

Original Article

Int J Oral Biol 45:211-217, 2020
 pISSN: 1226-7155 • eISSN: 2287-6618
<https://doi.org/10.11620/IJOB.2020.45.4.211>

Induction of anti-aquaporin 5 autoantibodies by molecular mimicry in mice

Ahreum Lee and Youngnim Choi*

Department of Immunology and Molecular Microbiology, School of Dentistry and Dental Research Institute, Seoul National University, Seoul 03080, Republic of Korea

Molecular mimicry is the most common mechanism that breaches self-tolerance. We previously identified autoantibodies to aquaporin-5 (AQP5) in the sera of patients with Sjögren's syndrome and found that the aquaporin of *Prevotella melaninogenica* (PmAqp), an oral commensal, is highly homologous to human AQP5. This study aimed to test whether PmAqp can induce anti-AQP5 autoantibodies via molecular mimicry. From the amino acid sequence of PmAqp, an immunizing peptide; i.e., PmE-L, was designed, which contained both the B cell epitope "E" and T cell epitope. C57BL/6 and BALB/c mice were subcutaneously immunized with linear or cyclic forms of PmE-L emulsified in incomplete Freund's adjuvant. The concentrations of the antibodies in sera were measured using enzyme-linked immunosorbent assays. Both linear and cyclic PmE-L induced high levels of antibodies against not only the immunized peptides but also autoantibodies against AQP5E and antibodies against PmE, a Pm homolog of AQP5E. In C57BL/6 mice; however, the cyclic form of PmE-L was more efficient than the linear form in inducing autoantibodies against AQP5E that contained a cyclic epitope. The levels of anti-PmE antibodies and anti-AQP5E autoantibodies showed a strong positive correlation ($r = 0.95$, $p < 0.0005$), suggesting molecular mimicry. Collectively, the mice produced anti-AQP5E autoantibodies in response to a PmAqp-derived peptide. This model proved to be useful for studying the mechanisms of autoantibody production by molecular mimicry.


Keywords: Sjögren's syndrome, Autoimmune diseases, Autoantibodies, Molecular mimicry, Aquaporin 5

Introduction

우리 몸의 면역체계는 자기(self)와 비자기(non-self)를 구별하여 자기 자신에 대한 항원에는 반응하지 않아야 하는데, 이를 자기 관용(self-tolerance)이라 한다. 자기 관용이 붕괴되면 자가면역질환이 발생하게 되며[1], 그 원인으로 다양한 이론들이 제시되고 있다[2,3]. 분자 모방 이론은 T세포 혹은 B세포가 외부 항원과 구조 혹은 서열이 비슷한 자가항원에 대해 교차 반응을 하게 되면서 자가항원에 반응할 수 있다는 이론으로 자기 관용의 붕괴를 설명하는 여러 원인 중 중요한 하나로 거론되고 있다[4].

쇼그렌 증후군은 중년 여성에서 호발하는 만성 염증성 자가면역질환으로 구강건조 및 작열감, 안구건조가 대표적인 증상이며 관절염과 피부염을 동반하기도 한다. 구순 소타액선 생검 조직 내 국소 림프구성 타액선염(focal lymphocytic sialadenitis, FLS)과 혈청 내 항-SSA/Ro, 항-SSB/La 자가항체 검출이 쇼그렌 증후군의 주요 병리학적 특성이 다[5-7]. 유발요인에는 유전인자와 환경인자가 복합적으로 작용하는 것으로 간주되고 있지만, 명확한 발병기전을 설명하지 못하고 있다[8-10]. 침의 주성분인 수분의 분비는 타액선의 샘파리세포(acinar cell)에 발현하는 물통로 단백질인 아쿠아포린(aquaporin)-5를 통해 이루어지며, 침 분비율이 감소할 경우 아쿠아포린-5 발현 감소가 관찰된다[11].

Received August 3, 2020; Revised October 8, 2020; Accepted October 15, 2020

*Correspondence to: Youngnim Choi, E-mail: youngnim@snu.ac.kr  <https://orcid.org/0000-0002-6496-5560>

Copyright © The Korean Academy of Oral Biology

© This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

우리는 이전 연구에서 쇼그렌 증후군 환자의 혈청에 아쿠아포린-5 단백질에 대한 자가항체가 존재함을 확인하였고 자가항체와 결합하는 아쿠아포린-5의 에피토프(epitope)를 규명하였다[12,13]. 이어서 환자 와 대조군의 구강 세균 분석을 통해 *Prevotella melaninogenica*의 증가가 쇼그렌 증후군과 연관되어 있음을 로지스틱 회귀분석으로 확인했으며, 16S rRNA에 결합하는 탐침자를 이용한 *in-situ* hybridization을 통해 쇼그렌 환자군의 타액선 도관(duct)과 림프구 침윤 부위에 *P. melaninogenica*를 포함한 세균이 많이 관찰되는 것을 확인하였다[14]. 또한, 인간의 아쿠아포린-5와 *P. melaninogenica*의 아쿠아포린 서열 간에 상동성이 높은 것을 확인하였다[13].

