

# 치주염환자의 *Porphyromonas gingivalis* 열충격단백에 대한 T-세포 항원 결정부위 특이성 연구

이지영 · 이주연 · 최점일

부산대학교 치과대학 치주과학교실

## I. 서론

열충격단백(heat shock protein; HSP)은 진화를 통해 잘 보존되어지고 모든 살아있는 유기체와 구조적으로 유사해서, 열충격단백에 대한 면역반응은 교차반응을 형성한다<sup>1)</sup>. 세균과 인체의 열충격단백 사이에 상당히 높은 염기서열상동성(sequence homology)이 존재함으로 인해, 이 단백질이 인간의 자가 면역 질환에 관여할 것이라고 널리 생각되어지고 있다<sup>2,5)</sup>.

치주염은 가장 흔한 병원균 중의 하나인 *Porphyromonas gingivalis*를 가지는 만성염증질환이다<sup>6)</sup>. 치주병인균은 치주낭에서 오래 지속되고 숙주 면역계에 세균성열충격단백(bacterial HSP)를 포함하여 장기간 문제를 나타낸다. *P. gingivalis*같은 주요 치주병인균의 열충격단백에 의해 감작된 숙주 면역계는 최근에 치은 결합조직 내에서 동종의 포유동물 끼리는 상호 작용하는 것으로 생각되어졌다<sup>7-10)</sup>. 치주병인균은 치주조직에 있는 세포를 자극하여 열충격단백60의 표현을 조절하고, 이것은 proinflammatory cytokines의 표현을 자극하고 치주병소에 T림프구, 대식세포와 단핵구의 모집을 유발한다. 이 기전은 만성적인 치주염과 치주질환의 조직파괴와 관여

가 있다<sup>9)</sup>. 치주병인균으로부터 열충격단백에 대한 계속적인 노출은 인체 열충격단백과 교차반응을 일으키는 원인이 되고, 그 교차반응은 치주조직의 파괴적인 형태를 변형시킨다.

열충격단백집단 중에, 열충격단백60(HSP60)은 다양한 세균성감염 중에서 주요한 열충격단백 항원(Heat Shock Protein antigens)이다<sup>12)</sup>. 이것은, 1979년 *E. coli*에서 Hendrix에 의해 처음으로 GroEL로 불리지면서 기술되었는데, 이 GroEL은 GroES와 함께 membrane barriers를 가로질러 일어나는 단백질 전위(translocation)을 촉진시킨다. 포유동물 열충격단백60의 주된 역할은 mitochondria matrix내에 단백질 주름형성(folding)과 조립(assembly)이다<sup>13)</sup>. 원래 열충격단백60은 mitochondria에서만 위치하는 것으로 생각되었지만, 최근 연구결과에서는 세포질 내에서도 존재한다고 보고되어졌다. 또한 열충격단백60이 많은 세균의 병원균에 대한 공통된 항원으로 알려졌지만<sup>14)</sup>, 동종이 포유동물(mammals)에서도 발견되었다<sup>15)</sup>.

열충격단백은 잘 보존되어질수 있고, 열충격단백60의 경우 세균(mycobacterial)과 인간간에 약 60%의 서열 유사성(sequence homology)이 관찰되었다

\*본 논문은 2003년도 부산대학교 임상연구비 지원에 의해 이루어짐

교신 저자: 최점일, 부산광역시 서구 아미 1가 10 부산대학교 치과대학 치주과학교실, 우편번호: 602-739, 전화번호: 051-240-7463,

Fax: 051-243-7606

15). 또한, 치주병인균간의 교차반응(cross-reactivity)이 밝혀졌다<sup>3)</sup>. 그러므로, 보존된 서열(conserved sequence)에 대한 특이성을 가진 T-세포와 항체는 잠재적으로 자가반응하고, 감염성 질환의 병인론에 영향을 미칠수 있다<sup>4,16)</sup>. 최근에, 여러 치주 병인균에서 열충격단백의 DNA 서열이 결정되었다<sup>7-22)</sup>. 세균의 열충격단백에 대한 T-세포 면역 반응은, 포유동물의 열충격단백을 표적으로 하는 자가면역 유도를 통하여<sup>5)</sup> 치주질환의 면역병리학적 기전에 관여하는 것 같다<sup>7-10)</sup>. 그것은 또한 치은 섬유아세포(gingival fibroblasts)로부터 matrix metalloproteinase를 생성시킬 수도 있다.

열충격단백이 치주질환의 면역 병인론에 관여하는 방법을 규명하기 위해서, 자가면역질환을 조절하는 면역기전을 명백히 하는 점에 있어서 T-세포와 B-세포에 의해 독점적으로 인식되어지는 감염 병원균의 항원결정부위(epitope)를 확인하는 것이 중요하다. 최근 Maeda등은 치주염환자에 대한 B-세포 항원결정부위 특이성 연구를 통해, *P.gingivalis* HSP60에 대한 B-cell epitope를 mapping한 결과 20개의 항원결정부위(epitope)를 규명하였다<sup>23)</sup>.

