대한치주과학회지 : Vol. 37, No. 1, 2007

*Porphyromonas gingivalis*의 열충격단백-특이성 단클론항체의 개발

이니나, 이주연, 김성조, 최점일*

부산대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

치주질환은 감염성 질환이다. 주요 치주병인균은 *Porphyromonas gingivalis (P. gingivalis)*, *Prevotella intermedia (P. intermedia)*, *Fusobacterium nucleatum (F. nucleatum)*, *Treponema denticola (T. denticola)*, *Bacteroides forsythus (B. forsythus)*, *Campylobacter rectus (C. rectus)*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans (A. actinomycetemcomitans)* 등으로 그 독성요소가 잘 규명되어있다. 이러한 감염성 치주 질환을 예방하기 위한 면역기법이 시도되어 왔다. 세균 감염에 유래한 치주염의 심각성은 치주병인균의 세포 자체 혹은 그 항원으로 면역시킬 때 감소할 수 있다는 것이 여러 동물 실험에서 밝혀졌다[1-8]. 그러나 인간 치주염에 대한 정교한 백신의 개발에는 몇 가지 문제점이 있다[2,9]. 첫째, 인간 치주염이 단일 병인균에 기인하지 않는다는 것이다. *P. gingivalis*를 포함하는 일곱에서 열 종류의 세균이 치주병인균으로 작용하다는 것이 밝혀졌다[10]. 이런 병인균의 다양성은 치주염에 대한 백신 개발을 매우 복잡하게 만든다[11]. 인간 치주염에 대한 백신 개발의 또 다른 문제점은 세균의 항원결정부위가 인간에서의 항원결정부위와 교차 반응할 위험이 크므로, 세균의 전체 세포나 crude extract preparation으로 백신을 제조할 수 없다는 점이다.

이런 문제점을 고려했을 때 복합 세균에 대해 교차 방어를 할 수 있는 백신 개발 전략에 사용될 수 있는 세균성 항원은 높은 배열 상동성을 공유하는 것이 필요하며, 열충격단백질(heat shock protein: 이하 HSP)과 phosphorylcholine(이하 PC)이 이에 적합하다 할 수 있다. 유핵 및 무핵 세포가 다양한 환경적 스트레스에 노출되었을 때 HSP를 포함하는 스트레스 단백질 합성이 증가하게 된다. HSP는 단백질의 folding과 막을 통한 위치 변화를 촉진시키며 독성 단백질이 분해될 때 protease로 작용한다. HSP60은 여러 세균 간의 공통 항원으로 밝혀졌으며[13] 그 교차 반응은 보고된 바 있다[14]. PC 역시 구강 세균에서 공통적으로 발견되며 상당한 교차 반응을 보였다[15]. PC와 치주염과 연관성 역시 보고되었다[16].

구강 세균과 유의한 배열 상동성을 갖고 치주염에

* 교신저자 : 최점일, 부산 서구 아미동 1가 10번지 부산대학교병원 치주과학교실, 602-739 (전자 우편 : jrapa@pusan.ac.kr)

* 이 연구는 2005년도 부산대학교병원 임상연구비와 한국과학재단 연구비 #1999-2-20500-004-3의 지원에 의하여 시행되었음.

서 면역병리기전을 갖는 이들 두 항원 중 우리는 다음의 이유로 HSP를 백신개발을 위한 후보로 선택하였다; 1) HSP는 주요 치주병인균 모두에서 발견된데 반해, PC는 *P. gingivalis*에서 발견되지 않았다, 2) HSP에 의한 자가면역기전은 치주염과 동맥경화증 모두에서 나타나므로 HSP에 대한 연구는 많은 정보를 줄 수 있을 것이다, 3) 각각 HSP60 및 HSP70의 유전자인 GroEL, DnaK 유전자가 치주병인균에서 광범위하게 클론되었다.

복합 세균에 대해 방어할 수 있는 백신 개발을 위해 이전에 *P. gingivalis* HSP를 잠재적인 백신의 하나로 실험하여 연구 결과를 발표한 바 있다[12]. 이 실험에서 *P. gingivalis* HSP는 여섯 종류의 치주병인균의 HSP와 교차 반응하였고, 이 6개 세균에 대해 높은 옵소닌 포식작용을 보였다. 또한 *P. gingivalis* HSP를 백서에 면역하였을 때 다양한 세균 감염에 기인한 치조골 파괴가 감소함을 보고한 바 있다[14]. 이런 결과들로 보아 *P. gingivalis* HSP는 다양한 치주병인균에 대한 효과적인 치주 백신으로 활용될 수 있다고 추정된다. 그러나 세균성 HSP는 인체 HSP와 아미노산 서열에 있어 높은 상동성을 보이기 때문에 이 항원에 대한 T세포 면역반응은 인체 HSP에 대한 교차반응을 야기하여 치주염의 면역병리학적 기전에 관여할 뿐만 아니라 다른 조직에 대한 자가면역 질환을 일으킬 내재적 문제점을 가지고 있다.

따라서 이러한 교차반응 활성가능성을 배제하기 위해 세균성 HSP의 면역우세 epitope 중에서 인체 HSP에 교차 반응하지 않는 epitope에 대한 단클론항체(monoclonal antibody)를 세균감염 방어용 백신 개발전략에 사용할 필요성이 대두된다.

본 연구는 실험적 동물에 *P. gingivalis* HSP를 면역한 후, 항원성 epitope에 대한 단클론 항체를 생성하는 hybridoma를 수립하고, 생성된 단클론항체의 반응 양상을 규명하고자 시행되었다.

