배양하고, liquid scintillation counter로 측정하였다. 증식은 stimulation index(SI); 항원이 없는 counts per minute(cpm)에 대한 항원첨가 cpm의 비율로 확인하였다. SI value가 2이상일 때 양성으로 판정하였다.

## 10. Conjugated plate 제작

Microtiter plate에 synthetic peptide을 부착하기 위해 용해성 1-ethyl-(3-dimethyl-aminopropyl) carbodiimide(EDC)와 N-hydroxy-succinamide(NHS)를 첨가하였다. EDC와 NHS는 1 M의 농도로 사용하였다. 각 peptide는 소량의 dimethyl sulfoxide로 용해하고, 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer로 희석하여, 결국 peptide농도가 1 µg/ml가 되게 하였다. 100 µl의 표본을 well의 바닥부에 조심스럽게 주입하였다. plate는 상온에서 하룻밤동안 유지하였다. 상층부를 제거하고, plate는 증류수로 5회 세척하고, 상온에서 건조시켰다. plate를 밀봉하고 4°C 에서 보관하였다.

## 11. B-세포 항원 결정 부위 mapping을 위한 enzyme immunoassay

Conjugated plate를 PBS-Tween으로 세척하여, 희석된 혈청 표본은 첨가하고 배양하였다. Plate를 세척한 후, peroxidase-conjugated mouse anti-human IgG(H+L)(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)를 첨가하였다. 2시간 배양 후 plate를 세척하고, tetramethylbenzidine(Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)를 첨가하고, 배양 후에 0.18 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 광학 흡광도는 450 nm에서 측정하였다. 각각의 표본에서 peptide에 대한 ELISA지표의 평균과 표준편차를 계산하였다. 평균 + 표준편차를 기준으로 하여 peptide의 각 지표를 양성 또는 음성으로 판정

하였다.

## III. 연구 성적

### 1. 동맥경화증 환자

6명의 동맥경화증 환자를 선택하여 검진하고, 수술 시 동맥 경화 병소를 추출하였다. 모든 환자는 남성이며, 흡연자였고, 나이는 50-76세 분포였다(Table 1).

### 2. Recombinant *P. gingivalis* hsp 60의 정제

Recombinant *P. gingivalis* hsp 60은 SDS-PAGE방법으로 분자량의 무게와 순도를 확인하였다(Figure 1). Gel 양상은 약 60 kDa크기로 recombinant heat shock protein의 순수한 순도를 보여주는 단일 band였다.

### 3. ELISA 방법을 이용하여 anti-*P. gingivalis* hsp 60 Ig G 항체 역가 측정

6명 환자의 anti-*P. gingivalis* hsp 60 IgG 항체역가는 10명의 대조군에 비해 증가되었다(Table 2).

### 4. Western Immunoblot

동맥 경화증 환자의 혈청은 Western immunoblot에서 *P. gingivalis* hsp 60과 human hsp 60에 강한 cross-reactive pattern을 보였다(Figure 2). 건강한 대조군에서는 *P. gingivalis* hsp 60이나 human hsp 60

Table 1. Summary of patient characteristics - systemic examination

Gender/Age	Medical diagnosis	Smoking
1 M/50	Arteriosclerosis obliterans (right superficial femoral artery)	Y
2 M/62	Arteriosclerosis obliterans (left superficial femoral artery)	Y
3 M/55	Arteriosclerosis obliterans (left superficial femoral artery)	Y
4 M/53	Arteriosclerosis obliterans (both superficial femoral artery)	Y
5 M/66	Arteriosclerosis obliterans (right superficial femoral artery)	Y
6 M/76	Arteriosclerosis obliterans (right superficial femoral artery)	Y

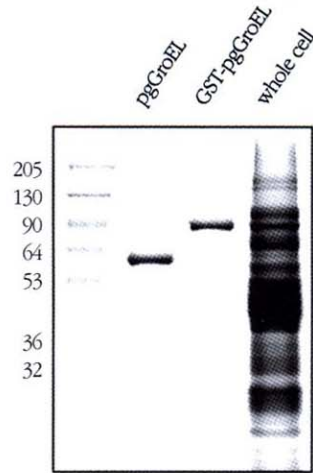


Figure 1. SDS-PAGE picture of purified recombinant *P. gingivalis* GroEL 60 (Lane 1).

Table 2. Anti-*P. gingivalis* heat shock protein IgG antibody titer of sera from each patient and control subjects

Atherosclerosis group						Control group (Mean)
1*	2	3	4	5	6	N=10
196,1	218,6	231,1	188,9	206,8	211,7	106,5 ± 11,8

\* number indicates each patient. All the antibody titer is greater than mean value of control subjects + 3,s.d.

