

# リウマチ性自己免疫疾患における抗カーボニックアンヒドラーゼ抗体の検討

渡辺 圭介

過去に当教室では、リウマチ性自己免疫疾患(Rheumatic autoimmune disease : RAD)患者の血清中に Carbonic anhydrase (CA) に対する自己抗体が存在することを報告している。今回の実験では、CA I, II の一次構造をもとに作成した合成ペプチドを抗原として (CA I : P1-P21, CA II : P1-P20), RAD 患者 (全身性エリテマトーデス, シェーグレン症候群, 全身性強皮症, 皮膚筋炎) 血清中の抗 CA 自己抗体の epitope mapping を行った。

CA I では健常人群と RAD 群に共通するエピトープ (P5, P7) に加え, 疾患特異的なエピトープが認められた (全身性エリテマトーデス ; P1, 2 シェーグレン症候群 ; P4 全身性強皮症 ; P1)。一方 CA II では RAD 群と健常人群では異なった部分に反応がみられ, RAD 群では P2, 8, 15, 健常人群では P20 であった。特に RAD 群のエピトープの 1 つ (P8 : 91-103) は亜鉛活性部位と一致していた。

(平成10年3月9日受理)

## Significance of Anti Carbonic Anhydrase Antibodies in Rheumatic Autoimmune Diseases

Keisuke WATANABE

We have previously reported that autoantibodies against carbonic anhydrase (CA) exist in sera from patients with rheumatic autoimmune diseases (RAD). For further characterization of this autoantibody, linear autoepitopes on CA I and CA II molecules were analyzed. CA I and CA II peptides consisting of 12-16 mer amino acids were synthesized and coupled with bovine serum albumin (CA I : P1-P21, CA II : P1-P20). The reactivity of patient and healthy control sera to each peptide was detected by ELISA. Anti-CA I autoantibodies showed dominant reactivity to several peptides. Peptides 5 and 7 were common epitopes in healthy controls and RAD. Peptides 1, 2 and 4 were also characteristic peptides in each disease ; i. e. peptides 1 and 2 in systemic lupus erythematosus, peptide 4 in Sjögren's syndrome and peptide 1 in progressive systemic sclerosis.

On the other hand, anti-CA II autoantibodies commonly showed dominant reactivity to peptides 2, 8 and 15 in RAD. However, the sera of healthy controls only reacted to peptide 20. Especially, noteworthy was the observation that peptide

8 was located on the active portion surrounding the zinc core. Therefore, anti-CA II autoantibodies might possibly affect the enzyme activity in RAD. (Accepted on March 9, 1998) *Kawasaki Igakkaishi* 23(4): 241-249, 1997

**Key Words** ① Anti-carbonic anhydrase antibody  
② Rheumatic autoimmune diseases  
③ Synthetic peptides ④ Epitope mapping

## はじめに

Carbonic anhydrase (CA: EC4, 2, 1, 1) 炭酸脱水酵素は中央部に亜鉛を含む金属酵素であり、259あるいは260のアミノ酸残基より構成される分子量約30,000の小分子量蛋白である。生体内では主に酸塩基平衡を司る触媒酵素であり、胃酸や尿のpH決定に重要な役割を果たしていることはよく知られている<sup>1), 2)</sup>。現在ヒトでは7種類のアイソザイムが報告されており<sup>3)</sup>、特にCA I, CA IIは生体内において広範囲に亘る臓器に分布し、発現量も多い<sup>4), 5)</sup>。すでに当教室では、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群の血清中にCAに対する自己抗体が存在することを報告しているが<sup>6)</sup>、その後Itohら<sup>7)</sup>も全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、強皮症、多発筋炎、慢性関節リウマチに抗CA抗体が出現する事を報告している。RADの発症または病態形成のメカニズムとして、いくつかの可能性が考えられているが、CA抗体が関与した例として、CA IIで免疫したPL/Jマウスが自己免疫性唾液腺炎を発症したという報告がある<sup>8)</sup>。しかしながら、抗CA抗体についての研究はほとんどされていない。今回human CA I, IIに対する自己抗体についてエピトープの解析を行ったので報告する。