II. 연구재료 및 방법

1. *P. gingivalis* HSP의 분리 및 정제

P. gingivalis 381에서 추출한 HSP60 유전자인 GroEL gene은 일본 Okayama 치과대학의 Yoji Murayama 교수로부터 양도받았다. *P. gingivalis* GroEL 유전자를 pGEX-4T-3 expression vector에 cloning하여 glutathione S-transferase-*P. gingivalis* GroEL fusion construct로 전환시켰다. Fusion construct는 HB-1142 세포에 transformation시킨 후, 1 M isopopyl α-D-thiogalactoside (IPTG)를 첨가해서 단백질 발현을 유도했다. 세포를 수거하여 100 mM Triethanolamine-HCl, 170 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10 mM dithiothreitol, pH 7.4 용액에 재부유시키고 sonication하였다. Phosphate-buffered saline (PBS)+1% Triton X-100으로 두 번 세척한 glutathione Sepharose 4B beads (Pharmacia, Sweden) slurry를 각 tube에 첨가하고 배양하였다. 침전된 bead들을 PBS+ 1% Triton X-100으로 조심스럽게 세척하고 재부유하였다. Fusion protein은 elusion buffer (10 mM reduced glutathione in 50 nM Tris-HCl, pH 8.0)로 처리하여 추출 정제하였다. Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) 분석하여 순도를 확인하였다.

2. *P. gingivalis* HSP의 면역

10마리의 C57B/6 생쥐를 대상으로 *P. gingivalis* HSP60을 complete Freund's adjuvant에 혼합하여 피하주사로 마리당 200 μg 면역시킨 후, incomplete Freund's adjuvant에 혼합하여 1주 간격으로 2회 추가 면역시켰다.

3. *P. gingivalis* HSP에 대한 단클론항체 형성과 hybridoma 수립

경추를 탈골시켜 생쥐를 희생시키고 70% 에틸알콜로 피부를 청결하게 소독하였다. 복강에 작은 절

개선을 넣어 비장을 채취하여 50 mℓ의 serum-free DMEM 배지가 들어있는 tube에 담아서 petri dish에 옮긴 다음 멸균된 glass slide 사이에 올려놓고 slide를 서로 맞대어 비장을 가벼운 힘으로 비벼 세포가 유출되도록 하였다. 여기에 serum-free DMEM을 넣고 세포 덩어리를 고르게 분산시켰다. 분산된 세포를 30 ㎛ nylon mesh (Milternyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany)에 통과시킴으로서 잔여 조직을 배제시키면서 통과된 세포만 15 mℓ의 배지에 수거하였다. 실온에서 원심분리한 후 (1500 rpm/5분) 상층부는 버리고 침전된 세포에 혼재된 적혈구를 제거하기 위해 lysing buffer로 5분간 처리하고 serum-free DMEM 배지로 최대한 희석시킨 후 같은 방법으로 세척하였다. 상층부를 버리고 추가로 세 번 세척한 후 세포 수를 측정하였다. 배양하고 있던 생쥐 myeloma cell (SP2/0-Ag14:ATCC #CRL-1581)을 serum-free DMEM으로 세 번 세척한 후 세포 수를 측정하였다.

세척이 끝난 후 비장으로부터 채취한 세포와 myeloma cell을 각각 동수가 되게 하여 각각 10 mℓ씩 혼합하여 실온에서 5분간 1500 rpm으로 원심분리 하였다. 상층부를 제거한 후 37℃로 예열된 비커에 세포 pellet을 담고 50% polyethylene glycol 1 mℓ를 1분 동안 천천히 두세 방울씩 떨어뜨리면서 젓는 것을 반복하였다. Serum-free DMEM 1 mℓ를 1분간 한 방울씩 떨어뜨려 젓고 한 번 더 1분간 반복하였다. Serum-free DMEM 7 mℓ를 2~3분간 천천히 넣어주며 이때는 젓지 않는다. 이때 세포의 clump 형성을 관찰할 수 있다. 실온에서 원심분리 후 상층부를 제거하고 미리 예열되어있던 DMEM-20 10 mℓ를 강하게 쏘듯이 넣고 한 번 더 DMEM-20 10 mℓ를 넣어준 후 천천히 젓고 2방울씩 96 well에 분주한 다음 CO2 배양기에서 배양하였다.

그 다음날 DMEM-2-/HAT 배지 10 mℓ을 각 well 당 두 방울씩 넣었다. 그 다음날 각 well에 있는 배지의 절반을 흡입하여 버리고 DMEM-2-/HAT 배지를 두 방울씩 넣었다. 배양 11일째까지 이틀 간격으로 이를 반복하고 14일째에는 HAT 배지를 중화시키기 위하여 DMEM-2-/HT 배지를 두 방울씩 넣었다.

세포의 follicle이 단일형으로 균질하게 군집된 well만 선별하여, 세포가 각 well의 25-50 %까지 차지하였을 때 각 well의 상층액을 수거하여 *P. gingivalis* HSP에 대한 항체형성 여부를 판정하기 위해 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 기법을 이용하여 screening을 시행하였다.