앞선 결과는 쇼그렌 환자에서 *P. melaninogenica* 아쿠아포린에 대한 항체 반응 과정에서 분자 모방에 의해 항-아쿠아포린-5 자가항체가 형성될 가능성을 시사한다. 본 연구의 목적은 *P. melaninogenica*의 아쿠아포린에서 유래된 펩타이드를 이용해 생쥐에서 분자모방에 의한 항-아쿠아포린-5 자가항체 생성을 유도하는 것이다.

Materials and Methods

1. 세균 배양

P. melaninogenica KCTC 5457은 한국생명공학연구원 미생물자원 센터(KCTC/BRC, Daejeon, Korea)에서 분양 받았으며, 37°C의 혐기 조건(CO₂ 10%, H₂ 10%, N₂ 80%)에서 10 µg/mL의 비타민K (Sigma, St. Louis, MO, USA)와 5 µg/mL의 hemin (Sigma)을 첨가한 modified PYG 액체 배지(0.5% trypticase peptone, 0.5% peptone, 1% yeast extract, 0.5% beef extract, 27.75 mM glucose, 11.48 mM K₂HPO₄, 0.1% tween 80, 3.17 mM L-cysteine, HCl, 4% salt solution; 5.74 mM K₂HPO₄, 7.35 mM KH₂PO₄, 119.03 mM NaHCO₃, 34.22 mM NaCl, 1.7 mM CaCl₂·2H₂O, 2.03 mM MgSO₄·7H₂O, pH 7.2)에 배양하였다. 배양한 *P. melaninogenica*는 인산완충생리식염수(phosphate buffered saline, PBS)로 세척 후, PBS 1 mL당 1 × 10⁸ 세포를 부유시켜 3회 이상 동결-해동을 반복함으로써 용해물(lysate)을 만들어 사용하였다.

2. 펩타이드

*P. melaninogenica*의 아쿠아포린 단백질 중 생쥐 주조직적합복합체(major histocompatibility complex, MHC) class II 단백질에 결합할 수 있는 펩타이드를 Immune Epitope Database and Analysis Resource (IEDB, <http://tools.immuneepitope.org/main/bcell/>)에서 제공하는 T 세포 에피토프 분석 엔진을 이용하여 분석하였다. 분석 결과에서 BALB/c와 C57BL/6 생쥐 MHC class II에 결합할 수 있는 펩타이드를 percentile rank 기준 10 이하로 선정하였다. 이 중에서 Alam 등[12]이 보고한 내용에 따라 항-아쿠아포린-5 자가항체 에피토프 E를 포함하는 펩타이드를 원형 및 선형 형태로 제작해 생쥐 면역 및 항체 정량 실험에 이용하였으며, 이를 포함한 실험에 사용된 모든 펩

타이드는 펩톤(Daejeon, Korea)에 합성 의뢰하였다. 시험에 사용된 펩타이드 서열과 구조는 Table 1에 정리되어 있다.

3. 생쥐 면역화

모든 동물 실험은 서울대학교 동물실험 윤리위원회의 승인을 받아 진행되었다(SNU-180508-2-2). C57BL/6와 BALB/c는 생쥐 MHC H-2의 단상형(haplotype)이 다른 생쥐로 오리엔트 바이오(Orient Bio, Seongnam, Korea)에서 구입한 6주령 암컷을 사용하였다. 일반적으로 연구에 양성을 모두 사용하는 것이 원칙이나, 쇼그렌 증후군은 16:1의 비율로 남성에 비해 여성에 호발하는 질환이라 본 연구에는 암컷 생쥐만 사용되었다.

C57BL/6와 BALB/c에 선형(linear PmE-L) 또는 원형(cyclic PmE-L)의 펩타이드를 면역하여 총 4개의 그룹을 진행했으며, 그룹당 10마리의 생쥐를 포함하였다. 모든 생쥐는 *P. melaninogenica* 용해 물을 100 µL씩 꼬리 밑동 주변에 피하 주사해 초기 면역화를 진행하였다. 초기 면역 10일 후, incomplete Freund's adjuvant (IFA, Sigma)와 1:1로 섞은 펩타이드를 생쥐당 100 µg을 꼬리 밑동 주변에 피하 주사하는 방법으로 2주 간격으로 3번의 추가 면역을 진행하였다. 마지막 면역화 2주 후에 희생했으며 심장 채혈하였다. 모든 실험은 Specific Pathogen-Free환경에서 진행됐다.

