

실험적 동맥경화증에서 *Porphyromonas gingivalis* 열충격단백-항원결정부위-특이성 T-세포주의 SCID mice 내로의 주입효과에 대한 연구

최점일¹ · Joseph Witztum²

¹부산대학교 치과대학 치주과학교실

²University of California at San Diego, School of Medicine

I. 서론

동맥경화증은 세계적으로 사망의 주요 원인이다¹⁾. 동맥경화증의 병인론에 대한 전통적인 견해는 초기에 단핵구의 내피세포층 부착, 통과, 축적과 지질을 축적시켜 포말세포가(foam cell) 형성되고, 중기에 병소 확장되면서 혈관 중막에서 유래되는 평활근 세포의 침윤되고 평활근세포의 기질 형성을 수반하며, 포말세포를 포함하는 'core'와 세포의 콜레스테롤을 둘러싸는 cap이 형성되며²⁾, 말기에는 plaque의 석회화, plaque의 혈관내강 파열, 치태 합병증³⁾, plaque의 비세포성 성분(세포의 기질 성분과 LDL)과 세포성 성분(대식세포와 이주한 평활근세포)이 관련되는 것으로 알려져 있다. 그러나 동맥경화증의 병인요소는 완전히 규명되지 않았다. 심혈관 질환과 연관된 전통적인 위험 요소는 전체 원인요소의 50% 밖에 해당되지 않으며 이들로서는 가족력, 흡연, 고혈압, 혈장 콜레스테롤 수치 등이 있다. 전통적인 견해의 문제점들로는 상기 위험 요소들은 심혈관계 질환 중 약 50%에만 연관되어 있다는 점과 atheroma

에서 나타나는 침윤성 염증세포의 10~20%가 활성화된 T lymphocyte⁴⁾로서 세포성 면역, 염증반응과 관련 병인기전 연구의 필요성 증대되고 있다. 결과적으로 새로운 병인기전이 제기되었는데 이들은 특수한 면역 반응이 동맥 경화 과정을 야기/지속시키며, bacteria, virus의 감염에 대한 T 임파구 반응의 중요성 대두되었고, 감염성 세균의 heat shock protein-특이성 T 세포성 면역/자가면역 이론 제시된 바 있다. 그러므로 면역병인론에서 나타나는 면역반응의 유해/방어적 역할을 확증할 필요성이 제기되었고, 실험적 연구에 의한 면역병리학적 병인론 정립이 시급하게 되었다. 최근의 새로운 가설로서 치주 질환의 세균감염이 심혈관 질환의 위험 요소로 제기되고 있고⁵⁻⁷⁾, 치주 병원균 *Porphyromonas gingivalis*가 부착분자를 (adhesion molecule) 역동화시킨다고 간주되고 있으며 치주병원균 *Porphyromonas gingivalis* 내피세포로의 침투할 수 있다고 보고되고 있다⁸⁾. 그러나 아직까지도 이러한 연구들은 문제점을 안고 있는데 정교하고 과학적인 방법으로 확인된 생물학적 기전 연구가 부족하고^{9,10)}, 합리적이고 직

*이 논문은 2003년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음 (KRF-2003-013-E00046)

교신저자: 최점일, 부산시 서구 아미동 1가 10 부산대학교 치과대학 치주과, 우편번호: 602-739

전화번호: 051-240-7460 팩스: 051-243-7606, E-mail: jrpa@pusan.ac.kr

접적인 증거의 부재하며 내과의사나 기초과학자들의 지지기반 미약하다는 점이다.

본 연구는 *P. gingivalis* heat shock protein에 대한 T-cell epitope mapping과 epitope-specific T cell line의 수립, 그리고 T cell line의 SCID mouse adoptive transfer 후 동맥경화증 방어능력 검증을 목표로 시행되었다.