4. Anti-*P. gingivalis* HSP IgG antibody 측정을 위한 ELISA

Microtiter plate (Covalink plate, NUNC, Denmark)를 15 mM Na_2CO_3, 35 mM $NaHCO_3$, 31 mM NaN_3 가 포함된 coating buffer로 coating (10 mg/mℓ) 해서 4℃에서 12시간 동안 반응한 후 PBST (PBS +0.05% Tween 20)로 plate를 세척하고 세포의 상층액을 첨가하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. PBST로 plate를 다시 세척하고 Horse Radish Peroxidase (HRP)가 결합된 Goat anti-mouse IgG (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)를 PBS+0.01% bovine serum albumin (BSA)을 이용하여 1:1000으로 희석해서 첨가하였다. 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 plate를 세척하고 TMB Membrane Peroxidase Substrate System (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)으로 발색 후 5% EDTA를 첨가하여 반응을 종결시켰다. 450 nm의 파장에서 광학 흡광도를 검사하였다.

5. Anti-*P. gingivalis* HSP 단클론항체의 분리 및 정제

배양한 세포 중 *P. gingivalis* HSP IgG에 높게 반응한 hybridoma cell을 선별하여 증폭시킨 후 nude mouse 복강에 5 x 107개의 세포를 주사하였다. 약 1개월 후 nude mouse를 희생시켜 복수를 채취하였고 Immuno Pure IgG Purification Kit

(Pierce)를 이용하여 anti-*P. gingivalis* HSP 단클론항체를 분리 정제하였다. 간단히 설명하면, 상온에 column을 설치한 후 하방의 저장 용액을 제거하고 binding buffer를 5 mℓ 넣는다. Binding buffer에 1:1로 희석시킨 복수 sample 1 mℓ을 column에 넣어준 후에 binding buffer를 15 mℓ 추가한다. Column의 gel에서 buffer가 떨어진 후에 elution buffer 5 mℓ를 넣는다. 이 때부터 column의 밑에 새로운 tube를 준비하여 받는다. 3 mℓ씩 받아서 280 nm에서 흡광도를 측정하여 값이 0.02 이상인 것만 선별하여서 D-salt를 시행하였다. 실온에서 D-salt column을 설치한 후 하방의 저장 용액을 제거하고 PBS buffer 10 mℓ로 column을 세척한다. 앞에서 선별하여 분리한 sample을 3 mℓ 넣고 column의 밑에 새로운 tube에서 받아낸 후 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. Western immunoblot 분석

정제한 anti-*P. gingivalis* 단클론항체 (IgG)의 *P. gingivalis* HSP60과 인체 HSP60에 대한 반응양상을 분석하기 위해 Western immunoblot을 시행하였다.

P. gingivalis HSP60과 인체 HSP60 (StressGen Biotechnologies, Victoria, BC, Canada)을 10% mini gel SDS-PAGE로 변성 분리하여, 이를 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (BIO-RAD)에 100 mA로 1시간 동안 transfer하였다. 그리고 membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TTBS (TBS + 0.1% Tween 20) 용액을 이용하였으며, 상온에서 1시간 동안 실시하였다. Anti-*P. gingivalis* HSP 단클론항체 IgG (1:2000)를 TTBS 용액으로 희석하여 사용하였으며, 반응은 4℃에서 12시간 동안 진행하였다. 2차 항체로는 HRP가 결합된 Goat anti-mouse IgG (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)를 1:5000으로 희석하여 이용하였으며, 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 membrane을 TTBS로 3회 세정하여 TMB Membrane Peroxidase Substrate System (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)으로 발색시켰다. 또한 이전에 분리한 IgG를 1차 항체로 하여 4종류의 상이한 치주병인균의 HSP에 대한 Western immunoblot을 실시하였다. 간단히 설명하면, *P. gingivalis* 381, *P. intermedia* ATCC 25611, *F. nucleatum* ATCC 10953, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384를 배양한 후, 44℃에서 1시간 동안 열충격을 가하였다. 배양한 세균을 4℃, 100000 rpm에서 20분간 세척한 후 상층부는 버리고 다시 두 번 세척하였다. Cell pellet에 lysing buffer 5 mℓ를 넣고 섞은 다음 배양액이 맑아질 때까지 sonication한 후 4℃, 1500 rpm에서 5분 세척 후 상층액만 사용하여 sample buffer와 섞었다. 그 후 앞에서 정제한 anti-*P. gingivalis* HSP 단클론항체 (IgG)를 사용하여 동일한 방법으로 Western immunoblot 양상을 분석하였다.

7. 치주 병소조직을 이용한 면역조직화학적 연구 (immunohistochemistry)

치주염에 이환된 환자의 치주낭과 치주결합조직을 포함한 치주 병소조직을 치은변연부로부터 약 3-4 mm 채취하여 액화질소에 급냉시킨 후 보관하였다. 내인성 peroxidase의 반응을 제거하기 위해 조직을 0.3% 과산화수소수에 넣어 20분간 실온에 방치하였다. 이후 조직을 0.02 M PBS로 15분간 3회 세척한 후에 비특이적인 면역반응(nonspecific immune reaction)을 방지하기 위해 2% BSA를 사용하여 humidified chamber에서 30분 동안 반응시켰다. Blocking antibody를 제거한 뒤 1차 정제된 단클론항체 IgG를 1:500으로 희석한 후, 4℃에서 12시간 동안 반응시켰다. 이때 희석액은 0.02 M PBS에 0.5% BSA가 섞여 있는 것을 사용하였다. 그 후 실온에서 0.02 M PBS로 15분간 3회 세척하였다. 2차 항체인 biotinylated anti-mouse IgG (Vector Laboratories)를 1:1000으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 2차 항체 반응이 끝난 후에

