

リウマチ病におけるサリドマイド

佐伯 行彦



最近、サリドマイドには本来の鎮静・催眠作用の以外に、抗炎症作用、免疫抑制作用、血管新生抑制作用、抗悪液質作用、抗発癌プロモーション作用などの多岐にわたる薬理作用があることが明らかになり、種々の疾患において治療試験が行われている。基礎的研究結果から、これらの薬理作用は主に TNF α の阻害によるものと考えられている。基本的には TNF 阻害剤のひとつと考えられるので、モノクローナル抗体等の抗 TNF α 阻害剤の治療効果が注目されている。関節リウマチ (RA) をはじめとするリウマチ性疾患の治療において有効であることが期待できる。実際に、これまでの治療試験の報告では、有望な結果が報告されている。しかしながら、これまでの治療試験はいずれもオープン試験であること、また、効果や副作用についても一定の結論が得られていないことから、大規模なコントロール試験の結果が待たれる。

はじめに

サリドマイドはドイツで開発され、1957年に鎮静・催眠剤として発売された。しかしながら、神経毒性や重症先天性奇形（とくに無肢症やアザラシ肢症）を引き起こすことが明らかとなり、ヨーロッパ、カナダを中心に使用が中止になるまでに1万人以上の奇形児を生じた。本邦では、妊婦のつわりに対して使用された経緯に加え、ヨーロッパで1961年に市場から姿を消したあとも9カ月にわたり販売が続けられ、回収も徹底されず、認定患者だけでも約300名の薬害患者をだした。このように、サリドマイドは薬物療法のなかで“歴史上最大の薬害”ともいわれる悲劇により日本でも市場から姿を消した。

しかしながら、1965年に躁状態にあるハンセン病患者に鎮静目的でサリドマイドが投与され、偶然に癩性結節性紅斑に著効したことが報告された。その報告を契機に、ベーチェット病やサルコイドーシスなどの皮膚病変に対する有効性が次々と報告された。その後の研究で、サリドマイドには抗炎症作用だけでなく、免疫抑制作用、血管新生抑制作用など多彩な薬理作用があることが判明し、現在、皮膚疾患だけでなく、関節リウマチ、強直性脊椎炎、SLEなどのリウマチ性疾患の治療薬としての応用が期待されている。また、米国では催奇形性のないニューサリドマイドの免疫調製剤としての治療試験が進められている。

本稿では、とくに、サリドマイドの薬理作用のメカニズムおよびリウマチ性疾患における有効性について最近の知見を紹介したい。

● サリドマイドの新たな薬理作用

サリドマイドには本来の鎮静・催眠作用の以外に、抗炎症作用，免疫抑制作用，血管新生抑制作用，抗悪液質作用，抗発癌プロモーション作用などの多岐にわたる薬理作用があることが明らかになり，種々の疾患において治療試験が行われている（表1）．最近の知見によると，このような薬理作用は主に $TNF\alpha$ の阻害によるものと考えられている（図1）．

1. $TNF\alpha$ 産生の選択的阻害

1991年に Sampaio らはサリドマイドに選択的な $TNF\alpha$ 産生阻害作用があることを報告している [1]．この報告では，ヒトの単球を LPS で刺激したときの $TNF\alpha$ をはじめとする各種炎症サイトカイン（IL-6, IL-1 β , GM-CSF）の産生に対するサリドマイドの影響を調べたところ，サリドマイドが用量依存的に $TNF\alpha$ の産生を選択的に阻害することが示されている（図2）．

2. $NF-\kappa B$ の活性化の阻害

2001年に Keifer らはサリドマイドに炎症における主役の転写因子のひとつである $NF-\kappa B$ （nuclear factor- κB ）の活性化を阻害する作用があることを報告している [2]．この報告では，ヒトの培養T細胞（Jurkat T細胞）を用いて $TNF\alpha$ で刺激したときの $NF-\kappa B$ の活性化を DNA 結合活性をゲルシフトアッセイで測定したところ，サリドマイドが $NF-\kappa B$ の活性化を有意に

表1 サリドマイドを用いた治療試験が行われている疾患

(1) 悪性腫瘍 多発性骨髄腫，骨髄異形成症候群，急性白血病，腎癌，大腸癌， 前立腺癌，肺癌
(2) HIV 感染症
(3) 自己免疫性炎症性疾患（リウマチ性疾患）およびその類縁疾患 SLE（とくに皮膚病変），ベーチェット病，関節リウマチ，強直性 脊椎炎，成人スチル病，クローン病，潰瘍性大腸炎
(4) 神経変性疾患 多発性硬化症
(5) GVHD (graft-versus-host disease)

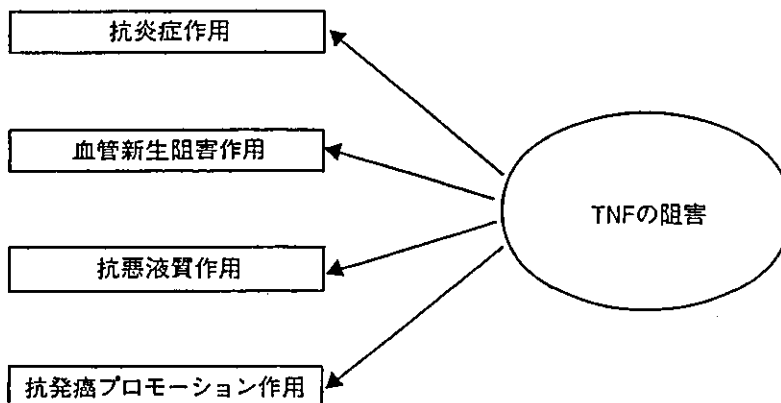


図1 サリドマイドの薬理作用と TNF の阻害の関係

抑制することが示された (図 3 A). さらに, NF- κ B は I κ B (inhibitor of NF- κ B) がリン酸化されることで活性化されるが, サリドマイドがこの I κ B の活性化 (リン酸化) を阻害することが示されている (図 3 B).

このように, サリドマイドは, TNF α の産生を抑制するとともに, NF- κ B の活性化を阻害

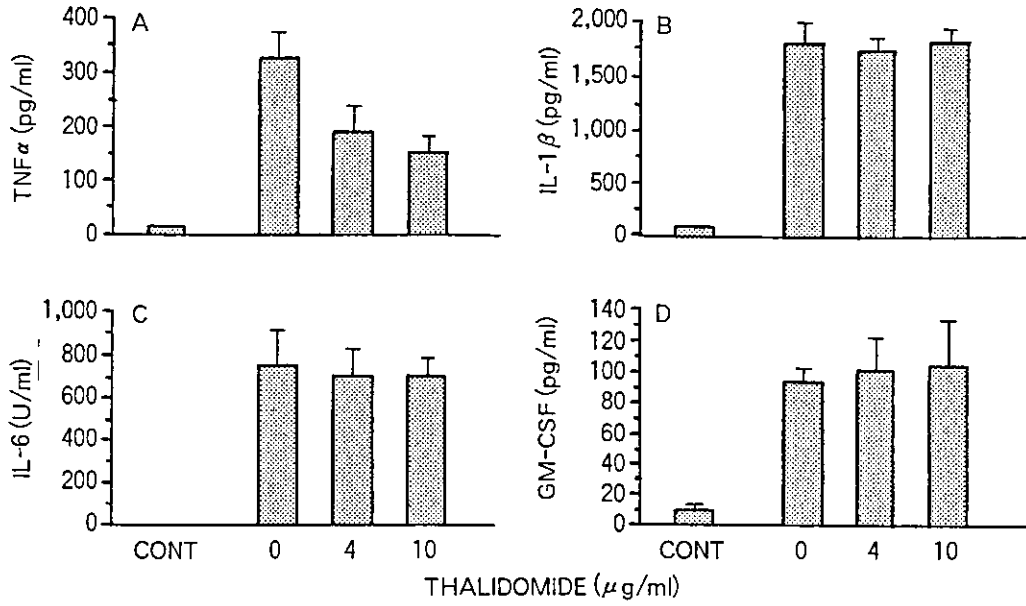
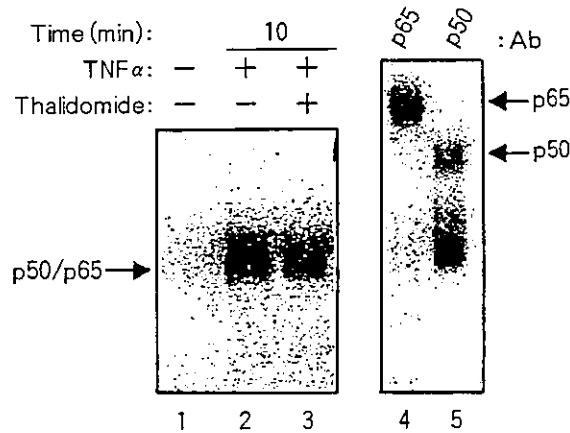