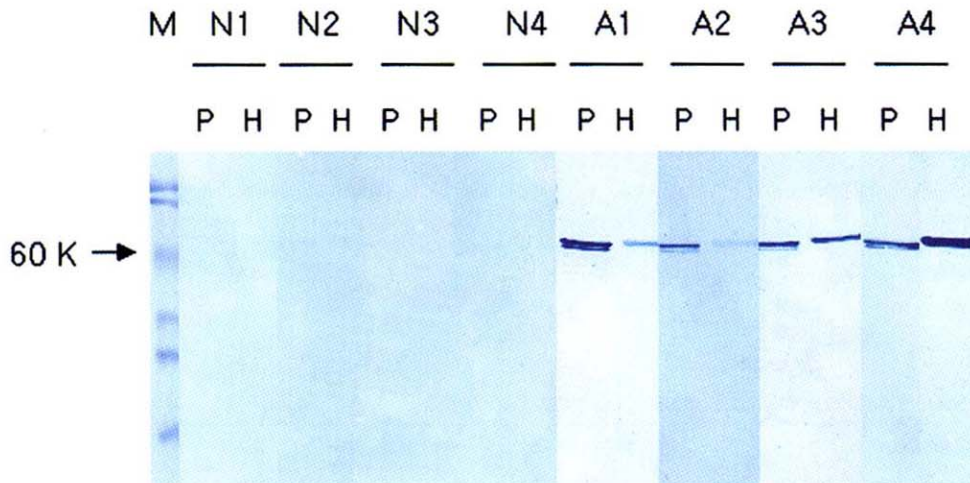


Figure 2. Western immunoblot pattern of cross-recognition of *P. gingivalis* hsp60 and human hsp60 by sera obtained from four healthy control subjects (N1-N4) or atherosclerosis (A1-A4). Pairs of two lanes represent serum reactivity of one subject, left panels being against *P. gingivalis* hsp 60 (P), while right panels being against human hsp 60 (H), respectively.

둘 다 반응이 없었다.

### 5. *P. gingivalis* heat shock protein-reactive T-cell line의 확립과 특성

동맥 경화증 환자에서 추출한 동맥 경화 병소에서

분리해낸 T-세포들은 *P. gingivalis* hsp에 대해 증식 반응을 보였다. 동맥 경화 병소에서 추출한 *P. gingivalis* hsp reactive T- cell line의 CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>나 CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> cell은 각 환자들에서 다양한 phenotypic profile을 보였다(CD4<sup>+</sup>T cell : 55.4-69.2%, CD8<sup>+</sup>T cell : 15.5-31.8%)(Figure 3). In vitro에서 *P. gingi-*