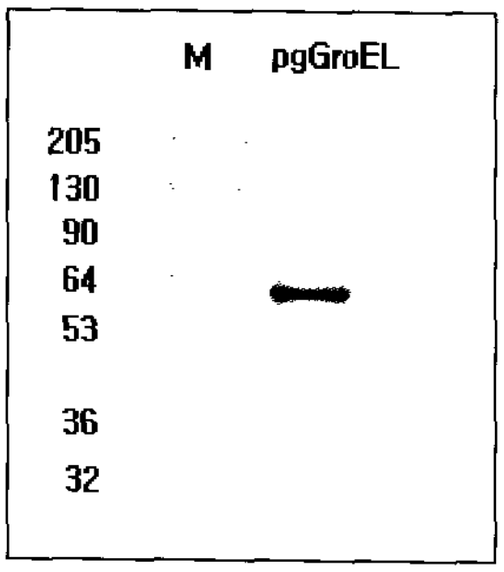

Figure 1. *P. gingivalis* HSP를 정제하고 순도를 확인하기 위해 SDS-PAGE로 전기영동하였다. 단일 band로 그 순도를 확인할 수 있었다.

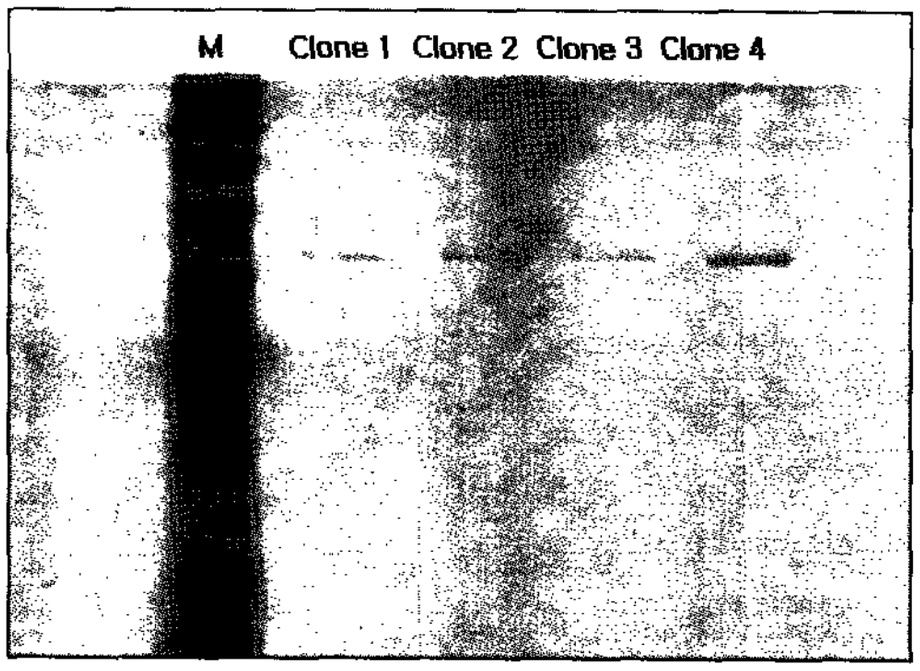

Figure 2. 정제한 4개의 anti-*P. gingivalis* HSP 단클론항체의 순도를 확인하기 위해 SDS-PAGE로 전기영동하여 각각 4개의 단일 band를 확인할 수 있었다.

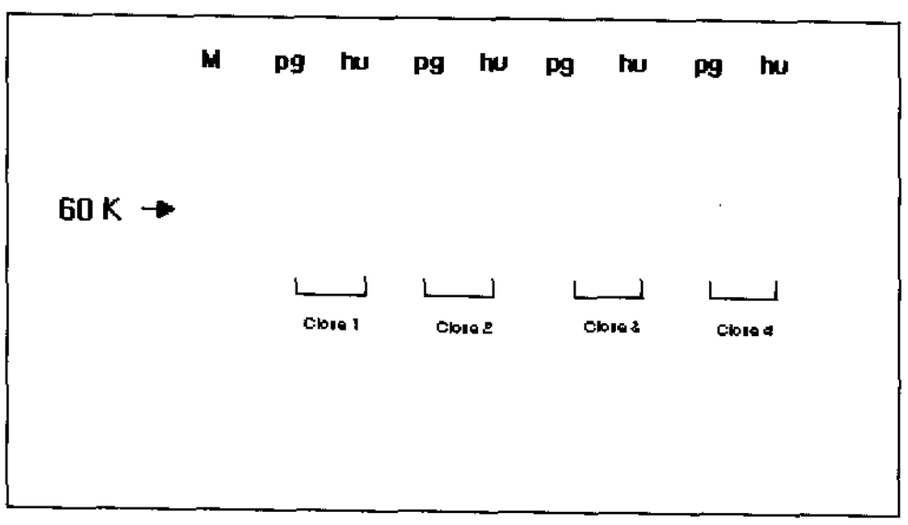

Figure 3. 4개의 단클론항체의 *P. gingivalis* HSP 및 인체 HSP에 대한 교차반응성 평가에서 각각 *P. gingivalis* HSP에 대해서만 반응하였다 (M: molecular weight marker, pg: *P. gigivalis* HSP, hu: 인체 HSP).

0.02 M PBS로 5분간 3회 세척한 후 3차 반응 용액인 avidin-biotin complex (ABC, Vectastatin Elite, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) 용액으로 넣어 실온에서 1시간 반응시킨 후, 0.02 M PBS로 15분간 3회 세척하고 diaminobenzidin (DAB) substrate kit (Vector Laboratories)를 이용하여 광학현미경(Carl Zeiss Axioskop 2) 하에서 확인하면서 착색반응을 시행하였다. 반응이 끝난 후 0.02 M PBS로 15분간 3회 세척하여 반응을 중지시키고, 알코올과 xylen으로 탈수 및 투명화 과정을 거친 후 Entellan (Merck, Darmstadt, Germany)으로 봉입하여 cover slide를 씌운 후 광학현미경으로 면역반응을 관찰하였다.