図 2 ヒトの単球を LPS で刺激したときのサリドマイドによる TNF α 産生の選択的阻害 (Sampaio EP ら, 1991 [1])

A. DNA binding activity of NF- κ B



B. Kinase assay for I κ B kinase

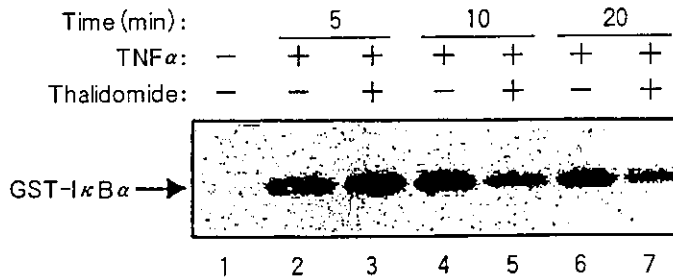


図 3 サリドマイドによる NF- κ B の活性化の阻害 (Keifer JA ら, 2001 [2])

することにより TNF α の主要な炎症のシグナル伝達をも抑える、ユニークな抗 TNF α 剤と考えられる。

● サリドマイドによる治療試験が行われている疾患

現在までに表1のような疾患においてサリドマイドの治療試験が行われている。まず、癌の治療への応用も考えられている。癌の増殖や転移には血管の新生が重要であることは周知の事実であるが、サリドマイドは前述のように血管新生作用をもつ TNF α や VEGF (vascular endothelial growth factor) の産生を抑制する作用をもつので、これらの血管新生促進分子を抑えることにより、癌の進展を抑えることが期待されている。ウサギを用いた β FGF で誘導される角膜の血管新生実験モデルにおいて、サリドマイドが有意に血管新生を抑制することが報告されている [3]。実際に、多くの固形癌 (乳癌、前立腺癌、腎癌、膵癌、卵巣癌、大腸癌、胃癌、脳腫瘍など) に対して治療試験が進められている。また、これまで有効な化学療法がなく治療が困難であった多発性骨髄腫においても有効性が報告され注目されている。HIV 感染症においては、TNF α は HIV の増殖を促進させることが知られている。また、HIV 感染症の口腔潰瘍や消耗症候群にも TNF α が関与していると考えられているので、サリドマイドが HIV 感染症の進行の抑止や、病状の改善に効果をもたらすことが期待される。さらに、自己免疫疾患およびその類縁疾患においても、ベーチェット病や SLE の皮膚病変だけでなく、最近、モノクローナル抗体などの抗 TNF α 阻害剤の治療効果が注目されている。リウマチ性疾患 (関節リウマチ、強直性脊椎炎等) やクローン病、潰瘍性大腸炎においても治療薬として期待されている。その他、多発性硬化症、痴呆などの神経変性疾患や GVHD などの治療にも応用が考えられている。

● リウマチ性疾患における主な治療試験

残念ながら、大規模のコントロール試験の結果はまだ、報告されていない。しかしながら、RA [4, 5]、強直性脊椎炎 [6, 7]、SLE [8] などにおける主にオープン試験の結果が報告されている。いずれも、現行の治療に抵抗する症例において有効であったとの有望な結果が報告されている。

● RA における治療試験

RA についても、1980年代後半にコロンビアのグループがオープン試験で有望な結果を報告している [9, 10]。これらの報告では、治療抵抗性の RA 患者にサリドマイドが投与され、過半数以上の患者に緩解が得られたと報告されている。副作用についても眠気、便秘、脱毛、皮疹、灼熱感など軽微なものがほとんどで重篤なものはなかったとの総じて有望な結果であった。しかしながら、追試では、カナダのグループの報告のように否定的なものもあり (表2) [4]、サリドマイドの RA の治療における有効性については、必ずしも明らかにされていない。

表2 サリドマイドの治療効果

	治療前	治療後	変化率 (%)
圧痛関節数	34.1±6.35	34.4±6.31	+0.87
腫脹関節数	15.2±4.59	12.7±3.04	-3.5
血沈 (mm/hr)	42.8±19.7	42.0±32.4	0
VAS (visual analog scale)	7.4±2.5	6.2±2.8	-16.3
HAQ (health assessment questionnaire)			
活動性	1.8±0.74	1.8±0.63	0
疼痛	2.0±1.83	2.0±1.81	0
患者の総括評価	NA	2.1±0.876	NA
医師の総括評価	NA	2.0±0.816	NA
朝のこわばり (min)	288±416.7	396±556	+37.6
握力 (mmHg)			
右	68.8±41.0	69.3±20.3	+0.72
左	72.3±49.3	66.8±20.4	-7.6

(Keesal INら, 1999 [4] 一部改変)

おわりに

これまで述べてきたように、多岐にわたる難病の治療においてサリドマイドの応用が期待されている。基本的にはTNF阻害剤のひとつと考えられるので、RAをはじめとするリウマチ性疾患においては有用であるものと考えられる。しかしながら、これまでの治療試験はいずれもオープン試験であること、また、効果や副作用についても一定の結論が得られていないことから、大規模なコントロール試験の結果が待たれる。現在、副作用の少ない“新しいサリドマイド”の開発も進んでいるが、将来、サリドマイドが「悲劇の薬」から「奇跡の薬」になることを期待したい。

●文 献●

- 1) Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R, et al : Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor a production by stimulated human monocytes. *J Exp Med* 173 : 699-703, 1991
- 2) Keifer JA, Guttridge DC, Ashburner BP, et al : Inhibition of NF- κ B activity by thalidomide through suppression of I κ B kinase activity. *J Biol Chem* 276 : 22382-7, 2001
- 3) D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, et al : Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 : 4082-4085, 1994
- 4) Keesal IN, Wasserman MJ, Bookman A, et al : Thalidomide in the treatment of refractory rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 26 : 2344-2347, 1999
- 5) Scoville CD : Pilot study using the combination of methotrexate and thalidomide in the treatment of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 19 : 360-361, 2001
- 6) Breban M, Gourbert B, Amor B, et al : Efficacy of thalidomide in the treatment of refractory ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 42 : 580-581, 1999
- 7) Haung F, Gu J, Zhao W, et al : One-year open label trial of thalidomide in ankylosing spondylitis. *Arthritis Care & Research* 47 : 249-254, 2002
- 8) Sato EI, Assis LS, Lourenzi VP, et al : Long-term thalidomide use in refractory cutaneous lesions of systemic lupus erythematosus. *Rev Assoc Med Bras* 44 : 289-293, 1998
- 9) Gutierrez-Rodriguez O : Thalidomide. A promising new treatment for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 27 : 1118-1121, 1984
- 10) Gutierrez-Rodriguez O, Starusta-Bacal P, Gutierrez-Montes O : Treatment of refractory rheumatoid arthritis-the thalidomide experience. *J Rheumatol* 16 : 158-163, 1989

サイトカインの治療への応用

関節リウマチに対する抗 IL-6 レセプター抗体による治療

Treatment of rheumatoid arthritis with anti-IL-6 receptor monoclonal antibody

Key point

- IL-6 阻害薬としてヒト型化抗 IL-6 レセプターモノクローナル抗体が開発されてきた。
- 関節リウマチの治療において抗 TNF- α 製剤、抗 IL-1 製剤と同等あるいはそれ以上の有効性が認められ、承認に向けて精力的な治験が進行中である。

関節リウマチ (RA) は骨破壊性の多関節炎を主徴とする慢性の全身性炎症性疾患である。病因はまだ不明であるが、これまでの研究により病態形成の分子機構の解明が進み、病態の各ステップでの責任分子が明らかになってきた。一方では遺伝子工学のめざましい進歩により免疫原性を抑えたヒト型化モノクローナル抗体、可溶性レセプターなどの人工的な生物製剤の作成が可能となり、RA においてそれらを用いた病態形成の責任分子を標的とした治療が精力的に開発されてきた。RA におけるこれらの生物製剤を用いた分子標的治療のなかで、TNF- α 、IL-1、IL-6 などの炎症性サイトカインを標的とした治療はこれまでに優れた効果が確認され、抗 TNF- α 製剤、抗 IL-1 製剤はすでに RA の治療薬として海外で (抗 TNF- α 製剤はわが国でも) 承認され、臨床の場で切り札的な治療薬として期待されている。また、IL-6 阻害薬についても大阪大学と中外製薬株式会社の共同研究でヒト型化抗 IL-6 レセプター抗体 (MRA) が開発され、抗 TNF- α 製剤、抗 IL-1 製剤と同等あるいはそれ以上の効果が認められ、承認に向けて精力的な治験が進行中である。