4. 항체 정량

96-well plates (Corning, Corning, NY, USA)에 웰(well)당 1 µg의 avidin (Sigma)을 4°C에서 16시간 이상 코팅한 후, blocking buffer (1% bovine serum albumin in PBS)를 1시간 동안 처리하였다. 바이오틴(biotin)을 N-말단에 붙인 다양한 항원 펩타이드 2 µg/mL 100 µL를 1시간 동안 처리한 후, 1:300으로 희석한 생쥐의 혈청 100

Table 1. Sequences of peptides used for immunization and ELISA

Peptide name	Sequence	Type	Application
Linear PmE-L	VGIRYTGCSVNPARSFGC-NH ₂	Linear	Immunization
Cyclic PmE-L	VGIRYTGCSVNPARSFGC	Cyclic	Immunization
Biotinylated linPmE-L	Biotin-VGIRYTGCSVNPARSFGC-NH ₂	Linear	ELISA
Biotinylated cPmE-L	Biotin-VGIRYTGCSVNPARSFGC	Cyclic	ELISA
Biotinylated PmE	Biotin-GCSVNPARSFGC	Cyclic	ELISA
Biotinylated AQP5E	Biotin-GCSMNPARSFGC	Cyclic	ELISA
Biotinylated AQP5A	Biotin-WPSALPT-NH ₂	Cyclic	ELISA

ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; C, cysteine bond for cyclization.

μL를 각 항원이 코팅된 well에 1시간 동안 처리하였다. 세척액(0.1% Tween 20 in PBS)으로 3회 세척 후, HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA)을 1시간 동안 처리하였다. 세척액을 각 well에 분주하여 5분간 shaker 위에서 세척하고 이 과정을 3회 반복한 후, 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine substrate (Sigma)을 처리하여 결합된 검출 항체를 발색시켰으며, 2 N H₂SO₄를 첨가하여 발색 효소 반응을 중지시킨 후, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 검출된 항원-특이 IgG 항체의 정량을 위해 항원 대신 mouse IgG1 (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)을 40 ng/mL에서 0.625 ng/mL까지 serial dilution 한 표준 곡선으로 만든 방정식을 이용하였다.

5. 통계 분석

면역 그룹 간 비교는Mann-Whitney 또는 Kruskal-Wallis를 사용하였으며, 항체 간의 상관 분석은 Spearman's rank test를 사용하였다. p 값이 0.05 미만일 때 유의한 결과로 보았으며, 모든 통계는 SPSS 23.0 (IBM, Armonk, NY, USA)으로 수행하였다.

Results

사람 아쿠아포린-5와 *P. melaninogenica* 아쿠아포린 아미노산 서열을 비교했을 때, 두 개체의 단백질 서열 간의 상동성이 높은 것을 확인하였으며, 특히 항-아쿠아포린-5 자가항체 에피토프 E 부분에선 11 개의 아미노산 서열 중 단 2개의 아미노산만 다른 것을 알 수 있었다 (Fig. 1). 또한, 사람과 생쥐의 아쿠아포린-5는 B 세포 에피토프 E 서열이 100% 일치하는 것도 알 수 있었다. 이와 같은 이유로 *P. melaninogenica* 아쿠아포린 유래 펩타이드가 분자 모방에 의해 항-아쿠아포린-5 자가항체를 유도할 수 있으리라 예측하였고 그 가설을 생쥐에서 시험해 보았다.

B세포가 단백질 항원을 인지하여 활성화된 후, 항체를 형성하기까지 CD4 T세포의 도움이 절대적으로 필요하다[15-17]. T세포는 MHC에 의해 표지되는 항원을 인지하여 활성화되기 때문에 MHC class II를 통해 CD4 T세포에 제시되는 항원의 존재가 중요하다[18]. 우리는 *P. melaninogenica* 아쿠아포린의 아미노산 서열 중 생쥐 MHC class II

에 결합할 수 있는 T 세포 에피토프를 IEDB의 엔진을 이용해 분석하였다. 예측된 MHC class II 결합 에피토프 중 37개는 C57BL/6의 H2-IA^b allele, 1개는 BALB/c의 H2-IE^d allele를 통해 표지될 수 있는 것으로 예측되었다(Table 2). 예측된 펩타이드 서열 내에 B세포 에피토프 E를 포함하거나 인접한 15개 중 C57BL/6의 H2-IA^b allele와 결합력이 가장 강한 VCIRYTGTSVNPARS (percentile rank = 0.51)을 선택하였다. 이전 연구에서 B 세포 에피토프 E의 원형 구조가 필수적이었기 때문에[12], T 세포 에피토프 VCIRYTGTSVNPARS에 포함된 B 세포 에피토프에 위치한 트레오닌(threonine, T)을 시스테인(cysteine, C)으로 치환한 뒤, 카르복실(C)-말단에 FGC서열을 붙여 항 결합을 이용한 B 세포 에피토프의 원형구조를 만들어 주었다. 시스테인의 안정화를 위하여 아민기(N)-말단에 위치하는 C를 생쥐 아쿠아포린-5의 서열인 G로 치환하였다. 선택된 면역 펩타이드와 같은 위치에 존재하는 생쥐 아쿠아포린-5의 MHC class II binding 에피토프 VGIFYTGCS-MNPARS는 세균 아쿠아포린 유래 펩타이드보다는 MHC class II와 결합력이 약하지만(percentile rank = 7) 결합 가능한 것으로 예측되었다. 이를 바탕으로 결정된 면역화에 사용할 펩타이드 VGIRYTGCSVNPARSFGC은 자가항원과 비교해 18개 아미노산 중 3개가 상이하였다 (Table 1).