*P.gingivalis* HSP60의 교차반응하는 항원성 epitope를 확인하는 것은 다음과 같은 점에서 중요하다. 1)인체 치주질환에 작용하는 열충격단백에 의해 조절되는 자가면역질환의 기전(HSP-modulated autoimmune disease)을 이해하고, 2) 치주병인 세균으로부터 다른 열충격단백과 교차 반응하는 열충격단백 항원결정부위(HSP epitope)를 확인하고, 3)인체 치주질환의 예방을 위해 peptide vaccine 전략을 발달시키는 점에서 중요한 의의를 가진다.

여러 치주병원성 세균의 열충격단백 가운데, 우리는 치주질환에서 T. 세포에 의해 매개되는 자가면역을 조절하는 대표적인 항원으로서 *P.gingivalis* HSP를 선택하였다. 왜냐하면, *P.gingivalis*가 파괴성 치주질환에서 가장 중요한 병원균이고<sup>24)</sup>, 본 연구팀이 동맥경화증환자에서 *P.gingivalis* HSP-specific T-cell lines의 확립에 초점을 맞추어 왔기 때문이다.

본 연구는 치주염 환자의 말초혈액에서 치주병원균 *P.gingivalis* HSP60-reactive T-cell lines을 수립하

고, *P.gingivalis* HSP60에 대한 T-cell epitope mapping을 통해 자가면역을 일으킬 수 있는 항원결정부위(epitope)의 분석을 위해 수행되었다. 이는 향후 *P.gingivalis* HSP60과 human HSP60의 서열 유사성(sequence homology)이 높은 peptide가 치주질환의 예방을 위한 vaccine을 연구하는데 중요한 의의가 있으리라 사료된다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 연구대상

어떤 두드러진 전신질환의 병력이 없는 6명의 성인형 치주염 환자가 실험군(experimental group)으로 선정되었다. 성인형 치주염은 지침에 따라 초기 치주염(early periodontitis ; EP), 중등도 치주염(moderate periodontitis ;MP), 및 진행성 치주염(advanced periodontitis ;AP)로 다시 세분화되었다. 그리고, 전신질환과 치주질환의 병력이 없는 임상적으로 건강한 환자가 대조군(control group)으로 설정되었다.

### 2. Recombinant *P.gingivalis* HSP60의 정제

*P.gingivalis* GroEL 유전자는, 세균세포의 chaperon으로 활동하는 *P.gingivalis*의 60 kilo-Dalton 열충격단백을 나타낸다. *P.gingivalis* 381(21)로부터 클론된 GroEL 유전자는 일본의 Okayama University Dental School의 Yoji Murayama 교수로부터 기증받았다. *P.gingivalis* GroEL 유전자는 pGEX-4T-3 발현 벡터(expression vector)에 glutathione S-transferase-*P.gingivalis* GroEL 융합구조(fusion construct)로 도입되었다. 이 융합구조는 E.coli HB-1142 cells로 변형(transformation)되어, 1M isopropyl a-D-thiogalactoside (IPTG)의 첨가로 단백질 발현이 유도되었다. 세포들을 채취하여, 100 mM Triethanolamine-HCl, 170 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10 mM dithiothreitol, pH 7.4에서 현탁(resuspend)한후 초음파로 분쇄(sonication)시켰다. Phosphate buffered saline + 1%

Triton X-100으로 2번 적정(equilibration)시킨 glutathione Sepharose 4B beads (Pharmacia, Sweden) 현탁액을 각 tube속에 첨가하여 배양시켰다. Beads를 가라앉히고, 다시 현탁하여, phosphate-buffered saline + 1% Triton X-100에서 조심스럽게 세척하였다. 융합 단백질(fusion protein)은 Elution buffer(10 mM reduced glutathione in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0)로 beads에서 추출하였다.

### 3. ELISA 방법을 이용한 anti-*P. gingivalis* HSP60 IgG 항체역가의 측정

anti-*P. gingivalis* HSP60 IgG 항체역가를 결정하기 위해, 혈청을 각 환자의 말초혈액에서 채취하였다. microtiter plate를 phosphate buffer<sup>26,32,33</sup>)로 희석한 *P. gingivalis* HSP60 의 전체세포항원(10 $\mu$ g/ml) 100 $\mu$ l 씩 이중으로 코팅하였다. 4 $^{\circ}$ C에서 하루 밤 동안 배양한 후, 0.05% Tween20을 함유한 PBS/Tween으로 plate를 3회 세척하였다. 각 환자의 혈청 50 $\mu$ l를 순차적으로 PBS/Tween에 희석시키고 각 well에 첨가하여 실온에서 2시간 배양하였다. 이후 PBS/Tween으로 plate를 3회 세척하고 각 well에 100 $\mu$ l의 peroxidase-conjugated mouse anti-human IgG(H+L) (Jackson immunoresearch Laboratories, West Grove, PA)를 첨가해서 실온에서 2시간동안 배양하였다. 이후 PBS/Tween으로 plate를 3회 세척한 후에 100 $\mu$ l tetramethylbenzidine(Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)을 첨가하여 실온에서 15분간 배양한 후 반응을 중지시키기 위해 0.18M의 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 첨가하였다. 파장 450nm에서 흡광도(optical density)를 읽어 혈청희석요소(serum dilution factor)를 함수로 도면화하고, 회귀분석(regression analysis)을 실행하였다. 대조군 혈청중의 하나를 ELISA unit 100으로 설정하고, 다른 대조군과 실험군의 anti-*P. gingivalis* HSP60 IgG 항체역가를 산출하였다. 항체역가는 만약 이것이 평균대조군역가보다 3 x 표준편차(standard deviation)보다 높으면 상승된 것으로 판정하였다.