IL-6 の RA の病態形成における役割

IL-6 は、炎症・免疫系、造血系、神経系などの生体の恒常性の維持に重要な役割を果たしている多彩な生物学的作用を有するサイトカインであるが、一方では RA、Crohn 病、多発性骨髄腫、Castleman 病など種々の疾患において病態形成に深くかかわっているこ

とが示唆されている¹⁾。実際に RA では血中、関節液に大量の IL-6 が存在し、IL-6 は過剰産生されている²⁾。また、RA にみられる特徴的な検査異常である CRP、フィブリノゲン、アミロイド A などの急性期蛋白の産生の亢進、高 γ -グロブリン血症、血小板の増加、あるいは骨吸収や血管新生の亢進はすべて IL-6 の作用に関連したものと考えられる。さらに、IL-6 のノックアウトマウスではワイルドマウスに比べて実験的関節炎の明らかな軽症化がみられる^{3,4)}。また、中和抗体による IL-6 のブロックで関節炎が緩和される⁵⁾ ことから IL-6 の過剰産生が RA の病態形成に直接関与していること、IL-6 の作用を阻害することが治療に有効であることが予想されていた。

RA における抗 IL-6 レセプター抗体を用いた治療試験

Wendling らは、マウス由来のモノクローナル抗 IL-6 抗体を用いて RA の治療試験を行い、はじめて IL-6 の作用をブロックすることが RA に有効であることを示した⁶⁾。しかし、彼らの用いたモノクローナル抗体はマウス由来の抗体であったため、その効果は一時的であった。

大阪大学と中外製薬株式会社の共同研究開発で、遺伝子工学的技術を用いてチャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO 細胞) で産生させたヒト型化モノクローナル抗ヒト IL-6 レセプター抗体 (MRA) が作成された (図 1)。まず、MRA の関節炎に対する効果がカニクイザルのコラーゲン誘導関節炎⁵⁾ や SCID マウスを用いた RA 患者の滑膜組織移植モデルにおいて実証された。吉崎、西本らは、DMARD 抵抗性の 11 名の RA 患者においてオープン試験を実施し有効性、安全性を検討し、報告した。その結果、臨床症状 (関節痛、関節腫脹、朝のこわばりなど) の改善とともに CRP、ESR の正常化などの検査上の改善が確認された⁷⁾。健康人を対象とした単回点滴静脈内投与による安全性、薬物動態の検討の後、イギリスで 45 名の RA 患者を対象として、MRA 0.1 mg/kg、1 mg/kg、5 mg/kg、10 mg/kg の単回投与によるプラセボを対照とした二重盲検試験が実施され、安全性が検討された⁸⁾。その結果、有害事象は投与群間で明らかな差は認められなかった。その後、わが国において西本、吉崎らにより臨床第 I / II 相試験が実施された。この試験では DMARD 抵抗性の 15 名の RA 患者を対象として MRA 2 mg/kg、4 mg/kg、8 mg/kg の 2 週間間隔反復投与による検討が行われた⁹⁾。その結果、初回投与 6 週後の有効性については ACR20 改善率は 60 % であった (サイドメモ)。引き続き行われた長期継続試験におい

佐伯行彦 / 国立病院機構大阪南医療センター臨床研究部 / 免疫異常疾患センター

Yukihiko SAEKI

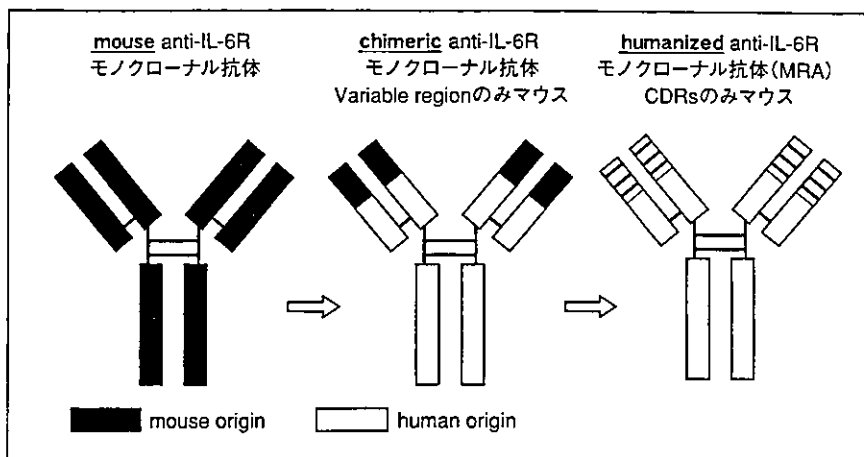


図1 マウス型抗IL-6レセプターモノクローナル抗体のヒト型化

ても、24週時86.7%、48週時76.9%、96週時80.0%と有効性は持続した。また、臨床症状の改善と併行してCRP、ESR、血清アミロイドA蛋白、フィブリノゲンなどの正常化が認められた。一方、有害事象についてはほとんど鼻咽頭炎など軽微なものであったが、1例において帯状疱疹の併発が報告された。検査所見の異常としては、比較的高頻度に総コレステロール値、トリグリセリド、LDLの上昇がみられたが、一過性であった。また、一過性の血球減少（とくに白血球）、トランスアミナーゼの上昇が認められたが、いずれも重篤なものではなかった。

さらに、多施設二重盲検試験が164名のDMARD抵抗性のRA患者において実施された¹⁰⁾。この試験ではMRA 4 mg/kg、8 mg/kgおよびプラセボが4週ごとに12週間にわたり投与された。その結果、ACR20、50、70いずれの改善率においてもプラセボ群に比べて有意な効果を示した（表1）。有害事象については過去の試験とほぼ同様の傾向であったが、MRA 8 mg/kg投与群においてEBウイルス感染の再活性化による多臓器不全での死亡例が報告された。この症例は後の解析ではEBウイルスの慢性潜在的な活動性を有する患者であったとのことでウイルスなどの潜在的な感染への留意が必要と考えられる。なお、抗TNF- α 剤にみられる結核の再活性化、抗DNA抗体など自己免疫現象の誘発はみられていない。現在、第Ⅲ相試験が展開されている。

今後の展望

これまでのRAにおける臨床試験の成績では安全性の面ではとくに感染症への留意は必要であるが、重大な問題は特別なようである。また、有効性についても先行する抗TNF- α 製剤と同程度あるいはそれ以上の臨床的効果が報告されている。さらに、治療により

表1 多施設二重盲検試験の成績

	プラセボ群 (n = 53)	4 mg/kg 投与群 (n = 54)	8 mg/kg 投与群 (n = 55)
ACR20	11.3 %	57.4 %	78.2 %
ACR50	1.9 %	25.9 %	40.0 %
ACR70	0.0 %	20.4 %	16.4 %

(文献¹⁰⁾より一部改変)

軟骨・骨破壊因子(マトリックスプロテアーゼ3など)やアミロイドA蛋白が低下するとの報告もあり、RAの臨床上の重大な問題である骨破壊やアミロイドーシスの抑止も期待される。2002年に発表されたアメリ

サイド メモ

ACR 改善基準

1993年、アメリカリウマチ学会(ACR)はACRコアセット(下表)の評価項目に従って臨床的改善度を評価することを提唱した。現在、この評価基準は新薬の薬効評価の国際的なスタンダードとなっている。下表の7項目のうち、腫脹関節数および疼痛(圧痛あるいは運動時痛)関節数が20%以上改善し、かつ、残りの5項目中3項目において20%以上の改善が認められた症例をACR20改善ありとする。ACR50、ACR70はそれぞれ50%、70%以上の改善度を意味する。

ACR コアセット

1. 腫脹関節数
2. 疼痛(圧痛あるいは運動時痛)関節数
3. 患者による疼痛評価
4. 患者による全般評価
5. 医師による全般評価
6. 患者による日常生活活動能力の評価(MHAQ)
7. CRPまたはESR

カリウマチ協会のRAの治療指針によると、生物製剤による治療は従来のMTXを中心とした抗リウマチ剤による治療に抵抗する症例に対して使用されるような位置づけになっている。しかし、本治療を含む生物製剤による抗サイトカイン療法は今後の臨床成績の結果次第ではコストの問題もあり、適応については十分考慮が必要であるが、RAの治療体系において早期治療薬としての主役を担う可能性もある。

文献

- 1) Kishimoto, T. : *J. Autoimmun.*, Suppl., A : 123-132, 1992.
- 2) Hirano, T. et al. : *Eur. J. Immunol.*, 18 : 1797-1801, 1988.
- 3) Sasai, M. et al. : *Arthritis Rheum.*, 42 : 1635-1643, 1999.
- 4) Ohshima, S. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 95 : 8222-8226, 1998.
- 5) Mihara, M. et al. : *Clin. Immunol.*, 98 : 319-326, 2001.
- 6) Wendling, D. et al. : *J. Rheumatol.*, 20 : 259-262, 1993.
- 7) Yoshizaki, K. et al. : *Springer Semin. Immunopathology*, 20 : 247-259, 1998.
- 8) Choy, E. H. et al. : *Arthritis Rheum.*, 46 : 3143-3150, 2002.
- 9) Nishimoto, N. et al. : *J. Rheumatol.*, 30 : 1426-1435, 2003.
- 10) Nishimoto, N. et al. : *Arthritis Rheum.*, 46 : S559, 2002.