MHC class II 결합 에피토프 예측 결과에 따라, 우리가 선택한 서열의 펩타이드를 C57BL/6에 면역할 시, H2-IA^b 를 통한 T 세포로의 제시가 가능해 항체를 잘 형성하고 BALB/c에서는 그렇지 못할 것이라 예상하였다. 또한 선형 펩타이드는 자가항체 생성 유도를 잘 못하는 반면, 원형의 펩타이드가 자가항체를 잘 형성할 것이라 예측하였다. 이를 시험하기 위해, 선형(linPmE-L) 또는 원형(cPmE-L) 형태로 합성한 면역 펩타이드를 BALB/c와 C57BL/6 생쥐에 IFA 보강하여 피하로 면역하였으며(Fig. 2A), 면역화에 사용된 펩타이드의 농도, 면역 루트와 주기는 예비실험을 통해 결정하였다.

생쥐 면역 실험에 앞서, 면역화를 하지 않은 생쥐의 혈청 내에 존재하는 항체 및 자가항체를 확인하는 예비실험을 진행하였다. 그 결과, BALB/c의 혈청 내에서 항-linPmE-L 항체가 0.36-4.04 μg/mL 존재하는 것을 확인하였고, 항-PmE 항체 및 AQP5A와 AQP5E에 대한 자가항체는 모두 1 μg/mL 미만으로 존재하는 것을 확인하였다. C57BL/6에서는 측정된 모든 항체와 자가항체가 1 μg/mL 미만 존재하는 것을 확인하였으며, 이에 따라 항체 형성 기준 농도를 결정하였다

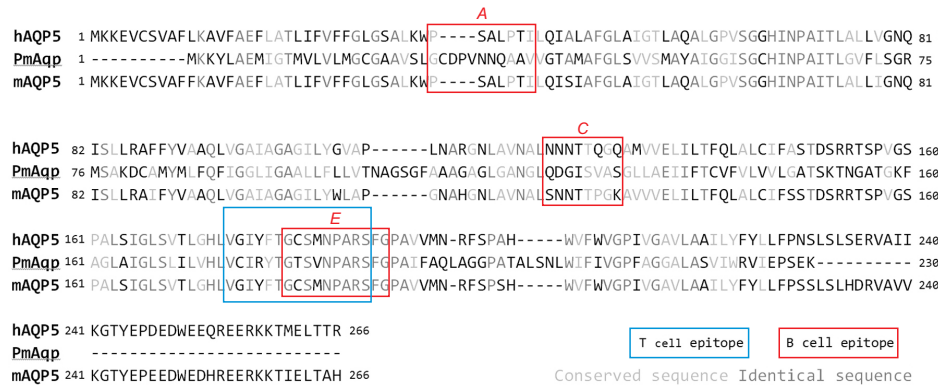


Fig. 1. The homology of *Prevotella melaninogenica* aquaporin (PmAqp) with human and mouse aquaporin-5 (AQP). The amino acid sequences of the human and mouse AQP5 and PmAqp were aligned. Compared with PmAqp, identical and conserved amino acids are highlighted in the dark and light grays, respectively. B cell epitopes are marked with red squares, and the selected T cell epitope, which includes the B cell epitope E, is marked with a blue square, respectively.

Table 2. Major histocompatibility complex class II binding prediction of *Prevotella melaninogenica* aquaporin