II. 연구재료 및 방법

1. 동맥 경화증 환자에서 *P. gingivalis* HSP-specific T cell lines의 확립

T cell은 치태에 의한 동맥 장애로 즉각적인 외과적 조치를 받게 될 6명 환자의 동맥경화성 치태와 혈액 으로부터 분리하였다. 환자들은 서로 다른 전신적 배경의 다양한 연령 대 남녀환자로 구성되었다. T cell은 우리 그룹이 이전에 사용했던 방법^{11, 12})에 따라 증식 반응을 평가하기 위해 정제된 *P. gingivalis* HSP60으로 자극되었다. 확립된 T cell line은 cytokine profile로 phenotype 특성이 규명되었고, *P. gingivalis* HSP60에 대한 증식 반응을 평가하였다. 구체적인 방법으로서 치은결합조직을 collagenase (10 µg/ml, Boehringer-Mannheim, Berlin, Germany)으로 반응시켜 mononuclear cell population을 얻어냈다. 12-well tissue culture plates (Costar, Corning, Corning, NY)를 사용하여 단핵구 세포들을 각 *P. gingivalis* hsp (5 µg/well in 12-well culture plate)와 항원전달세포를 함께 넣어 자극하였다. 항원 전달세포로 사용될 말초혈액 임파구는 환자로부터 얻어 냈고, 이 때 세포분리를 위해 Ficoll-Paque medium (Pharmacia, Upsala, Sweden)를 사용하였다. 항원전달세포는 mitomycin C로 처리하였다. 2 주간의 배양 후에 T 세포는 1 주간의 휴지기를 가졌다. 휴지기가 종료된 후 새롭게 mitomycin으로 처리된 항원 전달세포와 *P. gingivalis* hsp를 다시 투여하여 T cell 증식을 유도하였다. hsp-specific T cell lines을 특성을 확인하기 위해, Per-CP-conjugated mouse anti-human CD3, FITC-conjugated mouse anti-human CD4 or PE-conjugated mouse anti-human CD8 mono-

clonal antibodies (PharMingen, San Diego, CA)로 염색한 후 형태적 특성을 검증하기 위해 flow cytometry (Epics Elite ESP, Coulter, Hialeah, FL)를 사용하여 확인 분석하였다.

2. Synthetic peptide 합성

도합 108의 decapeptides를 제작하여 *P. gingivalis* GroEL (10) amino acid를 포괄하도록 하였다 이 때 제조회사의 지시에 따라 Epitope-Scanning Kit (Chiron Mimotopes, Clayton, Victoria, Australia)를 이용하여 Fmoc chemistry에 근거하여 제작하였다. Peptides 각각 5개의 아미노산을 중첩하도록 고안되었다. 단백질 합성의 충실도는 양성 (PLAQ) 및 음성 (GLAQ) 대조 peptide에 의해 검증하였고, 제조회사의 공급된 monoclonal antibody와의 결합반응으로 확증하였다.

3. Epitope mapping of *P. gingivalis* HSP60 for T-cell and B-cell specificity

T-cell 특이성 *P. gingivalis* HSP60 epitope mapping을 시행하기 위해 *P. gingivalis* HSP60은 10-mer synthetic peptides를 중첩 제작하여 각 T-cell line을 자극할 하고 이전에 보고된 방법에 따라 (최 등., 2000) ³H-thymidine incorporation assay로 증식 능력을 평가하였다. 이 때 1 x 10⁵ 개의 T 세포가 수립된 *P. gingivalis* hsp-specific T cell lines으로부터 사용되었고, 각각의 synthetic peptides (0.1 µg/l)와 1 x 10⁶ 개의 항원전달세포가 같이 투여되었다. 세포배양plate는 섭씨 37°C, 5% CO₂ 에서 48 시간동안 배양하였고, 세포는 1 Ci/well of ³H-thymidine으로 표지화하였다. 그리고 나서 6 시간 추가로 배양한 다음 liquid scintillation counter로 측정하여 세포분화능력으로 판정하였다. 세포분화도는 자극지수 (stimulation index)로 표기되었는데 이것은 항원 투여 시 평균 분당 방사선 카운트와 항원이 투여하지 않은 경우의 평균 분당 방사선 카운트의 상대비율로 정하였다. 자극지수가 2를 초과할 때 양성반응으로 판정하였다.