## 材料と方法

### 1. 血清

患者血清はARAの診断基準を満たしたもののについて全身性エリテマトーデス(SLE) 35検体、シェーグレン症候群(SjS) 25検体、全身性強皮

症(PSS) 27検体、皮膚筋炎(DM) 20検体を用いた。また、健康人ボランティアより得られた30検体を対照とした。

### 2. ペプチド合成

#### (1) 合成ペプチドのデザイン

ヒトCA I及びIIの一次構造を基本に<sup>9), 10)</sup>両者のN末端側より順にCA Iについては15~16個、CA IIについては12~14個のアミノ酸残基となるようにデザインした。それぞれのペプチドのN末端側にはcysteineを結合させ、N末端から順にCA IはP1~P21, CA IIはP1~P20と番号をつけた。なお、CA Iの各ペプチドはアミノ酸を前後2残基ずつ重複させるデザインとした(Fig. 1A, B)。

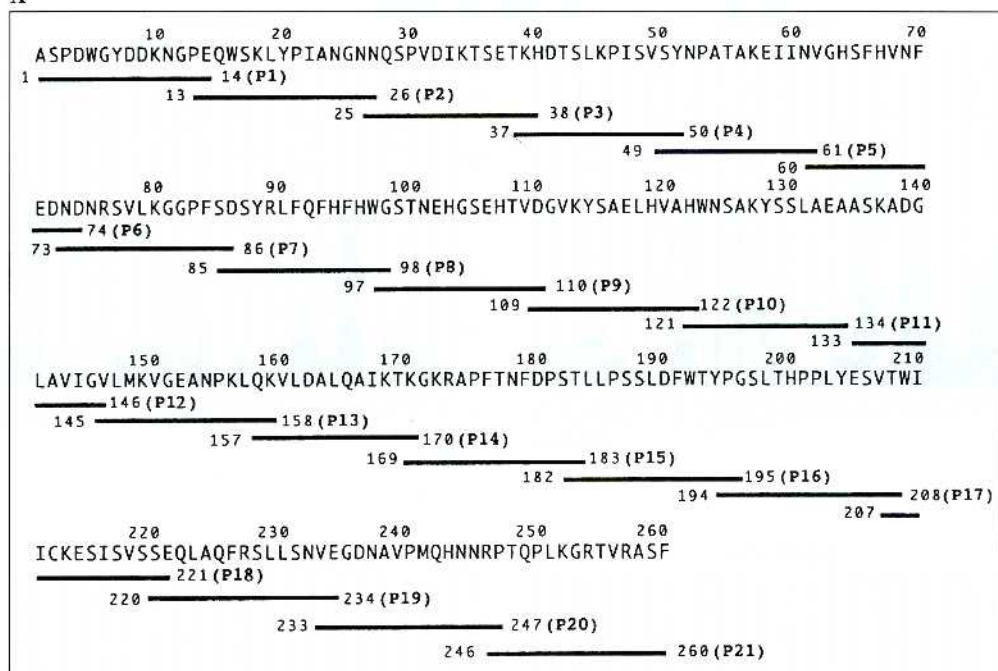
#### (2) ペプチドの合成

ペプチドの合成にはペプチドシンセサイザー(Applied Biosystems model 432A synergy<sup>TM</sup>)を用い、F-moc法で固相合成を行った。各合成ペプチドはthioanisole 50μl, 1,2, ethanedithiol 50μl, trifluoroacetic acid 900μlを加え室温で2時間反応させ脱保護した。次にmethyl t-butyl ether 15mlを加え吸引濾過し、濾過されたペプチドを2N acetic acid 5mlを加えた後に凍結乾燥させ4°Cで保存した。また、それぞれの合成ペプチドのアミノ酸配列はApplied Biosystems 477A protein sequencer chromatogramを用いて確認した。

#### (3) 合成ペプチドとBSAのカップリング

BSAと合成ペプチドの架橋はCelloら<sup>11)</sup>の方法に従ってN-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)-propionate (SPDP, Pharmacia)を使用した。0.1M Sodium Phosphate buffer (pH7.5)で0.08μmol/mlになるように調製したBovine serum albumin fraction V (BSA,

