

Kawasaki환자에서 HSP65에 대한 항체의 검출

연세대학교 의과대학 소아과학교실

노건웅 · 김동수 · 이기영

서 론

Heat shock protein family에 속하는 mycobacterial heat shock proteil 65(HSP65)는 Mycobacteria에서 분리되는 분자량 65kDa의 단백질로 이 균에 감염된 사람에게 있어서 항체반응 및 T림파구의 반응을 유발하는 면역반응성이 강한 단백질로 잘 알려져 있다.¹⁾ HSP는 많은 세균은 물론 포유동물의 세포에서 존재하는 단백질로 stress protein이라고도 한다. 그 기능은 다른 단백질의 기능과 운명을 변조하며 많은 생리적 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다.²⁾

HSP는 분자량에 따라 HSP90, HSP70, HSP60, ubiquitin등으로 분류 및 정의되며 HSP65는 이 중에서도 HSP60에 속한다. HSP는 감염체는 물론 암세포의 중요한 항원으로 역할을 하며, 자가 면역 질환에서도 중요한 실마리를 제공하고 있다.³⁾ HSP65는 많은 Bacteria병원체의 주항원으로 여기에는 Mycobacterium leprae, M. tuberculosis는 물론 Coxiella burnetti, Treponema, Chlamydia trachomatis등의 주 항원이다.⁴⁾

스트레스를 받아 숙주세포는 HSP65에 대한 T림파구의 공격대상이 될 수 있다고 하는데, 스트레스는 열, 바이러스 감염 및 γ -interferon의 자극등,

여러자극에 의하여 생기며 이러한 스트레스에 의하여 유도되는 HSP65에 대한 T림파구의 반응이 자가면역질환을 유발하는 기전으로 설명하기도 한다.

Kawasaki병은 면역조절기능의 이상으로 오는 질환으로 소아영역에서 호발하는 급성발열질환이고 미만성 점막염증, 경결성 부종, 다형성 발진, 그리고 비화농성 경부 임파절염을 그 특징으로 한다.⁵⁾ 관상동맥류 또는 확장증이 15~20%의 환자에서 발생하고 심근경색, 갑작스런 사망 또는 만성 관상동맥부전등이 생기기도 한다. 이러한 Kawasaki병의 발생원인과 병리기전은 분명치 않으며 감염에 의한 것으로 보기도 하는데, 급성기에 면역계가 활성화되어 몇몇cytokine 및 활성화된 세포독성 T림파구와 탐식세포들이 높게 증가한다는 많은 근거들이 있다.⁶⁾ Kawasaki병도 근자에 들어서는 자가면역성 질환으로 생각되고 있으며 다른 자가면역성 질환에서처럼 heat shock protein이 이 질환에서 병리기전에 관여할 수 있다는 의심이 있어왔고, 특히 Kawasaki병의 발병 소견중 BCG접종부위의 국소적 홍반을 띄는 양상으로 본 질환이 BCG감염과 관계가 있음을 보고하였다.⁷⁾ 실제로 1989년 Yokota는 BCG뿐만 아니라 mycobacterial HSP65가 Kawasaki병의 소인성의 또는 면역활성 요소로서 작용한다고 보고하여 이 가설을 뒷받침하고 있으며 아직 여기

에 대하여는 더 많이 연구되어야 할 부분들이 있다. 이에 본 저자는 일시적인 면역조절기능이상으로 나타나는 Kawasaki병과 BCG와 HSP65와의 관계를 알아보기 위하여 Kawasaki환자의 혈청에서 mycobacterial HSP65에 대한 항체반응을 조사하여 보았다.

재료 및 방법

1. 항원

항체를 검출하기 위하여 사용한 항원은 연세대학교 의과대학 미생물학교실에서 제공받은 Mycobacterium bovis BCG균과 이 BCG로부터 perchloric acid를 이용하여 추출한 65kDa단백을 사용하였고, purified protein derivative(PPD)항원은 Staten Serum Institute(Copenhagen, Denmark)에서 구입하여 사용하였으며, lipoarabinoman(LAM)항원은 결핵균에서 순수 정제된 것을 PJ Brennan(Colorado State University, Fort Collins, CO, USA)으로부터 공급받아 사용하였다.⁸⁾

2. BCG로부터 65kDa단백질 분리

BCG균 600mg을 증류수에 넣어 전체가 20ml가 되게 부유액을 만든뒤 perchloric acid (PCA)2.6ml와 증류수 17.4ml의 20ml와 섞어 30분 동안 휘저어 섞었다. 이것을 4℃ 4,000~5,000 rpm에서 15분간 원심분리하고 상층액을 취하여 흐르는 물에 16시간 투석하였다. 투석이 끝나면 17,000rpm으로 30분 동안 4℃에서 원심분리한 후 상층액을 취하여 증류수로 2일 동안 투석하고 냉동건조하였다. BCG생균 600mg에서 PCA로 추출한 항원을 냉동건조하였을 때 12.5mg을 얻었고, 이것을 실험의 항원으로 사용하였다. 단백질의 정량은 Lowry의 방법을 따라 시행하였으며 냉동건조 BCG 1mg/ml에는 34.840ug/ml의 단백질이 포함되어 있었다.⁹⁾