### 4. *P. gingivalis* HSP-reactive T cell lines의 수립

말초혈액이 6명의 환자로부터 추출되었고, 말초혈액단핵세포가 Ficoll-Paque medium (Pharmacia, Upsala, Sweden)을 이용하여 gradient cell separation방법에 의해 분리되었다. 나일론wool로 T세포를 제거하고, 비T세포부분은 항원전달세포(APC)로 사용하였다. 12-well tissue culture plates (Costar, Coming, Coming, NY)를 이용하여, 말초혈액 단핵세포는 mitomycin C로 처리한 항원제시세포(antigen presenting cells; APC)와 *P. gingivalis*로 함께 자극되어졌다. 2주간의 배양 후, T-세포들은 1주간 휴지기를 가졌다. 휴지기후에, T세포증식을 유도하기 위해 mitomycin으로 처리된 항원전달세포인 비T세포와 *P. gingivalis*를 첨가하여 자극하였다.

*P. gingivalis*-reactive T cell lines으로부터 *P. gingivalis* HSP-reactive T cell lines은 T세포 lines을 자극하기 위해, 열충격단백항원(heat shock protein antigen; 5 mg/well in 12-well culture plate)을 첨가함에 의해 자극과 휴지기의 반복을 통해 같은 방법으로 수립되어졌다.

### 5. T-cell line의 표현형의 발현

T-cell line의 특성화를 위하여, 세포들은 Per-CP-conjugated mouse anti-human CD3와 FITC-conjugated mouse anti-human CD4 또는 PE-conjugated mouse anti-human CD8 단일클론 항체(monoclonal antibodies (PharMingen, San Diego, CA))로 이중 염색하였다. 각각의 T-세포 line의 표현형 발현은 Epics Elite ESP (Coulter, Hialeah, FL)를 이용한 flow cytometry를 이용하여 관찰하였다.

### 6. Synthetic peptide

*P. gingivalis* GroEL의 전체 amino acid sequence에 걸쳐있는 총 108 decapeptides는 Fmoc chemistry에 기초를 둔 제조사 지시에 따라 Epitope-Scanning

Kit (Chiron Mimotopes, Clayton, Victoria, Australia)을 이용하여 합성되었다. Peptides는 10개의 amino acid가 합성이 되어 이루어졌는데, 5개의 amino acid 잔기(residue)에 의해 겹쳐지도록 도안이 되었다. 합성(synthesis)의 정확성은 positive (PLAQ)와 negative (GLAQ) control peptide의 동시합성과 제공된 단일클론 항체(monoclonal antibody)에 대한 그들의 결합을 연속적으로 test함에 의해 조정되어졌다.

### 7. T 세포 항원결정부위(epitope) mapping

Synthetic peptide의 항원결정부위 특이성을 밝히기 위해, *P. gingivalis* HSP-특이성 T-cell lines로부터 T세포( $1 \times 10^5$ )는 synthetic peptides ( $0.1 \text{ mg/ml}$ )와 항원제시세포(APC,  $1 \times 10^6$ )로 자극하였다. Plates는 5% CO<sub>2</sub> humidified incubator에서 배양하였다. 배양 48시간 후, 세포들은 3H-thymidine의 1 mCi/well로 label하여 6시간을 더 배양하고, liquid scintillation counter로 측정하였다. 증식(proliferation)은 stimulation index(SI)로서 표시하였다. 즉, SI = cpm(counter per minute) with antigen / cpm without antigen 이며, SI values가 2이상일 때 양성(positive)으로 판정하였다.

## III. 연구성적

### 1. Patient profiles

전신질환이 없는 6명(여성이 4명, 남성이 2명)의

치주염 환자를 선별하여, 말초혈액을 채취하였다. 치주질환 환자의 나이, 성별, 평균 탐침 치주낭 깊이, 평균 탐침 부착수준으로 구성된 임상적 매개변수는 table1에서 요약되었다. 치주질환자는 초기, 중등도에서 심도의 치주염 병력을 갖고 있었다.

### 2. ELISA를 이용한 anti-*P.gingivalis* HSP60 IgG 항체역가의 측정

6명의 치주염 환자에서 anti-*P. gingivalis* HSP60 IgG 항체역가는 107-420(예외적으로 한 명은 44)의 범위로 대조군 (antibody titer를 100으로 설정)보다 높게 나왔다(Figure 1).