* * *

d) 糖尿病性筋萎縮症

糖尿病患者の両側性殿筋や大腿四頭筋の筋力低下、萎縮が認められる場合糖尿病性ニューロパチーによる筋萎縮症を考へる。同部位の知覚障害は認められないが誘発電位伝導速度の低下を認めれば診断してよい。

e) ステロイドミオパチー

副腎皮質ステロイド薬を大量に長期間使用した場合、四肢近位筋の萎縮を認める場合がある。この場合 PM と違い、筋痛がない。また血清 CPK 値は上昇しない。

f) 神経性ミオパチー

Guillain-Barré 症候群(→p.1765)や Kugelberg-Welander 病では筋痛はないが、筋力低下の部位がしばしば PM と類似する。前者では多発性神経炎による麻痺が主体であり、髄液の蛋白細胞解離所見と筋電図が鑑別に有効である。後者では遺伝性で発病年齢が若く、筋萎縮部では筋線維性攣縮を認めるので鑑別される。やはり筋電図が役立つ。

g) Eaton-Lambert 症候群 (→p.1785)

本症は運動神経末端における Ca チャネルに対する自己抗体によって ACh 放出が阻害されるためである。肺小細胞癌例に多くみられるが、約 1/3 に肺癌のない症例がみられる。下肢の近位筋の筋力低下や眼瞼下垂、複視の症状があり MG に酷似している。

筋電図では反復性神経刺激検査で漸増現象を認め、PM と鑑別できる。

その他、口渇、インポテンズ、発汗減少、起立性低血圧等の自律神経失調が認められる。治療は腫瘍の摘出、血漿交換、免疫抑制薬等である。抗 ChE 薬の投与による効果は少ないようである。

(澤田滋正, 武井正美)

文 献

- 1) Bohan A, Peter JB: Polymyositis and Dermatomyositis. *N Engl J Med* 292: 344-347, 1975
- 2) Barnes BE: Dermatomyositis and malignancy. A review of the literature. *Ann Intern Med* 84: 68-76, 1976
- 3) Sigurgeirsson B et al: Risk of cancer in patients with dermatomyositis or polymyositis. A population-based study. *N Engl J Med* 326: 363-367, 1992
- 4) 樋口逸郎, 納 光弘: 炎症性疾患. 新筋肉学(杉田秀夫 他編), 南江堂, 東京, 1995, p 739
- 5) Drachman DB: Myasthenia gravis. *N Engl J Med* 330: 1797-1810, 1994
- 6) 石井潤一: クレアチンキナーゼとそのアイソザイム. *Medicina* 31 (増刊号): 73-75, 1994

8. 結晶誘発性関節炎の診断と治療

結晶誘発性関節炎(→p.2217)は関節内ないしは関節周囲に沈着した結晶に多核白血球を主体とした炎症細胞が反応し、その結果種々のケミカルメディエーターが放出されることによって生じる急性・亜急性関節炎の総称である。関節液中に証明され関節炎を起こすと考えられる結晶の種類は多いが、臨床頻度が高く結晶沈着機序や関節炎発症機序等が比較的好く研究されているものは尿酸ナトリウム(MSU)結晶(痛風)、ピロリン酸カルシウム(CPPD)結晶(偽痛風)、ヒドロキシアパタイト(HA)結晶(HA 結晶沈着症)の3種類である。以下、それぞれの疾患の臨床症状、診断、治療について概説する。

1) 痛 風 (→p.1078)

痛風は MSU 結晶によって惹起される結晶誘発性関節炎の代表疾患である。中年男性に多く女性の頻度は 1% 以下である。痛風関節炎は急激に発症し通常 24 時間以内に最大となる激しい関節炎であるが、特別な治療を施さなくても 1-2 週間以内に自然消退する。足の親指の中足趾関節、その他の足趾関節、足関節、膝関節が好発部位であり、上肢の関節が侵されることは比較的まれである。1 回の発作で 1 ヶ所の関節が侵される単関節炎の型式をとるのも特徴である。このような痛風発作の特徴を知っていれば典型例では問診だけでも容易に診断できる。血清尿酸値はまれに正常範囲内のこともあるが、通常は 7.0 mg/dL 以上の高値を示す。痛風関節炎では初期には骨の異常はないことが多く、単純 X 線上特徴的な所見はないが、高尿酸血症(→p.1141)が放置され幾度となく関節炎を反復する症例では骨びらん、骨の打ち抜き像等がみられるようになる。最も確実な診断は関節液中で MSU 結晶を確認することである。MSU 結晶は長さ 2-20 μm の針状結晶で、強い負の複屈折性を有するため、補正偏光顕微鏡を用いて関節液を観察すると MSU 結晶は容易に同定できる(図 III-8-1)。しかし関節穿刺はテクニックを要し、特に痛風では小関節に関節炎が好発することもあるため、すべての患者でこれを行うことは困難であり、臨床像から診断するのが実際的である。急性期の数日間は非ステロイド性抗炎症薬(NSAID)を常用量よりは多めに使用して我慢できる程度まで痛みを抑え、関節炎が軽減してきたら症状に合わせて服用量を漸減する(図 III-8-2)。

膝関節のような大きな関節に発作が起こった時は NSAID の内服に加えて、ステロイド薬の関節内注入も有効である。コルヒチンは発作極期を過ぎたものには効果がなく、大量使用では副作用が必発するので、発作初期に 1 錠だけ使用するととどめ、効果が得られない場合は速やかに NSAID に変更すべきである。発作の予防は基礎疾患である高尿酸血症を是正することで達成されるが、急激な血清尿酸値の変動は二次発作を誘発するので、尿酸低下薬の投与は関節炎の消退後に少量から開始するのが原則である。

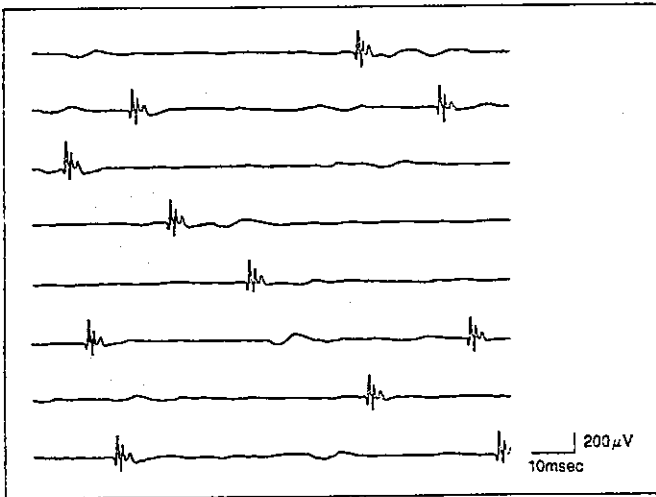


図 3-7-1 多発性筋炎患者の筋電図(日本大学練馬光が丘病院神経内科, 大石 実提供)
short duration potential, low amplitude potential が認められる。

度に比し増加している(この文献は米国における報告である)。1990年代になると、男性のPM/DMで肺癌の増加が認められ、女性では乳癌の増加がみられている。悪性腫瘍の治療が奏効した場合、DMやPMの症状も改善する場合がある。急性間質性肺炎(30-60%)を合併した場合、大量のステロイド投与にもかかわらず急速に呼吸不全が進行し死亡する場合と、改善する場合がある。急性間質性肺炎は生命予後に最も重大な合併症で治療により救命できることがあることより、最初からステロイドパルス療法を行うとともに血漿交換療法を積極的にすべきである。

2) 治療

薬物治療の主体は副腎皮質ホルモン(プレドニゾン)である。急性期ではプレドニゾン50-60mgの経口投与が行われる。嚥下障害が著明な場合、点滴で同量投与されるが、緊急の場合プレドニゾン1,000mgのパルス療法が必要なことがある。筋力が改善され、検査所見が改善されたら、漸減する。症状改善されてもかなり長期間維持量を投与する必要がある。糖尿病等の合併症がある場合プレドニゾンは使用できないので、メトトレキサート、エンドキサン等の免疫抑制薬を投与する。メトトレキサートは週1回、静注で25mgから100mgまで増量する。エンドキサンは75-100mgの内服投与する。嚥下障害がある場合鼻腔栄養を、呼吸筋障害がある場合気管切開を行い、薬物療法による筋力の改善に伴い機能回復訓練を行う。筋拘縮、関節拘縮を起こさせないようにハビリテーションを行うのが大切である。