3. 환자혈청 및 통계처리

Kawasaki disease로 진단된 환자의 입원당시와 회복기의 혈청을 얻어 사용하였고, 정상대조군의 혈청으로 이학적 소견상 특이 소견이 없는 외래 방문

환자의 혈청을 얻어 -70℃에 보관하였다가 사용전에 실온에서 녹여 사용하였다. 자료의 통계처리는 SPSS PC로 하였고 t-test를 이용하였다.

4. Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA)

항원은 BCG항원과 BCG에서 분리한 65kDa단백질을 사용하였다. 단백질농도가 BCG 항원은 10 μ g/ml, BCG에서 추출한 65kDa 단백질은 7 ug/ml, PPD항원은 10ug/ml, LAM항원은 0.2ug/ml이 되도록 0.05 M Carbonate 완충용액에 희석하여 ELISA판(Immunoplate, Nunc, enmark)에 100ul/well씩 넣고 37℃에서 18시간 방치하였다.

항원이 부착된 ELISA판을 세척액 phosphate buffered saline-Tween(PBST, 0.01M 인산완충용액, 0.05% Tween 20)으로 3회 세척한 후 PBST-BSA (0.01M인산완충용액, 0.05%, Tween 20, 1% bovine serum albumin)로 37℃에서 1시간 반응시켜 여백을 차단하였다. 다시 PBST으로 세척한 후 환자의 혈청과 정상인의 혈청을 PBST-BSA로 1:200희석하여 100ul/well씩 넣고 37℃에서 1시간 반응시켰다. PTN으로 3회 세척후 PTNB에 1:1000으로 희석한 peroxidase conjugated goat anti-human immunoglobulin G(Cappel, Malvern, NC, USA)를 100ul/well씩 넣고 37℃에서 1시간 반응시켰다. PBST로 5회 세척후 기질용액 (0.4mg/ml O-phenylenediamine hydrochloride in phosphatecitrate buffer pH5.0)을 100ul씩 넣고 실온에서 20분간 반응시켰다. 그 후 정지용액 (2N H₂SO₄)을 50ul씩 첨가하여 반응을 정지시키고 ELISA reader(Dynatech MR 300, Alexandria VA, USA)파장 490nm에서 각 Well의 흡광도를 측정하였다.

5. Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)

Perchloric acid를 이용하여 분리한 항원의 단백을 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 시행하였다. 4% stacking gel 과 12% separating gel을 사용하였고, 항원인 BCG와 BCG에서 분리한 65kDa단백질을 40ug/well씩을 2%(Wt/Vol)SDS, 5%

(Vol / Vol) 2-mercaptoethanol, 0.02%(Wt / Vol) bromophenol blue가 함유된 0.06 M/L Tris HCl, pH8.8에 녹여 100℃에 3분간 처리하여 34mA로 전기영동을 한 후에 염색은 neutral silver염색방법으로 하였고 저분자량의 표준단백(Bio Rad. Lab., Richmond CA)에 의거하여 계산하였다.

6. Immunoblotting

항원을 전기영동에 의하여 분리한 후 nitrocellulose membrane(Milipore, 0.45um, Belford MA)에 2시간동안 70V로 이행시키고 환자 혈청을 이용하여 다음의 과정을 거쳐 면역검출을 시행하였다. 단백질 전이된 각각의 nitrocellulose membrane을 10mM Tris 0.9%, NaCl로 3% BSA에 2시간 동안 담구어 여백을 차단시킨 후에 10mM Tris NaCl로 20분간 세척하였다. 이것을 환자혈청을 0.1% PBS Tween 20에 1:100으로 희석한 용액에 16시간 동안 방치하였다가 다시 세척하였다. 이를 다시 alkaline phosphatase가 부착된 anti-human IgG를 conjugate buffer(MgCl₂, ZnCl₂)를 포함한 20mM Tris 0.3% BSA 0.9% NaCl에 1:1000으로 희석한 용액에 2시간 반응시킨 후에 세척하였다. 여기에 naphthol as-mx phosphate (Sigma Co., St. Louis, MO)와 Fast Blue BB salt(4-benzoylamino-2,5-diethoxybenzene-diazodium chloride hemisalt, Sigma Co., Mo)를 섞은 용액을 첨가하여 발색시켜서 육안으로 항원 항체결합 띠를 관찰하였다.

