

Table 2. Characteristics of the subjects received CFLA

No.	Gender	Age	Type	Corticosteroid	Immunomodulator	CRP, mg/l	CAI
1	Male	37	pancolitis	yes	yes	29.0	15
2	Female	40	left-sided	yes	no	5.0	9
3	Male	18	left-sided	yes	no	<2.0	7
4	Male	16	pancolitis	yes	no	25.0	7
5	Male	46	left-sided	yes	no	12.0	9
6	Female	67	pancolitis	yes	yes	<2.0	8
7	Male	42	pancolitis	yes	yes	<2.0	13
8*	Female	43	left-sided	yes	no	116.5	15

*CAI score was increased after centrifugal leukocytapheresis (CFLA).

RESULTS

GRAIL, Itch, and c-Cbl mRNA and protein expression are upregulated in human anergic CD4⁺ T cells. Human CD4⁺ T cells freshly isolated from HV were cultured in the anergic or activated condition, and mRNA expression of these E3 ubiquitin ligases was analyzed. The calcium ionophore ionomycin has previously been used to mimic early events in the induction of T cell anergy (10, 16). The mRNA levels of the E3 ubiquitin ligases (GRAIL, Itch, and c-Cbl) were significantly higher in the ionomycin-treated CD4⁺ T cells than in the nontreated cells (Fig. 1A). In addition, protein expression of these E3 ubiquitin ligases in ionomycin-treated cells was upregulated compared with untreated cells, as determined by Western immunoblotting (Fig. 1B). The anergic state was confirmed by proliferation assay; the CD4⁺ T cells cultured in vitro with ionomycin showed significantly lower proliferation rates than the nontreated cells (Fig. 1C). Alternatively, T cell anergy can be induced by stimulation with anti-CD3 mAb in the absence of anti-CD28 mAb stimulation, whereas T cells are activated by the costimulation with anti-CD3 mAb and anti-CD28 mAb (25). Under anergic conditions (induced by anti-CD3 mAb treatment alone), GRAIL mRNA expression in human T cells was significantly higher than that of cells costimulated with

anti-CD3 mAb and anti-CD28 mAb ($P < 0.05$, data not shown).

Expression of GRAIL, Itch, and c-Cbl in CD4⁺ T cell subsets. To determine the cell types that express GRAIL, Itch, and c-Cbl in human PBMCs of HV, we isolated CD4⁺ T cells from PBMCs and compared the expression of the E3 ligases in CD4⁺ T cells and CD4⁻ cells. GRAIL was more highly expressed on CD4⁺ T cells than on CD4⁻ cells ($P < 0.05$, Fig. 2A). However, the levels of Itch and c-Cbl mRNA were not higher in CD4⁺ T cells than in CD4⁻ cells (Fig. 2A). Because GRAIL was highly expressed in CD4⁺ T cells, we analyzed the expression of GRAIL in memory/naïve and regulatory/non-regulatory T cell subsets of CD4⁺ T cells. However, there were no significant differences in the levels of GRAIL mRNA expression between the naïve CD4⁺CD45RA⁺ T cell subset and the memory CD4⁺CD45RO⁺ T cell subset (Fig. 2B). In contrast, the expression of Itch and c-Cbl in naïve CD4⁺CD45RA⁺ T cells was significantly higher than that in memory CD4⁺CD45RO⁺ T cells. Because murine regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells are reported to be anergic (28), the level of GRAIL mRNA in human peripheral CD4⁺CD25⁺ T cells was examined and compared with that in CD4⁺CD25⁻ T cells. However, there was no significant difference in the level of GRAIL expression between these two subsets (Fig. 2C). The expression of Itch and c-Cbl also revealed no significant difference between the two subsets.

Patients with UC in remission express high levels of GRAIL mRNA. We next analyzed the expression of GRAIL, Itch, and c-Cbl mRNA in human CD4⁺ T cells isolated from patients with UC. The patients' profile and disease characteristics are presented in Table 1. When we compared the levels of GRAIL, Itch, and c-Cbl expression between all UC patients (both active and in remission) and HV, we found no significant differences in the levels of E3 ligases between the two groups (data not shown). However, the level of GRAIL expression was significantly higher in UC patients in remission than in HV (median 1.25 AU vs. 0.23 AU, $P = 0.0021$, Fig. 3A). In addition,