2. 重症筋無力症

1) 診断

重症筋無力症 myasthenia gravis (MG) は、種々なる顔面筋の筋脱力が特徴で夕刻に症状は増悪し、休息によって改善する典型的

な臨床症状があれば診断は困難でない。特に上眼瞼下垂、嚥下障害、呼吸筋筋力低下により首下がり症状を呈することもある。二三日の歩行困難や起立困難の症状は85%に認められる。しかし知覚障害、反射障害等の症状は認められない。診察上、反復運動で筋力低下が増悪する。重症な場合、呼吸筋麻痺による呼吸困難により生命危険な状態になることがある。検査はテンシロン試験がある。ドロホニウム edrophonium chloride (テンシロン) 2-10mgの静注により筋力低下の改善があるか否か調べる。改善すれば重症と考えてよい。筋電図検査では誘発検査により活動電位の減衰 (fatigability) を認める。

抗アセチルコリン (ACh) 抗体はMG患者の80%で陽性であるので、この抗体が陽性であれば診断的意義は高い。しかしこの抗体が陰性であってもMGを否定できない。

30%に胸腺腫や胸腺過形成を認めるので胸部のCT検査は必須である。

2) 治療

アンベノニウム (mytelase)、ピリドスチグミン (mestinon)、スチグミン (ubretid) 等の抗コリンエステラーゼ (ChE) 薬の投与を行う。抗ChE薬過剰投与によるクリーゼでは気管切開、機械的呼吸による呼吸管理を行い、血漿交換療法で急速な改善を得るよう努力する。しかし寛解を得ることは困難である。感染は増悪の因子であるので注意する。

プレドニゾンの大量療法 (60-80mg) で寛解することがある。寛解したら漸減し維持量で経過をみる。フラジオマイシン (ネモマイシン)、ストレプトマイシン、カナマイシン、ポリミキシンE等の抗生物質は禁忌である。

3) 鑑別診断

a) リウマチ性多発筋痛症 (→ p. 2214)

中年以降の発症で、四肢近位部に疼痛があるが筋力低下、筋萎縮は認められず、血清酵素値は正常で、筋電図、筋生検でも異常は認められない。しかしリウマチ性多発筋痛症では赤沈値が亢進しているのが特徴である。

b) 甲状腺機能異常性ミオパチー

筋力低下、筋肉萎縮は認められるが、筋痛は認められない。甲状腺機能異常、機能亢進、機能低下でも筋力低下は認められる。甲状腺機能異常があれば鑑別は容易である。血清酵素値、特にCPK高値は甲状腺機能低下(粘液水腫)で認められる。甲状腺機能異常性ミオパチーは抗甲状腺薬や甲状腺薬が著効するので鑑別は重要である。

c) サルコイドミオパチー

肺サルコイドーシスや眼サルコイドーシスで筋力低下、筋萎縮を認めれば、症状のある筋の筋生検を行い、肉芽腫様病変が認められれば診断がつく。しかし臨床的に症状は明瞭でなく診断は困難である場合が多く、耳下腺炎、ぶどう膜炎等の随伴症状に注目し、肺サルコイドーシスや眼サルコイドーシスで血清CPK高値であれば本症を疑う。

6) 血管炎

腎臓はPNの代表的標的臓器として知られている。結節性動脈周囲炎 periarteritis nodosa(classical PN)とpANCA陽性のmicroscopic PAに分類され、前者では主として葉間動脈や弓状動脈が傷害され、後者では糸球体病変が主体となる。

血尿や蛋白尿等の異常検査所見を認める。腎血管造影や腎生検により診断される。治療はステロイド薬に加え、免疫抑制薬が投与される。

(高崎芳成)

文 献

- 1) 高崎芳成, 廣瀬俊一: 膠原病の肺所見. 肺と心 32: 50-59, 1985
- 2) 高崎芳成, 廣瀬俊一: 膠原病, 血管炎における肝障害. 日本臨床 46: 420-425, 1988
- 3) 高崎芳成: SLEの臨床評価法. Progress in Medicine 17: 3158-3165, 1997
- 4) 高崎芳成: 腎病変: 混合性結合組織病. 日内会誌 85: 1254-1258, 1996
- 5) 高崎芳成: 腎障害. 内科 78: 244-247, 1996

7. 筋肉性疾患の診断と治療

免疫関連筋肉疾患は炎症性筋肉疾患と神経・筋肉疾患に分けられる。前者には多発性筋炎/皮膚筋炎, その他の膠原病に伴う筋炎, 肉芽腫性筋炎があり, 後者には重症筋無力症がある。本項では多発性筋炎/皮膚筋炎, 重症筋無力症の診断, 治療について述べる。しかし免疫関連筋肉疾患あるいは炎症性筋肉疾患とはいえ, 筋力低下をきたす疾患はこれらの疾患以外に内分泌性, 感染症, 薬物中毒, 神経性, 代謝・栄養性, 腫瘍性, 蓄積症等の疾患との鑑別が必要である。

1. 多発性筋炎/皮膚筋炎

1) 診断

Wortmannは多発性筋炎 polymyositis(PM), 皮膚筋炎 dermatomyositis(DM)等のような特発性炎症性筋症は表 III-7-1 に示すような特徴をもっており, このうち4項目以上満たすものを definite, 3項目満たす場合を probable, 2項目の場合を possible としている。しかしこの診断基準は他の鑑別すべき疾患を除外する必要がある。我が国では厚生省特定疾患, 皮膚筋炎および多発性筋炎調査研究班による診断基準がある。DMは必然的に皮膚症状(ヘリオトロープ疹, Gottron疹等)が必須症状である。この皮膚症状を除けば両疾患とも主なる症状は筋症状である。

検査所見では血清筋原性酵素活性値, 筋電図所見, 筋生検所見が必要である。血清筋原性酵素活性値, 特に血清CPK値は種々なる条件で, すなわち外傷, 運動, 単なる注射, 麻酔薬の投与等,

表 III-7-1 Wortmannの炎症性筋炎の診断基準¹⁾

1. 対称性の体幹近位筋, および前頸筋の筋力低下(嚥下障害を伴うこともあり, 伴わないこともある)
2. 血清CPKの上昇
3. 筋電図では筋原性パターン
4. 筋生検では筋線維の壊死, 変性, 細胞浸潤を認める

表 III-7-2 骨格筋由来高CPK値をきたす疾患²⁾

- 高 度: 筋ジストロフィー, PM/DM, 悪性高熱症, 外傷, 末梢循環不全, 急性動脈閉塞
 中等度: 上記以外に, 痙攣, 甲状腺機能低下症
 軽 度: 上記以外に, 筋強直性ジストロフィー, 神経原性ミオパチー, 周期性四肢麻痺, 薬剤(β遮断薬, クロフィブラート), 麻酔薬(ハロタン, サクシニルコリン)

また進行性ジストロフィー, 甲状腺機能低下症, 心筋梗塞, 筋サルコイドーシス, 横紋筋融解症で上昇するので注意が必要である(表 III-7-2)。

抗Jo-1抗体はSLEや強皮症等の膠原病, また筋ジストロフィー, 重症筋無力症では検出されず, PMに特異的な抗体とされている。この抗体はヘリオトロープ皮疹やGottron徴候等の典型的なDMのないPMに陽性になるとされている。また抗Jo-1抗体陽性例は間質性肺炎を高率に合併するといわれている。抗Jo-1抗体の対応抗原はヒスチジルtRNA合成酵素であることがわかっている。

筋電図は血清CPK値と同様, 非特異的な検査で, 筋原性か神経原性かを鑑別できる程度である。short duration potential, low amplitude potentialが認められる(図 III-7-1)。筋電図は筋生検部位を決定する時に役立つ。すなわち, この疾患は左右対称性の筋肉が侵されるので, 一方の部位で異常があれば, 対照部の筋肉部位の生検を行うことができる。診断面からは筋生検が最も特異性が高い検査である。細胞浸潤, 筋線維変性(大小不同, 壊死), 筋外膜の結合組織増加等が認められる。

最近では, MRIによる画像診断の報告がある。炎症部位ではT₂画像にのみ強調画像が認められる。これに反し非炎症性の炎症性筋疾患ではT₁画像に強調画像が認められる。