결 과

Kawasaki환자에서 급성기와 아급성기에 환자의 혈청에서 초음파 처리한 BCG를 항원으로 하여 항체반응을 검사한 결과, 급성기(0.67±0.23)에 비하여 아급성기에 (1.22±0.38)에 통계학적으로 (p<0.01)의의있게 증가하는 항체반응을 관찰할 수 있었다(그림1). 이러한 BCG에 대한 항체반응이 어느 단백질에 대한 반응인가를 알아보기 위하여 다시 이 BCG를 항원으로 환자의 아급성기 혈청을 가지

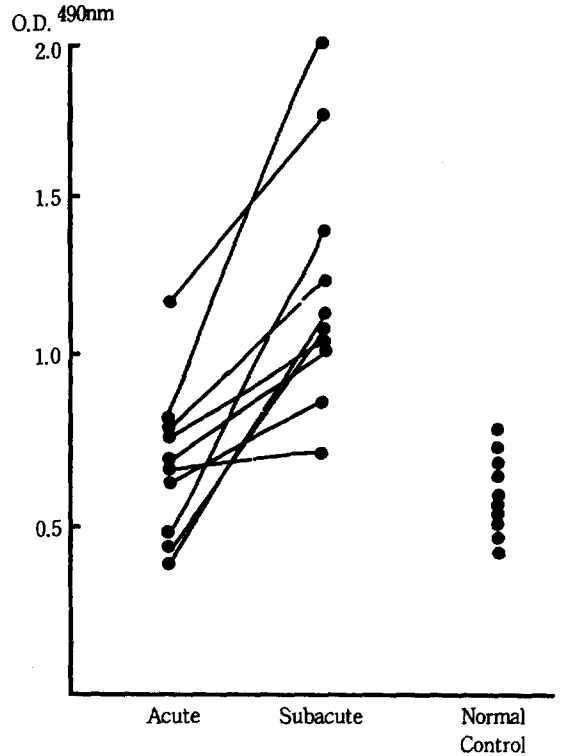


Fig.1 Antibody reactivity against BCG sonicate antigen in sera obtained serially from patients with Kawasaki disease.

고 Immunoblotting을 시행한 결과 (그림2). 에서 보여주는 바와 같이 65kDa에서 가장 강한 단백질 띠를 관찰할 수 있었고, 그외에도 99kDa, 38kDa등에서도 약하게 반응하는 여러 띠를 관찰할 수 있었다. 그러나 급성기 환자의 혈청으로 Immunoblotting을 시행하여 이러한 띠들을 관찰할 수가 없었다. Perchloric acid를 이용하여 BCG에서 단백질을 추출하여 SDS-PAGE를 시행한 결과 65kDa에서 관찰되는 단일 띠를 관찰할 수 있었고, 99kDa에서도 작은 띠가 관찰되기도 하였으나, 99kDa항원의 발견은 일정하게 관찰되지 않아서, 65kDa단백이 perchloric acid를 이용하여 BCG에서 추출되는 주 항원임을 알 수 있었다(그림3).

Kawasaki환자의 혈청에서 급성기에 비하여 아급성기에 의의 있게 증가하는 65kDa단백에 대한 항체반응이 perchloric acid를 이용하여 BCG에서

추출한 65kDa단백에 대한 것인지를 알아보기 위하여, 이 단백을 항원으로 ELISA를 시행하였고 BCG에서와 마찬가지로 급성기(0.66 ± 0.19)에 비하여 아급성기 (1.24 ± 0.49)에 통계학적으로 ($P < 0.0001$)의의있게 증가하는 항체반응을 관찰할 수 있었다(그림4).

이 단백질과 아급성기에 가장 강하게 반응하는 혈청으로 항체반응을 확인하기 위하여 Immunoblotting을 시행한 결과 65kDa단백의 단일 띠를 관찰할 수 있었다(그림5). 이경우에도 급성기 환자의 혈청에서는 이러한 반응 띠를 관찰하지 못하였다.

이러한 항체반응과 결핵균에 대한 면역반응과의 관계를 관찰하 위하여 PPD 및 lipoarabinomannan(LAM)은 항원으로 하여 ELISA를 시행하여

Fig.2 Immunoblotting of serum samples from a patient with Kawasaki disease during acute phase(Lane 1)and subacute phase(Lane 2)with BCG sonicate antigens.