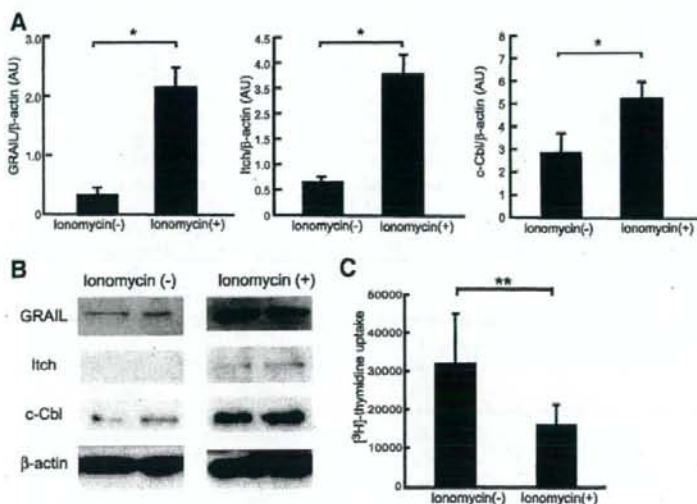


Fig. 1. E3 ligase is expressed on anergic human T cells. CD4⁺ T cells obtained from peripheral blood of healthy volunteers (HV) were cultured with the calcium ionophore ionomycin. A: mRNA levels of gene related to anergy in lymphocyte (GRAIL, Itch, and c-Cbl) were analyzed by real-time RT-PCR. Data are presented as the arbitrary units (AU) of GRAIL, Itch, and c-Cbl normalized to β -actin. GRAIL expression in ionomycin-treated T cells (+) was significantly higher ($*P < 0.05$) than in nontreated T cells (-) ($n = 5-10$). B: expression of GRAIL, Itch, and c-Cbl protein was analyzed by Western immunoblot analysis. Representative images are shown. C: cellular proliferation of ionomycin-treated cells was analyzed by [³H]thymidine uptake. [³H]thymidine uptake of the cells without ionomycin treatment was significantly higher than in ionomycin-treated cells ($**P < 0.01$).

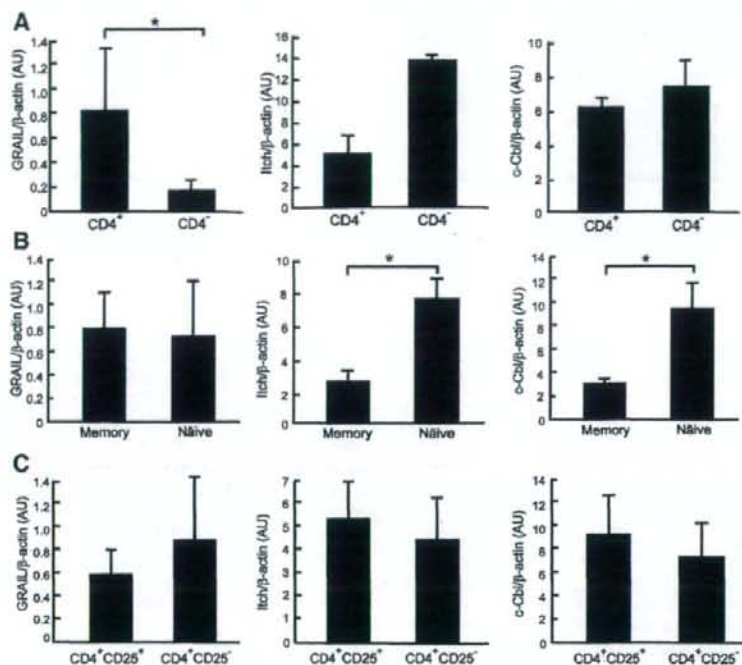


Fig. 2. E3 ligase expression in subsets of peripheral blood T cells. **A:** quantitative real-time PCR analysis of GRAIL, Itch, and c-Cbl expression in purified CD4⁺ T cells and CD4⁻ cells freshly isolated from peripheral blood of HV ($n = 6$). **B:** quantitative real-time PCR analysis of GRAIL, Itch, and c-Cbl expression in CD4⁺CD45RO⁺ memory and CD4⁺CD45RO⁻ naive T cells ($n = 5$). **C:** quantitative real-time PCR analysis of GRAIL, Itch, and c-Cbl expression in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and CD4⁺CD25⁻ nonregulatory T cells of HV ($n = 4$). Data are presented as the AU of GRAIL, Itch, and c-Cbl normalized to β -actin. The statistical significance was determined by Mann-Whitney U -test. * $P < 0.05$.

GRAIL expression was significantly higher in patients with UC in remission than in patients with active UC (median 1.25 AU vs. 0.16 AU, $P = 0.0015$). The levels of GRAIL expression in patients with active UC were similar to those of HV. Although there was a trend toward increased levels of Itch and c-Cbl expressions in patients in remission compared with other groups, there were no significant differences in the levels of Itch and c-Cbl mRNA among the three groups (Fig. 3A).