これらの検査以外に症状が重要であることは言うまでもない。物干し, 頭髪をとくこと, 蹲踞姿勢の困難さ等の近位筋筋力低下(80%以上)が認められる。その他, 各筋力低下の頻度であるが, 下肢筋力低下91.7%, 上肢筋力低下83.3%, 顔面筋力低下11.7%, 頸筋力低下40%, 眼球運動障害1.7%, 嚥下筋力低下12%である。さらに, 多発性関節炎(23.3%), Raynaud症状(18.3%), 筋肉痛(23.3%)が認められ, その他肝腫, 脾腫, リンパ腫等も少数例に認められる。さらに, 四肢軟部組織の石灰沈着等の症状も認められる。

合併症, 特に悪性腫瘍には注意が必要である。すなわち, 50歳以上の男性症例では危険性が高い。1970年代の報告では, 肺癌29.2%(14.8%; PM/DM以外の頻度), 前立腺癌13.9%(12.0%), 胃癌12.5%(3.1%), 悪性リンパ腫9.7%(3.3%), 腎腫瘍6.9%(1.9%), 大腸癌5.5%(10.7%)で, PM/DMの発症頻

G1 and S-Phase Checkpoints, Chromosome Instability, and Cancer

Hiroshi Nojima

Summary

Mitogen-dependent progression through the first gap phase (G1) of the mammalian cell-division cycle is precisely regulated so that normal cell division is coordinated with cell growth, while the initiation of DNA synthesis (S phase) is precisely ordered to prevent inappropriate amplification of the DNA that may cause genome instability. To ensure that these fundamental requirements of cell division are met, cells have developed a surveillance mechanism based on an intricate network of protein kinase signaling pathways that lead to several different types of checkpoints. Since these checkpoints are central to the maintenance of the genomic integrity and basic viability of the cells, defects in these pathways may result in either tumorigenesis or apoptosis, depending on the severity and nature of the defects. This review summarizes the genetic and molecular mechanisms of checkpoint activation in the G1/S and S phases of the mammalian cell cycle that monitor DNA damage and replication. The relevance of these mechanisms to the origin of cancer is also discussed.

Key Words: Cell cycle; checkpoints; G1/S; DNA damage; chromosome; p53; MYC; CHK1; CHK2; ATM; ATR; pRB; E2F; p21; INK4a; CDK2; Cyclin E; Cyclin G; NBS1; MRE11; BRCA1; MDM2; ARF; Cdc25A.

1. Introduction

Eukaryotic cells have developed a complex network of cell cycle checkpoint pathways. These act as surveillance mechanisms that ensure the proper progression of the cell cycle after exposure to various environmental stresses or after the occurrence of spontaneous perturbations such as DNA damage and improper progression of DNA replication (1–4). These evolutionally conserved surveillance mechanisms ensure that DNA replication remains faithful, thus guaranteeing the transmission of an unaltered genome and promoting the survival of the cells. The checkpoint regulatory machineries that serve as the guardians of proper cell cycle progression fulfill four fundamental consecutive

From: *Methods in Molecular Biology*, vol. 280: *Checkpoint Controls and Cancer, Volume 1: Reviews and Model Systems*

Edited by: Axel H. Schönthal © Humana Press Inc., Totowa, NJ

tasks. First, upon stress, they rapidly induce cell cycle arrest or delay. They then help activate the mechanisms that repair damaged DNA or stalled replication. They also maintain the cell cycle arrest until repair is complete. At this point, they then actively re-initiate cell cycle progression. The cell cycle arrest that is induced and maintained by these checkpoints gives the cell time not only to repair the cellular damage but also to wait for the dissipation of an exogenous cellular stress signal or to probe the availability of essential growth factors, hormones, or nutrients.

The cell cycle checkpoints were initially defined as constituting a regulatory mechanism that acts to arrest the cell cycle in response to DNA damage, so that cell cycle progression and repair could be temporally coordinated (5,6). However, more recent work suggests that the checkpoints may play many more regulatory roles in various cellular events (6). Indeed, they are now believed to regulate the transcription of DNA damage response genes (7), the telomere length and chromatin structure (8), the recruitment of proteins to damage sites (2,3), the kinetochore attachment to spindle microtubules (9), the arrangement of the cytoskeleton (10,11), meiotic recombination (12,13), meiotic chromosome pairing and segregation (14), and the cell cycle timing in the first cell divisions of the embryo (15). Notably, the checkpoint signaling pathways can also result in the activation of programmed cell death if cellular damage cannot be properly repaired (16–19).

The stability of the genome is under constant threat from chemicals, radiation, and normal DNA metabolism. Therefore, if the checkpoints are not properly controlled, the cells may suffer potentially catastrophic DNA damage that can lead to elevated mutation rates, chromosome instability, and aneuploidy, all of which can contribute to tumorigenesis (20). Failure of the G1/S phase and S-phase checkpoints to act properly is particularly deleterious because it may directly elicit chromosomal aberrations and the accumulation of deleterious mutations, which increase the likelihood of the occurrence of genetic syndromes and diseases such as cancer (21,4). In this review, I will discuss the recent progress in the study of the mammalian checkpoints at the G1 and S phases that guard the entry into and the progression through the S phase and thereby ensure proper DNA replication. Occasionally studies on budding yeast, fission yeast, and other eukaryotes will be mentioned if their observations aid our understanding of mammalian checkpoint mechanisms. I will also focus on the evidence that supports the notion that aberrant checkpoint regulatory mechanisms may promote the incidence of DNA alterations that may lead to cancer.

2. Molecular Mechanism Controlling the G1/S Transition of Mammalian Cells

2.1. Factors Regulating G1 Phase of the Cell Cycle

2.1.1. G1 Phase CDK/Cyclin Complexes

The progression through the cell cycle is governed by the periodic activation and inactivation of cyclin-dependent kinase (CDK) complexes. The CDK proteins are Ser/Thr protein kinases, and their kinase activities are controlled by their association partners, which are called cyclins (22). The protein levels of the CDKs remain constant through the cell cycle, whereas the levels of the cyclins vary during the cell cycle, owing to periodic expression and degradation. The timely regulation of different CDK/cyclin complexes is responsible for well-organized cell cycle progression, as these complexes act in G1 to initiate S phase and in G2 to initiate mitosis. These mechanisms are conserved from yeast to mammals (23). The kinase activity of the CDKs is also tightly controlled by the binding of inhibitors and phosphorylation events.

In the middle of the cyclin proteins is a domain of well-conserved amino acid sequences called the *cyclin box*. While cyclins were originally characterized as being the regulatory subunit of CDK that is periodically expressed and degraded during the cell cycle (24), it was later found that many cyclins do not cycle and that they can regulate cellular functions other than the cell cycle (25). These include: cyclin G (26), which is a regulatory subunit of protein phosphatase 1A (27); cyclin H, which forms a complex with CDK7 that regulates not only other CDKs as a CDK-activating kinase (CAK) (28) but also transcription and DNA repair (29); cyclin L, which is a regulatory subunit of CDK11 and promotes pre-mRNA splicing (30); and cyclin T, which forms a complex with CDK9 and activates transcription by hyperphosphorylation of the carboxyl-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II (31).

Eleven CDK proteins (Cdc2 = CDK1, CDK2, . . . CDK11) have been discovered and examined in mammalian cells to date. Of these, CDK2, CDK3, CDK4, and CDK6 are principally responsible for G1 progression and entry into S phase. CDK4 and CDK6 are activated in mid G1, whereas CDK2 is activated in late G1. While CDK4 and CDK6 are co-expressed in many cell types, CDK6 does not fully compensate for the function of CDK4 in most cells (32,33). The CDK4/cyclin D and CDK 6/cyclin D complexes play pivotal roles in early to mid G1, whereas CDK2/cyclin E and possibly CDK2/cyclin A function at the late stage of G1 (22). These cyclins are comprehensively termed

the G1 cyclins (34). Three types of cyclin Ds (D1, D2, and D3) have been identified, each of which functions as a regulatory subunit of either CDK4 or CDK6 (35). In mid G1 phase, the CDK4/cyclin D complexes phosphorylate the pRB (retinoblastoma) family of nuclear phosphoproteins (*see Subheading 2.1.4.*), which are the key regulators of the G1/S transition (36), whereas CDK2/cyclin A and CDK2/cyclin E phosphorylate pRB at the G1 to S transition (34,37).

When quiescent cells enter the cell cycle owing to mitogenic signals, the expression of the cyclin Ds is induced and the CDK4/cyclin D and CDK6/cyclin D complexes are formed as the cells progress through the G1 phase (38). The kinase activity of the complexes is then activated when they enter the cell nucleus and are phosphorylated by CAK. This allows the complexes to phosphorylate target proteins such as pRBs (39,38). Thus, the cyclin D protein types play a pivotal role in G1 by transmitting the mitogenic signal to the pRB/E2F pathway. Notably, cyclin D1 also seems to play a CDK-independent role as a modulator of transcription factors because it interacts with histone acetylases and components of the transcriptional machinery. The cyclin D1-deficient mouse is viable but does have developmental abnormalities that are limited to restricted tissues (38). Proteasomal degradation of cyclin D1 is triggered by its phosphorylation on a single threonine residue (Thr-286) by glycogen synthase kinase-3 β (40).