A



B

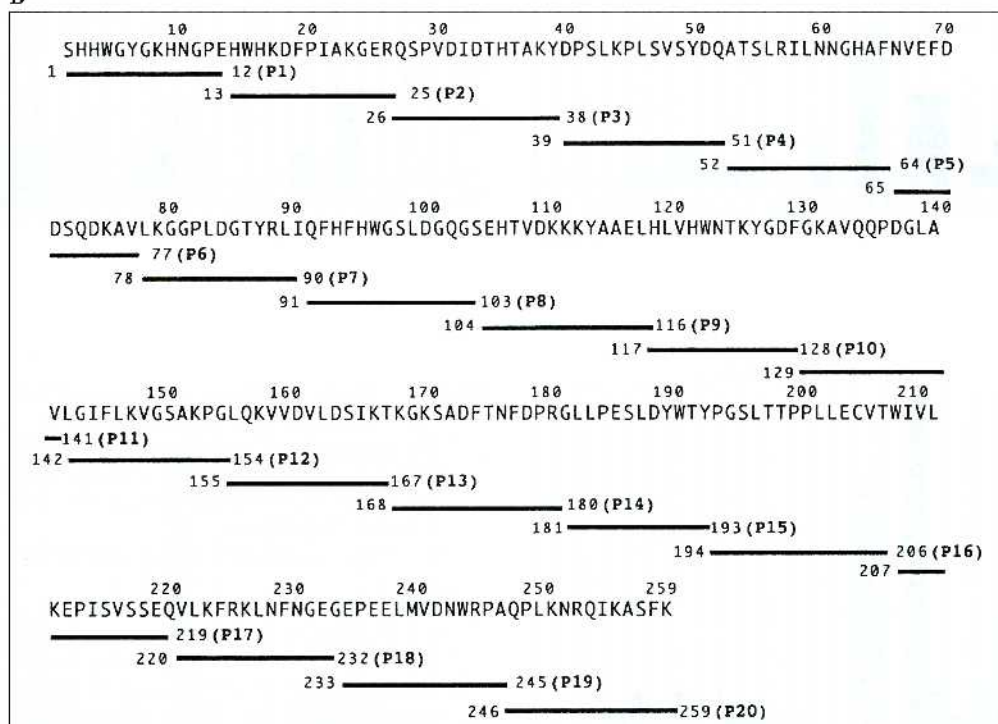
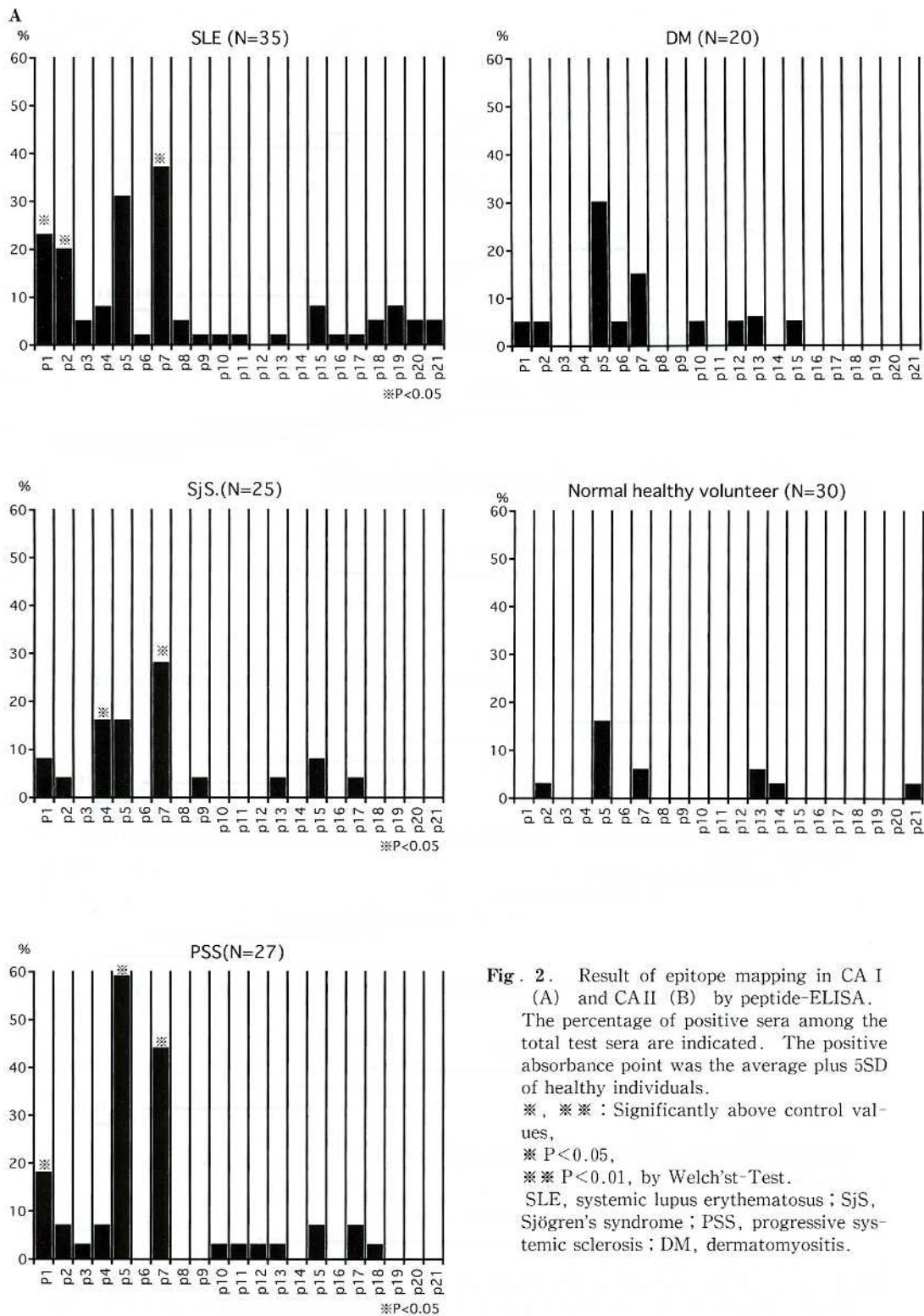