### 3. *P. gingivalis* HSP60-특이성 T-cell lines의 수립과 특성화

성인형 치주염(adult periodontitis) 환자의 말초혈액으로부터 분리된 T-세포들은 *P. gingivalis* 열충격단백에 대해 증식된 반응을 나타냈다. flow cytometry로 분석한 결과, *P. gingivalis* HSP-reactive T cell lines에서 수립된 CD3<sup>+</sup> T세포들은 CD4<sup>+</sup>(helper T-cell)와 CD8<sup>+</sup> 세포(suppressor T-cell)가 혼합된 표현형 (phenotypic profiles)을 보였다. (8.7-67 % for CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T cells and 8.1-34.3% for CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T cells) (Figure 2).

### 4. T-세포 항원결정부위(epitope) mapping

각 환자로부터의 T-cells은 *P.gingivalis* HSP60의

Table 1. Clinical parameters and anti-*P. gingivalis* IgG antibody titers of periodontitis patients(N=6)

NO	A/G	Diagnosis	Mean PPD	Mean PAL	Anti-Pghsp IgG antibody titer
1	52M	MP	4.84 ± 0.88	4.97 ± 0.81	107.1 ± 12.1
2	41M	MP	4.66 ± 0.51	4.86 ± 0.46	126.9 ± 14.3
3	38F	MP	4.74 ± 0.67	4.85 ± 0.33	279.4 ± 21.3
4	44F	MP	5.98 ± 0.54	6.11 ± 0.75	44.9 ± 7.2
5	46F	MP	5.04 ± 0.65	5.17 ± 0.52	420.2 ± 79.8
6	51F	MP	4.33 ± 0.39	4.45 ± 0.83	294.1 ± 66.1
Mean			4.93 ± 0.61	5.07 ± 0.62	212.1 ± 33.5

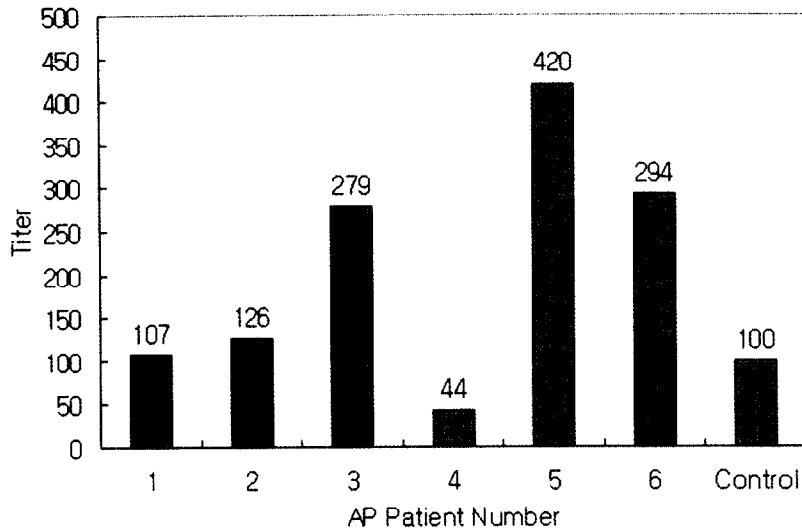


Figure 1, Anti-*P. gingivalis* heat shock protein IgG antibody titer of sera from each patient and control subjects