Peptide	Amino acid	Percent-ile_rank	Mouse	Allele
VCIRYGTGSVNPARS ^a	175-189	0.51	C57BL/6	H2-IA ^b
LVCIRYGTGSVNPARS ^a	174-188	0.54	C57BL/6	H2-IA ^b
HLVCIRYGTGSVNPA ^a	173-187	0.68	C57BL/6	H2-IA ^b
IFAQLAGGPATALS ^N	194-288	0.73	C57BL/6	H2-IA ^b
AIFAQLAGGPATALS	193-207	0.77	C57BL/6	H2-IA ^b
FAQLAGGPATALS ^{NL}	195-209	0.86	C57BL/6	H2-IA ^b
PAIFAQLAGGPATALS	192-206	0.92	C57BL/6	H2-IA ^b
CIRYGTGSVNPARS ^F ^a	176-190	0.93	C57BL/6	H2-IA ^b
IRYGTGSVNPARS ^{FG} ^a	177-191	1.1	C57BL/6	H2-IA ^b
GPAIFAQLAGGPATALS	191-205	1.5	C57BL/6	H2-IA ^b
AQLAGGPATALS ^{NLW}	196-210	1.77	C57BL/6	H2-IA ^b
VHLVCIRYGTGSVNP ^a	172-186	2.5	C57BL/6	H2-IA ^b
FIVGPFAGGALAS ^{VI}	212-226	2.8	C57BL/6	H2-IA ^b
IFIVGPFAGGALAS ^V	211-225	3.2	C57BL/6	H2-IA ^b
IVGPFAGGALAS ^{VIW}	213-227	3.3	C57BL/6	H2-IA ^b
AGSGFAAAGAGL ^{GAN}	106-120	3.45	C57BL/6	H2-IA ^b
GSGFAAAGAGL ^{GANG}	107-121	3.65	C57BL/6	H2-IA ^b
TNAGSGFAAAGAGL ^G	104-118	3.8	C57BL/6	H2-IA ^b
VGPFAGGALAS ^{VIWR}	214-228	3.95	C57BL/6	H2-IA ^b
NAGSGFAAAGAGL ^{GGA}	105-119	4	C57BL/6	H2-IA ^b
LVHLVCIRYGTGSV ^N ^a	171-185	4	C57BL/6	H2-IA ^b
SGFAAAGAGL ^{GANGL}	108-122	4.35	C57BL/6	H2-IA ^b
RYTGTGSVNPARS ^{FGP} ^a	178-192	4.35	C57BL/6	H2-IA ^b
TSVNPARS ^{FGPAIFA} ^a	182-196	5.1	C57BL/6	H2-IA ^b
YTGTGSVNPARS ^{FGPA} ^a	179-193	5.15	C57BL/6	H2-IA ^b
VNPARS ^{FGPAIFAQL} ^a	184-198	5.6	C57BL/6	H2-IA ^b
SVNPARS ^{FGPAIFAQ} ^a	183-197	5.65	C57BL/6	H2-IA ^b
FGPAIFAQLAGGPAT ^S	190-204	5.9	C57BL/6	H2-IA ^b
LVTNAGSGFAAAGAG	102-116	5.95	C57BL/6	H2-IA ^b
GTSVNPARS ^{FGPAIF} ^a	181-195	6.85	C57BL/6	H2-IA ^b
GPFAGGALAS ^{VIWRV}	215-229	7.5	C57BL/6	H2-IA ^b
NPARS ^{FGPAIFAQLA} ^a	185-199	7.75	C57BL/6	H2-IA ^b
VTNAGSGFAAAGAGL	103-117	8.2	C57BL/6	H2-IA ^b
AMAFGLSV ^{VSMAYAI}	40-54	8.4	C57BL/6	H2-IA ^b
LLVTNAGSGFAAAGA	101-115	8.55	C57BL/6	H2-IA ^b
ALAS ^{VIWRVIEPSEK}	221-235	9.35	BALB/c	H2-IE ^b
GLSV ^{VSMAYAIIGGIS}	44-58	9.45	C57BL/6	H2-IA ^b
FLLVTNAGSGFAAAG	100-114	9.9	C57BL/6	H2-IA ^b

^aPeptides that include or are adjacent to the B cell epitope E.

(Fig. 2B).

면역접종 후, 모든 생쥐 혈청에서 면역에 사용된 linPmE-L 또는 cPmE-L에 대한 항체가 형성된 것을 알 수 있었으며, 특히 C57BL/6

에서 cPmE-L을 면역한 생쥐가 linPmE-L을 면역한 생쥐보다 항-cPmE-L 항체를 유의하게 더 많이 형성한 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2C 상단). 항-PmE 항체는 linPmE-L을 면역화한 경우 BALB/c의 70%, C57BL/6의 100%에서 형성되었으며, cPmE-L을 면역화한 경우 BALB/c의 80%, C57BL/6의 100%에서 형성되었다. 항-AQP5E 자가항체는 linPmE-L을 면역화한 경우 BALB/c의 60%, C57BL/6의 90%에서 형성되었으며, cPmE-L을 면역화한 경우 BALB/c의 60%, C57BL/6의 100% 형성되었다. 특히, C57BL/6 생쥐에서 linPmE-L 면역화 생쥐(0.84-4.03 µg/mL) 대비하여 cPmE-L 면역화 생쥐(1.21-13.62 µg/mL)가 항-AQP5E 자가항체를 더 잘 형성하였다. 하지만 항-AQP5A 항체는 모든 면역 생쥐에서 형성되지 않은 것을 볼 수 있었다(Fig. 2C 하단).

형성된 항체 간의 상관관계를 살펴보았을 때, 항-linPmE-L 항체와 항-cPmE-L 항체 간에는 중등도 양의 상관관계가 관찰되었고($p < 0.000$, $r = 0.564$), 항-PmE 항체와 항-cPmE-L 항체 간에는 약한 양의 상관관계가 관찰된 반면($p = 0.045$, $r = 0.318$), 항-PmE 항체와 항-linPmE-L 항체 간에는 유의한 상관관계를 볼 수 없었다($p = 0.125$, $r = 0.247$). 항-PmE 항체와 항-AQP5E 자가항체 간에는 매우 강한 양의 상관관계가 있음을 알 수 있었다($p < 0.000$, $r = 0.95$, Fig. 2D).