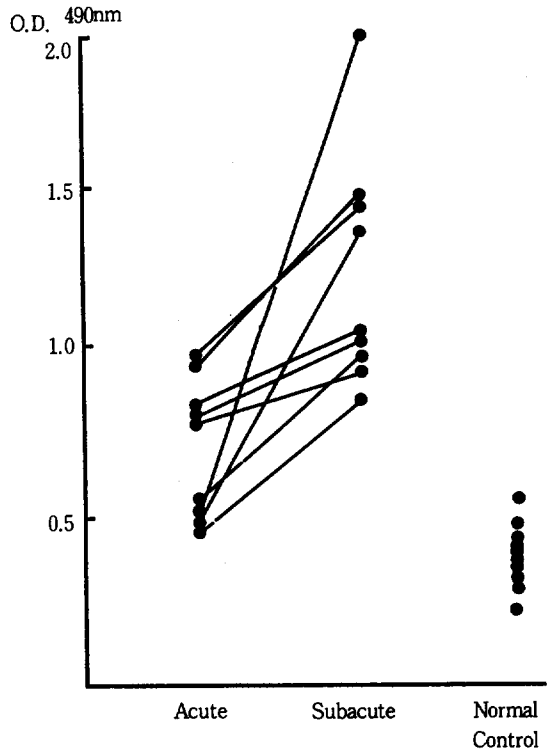


Fig.4 Antibody reactivity against PCA extract of BCG antigen in serial samples obtained from patients with Kawasaki disease.

Fig.3 SDS-PAGE analysis of perchloric acid soluble *M. bovis* antigen(BCG-P) (Lane 1:Standard molecular maker, Lane 2:BCG-P)

보았다. PPD항원에 대한 환자의 항체반응의 경우에 5명의 환자의 경우에는 BCG나 65kDa단백에 대한 항체반응의 경우처럼 아급성기에 의의있는 항체반응($p < 0.05$)을 보이기도 하였고 나머지 5명의 환자의 경우에는 통계학적으로 의의있는 항체반응을 관찰할 수가 없었다(그림6). LAM에 대한 환자의 항체반응도 PPD와 마찬가지로 2명 환자의 경우 통계학적으로 의의있는 항체반응을 관찰할 수 있었으나, 나머지는 일부는 관찰할 수 없었다(그림7).

Fig. 5 Immunoblotting of Serum samples from a patient with Kawasaki disease during acute phase(Lane 1)and subacute phase(Lane 2)with PCA extract of BCG.

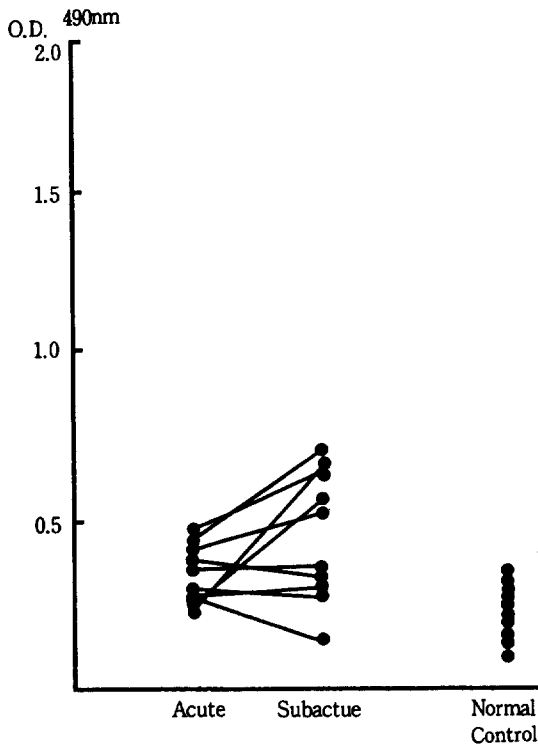


Fig.6 Antibody reactivity against PPD antigen in serial samples obtained from 10 patients during acute and subacute phase of Kawasaki disease.

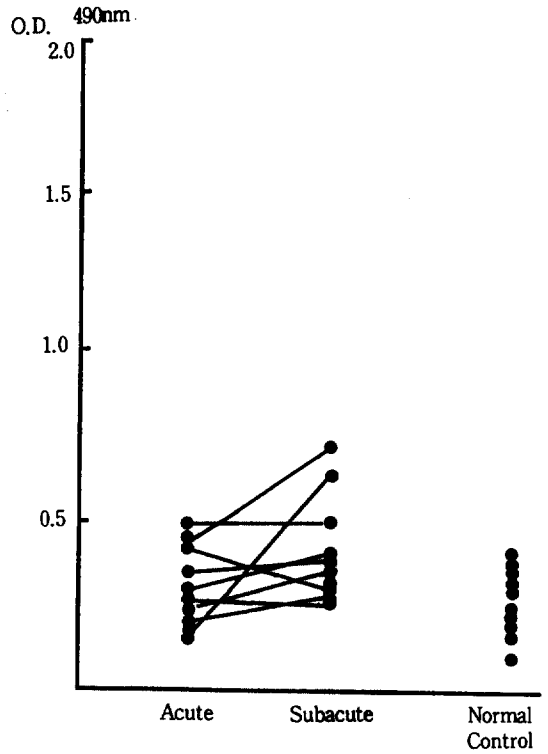


Fig.7 Antibody reactivity against LAM antigen in serial samples obtained from patients during acute and subacute phase of Kawasaki disease.