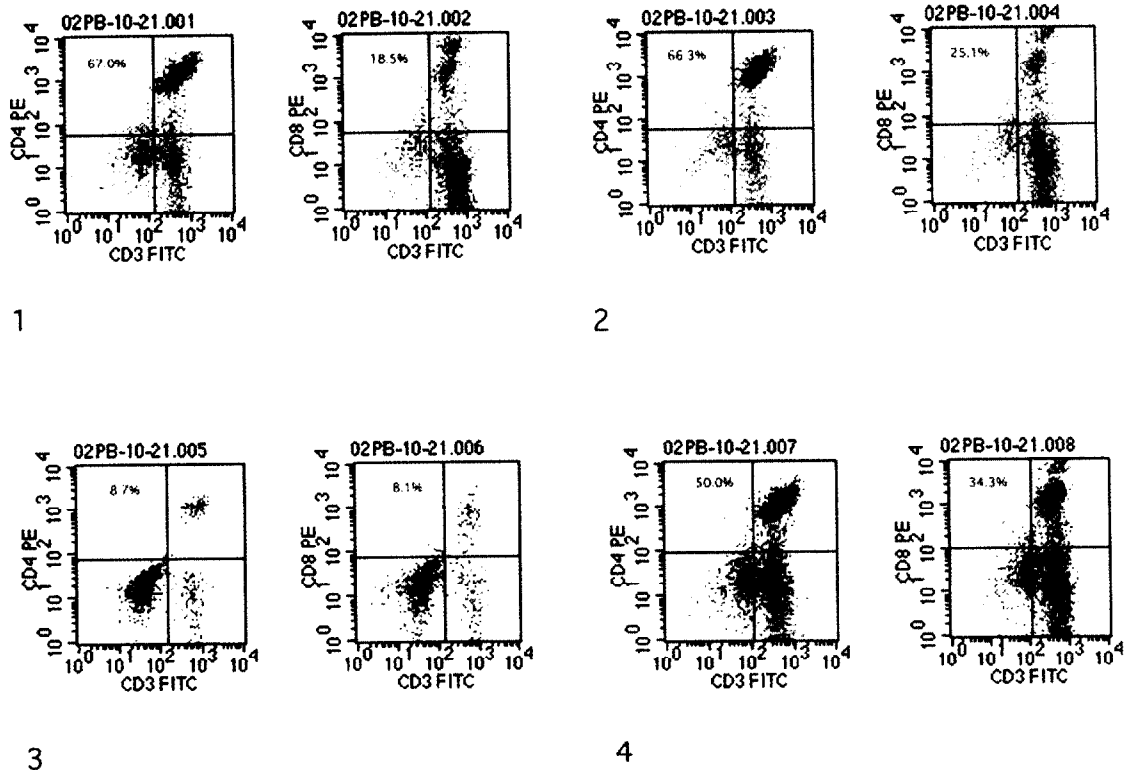


Figure 2, Phenotype profiles of *P. gingivalis* HSP60-specific T cell lines established from the peripheral blood lymphocyte from six patients analyzed by flow cytometry. Profiles of proportions (%) of CD3+/CD4+ T cells (left) and CD3+/CD8+ T cells (right) of indicates each patient.

전 sequence에 걸친 총 108개의 10-amino acid 펩타이드 중에서 6명의 각 T-cell line이 우세하게 반응하는 펩타이드를 분석한 결과, 10개의 peptide (no. 6, 15, 24, 29, 33, 39, 45, 53, 56, 74)에서 multiple reactivity를 보여주었다(Figure 3). Table 2는 SI value가 2또는 그이상인 T-cell major epitopes의 10개의 amino acid sequence를 나열하였다.

#### IV. 총괄 및 고안

본 연구는 치주염 환자의 말초혈액에서 치주병원균 *P. gingivalis* HSP60-특이성 T-cell line을 수립하고, *P. gingivalis* HSP60에 대한 T-cell epitope map-

ping을 통해 자가면역을 일으킬 수 있는 항원결정부위(epitope)의 분석을 위해 수행되었다.

본 연구에서는, 6명 치주염 환자의 말초혈액으로부터 분리한 단핵세포(mononuclear cells)로부터 *P. gingivalis* HSP60-reactive Tcell lines을 성공적으로 확립하였는데, 이것은 flow cytometry에 의한 표현형의 분석결과 CD4<sup>+</sup>와 CD8<sup>+</sup>cells의 혼합형으로 나타났다. 이것은 *P. gingivalis* HSP60에 대한 치주염 memory T-cell 면역반응이 자가면역에 관여한다는 것을 추정할 수 있다. 또한, 이것들은 *P. gingivalis* HSP60이 치주염의 면역병인기전(immunopathogenesis)을 조절하는 역할을 한다는 것을 제시했다.

또한 모든 치주염 환자에서 anti-*P. gingivalis*

Table 2. List of T-cell epitope peptide numbers and its amino acid sequences.

Peptide No.	Position	Sequence
P6	27-36	KVTLGPKVRN
P15	73-82	VKEVASKTND
P24	117-126	RGIDKSVKSV
P29	142-151	QKIEHVAKIS
P33	162-171	IAEAMRKVKKK
P39	193-202	MQFDRGYISP
P45	222-231	IYDKKISVLK
P53	262-271	LVVNRLRGSL
P56	279-288	PGFGDRRKAM
P74	366-375	QERLAKLAGG

Table 3. Comparison of peptide sequence between T-cell epitopes of *P. gingivalis* HSP60 in periodontitis and other published epitopes of human HSP60 in systemic disease.

Peptide	Sequence		degree of homology
	PgHSP 60	human HSP 60	
6	KVTLGPKVRN	AVTMGPKGRT	6/10
15	VKEVASKTND	VQDVANNTNE	5/10
24	RGIDKSVKSV	RGVMLAVDAV	4/10
29	QKIEHVAKIS	EEIAQVATIS	5/10
33	IAEAMRKVKKK	ISDAMKKVGR	5/10
39	MQFDRGYISP	MKFDYRGYISP	9/10
45	IYDKKISVLK	LSEKKISSIQ	4/10
53	LVVNRLRGSL	LVLNRLKVGL	6/10
56	PGFGDRRKAM	PGFGDNRKNQ	7/10
74	QERLAKLAGG	NERLAKLSDG	7/10