III. 결과

본 연구에 사용될 *P. gingivalis* HSP를 정제한 결과 60 kDa의 분자량을 가지는 HSP가 얻어졌고, SDS-PAGE로 전기영동한 바 단일 band로 순도를 확인할 수 있었다 (Figure 1).

P. gingivalis HSP로 면역한 10마리의 생쥐 중에서 혈청항체의 역가를 판정하기 위해서 ELISA 기법에 의한 optical density가 혈청희석배율 1:50에서 0.5 이상 되는 것을 면역 양성반응으로 설정한 바 이에 4마리의 생쥐가 양성반응을 보였다. *P. gingivalis* HSP에 대한 단클론항체 형성과 hybridoma를 수립하였고, anti-*P. gingivalis* HSP IgG 항체를 통상의 ELISA 기법으로 screening한 결과 4개의 상이한 hybridoma가 수립되었다 (Figure 2).

4개의 상이한 단클론항체를 이용하여 *P. gingivalis* HSP에 대한 반응성 및 인체 HSP에 대한 반응성을 실험한 결과 4개 항체 모두 *P. gingivalis* HSP에 반응하였으나 인체 HSP에는 교차 반응하지 않는 반응 특이성을 보였다 (Figure 3).

얻어진 4개의 *P. gingivalis* 단클론항체의 상이한 세균에 대한 교차반응성 여부를 평가하고자 네 종류 치주병인균의 HSP에 대한 Western immunoblot을 시행한 결과 4개의 단클론항체 모두 *P. gingivalis*

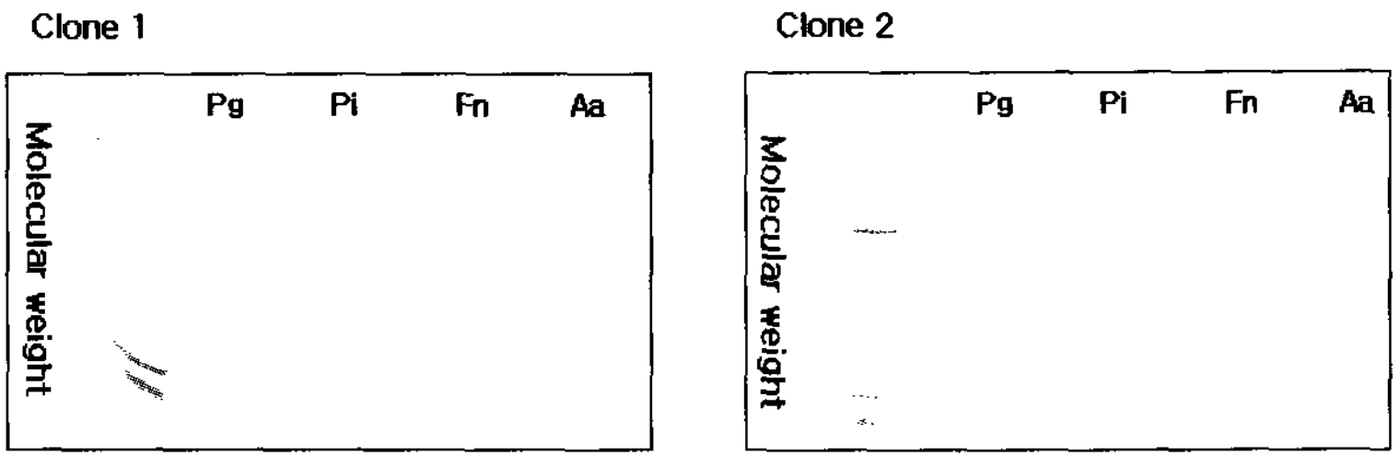

Figure 4. 4개의 단클론항체의 상이한 치주병인균의 HSP에 대한 반응성 평가에서 각각 *P. gingivalis* HSP에 대한 반응만 보여주고 있다. (Pg : *P. gingivalis*, Pi : *P. intermedia*, Fn, *F. nucelatum*, Aa : *A. actinomycetemcomitans*)