고 찰

Kawasaki병은 소아영역에서 주로 발병하는 급성 발열성 질환으로 그 원인과 병리기전이 확실히 밝혀진 바가 없으며 면역학적인 이상을 동반하는 질환으로 알려져 있다. 그 원인으로는 herpesvirus 6, measles virus, Epstein-Barr virus, adenovirus 등의 virus 감염과 chlamydia 등의 여러 감염을 제시하기도 하며¹⁰⁾, 최근에는 superantigen인 TSST-1을 분비하는 Staphylococcus에 의한 감염이라는 보고가 있다.¹¹⁾

Kawasaki병에 있어서 세포손상을 예상하는 지표들이 증가한다고 보고하고 있는데 thromboxane이 증가하여 이것이 병리기전에 관여하고, Leukotriene B₄, oxidative metabolism 등이 증가한다고 하며, 이에 따라 반응적으로 antioxidant 효소인 세포내 superoxide dismutase, plasma lipid peroxidase, manganese superoxide dismutase 등이 증가한다고 한다.¹²⁾

이러한 세포손상요소들이 증가하는 기전은 전신적으로 비특이적인 면역학적인 활성화에 의한 것으로 보고되고 있는데 주요한 면역학적인 활성화는 많은 cytokine들의 분비가 증가하여 adhesion 분자들과 혈관내피세포의 새로운 항원의 표현이 증가되어 혈관내피세포의 손상을 입는 것으로 알려져 있으며, 다클론의 B림파구의 활성화와 세포면역구성의 변화로 CD8+T림파구의 감소등이 그 변화로 알려져 있다.¹³⁾

Kawasaki병에 있어서 면역학적인 변화는 항원성의 변화로 HLA Class II¹⁴⁾, factor V 관련 항원으로 증가¹⁵⁾, 항체의 변화로 혈중 면역복합체의 증가, native type III collagen에 대한 항체의 발현¹⁶⁾, anti-neutrophil cytosolic antibody, anti-endothelial cell antibody¹⁷⁾ 등의 발현과 그외에 다양한 cytokine의 변화, 예를 들어 interleukin 1, interleukin 2, gamma interferon, interleukin 6, tumor necrosis factor alpha 등이 증가가 관찰된다.¹⁸⁾

면역세포의 변화로는 CD8+세포가 감소하고, CD14+macrophage/monocyte의 증가, CD23+B세포

포의 증가등이 보고되고 있다.¹³⁾

Heat shock protein(HSP)은 stress protein이라고도 하며 많은 동물세포와 병원체와 사람의 경우 여러 경우에 발견할 수 있는 것으로 알려져 있다. HSP는 분자량과 그 기능에 따라 HSP90, HSP70, HSP60, ubiquitin등으로 분류 및 정의되며, BCG에서 추출한 분자량 65kDa의 단백질은 이 중에서도 HSP60에 속한다.

HSP60계열의 기능은 단백질의 folding과 unfolding에 관여하고, multimeric complexes의 assembly에 관여하는 것으로 알려져 있다. 특히, HSP65의 경우 많은 병원체의 주항원으로 M. leprae, M. tuberculosis는 물론 Coxiella burnetii, Teponema 및 Chlamydia trachomatis 등의 균의 항원으로 알려져 있고, Entamoeba histolytica, Rabies virion, Salmonella typhimurium¹⁹⁾, Aspergillus²⁰⁾ 등에서도 발견되는 것으로 보고되고 있다. HSP65의 경우에는 사람의 정상 위점막에서도 발견되며²¹⁾, neutrophil에서 hepxillin A3에 의하여 유도될 수 있으며²²⁾ 콩팥에서 HSP90가 발견되기도 한다.

HSP는 자가면역질환의 발생에 관여한다고 알려져 있는데, 스트레스를 받은 세포가 표현하거나 생성하는 HSP65에 의하여 T세포의 공격대상이 될 수 있으며, 스트레스는 열, 바이러스 감염 및 gamma-Interferon 등의 자극에 의하여 생기며 이러한 스트레스에 의하여 유도되는 HSP65에 대한 T세포의 반응을 자가면역질환이 생기는 기전으로 설명하기도 한다.

HSP65와 자가면역질환과의 관계에 대하여는 류마치스양 관절염의 경우 잘 알려져 있다. 류마치스양 관절염환자에서 HSP65에 대한 항체가 높게 나타나며, 류마치스양 관절염환자의 혈액에서 mycobacterial HSP65와 반응하는 T림파구 클론들을 관찰하여 대부분이 γ/δ -TCR 수용체를 갖고 있다는 보고가 있다.²³⁾ HSP65는 이러한 류마치스양 관절염외에도 건선²⁴⁾, 공피증, 다발성 경화증²⁵⁾, 당뇨병²⁶⁾, 전신성 홍반성 낭창²⁶⁾등에서도 관련이 있다고 보고되고 있다.