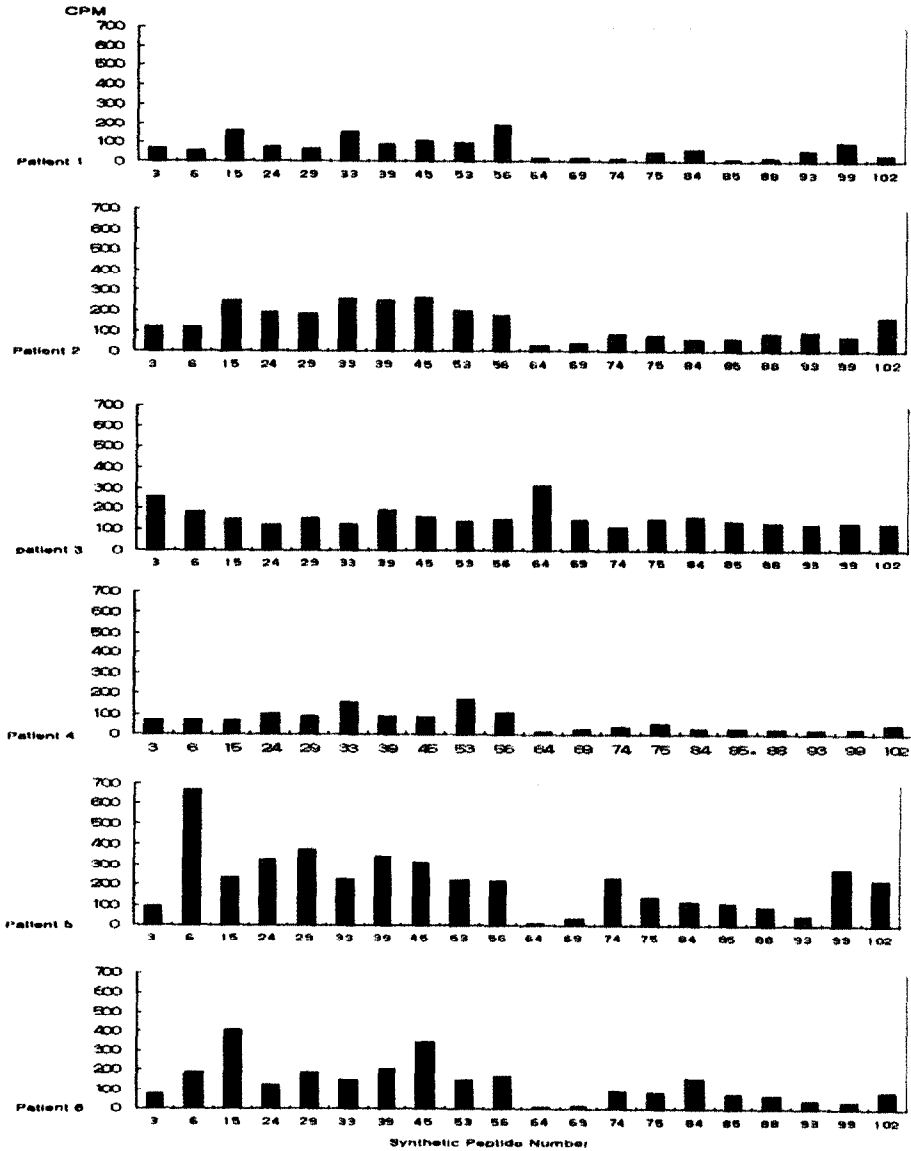


Figure 3. Bar diagrammatic representation of optical densities as a measure of serum reactivities to 108 synthetic peptides spanning whole *P.gingivalis* hsp60. The number indicates each patient.

HSP60 IgG 항체 역가는 대조군 (antibody titer를 100으로 설정)보다 높게 나타났다.(Figure1) 예외적으로, 1명은 44로 낮게 나왔는데 flow cytometry에 의한 표현형의 분석결과 T세포는 50%의 CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T세포, 34.3%의 CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T세포의 혼합형으로 나타났다.

본 연구에서는, 치주염 환자에서 *P.gingivalis* HSP60에 대한 T-cell 항원결정부위를 분석하기 위하여 T-cell epitope mapping한 결과, 10개의 항원결정부위(peptide Nos.6,15,24,29,33,39,45,53,56,74)가 관찰되었다. 최근에 Maedae등이 치주염 환자에서 *P.gingivalis* HSP60에 대한 B-cell epitope를 mapping

하였는데, 그 결과 20개의 항원결정부위(peptide Nos. 3,6,15,24,29,33,39,45,53,56,64,69,74,75,84,85,88, 93,99,102)를 규명하였다<sup>23)</sup>. 이 연구의 목적은 T-cell mapping인데, 흥미롭게도 이 10개의 항원결정부위는 치주염에서 B-cell epitopes뿐만 아니라 본 연구에서 T-cell epitopes로서 확인되었다<sup>23)</sup>. 그러므로, 이 10개의 항원결정부위(peptide Nos. 6,15,24,29,33,39,45,53,56,74)는 치주염에서 PgHSP60에 대한 공통적인 T세포 및 B세포 항원결정부위를 추정할 수 있다. 더구나, 우리는 이것들이 치주염에서 human hsp60의 알려진 항원결정부위에 해당한다면, 이 peptide sequence를 분석할 필요가 있다고 사료된다(Table 3).