Cyclin E, which regulates CDK2 and possibly also CDK3, is expressed in late G1 and early S phase (34). The level of cyclin E is abruptly decreased by proteolysis after polyubiquitination mediated by SCF (Skp2) ubiquitin ligase (41). Cyclin E regulates the initiation of DNA replication by phosphorylating components of the DNA replication machinery (39). The CDK2/cyclin E complex also triggers the duplication of centrosomes at G1/S phase by phosphorylating the multifunctional protein nucleophosmin (also known as B23) (42,43). CDK2/cyclin E also targets NPAT (nuclear protein mapped to the AT locus) as a phosphorylation substrate, which may explain why CDK activity is linked to the periodic synthesis of histones (44–46).

Cyclin A can activate two different CDKs and functions in both S phase and mitosis (47). Cyclin A starts to accumulate during S phase and is abruptly destroyed before metaphase. The synthesis of cyclin A is mainly controlled at the transcription level and involves E2F and other transcription factors. It is still unknown why CDK2/cyclin A and CDK2/cyclin E complexes are both required for the initiation of DNA replication and why their order of activation is tightly regulated. Using a cell-free system, it has been shown that cyclin E stimulates replication complex assembly by cooperating with Cdc6, a regulator of the initiation of DNA replication, whereas cyclin A has dual functions: first, it activates DNA synthesis by the replication complexes that are already as-

sembled, and second, it inhibits the assembly of new complexes (48). This regulatory mechanism allows cyclin E to promote replication complex assembly while cyclin A blocks this assembly. Thus, the dual functions of cyclin A ensure that the assembly phase (G1) ends before DNA synthesis (S) begins, thereby preventing re-initiation until the next cell cycle.

2.1.2. INK4 Family of CDK Inhibitors

CDK activity is negatively controlled by association with CDK inhibitors (CKIs), which inactivate CDK/cyclin complexes and thereby cause growth arrest (39,17). CKIs are grouped into either the INK4 (inhibitors of CDK4) family or the CIP/KIP family based on their structure and which CDK they target. There are four INK4 CKIs and three CIP/KIP CKIs (see Subheading 2.1.3.). The first class of inhibitors includes the INK4 proteins, which specifically inhibit CDK4/cyclin D1-associated kinase activity and are therefore specific for early G1 phase (49). Four such proteins have been identified: p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c}, and p19^{INK4d} (39). These INK4 CKIs compete with cyclin D for binding to CDK4 and consequently cause CDK4/cyclin D complexes to dissociate. Note that the major portion of these molecules is composed of four (p16^{INK4a} and p15^{INK4b}) or five (p18^{INK4c} and p19^{INK4d}) tandem ankyrin (ANK) repeats (Fig. 1). This 33-residue repeat was first discovered in ANK, a membrane protein of red cells. Later this motif was found in a wide variety of proteins (50). The beta hairpin helix-loop-helix folds formed by the multiple tandem ANK repeats stack in a linear manner to produce an elongated structure that is considered to be involved in macromolecular recognition. p16^{INK4a}, which consists of four ANK repeats (Fig. 1), represents the minimal ANK folding unit (51).

Of these CKIs, only the p16^{INK4a} gene (also known as major tumor suppressor 1 or *MTS-1*) has been classified as a tumor suppressor by the genetic criteria of loss of heterozygosity (LOH) (49). Unlike other tumor suppressor genes, *p16* is often silenced by homozygous deletions at the p16^{INK4a} locus (9p21) that also often inactivate two other important genes nearby, namely *p15INK4b* and *p14ARF* (see Subheading 2.3.).

2.1.3. CIP/KIP Family of CDK Inhibitors

The second family of CDK inhibitors is composed of the more broadly acting CIP/KIP proteins, such as p21^{CIP1/WAF1}, p27^{KIP1}, and p57^{KIP2}, which inhibit the activities of cyclin D-, E-, and A-dependent kinases and induce cell cycle arrest (39). Thus, these CKIs are not specific for a particular phase of the cell cycle. Unlike the INK4 proteins, the CIP/KIP proteins associate with the CDK-cyclin complexes and thus do not dissociate these complexes (39,52). The CIP/KIP proteins share a homologous domain at their N-termini that is believed to

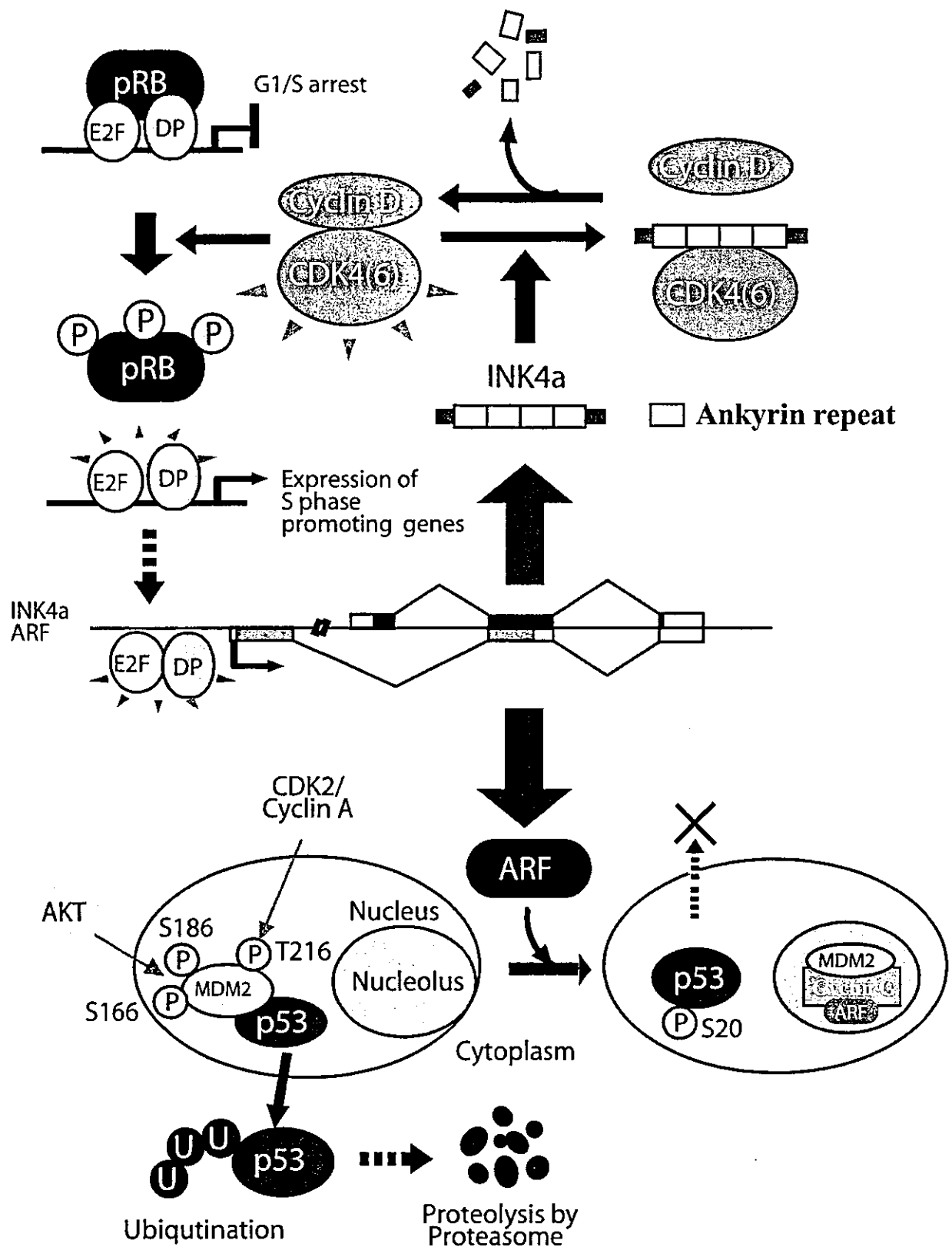


Fig. 1. The *INK4a/ARF* locus encodes p16^{INK4a} and p19^{ARF}, two degenerated tumor suppressor proteins. Absence of p16^{INK4a} (composed of ANK) activates CDK4(6)/cyclin D kinase, which phosphorylates pRB, thereby activating the E2F/DP1 transcription factor. Since the transcription of the *ARF* gene is regulated by E2F, expression of ARF is induced. ARF separates MDM2 from p53 by recruiting MDM2 into the nucleolus, possibly in collaboration with cyclin G1 and cyclin G2. This stabilizes p53 in the nucleus and allows it to activate the expression of the target genes that function in cell cycle checkpoint, DNA repair, and apoptosis. Thus, the *INK4a/ARF* locus influences both the pRB-E2F and p53 pathways.