4. *P. gingivalis* heat shock protein-specific T cell line의 adoptive transfer

동맥경화성 치태에서 *P. gingivalis* HSP60 의 T-cell epitope를 확인한 후에, 확인된 각각의 epitope 특이 T cell lines을 수립하였다. culture supernatants에서 flow cytometric analysis와 cytokine profiles에 의한 T cell lines의 phenotype은 과거에 사용된 방법에 따라 sandwich ELISA에 의해 결정된다(최 등, 2000). 가장 대표적인 epitope에 특이성을 가진 각각의 T cell line 하나를 선정하여 꼬리정맥주사를 통해 SCID 쥐에 adoptive transfer를 시행하였다 (1×10^6 cells/mouse). 각 실험 기간 동안 10마리의 SCID 쥐에 선정된 epitope-specific T cell line을 주입하였다. 10마리의 대조 SCID 쥐는 건강한 인간의 말초혈액 림프구를 투여하였다. adoptive transfer 일주일 후부터 24주간 콜레스테롤이 높은 음식으로 동맥경화를 유도하고, 실험에 사용된 쥐를 희생하여 대동맥부위의 동맥경화 발생정도를 병리조직학적으로 비교 관찰하였다. 병리조직학적 관찰을 위하여 사용된 동맥경화증 심도판정은 Table 1에 나타나 있다. 대동맥의 상단 중단 하단의 세부위를 선정하여 각각 조직 절편 10개씩을 선정하여 총 30절편의 조직을 관찰하여 사용된 scale의 수치를 통계적으로 처리 비교하였다.

III. 연구결과

1. 동맥 경화증 환자에서 *P. gingivalis* HSP-specific T cell lines의 확립

T cell은 치태에 의한 동맥 장애로 즉각적인 외과

적 조치를 받게 될 6명 환자의 동맥경화성 치태와 혈액으로부터 분리하였다. 환자들은 서로 다른 전신적 배경의 다양한 연령 대 남녀환자로 구성되었다. T cell은 우리 그룹이 이전에 사용했던 방법(최 등., 2001)에 따라 증식 반응을 평가하기 위해 정제된 *P. gingivalis* HSP60으로 자극되었다. 확립된 T cell line은 cytokine profile로 phenotype 특성이 규명되었고, *P. gingivalis* HSP60에 대한 증식 반응을 평가하였다. 수립된 T cell line은 IFN-g, IL-4, IL-10을 분비하는 CD4와 CD8의 특성을 공통적으로 나타내는 복합양상의 세포들로 구성되었다(Figure 1).

2. Epitope mapping of *P. gingivalis* HSP60 for T-cell and B-cell specificity

T-cell 특이성 *P. gingivalis* HSP60 epitope mapping을 시행하기 위해 *P. gingivalis* HSP60은 10-mer synthetic peptides를 중첩 제작하여 각 T-cell line을 자극할 하고 이전에 보고된 방법에 따라(최 등., 2000)³H-thymidine incorporation assay로 증식 능력을 평가하였다. 이에 따라 선정된 T cell epitope들은 Figure 2와 Table2에 나타나 있다. 이 중에서 가장 대표적인 증식상을 유도하는 면역 우세항원은 P15으로서 T-cell 면역을 위한 epitope-specific T-cell line 수립용 epitope으로 선정하였다.

3. *P. gingivalis* heat shock protein-specific T cell line의 adoptive transfer

동맥경화성 치태에서 확정된 *P. gingivalis* HSP60 의 T-cell epitope중 대표적 epitope으로 P15을 선정

Table 1. 쥐의 대동맥에 나타나는 fatty streak의 현미경적 관찰을 위한 심도 분류표

scale 0: no visible fatty streaks
scale 1: only a few small, widely spread fatty streaks
scale 2: a few streaks spread over the intimal surface
scale 3: a lot of small fatty streaks which do not overlap
scale 4: fatty streaks separated by little spots of intact intimal surface
scale 5: the total intimal surface of the artery is covered with fatty streaks