본 연구에서 *P. gingivalis* HSP60의 peptide Nos. 6,39,53,56,74는 human HSP60과 60%이상의 서열 유사성(sequence homology)을 보였다. 특히, peptide No.39 MQFDRGYISP는 human HSP60의 MKFDRGYISP에 해당하는 것으로 확인되어졌는데, 이 peptide No.39는 human HSP60과 90%의 서열 유사성을 가졌다. 이 지역은 GroEL homologs와 human HSP60사이의 교차반응에 결정적인 부위이고, 그러므로 미래의 치주질환을 예방하는 vaccine 적용을 위해 중요한 peptides로 생각되어진다.

본 연구에서 PgHSP60에 대한 T-cell면역반응은 치주질환의 자가면역기전에 관여하는 것이라고 사료된다. 중요 세균성(주로 PgHSP60)항원의 peptide는 약 10개로 추정되고, 특히 이 중 인체 HSP60과 염기서열 유사성이 높은 peptide는 향후 vaccine 연구의 대상으로 적용될 것으로 추정된다.

## V. 결론

본 연구는 치주염환자의 말초혈액에서 치주병원균 *P. gingivalis* HSP60-특이성 T-세포 line을 수립하고, *P. gingivalis* HSP60에 대한 T-cell epitope mapping을 통해 자가면역을 일으킬 수 있는 항원결정부위(epitope)의 분석을 위해 수행되었다. 본 연구를 통해 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 치주염 환자의 말초혈액에서 치주병원균 *P. gingivalis*의 HSP60에 특이성 반응을 나타내는 T-세포

line을 수립할 수 있었고, helper (CD4<sup>+</sup>) & suppressor (CD8<sup>+</sup>) T-cell이 공존함을 보여 주었다.

2. 치주염 환자에서 수립된 각 T-세포 line이 우세하게 반응하는 *P. gingivalis* HSP60의 항원결정부위(epitope)는 10개의 peptide로 판정되었다. 이 10개의 항원결정부위는 치주염에서 PgHSP60에 대한 공통적인 T-세포 및 B-세포 항원결정부위로 선정되었다.
3. *P. gingivalis* HSP60의 peptide Nos. 6,39,53,56,74는 human HSP60과 60%이상의 염기서열 유사성(sequence homology)을 보였다. 특히, peptide No.39는 인체 HSP60과 90%의 염기서열 유사성을 가졌는데, 이 지역은 향후 치주질환을 예방하는 vaccine 연구의 대상으로 적용될 것으로 추정된다.
4. 모든 치주염 환자에서 anti-*P. gingivalis* HSP60 IgG 항체역가가 상승되어 있었다.

결론적으로 치주병원균 *P. gingivalis*의 HSP60에 대한 T-세포면역반응은 항원결정부위 특이성과 함께 치주염의 자가면역 병인기전에 관여한다는 것을 제시한다.

본 연구는 향후 *P. gingivalis* HSP60과 인체 HSP60사이의 염기서열 유사성(sequence homology)이 높은 peptide가 치주질환의 예방을 위한 vaccine을 연구하는데 중요한 의의가 있으리라 사료된다.

## VI. 참고문헌

1. Young RA, & Elliott TJ. Stress proteins, infection, and immune surveillance. *Cell* 1989;59:5-8.
2. Hansson GK. Immune mechanism in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1876-1890.
3. Hinode D, Nakamura R, Grenier D, & Mayrand D. Cross-reactivity of specific antibodies directed to heat shock proteins from periodontopathogenic bacteria and of human origin. *Oral Microbiol Immunol* 1998;13:55-58.