Fig. 1. The sequence of carbonic anhydrases (CA) I (A) and II (B) and design of each 12-16mer synthetic peptides are indicated as a line with the peptide number (e. g. : P1). The activesites of the Zn ion (His-94, 96, 119) are located in P8 and P10.





**Fig. 2.** Result of epitope mapping in CA I (A) and CAII (B) by peptide-ELISA.

The percentage of positive sera among the total test sera are indicated. The positive absorbance point was the average plus 5SD of healthy individuals.

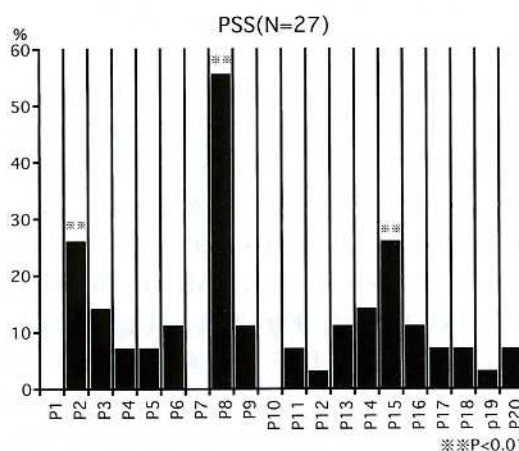
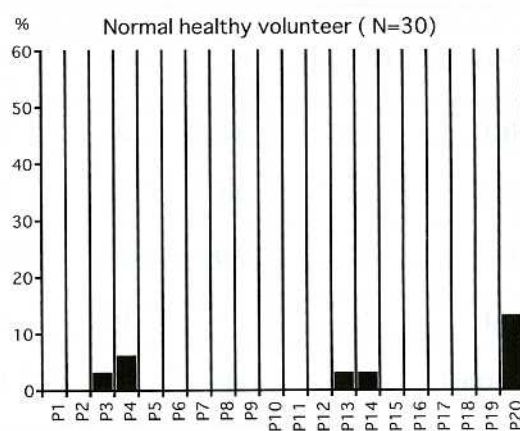
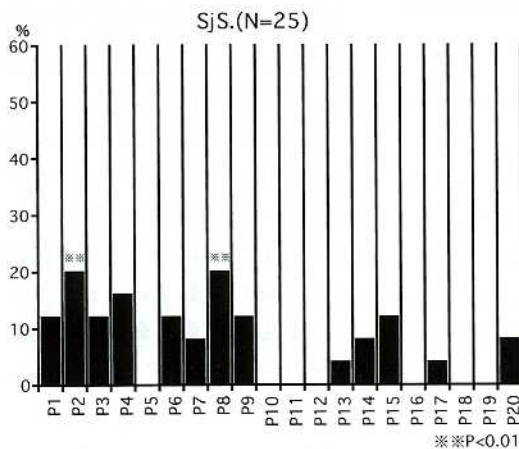
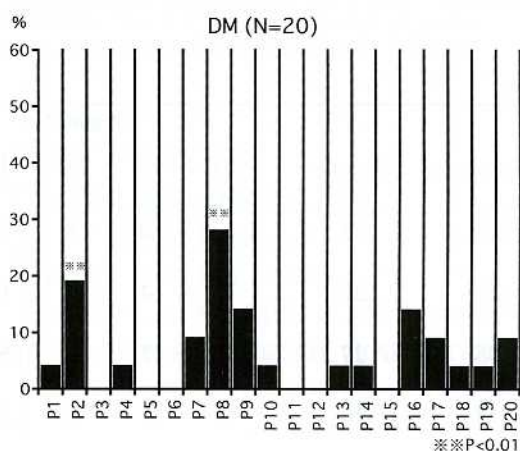
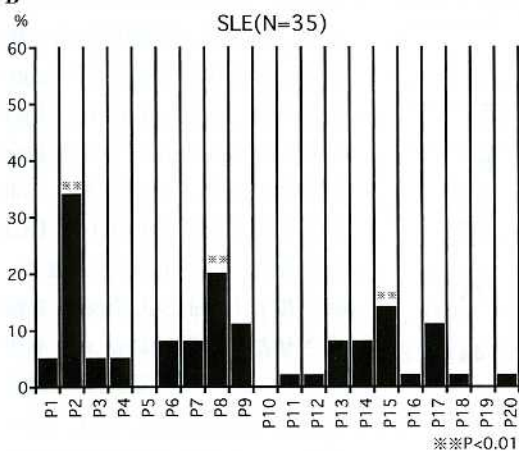
※, ※※: Significantly above control values,