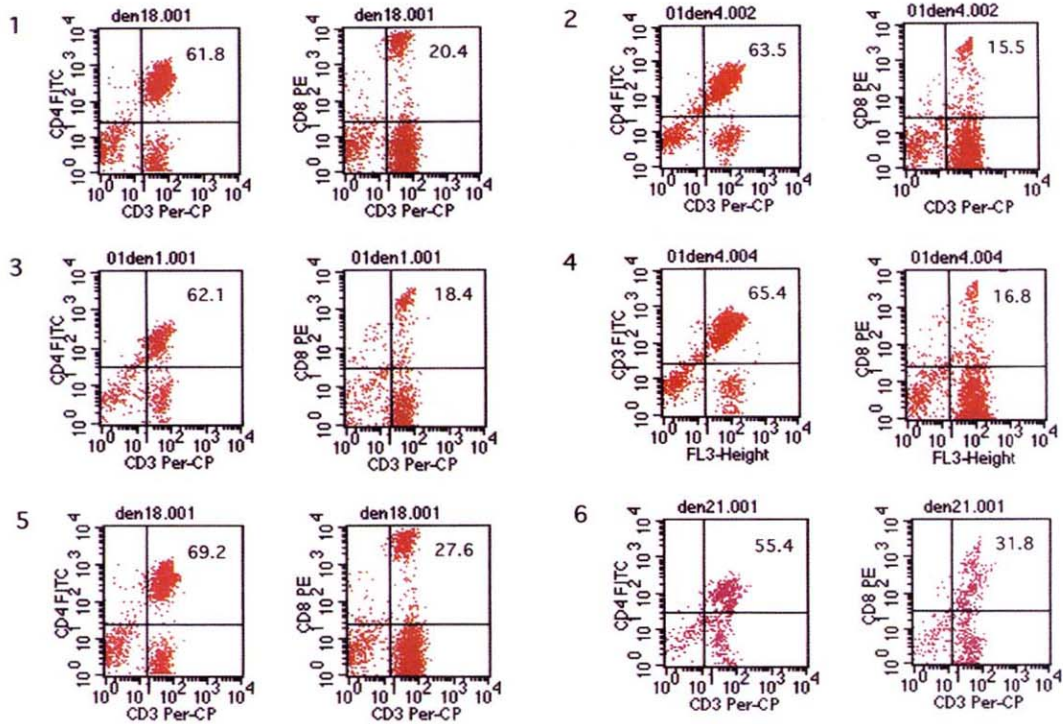


Figure 3. Phenotype profiles of *P. gingivalis* hsp60-specific T cell lines established from the atheroma lesion from six patients analyzed by flow cytometry. Profiles of proportions (%) of CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T cells (left) and CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T cells (right) of T cell lines established from atheroma lesions are demonstrated. The number indicates each patient.

Table 3. In vitro proliferating responses of *P. gingivalis* hsp-specific T cell lines established from 5 atheroma lesions to different antigen dose of *P. gingivalis* hsp60\*

antigen(μg/ml)	TCL1**	TCL2	TCL3	TCL4	TCL5	TCL6
0.1	2,120 ± 26	3,111 ± 113	2,191 ± 66	2,121 ± 192	2,332 ± 137	2,609 ± 89
1	5,428 ± 89	6,398 ± 241	4,519 ± 169	5,006 ± 227	4,198 ± 214	4,220 ± 105
10	8,158 ± 155	14,321 ± 357	7,188 ± 219	8,290 ± 296	7,982 ± 219	8,226 ± 282

\* unit expressed as mean counts per minute of triplicate measurements ± s.d.

\*\* TCL denotes T cell line and the number indicates each patient

*valis hsp* 60을 0.1, 1, 10  $\mu\text{g/ml}$ 로 자극하였을 때, 농도에 비례하여 증식 활성도가 증가되었다(Table 3). Atheroma에서 추출한 *P. gingivalis hsp*-specific T-cell line의 배양 상층 액에서 다양한 정도의 IFN- $\gamma$  (3.6-9.1 ng/ml), IL-4(2.1-4.1ng/ml)와 IL-10(1.7-3.6 ng/ml)이 검출되었다(Table 4).

### 6. T-세포 항원 결정부위 mapping

동맥 경화증에서 인지된 *P. gingivalis hsp* 60 peptide의 spectrum을 결정하기 위해, 6명의 환자로부터 추출한 *P. gingivalis hsp*-reactive T-cell line의 증식반응을 검사하였다. 각 환자의 T-cell은 *P. gingivalis hsp* 60의 모든 sequence를 spanning한 108개의 overlapping peptide들 중, SI value가 2 이상을 보인, 10개의 peptide들(Nos. 3, 15, 24, 33, 45, 53, 64, 84, 88, 99)을 주된 T-세포 항원 결정 부위로 선정하였다 (Table 5).

### 7. B-세포 항원 결정 부위 mapping

Peptide conjugated plate에 6명의 환자의 혈청을 주입하여 epitope mapping하였다. 이 연구에서 검사된 환자 혈청의 항원 결정 부위 scanning pattern은 비교적 비슷하였다. 5명이상에서 양성반응을 보인 20개의 antigenic peptide들(Nos. 3, 6, 15, 24, 29, 33, 39, 45, 53, 56, 64, 69, 74, 75, 84, 85, 88, 93, 99, 102)을 *P. gingivalis hsp* 60의 주된 B-세포 항원 결정 부위로 선정하였다. 확인된 항원 결정 부위는 Figure 4에 나타내었다.

## IV. 총괄 및 고안

Anti-*P. gingivalis hsp* 60 IgG 항체역가는 실험군 6명의 동맥 경화증 환자에서 대조군에 비해 더 높았다. *P. gingivalis hsp* 60에 대한 IgG항체 역가가 증가된 동맥경화증 환자의 혈청은 Western immunoblot

Table 4. Cytokine concentration of culture supernatants of *P. gingivalis*-specific T cell lines from atheroma (ng/ml)<sup>§</sup>