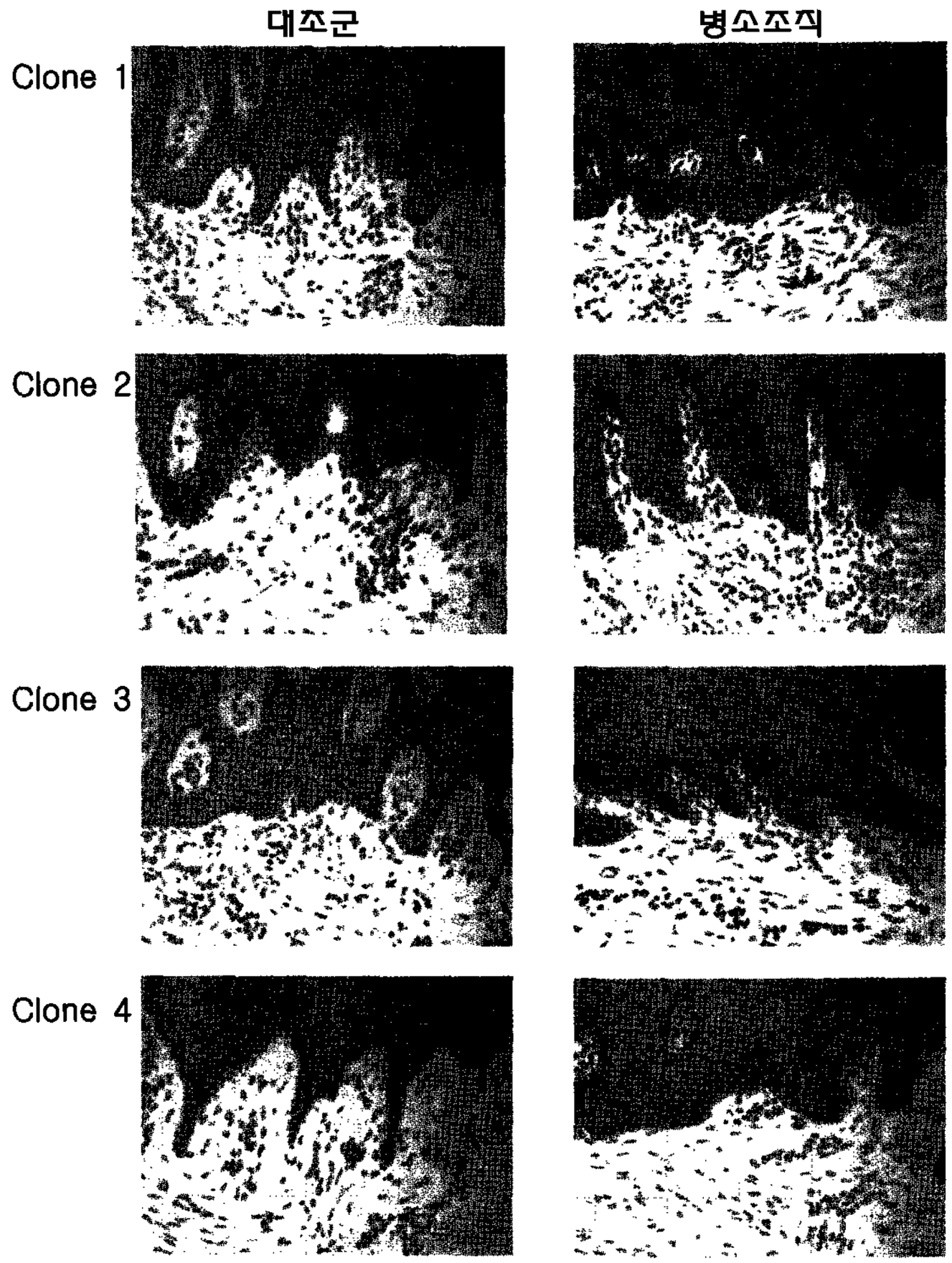

Figure 5. *P. gingivalis* HSP의 치주병소 내 분포를 평가하기 위해 4개의 단클론항체를 이용한 면역조직화학분석 결과 4개의 단클론항체 모두 건강한 치주조직에 비해 치주병소조직에 높은 반응성을 보였다.

에만 반응하고 사용된 다른 3종의 치주병인균의 HSP에는 교차 응을 보이지 않았다 (Figure 4).

P. gingivalis HSP의 치주병소 내 분포를 평가하기 위해 4개의 단클론항체를 이용하여 면역조직화학 분석을 시행한 결과 4종류의 단클론항체 모두 건강한 치주조직에 비해 치주병소조직에 높은 반응성을 보여주었다(Figure 5).

Ⅳ. 고안

인간 치주염은 복합 세균이 병인균으로 작용하므로, 치주염에 대한 백신 개발 계획은 높은 배열 상동성(sequence homology)을 갖고 상호작용하는 항원을 찾는 것에서부터 출발해야 한다. 유핵 및 무핵 세포가 다양한 환경 스트레스 (열, pH 등)에 노출되었을 때 HSP를 포함하는 스트레스 단백질의 생성이 증가하는데 이 HSP는 높은 상동성을 가진다. HSP 유전자는 매우 보존적이다. 그 중 HSP60은 많은 세균 간의 공통항원으로 발견되었고[13], 그 상호작용은 보고된 바 있다[14]. HSP 유전자는 *P. gingivalis*[17], *A. actinomycetemcomitans*[18], *B. forsythus*[19], *T. denticola*[20], *F. nucleatum*[21], *C. rectus*[22]와 *P. intermedia*[23]에서 클론되었다. 여러 치주병인균의 HSP 중에서 우리는 다음의 이유로 *P. gingivalis* HSP을 선택하여 연구하였다; 1) *P. gingivalis*는 파괴적인 치주염에서 가장 중요한 key pathogen의 하나로 밝혀졌다[24]. 2) 이전 연구에서 치주염 환자 및 치주염을 가진 동맥경화증 환자에서 *P. gingivalis* HSP60에 대한 항체 반응이 건강한 사람에서보다 유의하게 높았다[25,26]. 3) 이전 연구에서 치주염 환자 및 동맥경화증 환자에서 *P. gingivalis* HSP에 특이하게 반응하는 T cell line을 규명하였다[25,26]. 4) *F. nucleatum*과 같은 세균의 HSP은 자가 면역기전에 더 많이 관여하는 것으로 밝혀졌다[27].