Discussion

본 연구에서는 *P. melaninogenica* 아쿠아포린에서 유래된 펩타이드 PmE-L을 면역한 생쥐에서 아쿠아포린-5의 B 세포 에피토프드에 대한 자가항체가 형성되며, 항-PmE 항체와 항-AQP5E 자가항체 간의 강한 양의 상관관계를 통해 분자모방에 의한 것임을 확인하였다.

쇼그렌 증후군의 표적 장기 중 하나인 타액선은 구강과 밀접하여 구강 세균의 영향을 받을 수밖에 없다. 다른 자가면역 질환들은 세균에 의해 유도된 분자 모방을 통한 자가항체 연구가 보고되었지만, 쇼그렌 증후군은 바이러스 감염에 의한 연구만이 보고되었다[19,20]. 우리는 본 연구에서 C57BL/6에 세균 단백질 서열에서 유래한 cPmE-L을 면역하였을 때 항-아쿠아포린-5 에피토프 E 자가항체가 잘 형성되는 것을 통계적으로 확인할 수 있었다. 하지만 예상과는 달리 BALB/c에서도 항체가 형성되는 것을 볼 수 있었다. IEDB에서는 percentile rank 기준 10 이하를 결합 가능한 펩타이드로 선택하도록 추천하지만, 선택한 펩타이드 내 서열들이 BALB/c의 H2-IA^d와 H2-IA^d 모두에 약하게 결합 가능하기 때문에 항체가 형성된 것으로 추측할 수 있다(Table 3). 또한, BALB/c는 MHC class II 단백질로 I-A와 I-E 두 가지 유전자가 모두 존재하지만 C57BL/6 경우 I-A만 가지고 있기 때문에 그로 인해 면역 반응이 잘 일어났을 가능성이 존재한다. 또한 linPmE-L을 면역한 마우스에서도 원형의 항-PmE 항체 및 항-AQP5E 자가항체가 형성된 것을 볼 수 있는데, 면역한 linPmE-L 펩타이드에 시스테인이 두 개 존재하기 때문에 생체 내에서 자발적인 시스테인 이종결합이 생성되어 일부 원형 펩타이드로 전환되었을 가능성이 있다. 아쿠아포린-5의 또다른 B 세포 에피토프인 AQP5A에 대한 자가항체는 형성이 되지 않았는데, 이