※ P<0.05,

※※ P<0.01, by Welch's t-Test.

SLE, systemic lupus erythematosus; SjS, Sjögren's syndrome; PSS, progressive systemic sclerosis; DM, dermatomyositis.

B



Sigma) を Column PD-10 (Pharmacia) に通し回収し、これに99.5% ethanol に溶解した SPDP 0.24 $\mu$ mol/ml を加えて室温で30分反応させ、Column PD-10を用いて、2-pyridyl disulphide 構造の BSA を回収した。合成ペプチドは10% acetic acid で1mg/ml になるように溶解し、2-pyridyl disulphide 構造の BSA と室温で1時間30分反応させ、後に再度 Column で精製し、BSA と架橋したペプチドを得た。この時に一部を回収し、1ml あたり100mM の dithiothreitol (DTT) を50 $\mu$ l 加え、放出される pyridine-2-thione を343nm の吸光度で測定し、2-

**Table 1.** Values are expressed as the percentage of positive sera among the total test sera in CA I (A) and CA II (B). Dominant reactivity and common epitopes have been boxed.

Sera source	Patients (N)	Peptide No.				
		P1 (%)	P2 (%)	P4 (%)	P5 (%)	P7 (%)
SLE	35	23	20	8	31	37
SjS	25	8	4	16	16	28
PSS	27	18	7	7	59	44
DM	20	5	5	0	30	15
Normal	30	0	3	0	16	6

Sera source	Patients (N)	Peptide No.			
		P2 (%)	P8 (%)	P15 (%)	P20 (%)
SLE	35	34	20	14	2
SjS	25	20	20	15	8
PSS	27	25.9	55.5	25.9	7
DM	20	19	28	0	9
Normal	30	0	0	0	13

希釈した患者血清を100 $\mu$ lずつ注ぎ、4℃で一晩静置した。洗浄後、5000倍希釈 HRP-conjugated anti-human IgG (Sigma) を100 $\mu$ lずつ注ぎ30分間室温で反応させ、洗浄し、30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を加えた OPD・2 HCl (DAKO) で5分間発色させた。吸光度は1MH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で反応を停止させた1時間後に、エライザオートリーダーで  $\lambda T/\lambda R=490/630$ nm で測定した。なお、同一のプレート内に患者血清及びコントロールとしての BSA を各2ウェルずつ入れ、それぞれの平均値を求め、バックグラウンドとしての BSA の吸光度を差引き、真の吸光度とした。

Peptide-ELISA の結果, cut off point は健常人ポランティア血清の平均吸光度+5 SD とした。そして各疾患の全患者数のうちの陽性者数をパーセンテージで示した。尚、有意差検定は Welch's T-test によって行い、 $p<0.05$ を有意と判定した。

pyridyl disulphide 構造の BSA が合成ペプチドと置換されていることを間接的に確認した<sup>12)</sup>。

### 3. 合成ペプチドによるスクリーニング (ELISA 法)

ELISA 法は常法で行った。合成ペプチド及びコントロールとしての BSA を各々炭酸緩衝液 (pH9.6) で 4  $\mu$ g/ml に希釈し、96穴平板マイクロプレート (NUNC) に100 $\mu$ lずつ注ぎ4℃で一晩静置した。後に、Tween-20 (Sigma) を 0.05%含むリン酸緩衝液 (pH7.0) (TPBS) で3回洗浄し、1% BSA 及び Tween-20を含む PBS (1% BSA-TPBS) 200 $\mu$ l を注ぎ4℃で一晩ブロッキングした。洗浄後、TPBS で50倍に