4. Lamb JR, Bal V, Mendez-Samperio P, Mehlert A, So A, Rothbard J, Jindal S, Young RA, & Young DB. Stress proteins may provide a link between the immune response to infection and autoimmunity. *Int Immunol* 1989;1:191-196.
5. Wick G, Perschinka H, & Millonig G. Atherosclerosis as an autoimmune disease: an update. *Trends Immunol* 2001;22:665-669.
6. Slots J. Subgingival microflora and periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1979;6:351-382
7. Ando T, Kato T, Ishihara K, Ogiuchi H, & Okuda K. Heat shock proteins in human periodontal disease process. *Microbiol Immunol* 1995;39:321-327.
8. Lopartin DE, Shelburne CE, Van Poperin N, Kowalski CJ, & Bagramian RA. Humoral immunity to stress proteins and periodontal disease. *J Periodontol* 1999;70: 1185-1193.
9. 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.
10. Yamazaki K, Ohsawa Y, Tabeta K, Ito H, Ueki K, Oda T, Yoshie H, & Seymour GJ. Accumulation of human heat shock protein 60-reactive T cells in the gingival tissues of periodontitis patients. *Infect Immun* 2002;70:2492-2501.
11. Choi JI, Chung SW, Kang HS, Rhim BY, Kim SJ, & Kim SJ. Establishment of *Porphyromonas gingivalis* heat shock protein-specific T cell lines from atherosclerosis patients. *J Dent Res* 2002;81:344-348.
12. Shinnick TM, Vodkin MH, & Williams JC. The Mycobacterium tuberculosis 65-kilodalton antigen is a heat shock protein which corresponds to common antigen and to the Escherichia coli GroEL protein. *Infect Immun* 1988;56:446-451.
13. Langer T, Neupert W. Heat shock proteins hsp 60 and hsp 70: their roles in folding, assembly and membrane translocation of proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 1991;167:3-8.
14. Shinnick TM. Heat shock proteins as antigens of bacterial and parasitic pathogens. *Curr Top Microbiol Immunol* 1991;167:145-151.
15. Jindal S, Dudani AK, Singh B, Harley CB, & Gupta RS. Primary structure of a human mitochondrial protein homologous to the bacterial and plant chaperonins and to the 65-kiloDalton mycobacterial antigen. *Mol Cell Biol* 1989;9:2279-2283.
16. Schoenfeld Y, & Isenberg DA. Mycobacteria and autoimmunity. *Immunol Today* 1988;9:178-182.
17. 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.
18. 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;13:113-9.
19. Reid HI, & Riggio MP. Identification and nucleotide sequence of the heat shock protein 60(GroEL) gene of *Bacteroides forsythus*. *DNA Seq* 1998;9:359-64.
20. Tsai JP, Shi W. Analysis of gene expression in *Treponema denticola* with differential display polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol* 2000;15:305-8.
21. Skar CK, & Bakken V. The heat shock response of *Fusobacterium nucleatum*. *Eur J Oral Sci* 2001;109:402-8.
22. Kadri R, Devine D, & Ashraf W. Purification and

- functional analysis of the DnaK homologue from *Prevotella intermedia* OMZ 326. FEMS Microbiol Lett 1998;167:63-8.
23. Maeda H, Miyamoto M, Kokeguchi 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.
  24. Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. Periodontol 2000 1999;20:168-238.
  25. Metzler 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.
  26. Choi JI, Chung SW, Kim SJ, & Kim SJ. Establishment of *Porphyromonas gingivalis*-specific T cell lines from atherosclerosis patients. Oral Microbiol Immunol 2001;16:316-318.
  27. Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, & Genco RJ. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. J Periodontol 2000;71:1554-1560.
  28. Deshpande RG, Khan MB, & Genco CA. Invasion of aortic and heart endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun 1998;66:5337-5343.
  29. Mori Y, Kitamura H, Song QH, Kobayashi T, Uemura S, & Oyong JC. 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.
  30. 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.
  31. Kaufmann SHE, Schoel A, Wand-Wurtenberger A, Steinhoff U, Munk ME, & Koga T. T-cells, stress proteins, and pathogenesis of mycobacterial infections. Curr Top Microbiol Immunol 1990;155:125-141.
  32. Choi JI, Borrello MA, 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.
  33. Choi JI, Borrello M, Smith E, Cutler CW, Sojar H, & Zauderer M. Prior exposure of mice to *Fusobacterium nucleatum* modulates host response to *Porphyromonas gingivalis*. Oral Microbiol Immunol 2001;16:338-344.
  34. Abulafia-Lapid R, Elias D, Raz I, Keren-Zur Y, Atlan H, & Cohen IR. T cell proliferative responses of type 1 diabetes patients and healthy individuals to human hsp60 and its peptides. J Autoimmun 1999;12:121-129.

## T-cell epitope specificity for *Porphyromonas gingivalis* heat shock protein in periodontitis

Ji-Young Lee, Ju-Yeon Lee, Jeom-il Choi

Department of Periodontology, College of Dentistry, Pusan National University

Due to considerably high degree of sequence homology between bacterial and human heat shock proteins (hsp), it has been widely thought that this protein might be involved in autoimmune disease mechanisms in humans. To elucidate how stress proteins contribute in the immunopathogenesis of periodontitis, 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 epitope specificities for *P. gingivalis* hsp60 in periodontitis. Anti-*P. gingivalis* IgG antibody titers were elevated in all patients. We could establish *P. gingivalis* hsp-specific T cell lines from the peripheral blood of periodontitis, a mixture of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells. Of 108 overlapping synthetic peptides spanning whole *P. gingivalis* hsp60 molecule, ten peptides with epitopes specificities for T-cell were showed. Interestingly, ten epitopes were also identified as T-cell epitopes in the present study as well as B-cell epitopes in periodontitis. Therefore, all the ten representative epitopes were designated as common T-and B-cell epitopes for periodontitis. It is critical in developing a peptide vaccine strategy for potential prevention of periodontitis. It was concluded that *P. gingivalis* hsp60 might be involved in the immunoregulatory process of periodontitis with heat shock protein specificities.