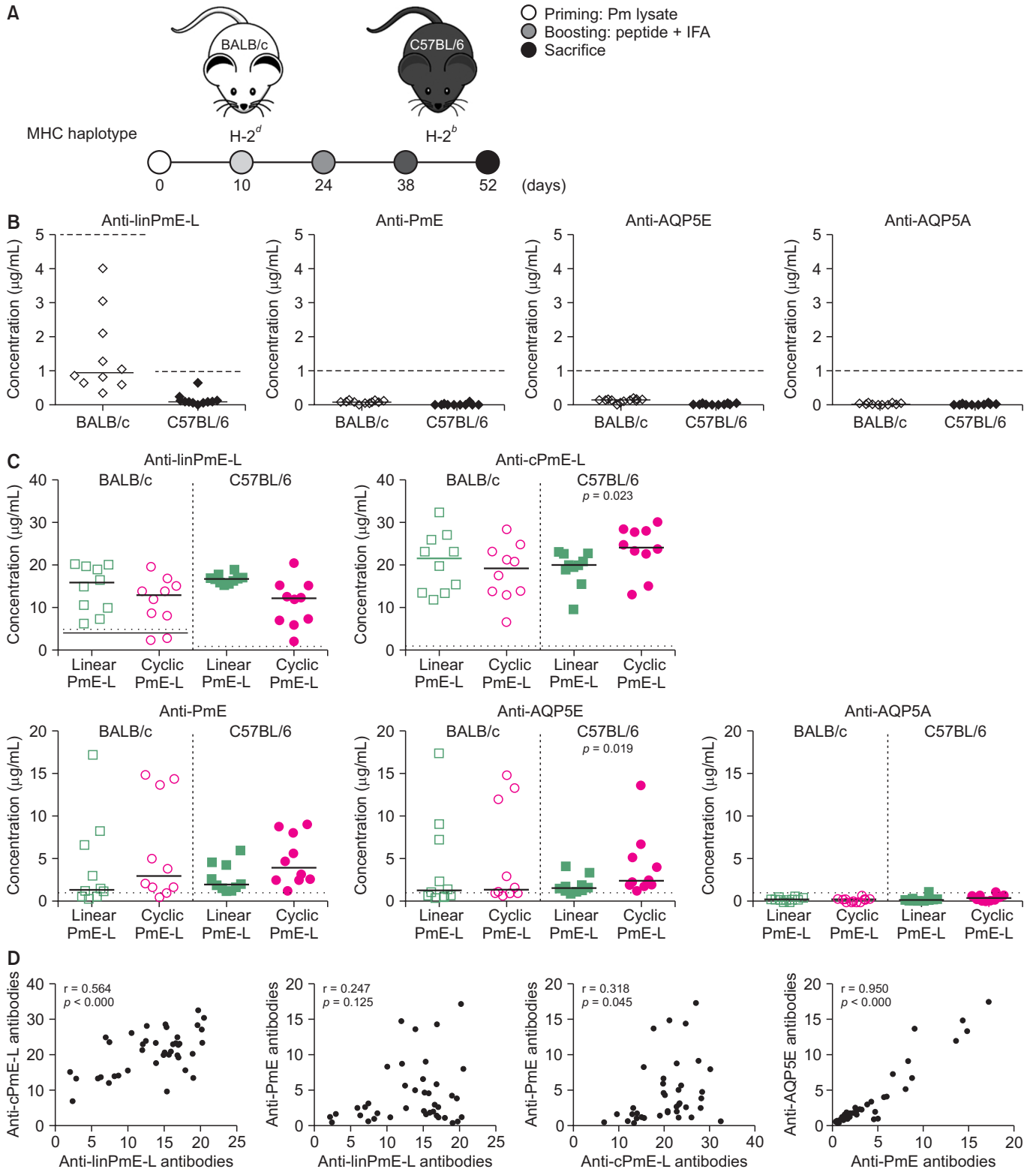


Fig. 2. Anti-AQP5E autoantibodies were induced by immunizing *Prevotella melaninogenica* aquaporin (PmAq)–derived peptides in mice. (A) The experimental scheme is shown. (B) Basal levels of the antibodies and autoantibodies were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in preliminary experiments. Dotted lines indicate the cut-off value for the antibody positivity used in this study. (C) Concentrations of anti-linear (lin) PmE-L, anti-cyclic (c) PmE-L, anti-PmE, anti-AQP5E, anti-AQPA IgG antibodies in mouse sera were determined by ELISA. The horizontal line presents the median of each group. p -values were obtained by the Mann–Whitney U test. (D) Spearman’s rank correlations between the levels of the two different antibodies are shown. IFA, incomplete Freund’s adjuvant; MHC, major histocompatibility complex.

Table 3. Binding efficiencies of BALB/c major histocompatibility complex class II molecules to the selected T cell epitope peptides

Peptide	Amino acid	Percentile rank	Allele
VCIRYTGTSVNPARS	175-189	14.5	H2-IA ^d
CIRYTGTSVNPARSF	176-190	16.5	H2-IA ^d
IRYTGTSVNPARSFG	177-191	21.5	H2-IA ^d
VCIRYTGTSVNPARS	175-189	45.5	H2-IE ^d
CIRYTGTSVNPARSF	176-190	53.0	H2-IE ^d
IRYTGTSVNPARSFG	177-191	67.0	H2-IE ^d

는 우리 생쥐모델에서 항원결정부확산(epitope spreading)이 일어나지 않았음을 의미한다.

형성된 항체 간의 상관관계를 분석했을 때, 비슷한 아미노산 서열에 대해 교차 반응을 보이는 것을 알 수 있었다. 특히, B세포 에피토프 PmE와 AQP5에 대한 항체와 자가항체 간의 상관 계수가 1에 가까운 강한 양의 상관관계를 보이는 것은 펩타이드 면역 후 형성된 항체가 서열이 단 2개 차이 나는 PmE와 AQP5에 대해 교차 반응하는 것을 의미하며, 이는 형성된 자가항체가 분자 모방에 의함을 알 수 있다.

항체를 형성하는 생쥐 모델에서 항체 형성의 추이 및 면역 보강제, 면역 루트 등 다양한 요인에 대한 고려가 이루어지고 있지만 본 실험에는 그러한 고려가 반영되지 않았다는 한계가 존재한다[21,22]. 또한 ELISA를 통한 자가항체의 형성만 확인했을 뿐, 타겟 항체를 형성할 수 있는 항원 특이 B 림프구와 MHC class II에 의해 제시되는 항원을 인지한 T 림프구의 활성화에 대한 확인은 이루어 지지 않았다.

결론적으로, 쇼그렌 증후군 관련 세균 유래 항원에 의해 유도된 분자 모방에 의한 자가항체의 형성을 생쥐 모델에서 확인하였으며, 이러한 생쥐 모델은 쇼그렌 증후군 병인 연구 및 자가면역 형성 기전 연구에 활용될 수 있을 것이다.

Acknowledgements

본 연구는 보건장학회의 지원으로 수행하였음.