## 結 果

### 1. CA I のエピトープ

SLE では P1:23%, P2:20%, P5:31%, P7:37% と P1, 2, 5, 7 に反応する血清が多く、SjS では P4:16%, P5:16%, P7:28% と P4, 5, 7 に反応する血清が多数であった。また、PSS では P1:18%, P5:59%, P7:44% と P1, 5, 7 に多く反応し、DM では P5:35%, P7:15% であった (Fig. 2A)。以上より、P5, P7 は SLE, SjS, PSS, DM の4疾患において共通して認められるエピトープであった。また健常人群においても同様に P5:16%, P7:5%



と P5, P7 に反応する血清があり, P5, P7 は RAD 群と健常人群の両者において共通したエピトープであった。対して P1, 2 は SLE, P4 は SjS, P1 は PSS で有意に反応があった (Table 1A)。

## 2. CA II のエピトープ

SLE では P2 : 34%, P8 : 20%, P15 : 14% と P2, 8, 15 に多く, 同様に SjS では P2 : 20%, P8 : 20%, P15 : 12% であり, PSS では P2 : 25.9%, P8 : 55.5%, P15 : 25.9%, DM は P2 : 19%, P8 : 28%, P15 は陰性であった。一方健常人群では RAD 群とは異なる P20 が 13% と高い傾向であった (Fig. 2B)。以上より RAD 群では共通して P2, P8, P15 に反応する血清が有意に多く, 健常人群では P20 に反応する血清が多かった (Table 1B)。

## 考 察

CA は,  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$  の反応を可逆的に触媒する酵素で, 生体内では赤血球中の  $\text{CO}_2$  の運搬に関与し, 肺で  $\text{HCO}_3^-$  を再度  $\text{CO}_2$  と  $\text{H}_2\text{O}$  に分解する。更に骨の石灰化にも関与している<sup>5)</sup>。その体内分布は広く赤血球, 胃粘膜, 上皮細胞, 虫垂, 脾臓, 大腸 (CA I, CA II)<sup>13)~15)</sup>, 肝臓, 胆嚢, 肺, 気管支, 脳, 網膜 (CA II)<sup>16), 17)</sup>, 筋細胞 (CA III)<sup>18)</sup>, 顎下腺, 唾液腺 (CA II, CA IV)<sup>14)</sup>, 腎細胞 (CA II, CA IV, CA V)<sup>16), 19)</sup>などに発現している。これらは主に細胞質に分布しているが, 細胞膜上に露出しているアイソザイムも存在し<sup>19)~21)</sup>, CA I, II, III ではその交差反応も指摘されている<sup>5)</sup>。RAD における抗 CA 抗体の陽性率はおよそ 20~30% であると報告されている<sup>6), 7), 22)</sup>。ヒト CA I 及び CA II は一次構造上の homology は 59.5% と高く, 当初 CA I, CA II のエピトープはおそらく共通するものと考えていた。しかし今回の実験の結果では CA I 及び CA II のエピトープは異なる結果となった。

CA I では疾患特異的なエピトープが存在し (SLE : P1, 2, PSS : P1, SjS : P4), それらは

高次構造上, SLE と PSS では N 末端とそれに続く  $\alpha$ -helix に相当し, また SjS では turn の部分にあたる。これらの部分はいずれも N-末端側で比較的蛋白表面に位置するため, エピトープになりやすい部分であると考えた<sup>23), 24)</sup>。また RAD 群と健常人群に共通したエピトープ : P5, P7 が存在し, これらは高次構造上で N 末端側の turn と  $\beta$ -sheet 構造から turn に続く部位に相当していた。おそらく P5, P7 は健常人では自然発生自己抗体として形成され, RAD 群では病態形成によって同部位がより修飾され, 健常人群と RAD 群に共通して反応したものと考えた。

一方 CA II では RAD 群と健常人群ではエピトープが異なり, CA I のような疾患特異的なエピトープや, 健常人群と共通したエピトープはみられなかった。つまり RAD 群では DM の P15 を除いては P2, 8, 15 が共通して反応していた。高次構造上では P2 は CA I と同様に N-末端側の  $\alpha$ -helix に一致しており, P8 は  $\beta$ -sheet 構造を呈する core 付近の亜鉛活性部位に一致し, P15 も  $\beta$ -sheet 構造を形成している。また, P8, P15 は core の亜鉛を取り囲むような形で存在している。健常人群に反応がみられた P20 は C 末端に位置し, CA II では同部位が自然発生自己抗体であると考えた。