Kawasaki병이 근자에 들어서 자가면역성 질환이

라는 증거가 제시되고, 특히 BCG주사부위의 홍반이 나타나는 것을 관찰하고⁷⁾ BCG에서 추출한 HSP65에 대한 항체를 측정할 바 있는데, 염증반응에 있어서 BCG또는 HSP와의 관계를 알아보기 위하여 BCG로부터 mycobacterial HSP65단백을 추출하여 급성기와 아급성기의 항체반응을 비교 검토하였다.

초음파 처리한 BCG를 항원으로 하여 ELISA를 시행한 결과, 급성기에 비하여 아급성기에 유의있게 증가하는 항체반응을 관찰할 수 있었고, immunoblotting을 시행한 결과 65kDa에서 강하게 반응하는 띠를 관찰할 수 있었으며, 그외에 여러 개의 약하게 반응하는 띠를 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 Kawasaki병이 BCG감염과 관계가 있을 것이라는 간접적인 증거는 되나 BCG감염이 Kawasaki병에 직접 관여하고 있는지 또는 BCG균에 대한 항체를 만드는 B림파구의 다클론 활성화 때문인지는 아직도 불분명하다.

BCG의 65kDa단백은 mycobacterial HSP65로서 perchloric acid를 이용하여 추출하였고 SDS PAGE를 시행한 결과 65kDa에서 단일 띠를 얻을 수 있었다. 이렇게 순수분리된 mycobacterial HSP65를 항원으로 다시 ELISA를 시행한 결과 BCG를 음파처리하여 항원으로 사용한 경우와 유사하게 급성기에 비하여 아급성기에 유의있게 증가하는 항체반응을 얻을 수 있었으며, immunoblotting을 시행하여 65kDa에서 강하게 반응하는 단일 띠를 얻었다. 이와같은 결과는 Kawasaki환자의 급성기 및 아급성기에 BCG에 대한 항체반응은 주로 65kDa Mycobacterial HSP65에 대한 것으로 추측할 수 있었다.

앞서도 언급하였지만 실제로 BCG항원과 HSP65에 대한 항체반응이 증거한 것이, 이 항원에 의한 노출이 Kawasaki병에서 원인이 될 수 있는지에 대한 근거는 없다. 또한 Kawasaki병은 초기에 B림파구의 다클론 활성화가 동반되는 질환이기 때문에 이러한 B림파구들의 변화로 혈중에 증가된 항체가 HSP65와 교차반응을 할 수 있는 가능성에 대해서도 전혀 배제할 수 없다. 또한 치료를 위하여 투여한 면역글로블린내에 이들에 대한 항체가 존재할 수도

있는 문제를 배제할 수도 없는데, 이부분에 대해서는 더 많은 연구가 있어야 되겠다.

이러한 mycobacterial HSP65에 대한 반응이 결핵항원에 특이한 반응인지 알아보기 위하여 같은 환자들이 혈청을 PPD를 항원으로 하여 ELISA를 시행한 결과 BCG나 mycobacterial HSP65를 항원으로 사용한 경우와는 달리 통계학적으로 유의있는 항체반응을 얻지 못하였고, 또 급성기에 비하여 아급성기에 유의있게 증가는 하였지만 BCG나 65kDa HSP에 대한 항체반응과는 비교가 될 수 없는 낮은 항체만을 얻었다. 몇몇 환자의 경우 PPD와 LAM에서도 약간 항체반응을 보였지만 BCG에서 얻은 mycobacterial HSP65에 대한 반응에는 미치지 못함을 알 수 있었다. 즉 BCG 및 BCG로 부터 추출한 HSP65에 대한 항체반응은 PPD나 결핵균에 특이한 LAM항원에 대한 반응과는 다소 차이가 있음을 알 수 있었다. BCG에 대한 항체반응에 비하여 PPD나 LAM에 대한 항체반응이 별로 증가하지 못한 것으로 보아 이 BCG에서 추출한 HSP65에 대한 반응은 BCG의 HSP65와 유사한 교차반응을 갖는 숙주의 HSP65에 대한 자가항체반응일 가능성도 배제할 수 없다.