Conflicts of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

References

- Goodnow CC, Sprent J, Fazekas de St Groth B, Vinuesa CG. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* 2005;435:590-7. doi: 10.1038/nature03724.
- Christen U. Pathogen infection and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* 2019;195:10-4. doi: 10.1111/cei.13239.
- Sinha AA, Lopez MT, McDevitt HO. Autoimmune diseases: the failure of self tolerance. *Science* 1990;248:1380-8. doi: 10.1126/science.1972595.
- Cusick MF, Libbey JE, Fujinami RS. Molecular mimicry as a mechanism of autoimmune disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 2012;42:102-11. doi: 10.1007/s12016-011-8294-7.
- Ben-Chetrit E, Fischel R, Rubinow A. Anti-SSA/Ro and anti-SSB/La antibodies in serum and saliva of patients with Sjögren's syndrome. *Clin Rheumatol* 1993;12:471-4. doi: 10.1007/BF02231773.
- Daniels TE, Cox D, Shiboski CH, Schiødt M, Wu A, Lanfranchi H, Umehara H, Zhao Y, Challacombe S, Lam MY, De Souza Y, Schiødt J, Holm H, Bisio PA, Gandolfo MS, Sawaki T, Li M, Zhang W, Varghese-Jacob B, Ibsen P, Keszler A, Kurose N, Nojima T, Odell E, Criswell LA, Jordan R, Greenspan JS. Associations between salivary gland histopathologic diagnoses and phenotypic features of Sjögren's syndrome among 1,726 registry participants. *Arthritis Rheum* 2011;63:2021-30. doi: 10.1002/art.30381.
- Christodoulou MI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Characteristics of the minor salivary gland infiltrates in Sjögren's syndrome. *J Autoimmun* 2010;34:400-7. doi: 10.1016/j.jaut.2009.10.004.
- Nezos A, Mavragani CP. Contribution of genetic factors to Sjögren's syndrome and Sjögren's syndrome related lymphomagenesis. *J Immunol Res* 2015;2015:754825. doi: 10.1155/2015/754825.
- Imgenberg-Kreuz J, Rasmussen A, Sivils K, Nordmark G. Genetics and epigenetics in primary Sjögren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 2019;key330. doi: 10.1093/rheumatology/key330.
- Routsias JG, Tzioufas AG. Sjögren's syndrome--study of autoantigens and autoantibodies. *Clin Rev Allergy Immunol* 2007;32:238-51. doi: 10.1007/s12016-007-8003-8.
- Lim YS, Yoo KY. Study on the changes in distributions and expressions of aquaporin5 (AQP5) in salivary glands of mice after alcohol ingestion. *Int J Oral Biol* 2018;43:185-91. doi: 10.11620/IJOB.2018.43.4.185.
- Alam J, Koh JH, Kwok SK, Park SH, Park K, Choi Y. Functional epitopes for anti-aquaporin 5 antibodies in Sjögren syndrome. *J Dent Res* 2017;96:1414-21. doi: 10.1177/0022034517717965.

13. Alam J, Koh JH, Kim N, Kwok SK, Park SH, Song YW, Park K, Choi Y. Detection of autoantibodies against aquaporin-5 in the sera of patients with primary Sjögren's syndrome. *Immunol Res* 2016;64:848-56. doi: 10.1007/s12026-016-8786-x.
14. Alam J, Lee A, Lee J, Kwon DI, Park HK, Park JH, Jeon S, Baek K, Lee J, Park SH, Choi Y. Dysbiotic oral microbiota and infected salivary glands in Sjögren's syndrome. *PLoS One* 2020;15:e0230667. doi: 10.1371/journal.pone.0230667.
15. Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol* 2011;29:621-63. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101400.
16. Barnett LG, Simkins HM, Barnett BE, Korn LL, Johnson AL, Wherry EJ, Wu GF, Laufer TM. B cell antigen presentation in the initiation of follicular helper T cell and germinal center differentiation. *J Immunol* 2014;192:3607-17. doi: 10.4049/jimmunol.1301284.
17. Garside P, Ingulli E, Merica RR, Johnson JG, Noelle RJ, Jenkins MK. Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science* 1998;281:96-9. doi: 10.1126/science.281.5373.96.
18. Harding CV, Unanue ER. Quantitation of antigen-presenting cell MHC class II/peptide complexes necessary for T-cell stimulation. *Nature* 1990;346:574-6. doi: 10.1038/346574a0.
19. Maślińska M. The role of Epstein-Barr virus infection in primary Sjögren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 2019;31:475-83. doi: 10.1097/BOR.0000000000000622.
20. Yeh CC, Wang WC, Wu CS, Sung FC, Su CT, Shieh YH, Chang SN, Su FH. Association of Sjögren's syndrome in patients with chronic hepatitis virus infection: a population-based analysis. *PLoS One* 2016;11:e0161958. doi: 10.1371/journal.pone.0161958.
21. Mozdzanowska K, Zharikova D, Cudic M, Otvos L, Gerhard W. Roles of adjuvant and route of vaccination in antibody response and protection engendered by a synthetic matrix protein 2-based influenza A virus vaccine in the mouse. *Virology* 2007;4:118. doi: 10.1186/1743-422X-4-118.
22. Uddowla S, Freytag LC, Clements JD. Effect of adjuvants and route of immunizations on the immune response to recombinant plague antigens. *Vaccine* 2007;25:7984-93. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.09.030.