	1 <sup>¶</sup>	2	3	4	5	6
IFN- $\gamma$	4.6 $\pm$ 0.7	3.6 $\pm$ 0.2	5.4 $\pm$ 0.6	4.8 $\pm$ 0.4	9.1 $\pm$ 0.6	7.7 $\pm$ 0.4
IL-4	3.2 $\pm$ 0.2	4.1 $\pm$ 0.4	2.2 $\pm$ 0.3	2.3 $\pm$ 0.7	3.8 $\pm$ 0.9	2.1 $\pm$ 0.3
IL-10	1.7 $\pm$ 0.3	2.8 $\pm$ 0.5	2.1 $\pm$ 0.5	1.9 $\pm$ 0.8	2.3 $\pm$ 0.7	3.6 $\pm$ 0.7

<sup>§</sup> results from the triplicate measurements (mean  $\pm$  s.d)

<sup>¶</sup> number indicates each patient

Table 5. List of T-cell epitope peptide numbers and its amino acid sequences.

Peptide No.	position	Sequence
P3	12-21	RDLLKKGVDA
P15	73-82	VKEVASKTND
P24	117-126	RGIDKSVKSV
P33	162-171	IAEAMRKVKK
P45	222-231	IYDKKISVLK
P53	262-271	LNVNRLRGLS
P64	316-325	MLGTAEKVRV
P84	416-425	GTTYIRAIAA
P88	438-447	TGIEIVKRAI
P99	493-502	VIDPAKVTRV

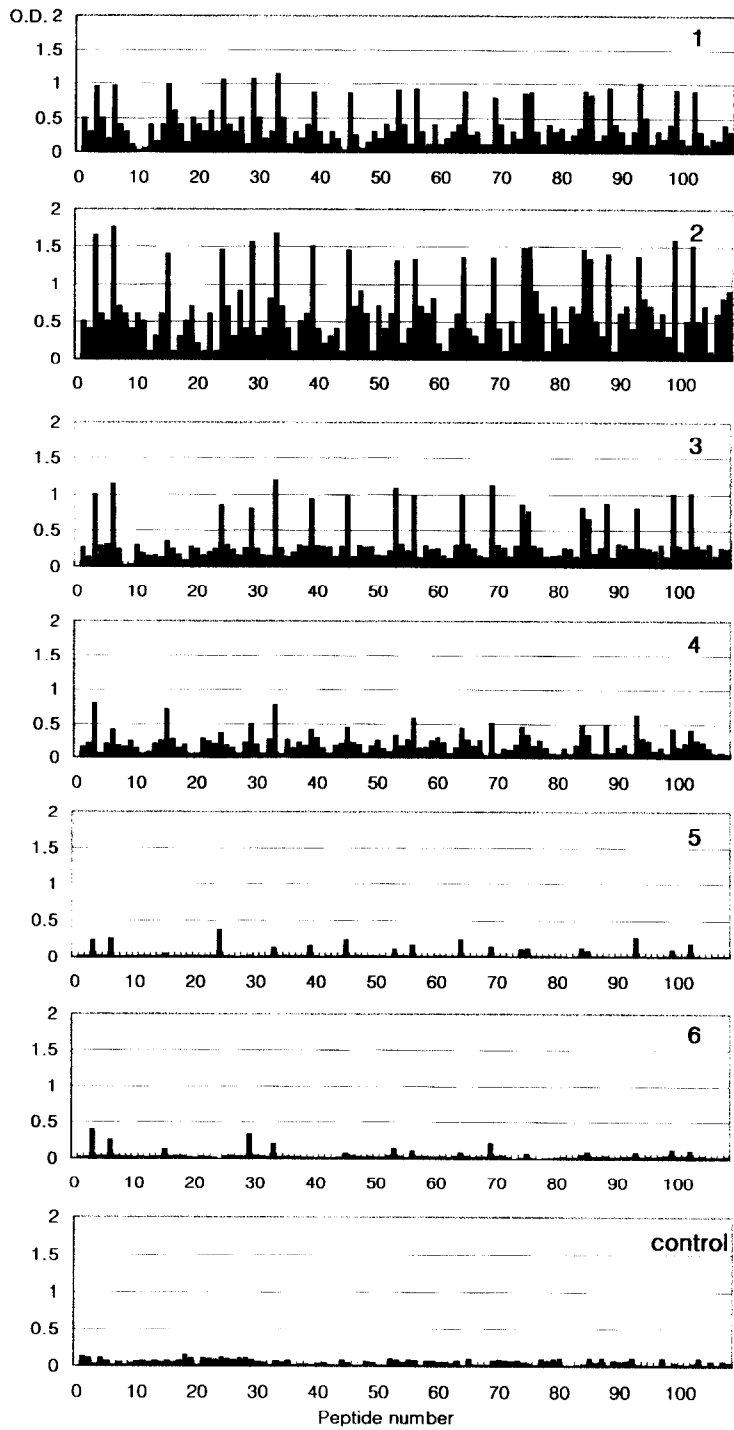


Figure 4. Bar diagrammatic representation of optical densities as a measure of serum reactivities to 108 synthetic peptides spanning whole *P. gingivalis* hsp60. The number indicates each patient,