이와 같은 저자의 결과는 Yokota의 보고와 일치하는데 mycobacterial HSP65가 Kawasaki병의 원인 또는 병리기전에 역할을 할 것을 주장한 바 있으며, 저자도 이러한 mycobacterial HSP65단백의 표현이나 이에 대한 항체반응, 또 급성기에 비하여 아급성기에 증가하는 항체반응으로부터 mycobacterial HSP65단백이 Kawasaki병의 원인과 병리기전의 관련이 있거나 mycobacterial HSP65와 유사한 숙주의 HSP65단백에 대한 자가항체반응일 것으로 추측되며, 이에 대한 정확한 기능과 병리기전에 관하여는 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

Kawasaki환자의 급성기 및 아급성기의 혈액을 채취하여 BCG와 BCG로부터 Perchloric acid를 이용하여 추출한 65kDa의 mycobacterial HSP65

단백에 항체반응을 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 초음파 처리한 BCG를 항원으로 사용한 경우 급성기(0.67 ± 0.23)에 비하여 아급성기(1.22 ± 0.38)에 통계학적으로 유의있게 증가하는 항체반응을 얻을 수 있었다. ($p < 0.01$)
2. 급성기와 아급성기의 환자 혈청을 BCG를 항원으로 immunoblotting을 시행하여, 급성기에는 관찰할 수 없고 아급성기에 관찰되는 65kDa에 반응하는 강한 띠와 다른 항원에 반응하는 여러 약한 띠를 관찰할 수 있었다.
3. BCG로부터 perchloric acid를 이용하여 추출한 mycobacterial 65kDa단백을 항원으로 항체반응을 검사한 결과, 급성기(0.66 ± 0.19)에 비하여 아급성기(1.24 ± 0.49)에 통계학적으로 유의있게 증가하는 항체반응을 관찰 할 수 있었다. ($p < 0.0001$)
4. BCG에서 추출한 mycobacterial 65kDa단백을 항원으로 아급성기에 항체가 가장 높은 환자의 혈청으로 immunoblotting을 시행한 결과 65kDa에서 강하게 반응하는 단일 띠를 관찰할 수 있었다.
5. 이러한 항체반응이 결핵반응이나 결핵 특이 항원과의 관련을 확인하기 위하여 purified protein derivatives(PPD)을 항원으로 하여 항체반응을 검사하여 아급성기에 통계학적으로 유의있는 약한(0.49 ± 0.24) 항체반응을 관찰할 수 있었으며 ($p < 0.05$) 및 lipoarabinomannan(LAM)에 대하여는 유의있는 항체반응을 관찰 할 수 없었다.

이러한 결과로 부터 Kawasaki병에서 BCG에서 추출한 mycobacterial HSP65단백이 원인 또는 병리기전에 관여하거나 mycobacterial HSP65와 유사한 숙주의 HSP65에 대한 자가항체반응으로 추측할 수 있으며 이러한 mycobacterial HSP65에 대한 항체반응이 Kawasaki병에서 갖는 의의와 병리기전에 관여하는 바에 대하여 더 깊은 연구가 필요한 것으로 사료된다.

-Abstract-

Antibody responses to HSP65 protein in Kawasaki disease

**Geun Woong Noh, M.D.
Doong Soo Kim, M.D.
Ki Young Lee, M.D.**

*Department of Pediatrics, College of Medicine,
Yonsei University, Seoul, Korea*

Kawasaki disease is an acute febrile illness affecting mainly infants and children and characterized by systemic vasculitis with multiple immunologic abnormalities. Heat shock proteins have many functions such as inflammation and autoimmunity. To observe the role of heat shock protein in the Kawasaki disease, antibody responses to mycobacterial 65kDa protein were examined by ELISA and immunoblotting using acute and subacute phase sera of 10 patients with Kawasaki disease. Markedly increased antibody titer against antigen of BCG and perchloric acid extracted mycobacterial 65kDa protein were observed in the subacute sera compared to their acute sera, but not against purified protein derivatives(PPD) and lipoarabinomannan(LAM). By immunoblotting, the subacute sera reacted with 65 kDa protein strongly and other proteins of sonicated BCG antigen, and also reacted with 65 kDa protein of perchloric acid soluble BCG antigen, but the acute serum did not. These results indicated that BCG extracted mycobacterial heat shock protein 65 might have play some important roles in pathogenesis of Kawasaki disease so we suggest autoreactivity to host HSP65 similar to mu-

cobacterial HSP65 and further study on the roles or functions of this mycobacterial heat shock protein 65 or the auto-reactivity to self HSP65 should be done.