participate in the CKI role of these proteins. This amino-terminal domain contains characteristic motifs that are used for binding to both the CDK and cyclin subunits. This association of CIP/KIP proteins with CDK/cyclin complexes has an inhibitory effect. For example, it inhibits CDK2 activity by preventing its Thr-160 phosphorylation by CAK.

p21^{WAF1} was discovered almost simultaneously by several studies, each of which employed different approaches. It was discovered as a CDK2-associated protein by a two-hybrid system (53), as a senescent cell-derived inhibitor (Sdi1) of cellular growth (54), as a potential mediator of p53 tumor suppression that was named wild-type p53-activated fragment (WAF1) (55), and as a biochemically isolated CDK2/cyclin-binding protein (56). Transcription of the *p21WAF1* gene can be induced by the tumor suppressor p53 (55), by the antimitogenic cytokine transforming growth factor (TGF)- β (57), and by the phorbol ester tetradecanoyl-phorbol acetate (TPA), which is a protein kinase C activator (58).

Apart from their role as CDK inhibitors, the CIP/KIP proteins may also act to bridge the bond between CDK4 (or CDK6) and cyclin D protein types (but not other CDKs or cyclins), thereby enhancing this association and promoting the recruitment of the CDK/cyclin D complexes to the nucleus (52,59,60). A fact supporting this notion is that mouse fibroblasts that lack both p21^{WAF1} and p27^{KIP1} are unable to assemble detectable amounts of CDK/cyclin D complexes, and fail to efficiently direct cyclin D proteins into the nucleus (61). These effects were reversed by returning the CKIs to these cells. Thus, unlike the INK4 family proteins, the CIP/KIP CKIs promote the formation of CDK4/cyclin D complexes (62).

In the nucleus, p21^{WAF1} binds to proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and blocks DNA replication (63–65). p21^{WAF1} may also regulate the transcription of the genes involved in growth arrest, senescence, aging, or apoptosis after DNA damage (52).

2.1.4. Retinoblastoma Family of Proteins and E2F

The tumor suppressor pRB is the protein product of the retinoblastoma (Rb) susceptibility gene that is required for the arrest in the G1 phase of the cell cycle (66,67). pRB, and the related p107 and p130 proteins, share structural and functional properties and interact with a number of common cellular targets. Consequently, they form together the “pocket protein family” (36,68) (Fig. 1). They function as transcriptional repressors in the nucleus and inhibit the activity of the E2F (early gene 2 factor) transcription factor that regulates the expression of the many genes required for S phase entry and DNA synthesis (69). Although the pRB proteins do not interact directly with DNA, they repress E2F-regulated genes in two ways. First, they directly bind to the transactivation domain of E2F proteins to repress their transcriptional activity.

Second, they recruit chromatin remodeling enzymes such as histone deacetylases (HDACs) or methyl transferases to the nearby surrounding nucleosome structure (46,70).

In the early G1 phase, pRBs are not phosphorylated and can associate with more than eighty proteins, including the E2F family of transcription factors. As G1 progresses, however, the pRB proteins become phosphorylated on multiple serine and threonine residues, primarily by the CDK4/cyclin D or CDK6/cyclin D complexes, but also partly by CDK2/cyclin E (71). This hyperphosphorylation inactivates the pRB proteins and causes them to release their cargo proteins, which activates the cargo proteins and allows them to mediate the events that are required for further cell cycle progression (39,72). The phosphorylation of pRB by the CDK4(6)/cyclin D complexes releases histone deacetylase, which alleviates transcriptional repression, whereas the phosphorylation by CDK2/cyclin E disrupts the pocket domain of pRB, causing the pRB–E2F complex to dissociate (73). Recently, it was suggested that the acetylation of pRB proteins may also influence their activity (74).

The E2F transcription factor was first identified as a transcriptional activity that influences the adenovirus E2 gene promoter (75). The family of E2F-related proteins include E2F1–E2F6. These proteins have conserved DNA-binding and dimerization domains, and three heterodimeric partners, namely DP1, DP2, and DP3 (76,77). Of the six E2Fs, E2F6 is exceptional in that it lacks the domains required for transactivation and pRB binding that are normally in the E2F carboxy-termini. E2F6 appears to play a pRB-independent role in gene silencing and modulation of G0 phase (78,79). Recent studies have expanded the roles that are played by the E2F family of transcription factors. It now appears that apart from being transcriptional regulators of genes involved in DNA metabolism and DNA synthesis, these proteins also seem to play contrasting roles in transcriptional activation and repression, proliferation and apoptosis, tumor suppression and oncogenesis, and possibly differentiation and DNA repair (66,69,76,80,81).

2.1.5. *Cdc25A Phosphatase*

Cdc25, a dual-specificity phosphatase, removes inhibitory phosphates from the tyrosine and threonine residues of CDKs and thereby promotes cell cycle progression (82). Three Cdc25 homologs, namely Cdc25A, Cdc25B, and Cdc25C, have been identified in mammalian cells. Cdc25C promotes the G2/M transition by activating CDK1 (Cdc2), whereas Cdc25B is proposed to act as a “starter phosphatase” that initiates the positive feedback loop at the entry into M phase (83,84). In contrast, Cdc25A plays an important role in the G1/S transition (85). Overexpression of Cdc25A activates CDK2/cyclin E or CDK2/cyclin A by inducing CDK2 tyrosine dephosphorylation. The activated CDK2/

cyclin complexes then abrogate checkpoint-induced arrest in S phase (86,104,199). Without Cdc25A activity, the inhibitory tyrosine phosphorylation of CDK2 would persist, which would maintain the block of entry into S phase and DNA replication. Cdc25A and Cdc25B (but not Cdc25C) are potential human oncogenes that have been found to be overexpressed in a subset of aggressive human cancers (87,88).

To activate the protein kinase activity of CDK2, it must be phosphorylated on Thr-160 but not on Thr-14 and Tyr-15 (89). A multi-subunit enzyme CAK, which consists of cyclin H and CDK7, phosphorylates CDK2 on Thr-160 (90,91), whereas the KAP phosphatase dephosphorylates Thr-160 in the absence of cyclin, thereby rendering CDK2 inactive (92). CDK2 is phosphorylated on Thr-14 and Tyr-15 by Wee1/Mik1-related protein kinases, whereas the Tyr-15 residue and possibly also the Thr-14 residue are dephosphorylated by Cdc25A (93). Thus, downregulation of Cdc25A leads to growth arrest in late G1 (94). Transcription of the *cdc25A* gene is inhibited by the E2F-4/p130 complex, which recruits histone deacetylase to the E2F site of the *cdc25A* promoter in response to TGF- β (95).

As a cellular response to ultraviolet light (UV)-induced DNA damage, Cdc25A is highly degraded by ubiquitin- and proteasome-dependent proteolysis (96). The same degradation also occurs after hydroxyurea (HU)-triggered stalling of replication forks (97) as well as during the midblastula transition in *Xenopus* embryos under physiological conditions (98). Following DNA damage, Cdc25A is phosphorylated by checkpoint kinase 1 (CHK1) or checkpoint kinase 2 (CHK2) (Fig. 2B). This phosphorylation is recognized as a tag by the proteolysis system and Cdc25A is degraded. Thus, CHK1 or CHK2 induces the G1/S phase checkpoint by phosphorylating Cdc25A (see Subheading 4.2.). Supporting this is the finding that the elimination of CHK1 expression through the use of siRNA not only abrogated the S or G2 arrest, it also protected Cdc25A from degradation(88). During the basal turnover in unperturbed S phase, CHK1 phosphorylates serines 75, 123, 178, 278, and 292 of Cdc25A. In contrast, ionizing radiation (IR)-induced Cdc25A proteolysis is mediated by a combined action of CHK1 and CHK2. Thus, a CHK1-CHK2 inhibitor may be useful in cancer chemotherapy, as it may potentiate the cytotoxicity caused not only by DNA-damaging drugs that induce G2 arrest but also by agents that promote S arrest (99,100).

2.1.6. Myc

The *c-myc* protooncogene is a pivotal regulator of cellular proliferation, growth, differentiation, and apoptosis (101). The Myc family proteins (Myc, N-Myc, and L-Myc) are transcription factors with basic helix-loop-helix leucine zipper protein (bHLH-ZIP) motifs that bind to the DNA sequence