에서 *P. gingivalis* hsp 60과 human hsp 60에 동시에 반응하였다. 이 결과는 *P. gingivalis*와 연관된 동맥 경화증의 자가 면역 병인 기전에서 bacterial hsp의 연관 가능성을 언급한 다른 보고들과 일치한다<sup>9,12,18-20</sup>. 최근 일부 연구자들은 bacterial stress protein이나 human hsp가 표적 항원에 면역세포가 모이는데 중요한 역할을 하고, 이것이 동맥 경화증 병소와 plague의 형성을 유도한다고 주장하였다<sup>13,14</sup>. Bacterial hsp에 대한 T-cell 면역반응 특이성이 동맥 경화증에서도 확인되었다<sup>14,16</sup>.

Hsp는 보존성이 높고, hsp 60 경우에 mycobacteria와 유인원 사이에 약 60%의 배열 상동성을 보인다<sup>24</sup>. 치주병인 세균들 중에서도 상호작용(cross-reactivity)을 보인다<sup>10</sup>. 즉 conserved sequence에 대한 특이성을 가진 T-세포와 항체들은 감염성 질병의 병인에 기여할 수 있는 auto-reactive일 가능성이 있다<sup>11,25</sup>. 최근 주요 치주 질환 원인 균의 hsp DNA sequence가 밝혀졌다<sup>21,26-30</sup>. Bacterial hsp에 대한 T-세포 면역반응은 포유류 hsp를 표적으로 하는 자가 면역을 유도함으로써 치주 질환의 면역학적 병인기전에 관여할 수 있다<sup>17-19</sup>.

6명의 환자에서 추출한 동맥 경화증 병소에서 분리한 단핵구 세포군에서 *P. gingivalis* hsp-reactive T-cell line을 확인할 수 있었는데, Th1과 Th2 둘 다의 독특한 cytokine을 분비하는 CD4<sup>+</sup>와 CD8<sup>+</sup> T-세포 혼합형이었다. 이것은 이전 연구와 일치한다<sup>20</sup>. *P. gingivalis* hsp-reactive T-cell line은 in vitro에서 *M. tuberculosis* hsp 65 항원에 증식되는 것이 없었다. 이것은 *P. gingivalis* 감염을 경험한 동맥 경화증 환자의 T-세포가 혈중에 순환하는 *P. gingivalis* hsp 항원에 의해 자극되고, *P. gingivalis*가 침윤된 atheroma 병소에 유도될 수 있다는 것을 증명하는 것이다.

이 연구의 목적은 hsp 60 단백질에 존재하는 특이 liner B-세포 항원 결정부위를 알기위한 anti-hsp 60 혈청 항체를 관찰하는 것이었다. 이를 위해 overlapping peptide를 Covallink plate에 coating하였다. 환자 대부분에서 항원-항체 반응이 관찰된 것은 20개 부위였다. 이들 항원 결정 부위 중 10개가 치주질환에서 B-세포 항원 결정 부위일 뿐 아니라, T-세포 항

원 결정 부위인 것으로 확인되었다<sup>31</sup>. 따라서 10개의 항원 결정부위를 동맥 경화증의 공통 T-세포와 B-세포 항원 결정 부위로 선정하였다. 또한 이들의 peptide의 sequence를 분석하여, 동맥 경화증 환자의 human hsp 60에서 확립된 항원 결정 부위와 일치하는 것이 있는지 확인하였다(Table 6). *P. gingivalis* hsp 60의 peptide no. 15 VKEVASKTND가 human hsp 60의 VQDVANNTNE와 동일하며, 이것은 동맥 경화증의 B-세포 항원 결정 부위로 확인되었다. 이 부위는 human hsp 60과 동일한 GroEL사이의 교차 반응의 결정적인 열쇠일 수 있고, 이 peptide를 미래의 동맥 경화증의 예방 백신으로 이용할 수 있을 것이다. 앞으로 atheromatous plaque에서 항원 결정 부위 특이성 T-cell line을 확립하고, 이들 세포들을, 백신 효과를 검정하기 위한 인간의 면역을 평가하기 위한 실험적 동맥 경화 발병실험에서, 면역 결핍 쥐(severe combined immunodeficiency mice)에 적용할 수 있을 것이다.