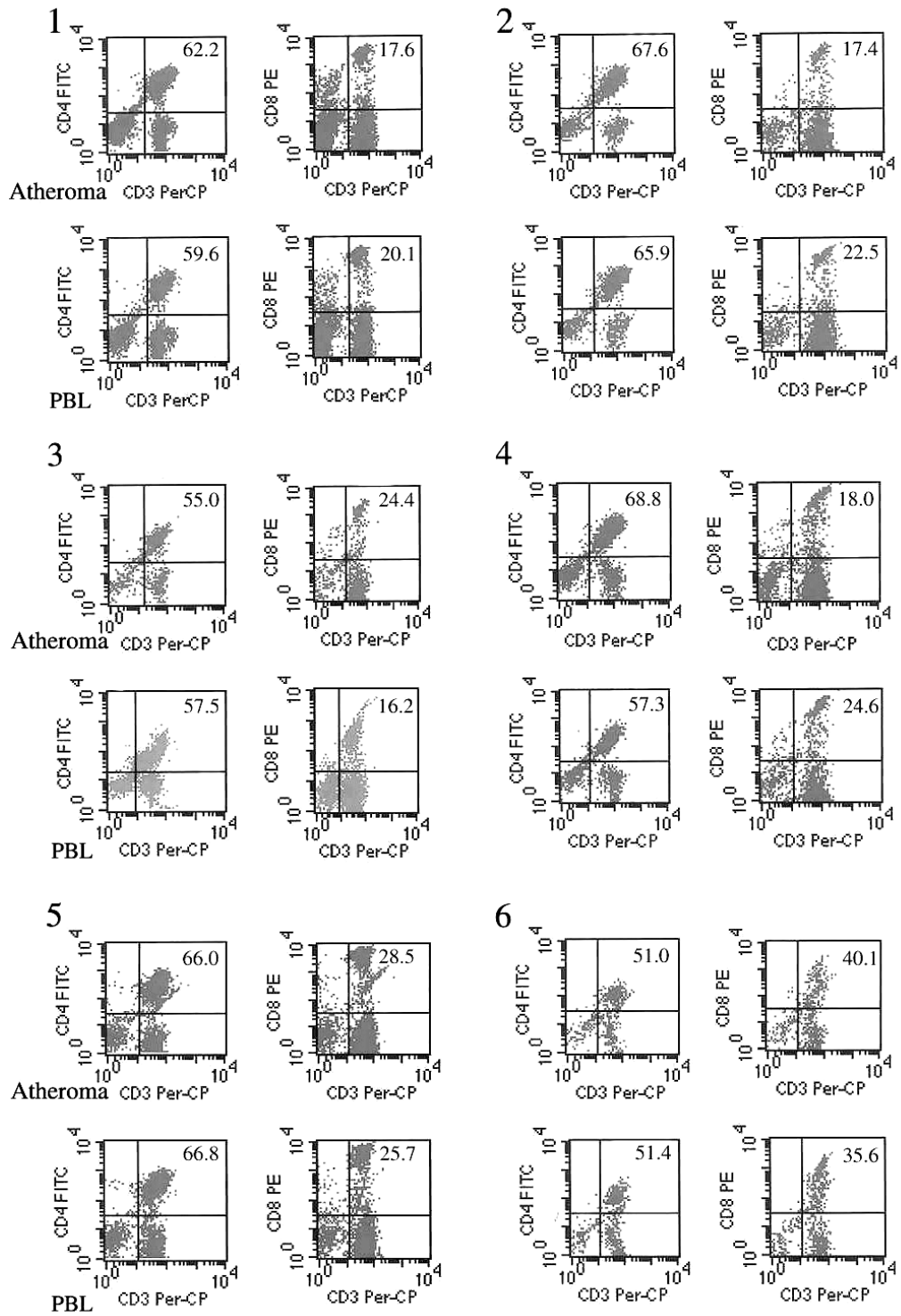


Figure 1. 6명의 동맥경화증 환자의 atheroma에서 추출한 *P. gingivalis* heat shock protein60-specific T cell line의 flow cytometry에 의한 분석상