CA I 及び CA II の亜鉛活性ドメインはアミノ酸残基の His-94, 96, 119 である<sup>4)</sup>。CA II のエピトープの 1 つである P8 はアミノ酸残基が 91-103 の部位に相当し, His-94, 96 の活性ドメインを 2 つを含んでいる。Inagaki ら<sup>6)</sup>, Itoh ら<sup>7)</sup> は, 抗 CA 抗体が直接 CA の酵素活性を阻害している可能性のあることを報告しているが, 少なくともエピトープの一つが亜鉛活性部位を認識している事が証明され, 特に抗 CA II 抗体が酵素活性に影響する可能性が示唆された。なお, CA I では P8 の部分は有意な反応はみられなかった。

自己免疫疾患における自己抗体発生の機序として : ①病態形成に直接関与するもの, ②直接関与しないもの, ③組織破壊により二次的に生じたものが考えられる<sup>25)</sup>。

抗 CA 抗体に関しては, CA は赤血球中に大

量に含まれていること<sup>4), 5)</sup>, 汗腺では分泌型 CA が発現<sup>26)</sup>していることから, 溶血あるいは発汗等による抗原との暴露の機会があり, 自己抗体が産生されるのではないかと推察している。

抗 CA 抗体は RAD のみでなく, 自己免疫性肺炎<sup>22)</sup>や自己免疫性胆管炎<sup>27)</sup>, 子宮内膜症<sup>21)</sup>の患者血清中にも存在することが報告されている。また CA II によって免疫された PL/J マウスが自己免疫性唾液腺炎をおこすという事実や<sup>8)</sup>, 先天性 CA II 機能低下症もしくは欠損症では尿細管性アシドーシス, 脳, 骨の石灰化, あるいは骨粗鬆症, 齲歯の多発などの症状を呈することは<sup>28)~30)</sup>, 一部シェーグレン症候群の病態と共通する。以上の事実は抗 CA 抗体が直接病態形成に関与している可能性も推察され興味深い。今

回の実験結果からこの自己抗体の一次構造に依存したエピトープが解明されたが, 通常高次構造を形成する蛋白の core 部分に位置する亜鉛活性ドメインが, どのような機序で抗原として認識されるに至るかは不明である。今後の研究課題であると考えた。

稿を終えるにあたり, ご指導とご校閲を賜った川崎医科大学皮膚科学教室植木宏明教授に謹んで感謝いたします。また終始懇切丁寧にご指導頂いた同小野麻理子講師, 小野雅史講師に深く感謝いたします。なお, 本研究の一部は川崎医科大学プロジェクト研究費 (8-502, 9-603), 文部省科学研究費補助金基盤研究 C (平成 8 年度) の援助によって行われたものである。

## 文 献

- 1) Tashian RE: The carbonic anhydrases: widening perspectives on their evolution, expression and function. *Bio Essays* 10: 186-192, 1989
- 2) Floyd C, Rector JR: *Handbook of Physiology*. ed by Geiger SR 3rd ed Washington, DC, American Physiological Society. 1973, pp 444-445
- 3) Shapiro LH, Venta PJ, Yu YS, Tashian RE: Carbonic anhydrase II is indicated in HL-60 cells by 1,25-dihydroxy vitamin D<sub>3</sub>: a model for osteoclast gene regulation. *FEBS Lett* 249: 307-310, 1989
- 4) Tashian RE, Hewett-Emmett D, Goodman M: On the evolution and genetics of carbonic anhydrases I, II and III. In *Isozymes Current Topics in Biological and Medical Research*, vol 7: molecular structure and regulation. New York, Liss Inc. 1983, pp 79-100
- 5) Erickson RP, Kay G, Hewett-Emmett D, Tashian RE, Claflin JL: Cross-reactions among carbonic anhydrases I, and III studied by binding tests and with monoclonal antibodies. *Biochem Genet* 20: 809-819, 1982
- 6) Inagaki Y, Jinno-Yoshida Y, Hamasaki Y, Ueki H: A novel autoantibody reactive with carbonic anhydrase in sera from patients with systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *J Dermatol Sci* 2: 147-154, 1991
- 7) Itoh Y, Reichlin M: Antibodies to carbonic anhydrase in systemic lupus erythematosus and other rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 35: 73-82, 1992
- 8) Nishimori I, Bratanova T, Toshkov I, Caffrey T, Mogaki M, Shibata Y, Hollingsworth MA: Induction of experimental autoimmune sialoadenitis by immunization of PL/J mice with carbonic anhydrase II. *J Immunol* 154: 4865-4873, 1995
- 9) Lowe N, Brady HJ, Barlow JHM, Sowden JC, Edwards M, Butterworth PHW: Structure and methylation patterns of the gene encoding human carbonic anhydrase I. *Gene* 93: 277-283, 1990
- 10) Forsman C, Behravan G, Osterman A, Jonsson BH: Production of active human carbonic anhydrase II in *E. coli*. *Acta Chem Scand, B, Org Chem Biochem* 42: 314-318, 1988
- 11) Cello J, Svennerholm B: Detection of enterovirus-specific total and polymeric IgA antibodies in