No. p39 MQFDRGYISP도 흥미를 끄는 peptide인데, 이것은 다른 세균 hsp 와 인간 hsp 60과 동일성을 보인다<sup>31</sup>. 그러나 인간의 hsp 60에서 이 부위는 항원 결정 부위로 나타나지 않았다. 따라서 이 peptide는 앞으로의 연구 과제로 두고 이번 연구에서 배제하였다.

## V. 결론

이 연구의 목적은 동맥 경화증에서 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) 열충격 단백질 (heat shock protein, hsp) 60에 대한 T-세포 면역반응 특이성과 T-세포 및 B-세포 항원 결정 부위 특이성을 평가하는 것이다. Anti-*P. gingivalis* Ig G항체역가는 모든 환자에서 증가되었다. 동맥 경화증 환자에서 추출한 Atheroma 병소에서 *P. gingivalis* hsp-specific T-cell line을 확립하였다. 이것은 Th1과 Th2 세포 둘 다의 특징적인 cytokine을 분비하는 CD4<sup>+</sup>와 CD8<sup>+</sup>세포의 혼합형이었다. *P. gingivalis* hsp 60 molecule에서 spanning된 108 overlapping synthetic peptide중에서 T-세포와 B-세포에 공통적으로 항원 결정 부위 특이성을 나타내는 10개의

**Table 6. Comparison of peptide sequence homology between T- or B-cell epitopes of *P. gingivalis* hsp60 and other published epitopes of human hsp60 in systemic diseases.**

Peptide	source	sequence	remarks	reference
3	Pg hsp60	RDLLKKGVDA	T- & B-cell epitope in atherosclerosis	present study
			B-cell epitope in periodontitis	31
	hsp60	RALMLQGVDL	T-cell epitope in diabetes	32
15	Pg hsp60	VKEVASKTND	T- & B-cell epitope in atherosclerosis	present study
			B-cell epitope in periodontitis	31
	hsp60	VQDVANNITNE	B-cell epitope in atherosclerosis	33
24	Pg hsp60	RGIDKSVKSV	T- & B-cell epitope in atherosclerosis	present study
			B-cell epitope in periodontitis	31
	hsp60	RGVMLAVDAV	T-cell epitope in diabetes	32
			T-cell epitope in Behcet syndrome	34
33	Pg hsp60	IAEAMRKVKK	T- & B-cell epitope in atherosclerosis	present study
			B-cell epitope in periodontitis	31
	hsp60	ISDAMKKVGR	T-cell epitope in Behcet syndrome	34
45	Pg hsp60	IYDKKISVLK	T- & B-cell epitope in atherosclerosis	present study
			B-cell epitope in periodontitis	31
	hsp60	LSEKISSIQ	T-cell epitope in Behcet syndrome	34
53	Pg hsp60	LVVNRLRGS	T- & B-cell epitope in atherosclerosis	present study
			B-cell epitope in periodontitis	31
	hsp60	LVLNRLKVGL	T-cell epitope in diabetes	32
64	Pg hsp60	MLGTAEKVRV	T- & B-cell epitope in atherosclerosis	present study
			B-cell epitope in periodontitis	31
	hsp60	DLGKVGIV	T-cell epitope in Behcet syndrome	34
84	Pg hsp60	GTTYIRAIAA	T- & B-cell epitope in atherosclerosis	present study
			B-cell epitope in periodontitis	31
	hsp60	GCALLRCIPA	T-cell epitope in diabetes	32
88	Pg hsp60	TGIEIVKRAI	T- & B-cell epitope in atherosclerosis	present study
			B-cell epitope in periodontitis	31
	hsp60	IGIEIKRTL	T-cell epitope in diabetes	32
99	Pg hsp60	VIDPAKVTRV	T- & B-cell epitope in atherosclerosis	present study
			B-cell epitope in periodontitis	31
	hsp60	IIDPTKVVRT	T-cell epitope in diabetes	32

Pg hsp60: *Porphyromonas gingivalis* heat shock protein 60

Hsp60: human heat shock protein 60

peptide를 확인하였다. *P. gingivalis* hsp 60은 항원 결정 부위로서 동맥 경화증의 면역 조절 과정에 영향을 주는 것으로 생각된다.