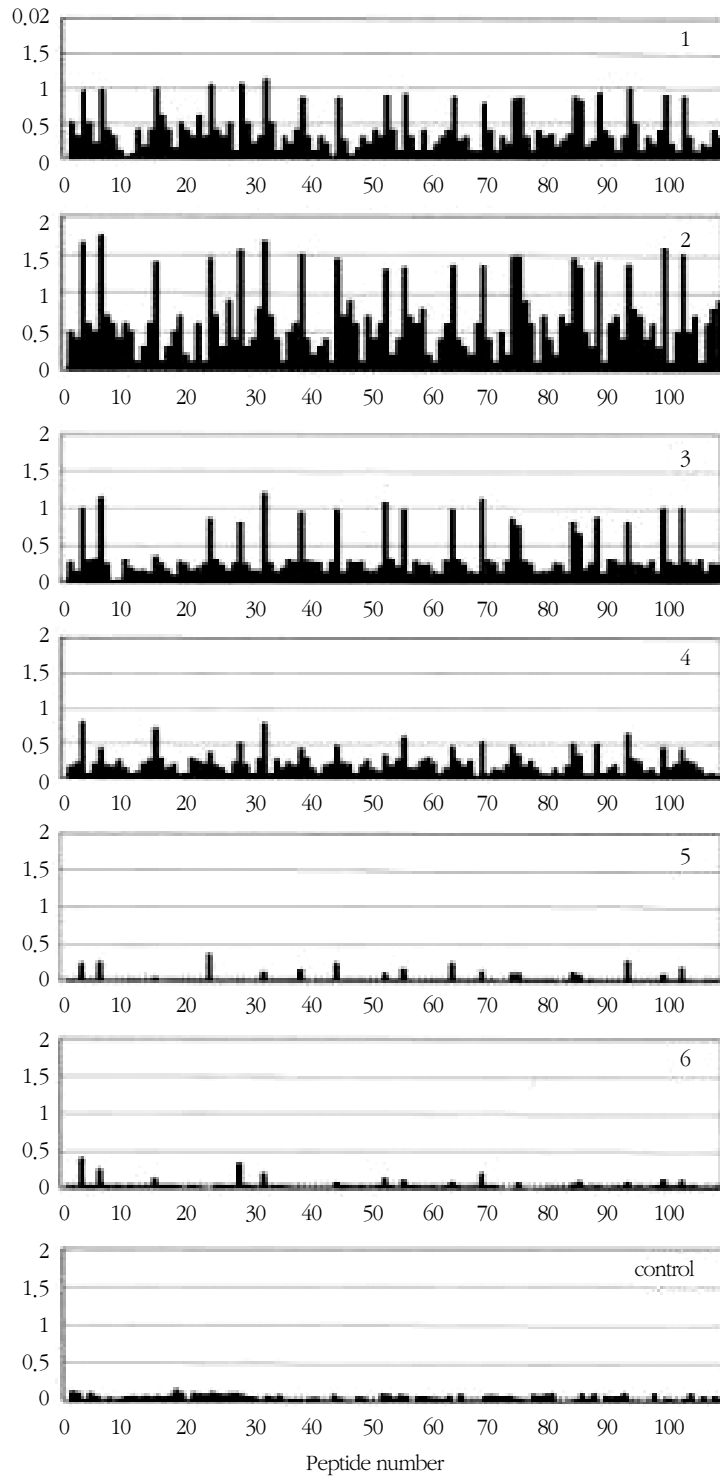


Figure 2. *P. gingivalis* hsp60-specific T cell line을 각 synthetic peptide로 자극한 후 나타나는 증식도를 scintillation counter로 측정했을 경우의 막대그림표

Table 2. List of one-letter amino acid sequences of ten peptides that showed epitope specificities for T-cells

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	LVVNRLRGSL
P64	316-325	MLGTAEKVRV
P84	416-425	GTTYIRAIAA
P88	438-447	TGIEIVKRAI
P99	493-502	VIDPAKVTRV

Table 3. 실험군과 대조군 동물의 혈중 콜레스테롤 농도 (mg/dl)

	cholesterol	low density lipoprotein (LDL)	유의성
대조군 (N=10)	1283.2 \pm 86.5	323.6 \pm 23.4	p > 0.05
실험군 (N=10)	1158.6 \pm 92.3	310.8 \pm 29.4	p > 0.05

Table 4. 실험군과 대조군 동물의 병리조직학적 판정지수

	mean scale	유의성
대조군 (N=10)	3.2 \pm 0.2	p > 0.05
실험군 (N=10)	3.1 \pm 0.3	

하여 다시 epitope-specific T cell line을 수립한 다음 꼬리정맥주사를 통해 SCID 쥐에 adoptive transfer를 시행하였다. 각 실험 기간 동안 10마리의 SCID 쥐에 선정된 epitope-specific T cell line을 주입하였다. 10마리의 대조 SCID 쥐는 건강한 인간의 말초혈액 림프구를 투여하였다. adoptive transfer 일주일 후부터 24주간 콜레스테롤이 높은 음식으로 동맥경화를 유도하고, 실험에 사용된 쥐를 희생하여 대동맥부위의 동맥경화 발생정도를 병리조직학적으로 비교 관찰한 결과 양측 군 콜레스테롤 수치가 상승하였고, 그 차이는 통계적으로 유의성을 보이지 않았다 (Table 3). 조직 병리학적인 관찰을 통해 실험군이나 대조군에서 비슷한 수준의 동맥경화증 심도를 나타내어 T cell의 adoptive transfer에 의한 동맥경화 감소나 예방효과를 관찰할 수 없었다 (Table 4)