Key Words : Kawasaki disease, Mycobacterial heat shock protein 65

참 고 문 헌

- 1) Douglas BY, Huraj I, Josephine HC, Jonathan RL : The 65kDa antigen of mycobacteria common bacterial protein? Immunol Today 8:215-219, 1987
- 2) Stefan HE, Kaufmann : Heat shock proteins and the immune response. Immunol Today 11:129-136, 1990
- 3) Pierre G, Anthony AG, George HL : GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose bisphosphate carboxylase oligomers in Escherichia coli, Nature 337, 44-47, 1989
- 4) Douglas Y, Raju L, Roger, H, Doug S, Richard AY : Stress proteins are immune targets in leprosy and tuberculosis Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4267-4270, 1988
- 5) Donald SR, Richard LH, Alan MM : Characterization of the yeast HSP60 gene coding for a mitochondrial assembly factor. Nature 337:655-659, 1989
- 6) Hirohisa K, Eisei I, Fumio Y, Tetsuhisa T, Shingi M, Kazushige S, Noriko R : Fate of coronary aneurysms in Kawasaki disease: serial coronary angiography and long-term follow-up study. American J Cardiol, 49, 1758-1765, 1982
- 7) Shumpei Yokota : Heat shock protein as a predisposing and immunopotentiating factor in Kawasaki disease. Acta Paediatr Jpn. 33:756-764, 1991
- 8) 조태영, 김윤중, 박수철, 이병인, 조상래, 이홍렬, 김세규, 김성규, 결핵성 뇌막염에서 뇌척수액내 면역글로불린 형성과 항결핵성 체액성 면역반응. 대한신경과학회지 11:54-62, 1993
- 9) 김경호, 김동수 : Perchloric Acid분리 BCG항원의 특성과 임상적의의(BCG-1), 소아과 35: 1059-1065, 1992
- 10) Abe J, Klotz BL, Jujo K, Melish ME, Glode MP, Kohsaka T, Leung DYM : Selective expansion of T cells expressing T-cell receptor variable regions V beta 2 and V beta 8 in Kawasaki disease. Proc Natl Acad Sci USA 89:4066-4070, 1992
- 11) Leung DYM, Messner HC, Fulton DR, Murray DL, Kotzin BL, Schlievert PM : Toxic shock syndrome toxin secretion Staphylococcus aureus in Kawasaki syndrome. Lancet 342:1385-1388, 1993
- 12) Hamasaki Y, Miyazaki S : Leukotriene B4 and Kawasaki disease. Acta Paediatr Jpn n33:771-777, 1991
- 13) Leung DYM : The immunoregulatory effects of IVIG in Kawasaki disease and other autoimmune diseases. Clin Rev Allergy 10:93-104, 1992
- 14) Fildes N, Burns JC, Newburger JW, Klitz W, Begovich AB : The HLS class II region and susceptibility to Kawasaki disease. Tissue Antigens 39:99-101, 1992
- 15) Irazuzta JE, Elbl F, Rees AR : Factor V related antigen (von Willebrand's factor) in Kawasaki disease. Clin Pediatr Phila 29:347-348, 1990
- 16) Kobayashi S, Wada N, Kobo M : Antibodies to native type III collagen in the serum of patient with Kawasaki disease.

- Eur J Pediatr 151 : 183-187, 1992
- 17) Dillon MJ, Tizard EJ : Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies and anti-endothelial cell antibodies. *Pediatr Nephrol* 5: 256-259, 1991
 - 18) Lin CY, Lin CC, Hwan B, Chiang B : Serial changes of serum interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor alpha among patients with Kawasaki disease. *J Pediatr* 121:924-926, 1992
 - 19) Ensgraber M, Loos M : A 66-kilodalton heat shock protein of *Salmonella typhimurium* is responsible for binding of the bacterium to intestinal mucus. *Infect Immun*, 60:3072-3078 1992
 - 20) Burnie JP, Matthews RC : Heat shock protein 88 and *Aspergillus* infection, *J Clin Microbiol* 29:2099-2106, 1991
 - 21) Teramae N, Azuma T, Habu Y, Kodama T, Kashima K, AoiYe A, Kawai K : Expression of heat shock protein in human gastric mucosa. *Gastroenterol Jpn* 26:683, 1991
 - 22) Lin Z, Laneuville O, Pace-Asciak CR : Hepoxilin A3 induces heat shock protein (HSP72) expression in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 179:52-56, 1991
 - 23) Rambukkana A, Das PK, Witkamp L, Yong S, Meinardi MM, Bos JD : Antibodies to mycobacterial 65-kDa heat shock protein and other immunodominant antigens in patients with psoriasis. *J Invest Dermatol* 100:87-92, 1993
 - 24) Selmaj K, Brosnan CF, Raine CS : Colocalization of lymphocytes bearing $\gamma\delta$ -T cell receptor and heat shock protein hsp65-oligodendrocytes in multiple sclerosis-*Proc Natl Acad Sci USA* 88:6452-6456, 1991
 - 25) Elias D, Reshef T, Birk OS, van der Zee R, Walker M, Cohen IR : Vaccination against autoimmune mouse diabetes with a T-cell epitope of the human 65-kDa heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:3088-3091, 1991
 - 26) Deguchi Y, Kishimoto S : Enhanced expression of the heat shock protein in peripheral blood mononuclear cells of patients with active systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 49:893-895, 1990