한편, HSP는 치주염 및 동맥경화증의 자가 면역기전에 깊게 관계하는 것으로 생각되는데[28-30], 이는 세균성 HSP가 인체 HSP과 높은 배열 상동성을 공유하기 때문이다. 치주염 환자에서 *P. gingivalis* HSP60에 대한 항체 반응이 증가한 것[25]은 *P. gingivalis* HSP60이 치은섬유모세포와 혈관내피세포를 표적으로 하는 치주 조직의 자가 면역성 파괴에 관여할 가능성을 보여주는 것이다. 이전 연구에서 *P. gingivalis* HSP60에 대한 IgG 항체역가가 증가된 동맥경화증 환자의 혈청은 *P. gingivalis* HSP60과 인체 HSP60에 동시에 반응하였다[31]. 이것은 *P. gingivalis*와 연관된 동맥경화증의 자가 면역 병인기전에서 세균성 HSP의 연관 가능성을 언급한 다른 보고들과 일치한다[26,32-35].

따라서 자가 면역의 위험성을 배제하기 위해서는 인체 HSP와는 반응하지 않는 *P. gingivalis* HSP 단클론항체를 찾아야 할 필요성이 대두된다. 본 연구의 목적은 1) *P. gingivalis* HSP 단클론항체를 얻고, 이 단클론항체로 면역한 nude mouse로부터 IgG를 분리하여 이 IgG가 *P. gingivalis* HSP 및 인체 HSP에 어떻게 반응하는지를 알아보고, 2) 이 IgG가 다른 치주병인균에 어떻게 반응하는지를 관찰하는 것이었다.

본 연구에서 얻은 IgG를 Western immunoblot하여 4개의 단클론항체를 확인하였다. 또한 이 IgG는 *P. gingivalis* HSP에는 반응을 보였으나 인체 HSP에 대해서는 반응을 보이지 않았다. 이로써 이 단클론항체를 자가 면역을 유도하지 않는 치주염 백신 전략에 이용할 수 있는 가능성이 제시된다. 이 단클론항체의 epitope을 규명하는 것은 향후 더 연구가 진행되어야 할 것이다. 또한 이 단클론항체가 동물실험에서 임상적인 골 파괴 감소를 가져오는지도 연구되어야 할 것이다.

그러나 이 연구에서 얻은 IgG는 *P. gingivalis*에만 반응을 보이고 그 외 치주병인균으로 밝혀진 *P. intermedia*, *F. nucleatum* 및 *A. actinomycetemcomitans*에는 반응을 보이지 않았다. 이는 다양한 병인균에 기인하는 치주염을 예방하기에는 이 단클론항체가 부족함을 보여주는 것이다. 향후 복합 치주병인균과 상호작용하는 단클론항체를 찾아내는 연구가 계속되어 미래의 치주염에 대한 예방백신으로 이용될 수 있을 것이다.

V. 결론

이 연구의 목적은 1) *P. gingivalis* HSP 단클론항체를 얻고, 이 단클론항체로 면역한 nude mouse로부터 IgG를 분리하여 이 IgG가 *P. gingivalis* HSP 및 인체 HSP에 어떻게 반응하는지를 알아보고, 2) 이 IgG가 다른 치주병인균에 어떻게 반응하는지를 관찰하는 것이다.

P. gingivalis HSP60 단백질을 생쥐에 접종한 후 비장으로부터 얻은 세포와 생쥐의 myeloma cell을 융합하여 배양하여 단클론항체를 얻었다. 이 단클론항체를 nude mouse에 주사하여 면역시킨 후 그 복수를 채취하여 IgG를 분리하였다. 이 IgG는 *P. gingivalis* HSP에만 반응하고 인체 HSP에는 반응하지 않았다. 또한 이 IgG는 *P. gingivalis*를 제외한 다른 세 종류의 치주병인균에는 반응하지 않았다. 숙주에 자가 면역을 유도하지 않는 anti-*P. gingivalis* HSP 단클론항체가 인간 치주염의 예방에 도움을 줄 것으로 생각된다.

VI. 참고문헌

1. Taubman MA, Yoshie H, Wetherell JR, Ebersole JL, Smith DJ. Immune response and periodontal bone loss in germfree rats immunized with and infected with Actinobacillus actinomycetemcomitans. J Periodont Res 1983;18:393-401.
2. Klausen B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: A review article. J Periodontol 1991:62:59-73.
3. Klausen B, Evans RT, Ramamurthy NS et al. Periodontal bone level and gingival proteinase activity in gnotobiotic rats immunized with Bacteroides gingivalis. Oral Microbial Immunol 1991:6:193-201.
4. Genco CA, Kapczynski DR, Cutler CW, Arko RJ, Arnold RR. Influence of immunization on *Porphyromonas gingivalis* colonization and invasion in the mouse chamber model. Infect Immun 1992:60:1447-1454.
5. Choi JI, Schifferle RE, Yoshimura F, Kim BW. Capsular polysaccharide-fimbrial protein conjugate vaccine protects against *Porphyromonas gingivalis* infection in SCID mice reconstituted with human peripheral blood lymphocytes. Infect Immun 1998:66: 391-393.
6. Katz J, Black KP, Michalek SM. Host responses to recombinant hemagglutinin B of *Porphyromonas gingivalis* in an experimental rat model. Infect Immun 1999:62:4352-4359.
7. Rajapakse PS. OBrien-Simpson NM, Slakeski N, Hoffman B, Reynolds EC. Immunization with the RgpA-Kgp proteinase-adhesin complexes of *Porphyromonas gingivalis* protects against bone loss in the rat periodontitis model. Infect Immun 2002:70:2480-2486.
8. DeCarlo AA, Huang Y, Collyer CA, Langley DB, Katz J. Feasibility of an HA2 domain-based periodontitis vaccine. Infect Immun 2003:71:562-566.
9. Page RC. The humoral response in patients with periodontitis: Effects of treatment and prospects for a vaccine. Compend Conti Educ Dent Suppl. 1994:No.18:S666-S671.
10. Dzink JL, Socransky SS, Haffajee AD. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal disease. J Clin Periodontol 1998:15: 316-323.
11. Podmore M, Ebersole JL, Kinane DF. Immunodominant antigens in periodontal disease: a real or illusive concept? Crit Rev Oral Biol Med 2001:12:179-185.