## VI. 참고문헌

1. Ando, T., Kato, T., Ishihara, K., Ogiuchi, H., & Okuda, K. Heat shock proteins in human periodontal disease process. *Microbial, Immunol* 1995 ; 39 : 321-327.
2. Chiu, B. Multiple infections in carotid atherosclerotic plaques. *Am. Heart J* 1999 ; 138 (part 2) : S534-S536.
3. Choi, J., Chung, S.W., Kim, S.J., and Kim, S.J. Establishment of *Porphyromonas gingivalis*-specific T cell lines from atherosclerosis patients. *Oral Microbial, Immunol* 2001 ; 16 : 316-318.
4. Haraszthy, V.I., Zambon, J.J., Trevisan, M., &

- Genco, R.J. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J. Periodontol* 2000 ; 71 : 1554-1560.
5. Okuda, K., Ishihara, K., Nakagawa, T., Hirayama, A., Inayama, Y., & Okuda K. Detection of *Treponema denticola* in atherosclerotic lesion. *J. Clin. Microbiol* 2000 ; 39 : 1114-1117.
  6. Deshpande, R.G., Khan, M.B., & Genco, C. A. Invasion of aortic and heart endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. immun* 1998 ; 66 : 5337-5343.
  7. Slavkin, H.C. Does the mouth put the heart at risk ? *J. Am. Dent. Assn* 1998 ; 130 : 109-113.
  8. Slots, J. Casual or causal relationship between periodontal infection and non-oral disease ? *J. Dent. Res* 1998 ; 77 : 1764-1765.
  9. Hansson, G.K. Immune mechanism in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 2001 ; 21 : 1876-1890.
  10. Hinode, D., Nakamura, R., Grenier, D., & Mayrand, D. Cross-reactivity of specific antibodies directed to heat shock proteins from periodontopathogenic bacteria and human origin. *Oral Microbiol. Immunol* 1998 ; 13 : 55-58.
  11. Lamb, J.R., Bal, V., Mendez-Samperio, P., Mehlert, A., So, A., Rothbard, J., Jindal, S., Young, R.A., & Young, D. B. Stress proteins may provide a link between the immune response to infection and autoimmunity. *Int. Immunol* 1998 ; 1 : 191-196.
  12. Wick, G., Perschinka, H., & Millonig, G. Atherosclerosis as an autoimmune disease: an update. *Trends Immunol* 2001 ; 22 : 665-669.
  13. Mori, Y., Kitamura, H., Song, Q.H., Kobayashi, T., Uemura, S., & Oyong, J.C. A new murine model for atherosclerosis with inflammation in the periodontal tissue induced by immunization with heat shock protein. *Hypertens. Res* 2000 ; 23 : 475-481.
  14. Wick, G., Kleindienst, R., Schett, G., Amberger, A., & Xu, Q. Role of heat shock protein 65/60 in the pathogenesis of atherosclerosis. *Int. Arch. Allergy. Immunol* 1995 ; 107 : 130-131.
  15. Kaufmann, S.H.E., Schoel, A., Wand-Wurtenberger, A., Steinhoff, U., Munk, M.E., & Koga, T. T-cell, stress proteins, and pathogenesis of mycobacterial infections. *Curr. Top. Microbiol. Immunol* 1990 ; 155 : 125-141.
  16. Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993 ; 362 : 801-809.
  17. Lopartin, D.E., Shelburne, C.E., Van Poperin, N., Kowalski, C.J., & Bagravian, R.A. Humoral immunity to stress proteins and periodontal disease. *J. Periodontol* 1999 ; 70 : 1185-1193.
  18. Ueki, K., Tabeta, K., Yoshie, H., & Yamazaki, K. Self-heat shock protein 60 induces tumour necrosis factor-alpha in monocyte-derived macrophage: possible role in chronic inflammatory periodontal disease. *Clin. Exp. Immunol* 2002 ; 127 : 72-77.
  19. Yamazaki, K., Ohsawa, Y., Tabeta, K., Ito, H., Ueki, K., Oda, T., Yoshie, H., & Seymour, G.J. Accumulation of human heat shock protein 60-reactive T cell in the gingival tissues of periodontitis patients. *Infect. Immun* 2002 ; 70 : 2492-2501.
  20. Choi, J.I., Chung, S.W., Kang, H.S., Rhim, B.Y., Kim, S.J. Establishment of *Porphyromonas gingivalis* heat shock protein-specific T cell lines from atherosclerosis patients. *J. Dent. Res* 2002 ; 81 : 344-348.
  21. Maeda, H., Miyamoto, M., Hongyo, H., Nagai, A., Kurihara, H., & Murayama, Y. Heat shock protein 60 (GroEL) from *Porphyromonas gingivalis*: Molecular cloning and sequence analysis