IV. 총괄 및 고안

본 연구에 사용된 P. gingivalis heat shock protein60의 대표적인 T-cell epitope인 P15 (VKEVASKTND)를 쥐에 adoptive transfer를 시행한 다음 실험적인 동맥경화증을 유도하여 그 예방효과를 대조군과 비교한 결과 병리조직학적으로 유의한 차이를 관찰할 수 없었다. 그 원인은 불분명하나 추정되는 사유로는 이 epitope으로 선정된 synthetic peptide의 amino acid sequence(VKEVASKTND)가 mammalian heat shock protein60의 VQDVANNTNE와 50%의 sequence homology를 보이고 있어 쥐의 혈관세포나 평활근세포에 자가면역성 질환을 유발하였기 때문으로 추정한다. 향후 다양한 epitope-specific T cell line을 수립할 경우 자가면역질환을 유발할 가능성이 낮은, 즉 sequence homology가 낮은 synthetic peptide를 epitope으로 선정하여 지속적인 연구를 시행할 예정이다.

V. 참고문헌

1. Murray CJ, Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 349:1436-1442, 1997.
2. Rosenfeld ME, Tsukada T, Gown AM, Ross R. Fatty streak initiation in Watanabe Heritable Hyperlipemic and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis* 7:9-23, 1987.
3. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 91:2844-2850, 1995.
4. Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res* 91:281-291, 2002.
5. Ando T, Kato T, Ishihara K, Ogiuchi H, Okuda K. Heat shock proteins in the human
6. Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, Genco RJ. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J Periodontol* 71:1554-1560, 2000.
7. Okuda K, Kato T, Ishihara K. Involvement of periodontopathic biofilm in vascular diseases. *Oral Dis* 10:5-12, 2004.
8. Deshpande RG, Khan MB, Genco CA. Invasion of aortic and heart endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 66:5337-5343, 1998.
9. Slots J. Casual or causal relationship between periodontal infection and non-oral disease? *J Dent Res* 77:1764-1765, 1998.
10. Slavkin HC. Does the mouth put the heart at risk? *J Am Dent Assoc* 130:109-113, 1999.
11. Choi JI, Chung SW, Kang HS, Rhim BY, Kim SJ, Kim SJ. Establishment of *Porphyromonas gingivalis* heat shock protein-specific T cell lines in atherosclerosis patients. *J Dent Res* 81:344-348, 2002.
12. Choi JI, Jung SW, Kim SJ, Kim SJ. Establishment of *Porphyromonas gingivalis*-specific T cell lines in atherosclerosis patients. *Oral Microbiol Immunol* 16:316-318, 2001.

Adoptive transfer of *Porphyromonas gingivalis* heat shock protein epitope-specific T-cell lines into SCID mice in experimental atherosclerosis

Jeomil Choi¹, Joseph Witztum²

¹Department of Periodontology, School of Dentistry, Pusan National University

²University of California at San Diego, School of Medicine

Bacterial heat shock protein has been one of the components that are responsible to induce autoimmune disease mechanisms in the pathogenesis of atherosclerosis due to high level of homology in sequence with human counterpart. This mechanism may explain how bacterial infectious disease, such as periodontal disease, might contribute to the acceleration of the disease process of atherosclerosis. *Porphyromonas gingivalis* which is a major periodontal pathogenic bacterial species, has been implicated as one of the pathogenic bacteria playing the role in this context. The present study has been performed to evaluate the anti-atherosclerotic effect of adoptive transfer of *Porphyromonas gingivalis* heat shock protein epitope-specific T cell lines into severe combined immunodeficiency (SCID) mice. Peptide no. 15 with amino acid sequence VKEVASKTND-specific T cell line was selected for the transfer. When experimental atherosclerosis was induced in SCID mice adoptively transferred either by the T cell lines (experimental group) or by non-specific mouse T cells (control group), there was no significant difference in the severity and extent of the atherosclerosis induced by hypercholesterol diet.

Key words : atherosclerosis, periodontitis, *Porphyromonas gingivalis*, heat shock protein