- serum using a synthetic peptide or heated viron antigen in ELISA. *J Wed Virol* 44 : 422–427, 1994
- 12) Carlsson J, Drevin H, Axen R : Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. *Biochem J* 173 : 723–737, 1978
  - 13) Tasian RE, Hemmett-Emmett D : The value of inheritead deficiencies of human carbonic anhydrase isozymes in understanding their cellular roles. *Ann NY Acad Sci* 429 : 262–275, 1984
  - 14) Parkkila S, Parkkila A-K, Juvonen T, Rajaniemi H : Distribution of the carbonic anhydrase isozymes I, II and VI in the human alientary tract. *Gut* 35 : 646–650, 1994
  - 15) Kumpulainen T : Immunohistochemical localization of human carbonic anhydrase isozyme C. *Histchem* 62 : 271–280, 1979
  - 16) Kumpulainen T : Immunohistochemical localization of human carbonic anhydrase isozymes. *Ann NY Acad Sci* 429 : 359–368, 1984
  - 17) Kumpulainen T, Dahl D, Korhonen LK, Nyström SHM : Immunolabeing of carbonic anhydrase isozyme C and grial fibrillary acidic protein in paraffin-embedded tissue sections of human brain and retina. *J Histochem Cytochem* 31 : 879–886, 1983
  - 18) Shima K, Tashiro K, Hibi N, Tsukada Y, Hirai H : Carbonic anhydrase-III immunohistochemical localization in human skeltal muscle. *Acta Neuropathol* 59 : 237–239, 1983
  - 19) Wistrand PJ, Knuuttila K-G : Renal membrane-bound carbonic anhydrase. Purification and propeties. *Kidney Int* 35 : 851–859, 1989
  - 20) Wistrand PJ : Properties of membrane-bond carbonic anhydrase. *Ann NY Acad Sci* 429 : 195–206, 1984
  - 21) Kiechle FL, Quattrociochi-Longe TM, Brinton DA : Carbonic anhydrase antibody in sera from patients with endometriosis. *Am J Clin Pathol* 101 : 611–615, 1994
  - 22) Kino-Ohsaki J, Nishimori I, Morita M, Okazaki K, Yamamoto Y, Onishi S, Hollingsworth MA : Serum antibodies to carbonic anhydrase I and II in patients with idiopathic chronic pancreatitis and Sjögren's syndrome. *Gastroenterology* 110 : 1579–1586, 1996
  - 23) Thornton JM, Sibanda BL : Amino and carboxy-terminal regions in globular proteins. *J Mol Biol* 167 : 443–460, 1983
  - 24) Chou PY, Fasman GD : Empilical predictions of protein conformation. *Ann Rev Biochem* 47 : 251–276, 1978
  - 25) 山本一彦：実験医学バイオサイエンス。「自己免疫のメカニズム」，東京，羊土社，1997，pp 97–98
  - 26) 小野麻理子：ヒト正常皮膚組織における Carbonic anhydrase I, II の局在. *川崎医学会誌* 18 : 101–107, 1992
  - 27) Gordon SC, Quattrociochi-longe TM, Khan BA, Kodali VP, Chen J, Silverman AL, Kiechle FL : Antibodies to carbonic anhydrase in patients with immune cholangiopathies. *Gastroenterology* 108 : 1802–1809, 1995
  - 28) Sly WS, Hewett-Emmett D, Whyte MP, Yu YS, Tashian RE : Carbonic anhydrase II deficiency identified as the primary defect in the autosomal recessive syndrome of osteoporosis with renal tubular acidosis and cerebral calcification. *Proc Natl Acad Sci USA* 80 : 2752–2756, 1983
  - 29) Sly WS, Whyte MP, Sundaram V, Tashian RE, Hewett-Emmet D, Guibaud P, Vainsel M, Baluarte HJ, Gruskin A, Mosawi M, Sakati N, Ohlsson A : Carbonic anhydrase II deficiency in 12 families with the autosomal recessive syndrome of osteoporosis with renal tubular acidosis and cerebral calcification. *N Engl J Med* 313 : 139–145, 1985
  - 30) Soda H : Carbonic anhydrase II deficiency syndrome-clinico-pathological, biochemical and molecular studies-. *Kurume Med J* 40 : 233–240, 1994