- of its gene and purification of the recombinant protein. *FEMS Microbiol. Lett* 1994 ; 119 : 129-136.
22. Choi, J.I., Borrello, M.A., Smith, E., & Zauderer, M. Polarization of *Porphyromonas gingivalis*-specific helper T cell subsets by prior immunization with *Fusobacterium nucleatum*. *Oral Microbiol. Immunol* 2000 ; 15 : 181-187.
  23. Choi, J.I., Borrello, M.A., Smith, E., Cutler, C.W., Sojar, H., & Zauderer, M. Prior exposure of mice to *Fusobacterium nucleatum* modulates host response to *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol. Immunol* 2001 ; 16 : 338-344.
  24. Jindal, S., Dudani, A.K., Singh, B., Harley, C.B., & Gupta, R.S. Primary structure of a human mitochondrial protein homologous to the bacterial and plant chaperonins and to the 65-kiloDalton mycobacterial antigen. *Mol. Cell. Biol* 1998 ; 9 : 2279-2283.
  25. Schoenfeld, Y., & Isenberg, D.A., Mycobacteria and autoimmunity. *immunol. Today* 1998 ; 9 : 178-182.
  26. Kadri, R., Devine, D., & Ashraf, W. Purification and functional analysis of the Dnak homologue from *Prevotella intermedia* OMZ 326. *FEMS Microbiol. Lett* 1998 ; 167 : 63-68.
  27. Minami, J., Matsumoto, S., & Yamada, T. Putative heat shock protein 70 gene from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: molecular cloning and sequence analysis of its gene. *Oral Microbiol. Immunol* 1998 ; 13 : 113-119.
  28. Reid, H.I., & Riggio, M.P. Identification and nucleotide sequence of the heat shock protein 60(GroEL) gene of *Bacteroides forsythus*. *DNA Seq* 1998 ; 9 : 359-364.
  29. Skar, C.K. & Bakken, V. The heat shock response of *Fusobacterium nucleatum*. *Eur. J. Oral Sci* 2001 ; 109 : 402-408.
  30. Tsai, J.P., Shi, W. Analysis of gene expression in *Treponema denticola* with differential display polymerase chain reaction. *Oral Microbiol* 2000 ; 15 : 305-308.
  31. Maeda, H., Miyamoto, M., Koikeguchi, S., Kono, T., Nishimura, F., Takashiba, S., & Murayama, Y. Epitope mapping of heat shock protein 60(GroEL) from *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol* 2000 ; 28 : 219-224.
  32. Abulafia-Lapid, R., Elias, D., Raz, I., Keren-Zur, Y., Atlan, H., & Cohen, I.R. T cell proliferative responses of type 1 diabetes patients and healthy individuals to human hsp60 and its peptides. *J. Autoimmun* 1999 ; 12 : 121-129.
  33. Metzger, B., Schett, G., Kleindienst, R., van der Zee, R., Ottenhoff, T., Hajeer, A., Bernstein, R., Xu, Q., & Wick, G. Epitope specificity of anti-heat shock protein 65/60 serum antibodies in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 1997 ; 17 : 536-541.
  34. Rabinovich, C.E., Wagner-Weiner, L., Pazarli, H., & Barner, C.G. A controlled trial of azathioprine in Behcet's syndrome. *eMedicine* 2 (6), 2001.

## Epitope specificity of *Porphyromonas gingivalis* heat shock protein for T-cell and/or B-cell in human atherosclerosis

Jung-gyu Bak, Sung-Jo kim, Jeom-il Choi

Department of Periodontology, College of Dentistry, Pusan National University

Since periodontal infections are suggested as risk factors for the development of cardiovascular diseases, the present study was performed to evaluate the T cell immune responses specific to *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) heat shock protein (hsp) 60 and T-cell and B-cell epitope specificities for *P. gingivalis* hsp60 in atherosclerosis. Anti-*P. gingivalis* IgG antibody titers were elevated in all patients. We could establish *P. gingivalis* hsp-specific T cell lines from the atheroma lesions, a mixture of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells producing the cytokines characteristic of both Th1 and Th2 subsets, of 108 overlapping synthetic peptides spanning whole *P. gingivalis* hsp60 molecule, ten peptides with common epitopes specificities for both T-cell and B-cell were identified. It was concluded that *P. gingivalis* hsp60 might be involved in the immunoregulatory process of atherosclerotic diseases with epitope specificities.

---

Key words : *Porphyromonas gingivalis* heat shock protein, Epitope, Atherosclerosis