12. Choi JI, Choi KS, Yi NN et al. Recognition and phagocytosis of multiple periodontopathogenic bacteria by anti-*Porphromonas gingivalis* heat-shock protein 60 antisera. Oral Microbiol Immunol 2005;20:51-55.
13. Shinnick TM. Heat shock proteins as antigens of bacterial and parasitic pathogens. Curr Top Microbiol Immunol 1991:167:145-160.
14. 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.
15. Gmur R, Thurnheer T, Guggenheim B. Dominant cross-reactive antibodies generated during the response to a variety of oral bacterial species detect phosphorylcholine. J Dent Res 1999:78:77-85.
16. Schenkein HA, Gunsolley JC, Best AM et al. Antiphosphorylcholine antibody levels are elevated in humans with periodontal diseases. Infect Immun 1999 : 67 : 4814-4818.
17. Maeda H, Miyamoto M, Hongyo H et al. Heat shock protein 60(GroEL) from *Porphyromonas gingivalis*:molecular cloning and sequence analysis of its gene and purification of recombinant protein. FEMS Microbiol Lett 1994:119:129-135.
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 1998:13:113-119.
19. Reid HI, Riggio MP. Identification and nucleotide sequence of heat shock protein 60(GroEL) gene of Bacteroides forsythus. DNA Seq 1998:9:359-364.
20. Tsai JP, Shi W. Analysis of gene expression in Treponema denticola with differential display polymerase chain reaction. Oral Microbiol Immunol 2000:15:305-308.
21. Skar CK, Bakken V. The heat shock response of Fusobacterium nucleatum. Eur J Oral Sci 2001:109:402-408.
22. Hinode D, Yoshioka M, Tanabe S et al. The GroEL-like protein from Campylobacter rectus:immunological characterization and interleukin-6 and -8 induction in human gingival fibroblast. FEMS Microbiol Lett 1998:167:1-6.
23. 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.
24. Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. Periodontol 2000 1999:20:168-238.
25. Choi JI, Kang HS, Park YM, Kim SJ, Kim US. Identification of T-cell epitopes of *Porphyromonas gingivalis* heat-shock-protein 60 in periodontitis. Oral Microbiol Immunol 2004:19:1-5.
26. Choi JI, Chung SW, Kang HS et al. Establishment of *Porphyromonas gingivalis* heat shock protein-specific T-cell lines from atherosclerosis patients. J Dent Res 2002:81(5):344-348.
27. Saito K, Katsuragi H, Mikami M et al. Increase of heat-shock protein and induction of gamma/delta T cells in peritoneal exudate of mice after injection of live Fusobacterium nucleatum. Immunology 1997:90:229-235.
28. Ando T, Kato T, Ishihara K, Ogiuchi H, Okuda K. Heat shock proteins in the hu-

man periodontal disease process. Microbiol Immunol 1995:39:321-327.
29. 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.
30. Ishihara K, Ando T, Kosugi M et al. Relationships between the onset of pustulosis palmaris et plantaris, periodontitis and bacterial heat shock proteins. Oral Microbiol Immunol 2000:15:232-237.
31. Choi JI, Chung SW, Kang HS et al. Epitope mapping of *Porphyromonas gingivalis* heat-shock protein and human heat-shock protein in human atherosclerosis. J Dent Res 2004:83(12):936-940.
32. Hansson GK. Immune mechanism in atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001:21:1876-1890.
33. Wick G, Perschinka H, Millonig G. Atherosclerosis as an autoimmune disease: an update. Trends Immunol 2001:22:665-669.
34. 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.
35. Yamazaki K, Ohsawa Y, Tabeta K et al. Accumulation of human heat shock protein 60-reactive T cell in the gingival tissues of periodontitis patients. Infect Immun 2002:70:2492-2501.

– Abstract –

Development of monoclonal antibody against *Porphyromonas gingivalis* heat shock protein

Ni-Na Yi, Ju-Youn Lee, Sung-Jo Kim, Jeom-Il Choi

Department of Periodontology, College of Dentistry, Pusan National University

Heat shock protein (HSP) is one of cellular protein commonly present in major periodontopathogenic bacteria as well as mammalian cells. The protein may play a role in the immunopathogenesis by modulating autoimmune reaction due to its high level of sequence homology between bacteria and human counterpart. Hence, identifying immunodomiant epitope of bacteria HSP that is cross-reactive to periodontopathogenic bacteria with a specificity to human HSP may comprise a critical strategy for development of a periodontal vaccine.

The present study was performed to establish clones producing monoclonal antibody reactive to *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) HSP with a specificity to human HSP. 4 different hybridomas were cloned producing monoclonal IgG antibodies to *P. gingivalis* HSP and evaluated for their reactivity and specificity to other periodontopathogenic bacteria as well as to human HSP.

These four monoclonal antibodies reacted with *P. gingivalis* HSP only with specificities to other bacteria tested and human HSP as well. The antigenic epitopes producing the 4 monoclonal antibody may be potentially developed as vaccine candidates. Further investigations are under way to identify more clones producing monoclonal antibodies reactive to *P. gingivalis* HSP and to other periodontopathogenic bacteria as well, while maintaining specificities to human counterpart.

key words : natural antibody, vaccine, *Porphyromonas gingivalis*