The correlation between the level of GRAIL expression and extension of the disease in patients with UC was analyzed further. GRAIL expression was relatively lower in patients with pancolitis than in patients with left-sided colitis, but the results were not statistically significant (Fig. 3B). Although we analyzed the correlation between the level of GRAIL expression and severity of UC, GRAIL expression did not correlate with CAI (data not shown).

CAI scores, GRAIL expression, and T cell subsets at the initial and final CFLA. We next analyzed GRAIL mRNA expression during treatment of UC. Eight patients with active UC were treated with prednisolone (initial dose was 40–80 mg/day) and CFLA (once per wk) for 4–5 wk. In these eight patients, CAI scores at the final CFLA were significantly decreased compared with the scores at the first CFLA (Fig. 4A, $P < 0.05$). In these patients, the levels of GRAIL mRNA expression were not significantly different between the samples obtained at the first and the final CFLA (Fig. 4B). However, when a patient who did not respond to the treatment (\circ in Fig. 4, A and B) was eliminated from the analysis, the levels of GRAIL mRNA expression were significantly higher in CD4⁺ T cells obtained at the final CFLA (average 1.22 AU) than in

those obtained at the first CFLA (average 0.98 AU) in patients who responded to the treatment (\bullet in Fig. 4, A and B, $P < 0.05$). In a patient whose CAI increased despite treatment, GRAIL expression was decreased after the treatment (\circ in Fig. 4, A and B).

It has been reported that $\sim 10^9$ cells can be eliminated from the blood circulation in each CFLA session (3), and there is a possibility that change of GRAIL expression is induced by alteration of cellular population by CFLA. Because CD4⁺ T cells express higher levels of GRAIL compared with CD4⁻ cells (Fig. 2A), it is possible that increase of the CD4⁺ T cell population in the peripheral blood corresponds with the elevation of GRAIL after CFLA. However, the proportion of CD4⁺ T cells obtained in the buffy coat was not significantly different between the first and the final CFLA (Fig. 4C). During analysis of the surface markers of buffy coat cells, we found that the proportion of naive T cells was significantly increased and the proportion of memory T cells was significantly decreased after the treatment ($P < 0.05$, Fig. 4, D and E). However, the levels of GRAIL mRNA expression were not different between memory and naive CD4⁺ T cells, as shown in Fig. 2A. It is also possible that regulatory T cells (Tregs) were increased and contribute to the improvement of CAI scores by CFLA. However, there was no significant difference in the proportion of regulatory CD4⁺CD25^{high} T cells between the first and the final CFLA (Fig. 4F).

GRAIL expression and duration of maintaining remission in UC after the treatment by CFLA. One may suspect that GRAIL expression is not only driving but also maintaining remission in UC. We therefore examined the GRAIL expression and the

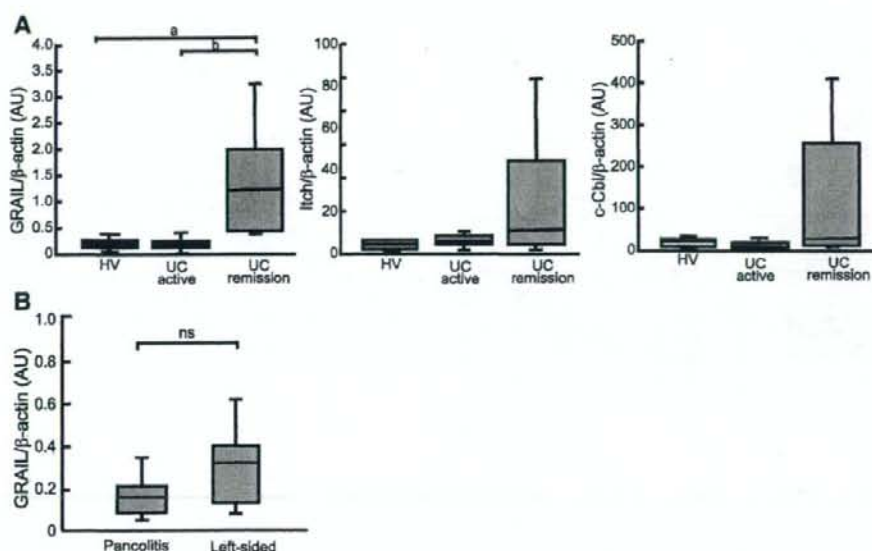


Fig. 3. E3 ligase expression in peripheral CD4⁺ cells. *A*: levels of GRAIL, Itch, and c-Cbl mRNA in CD4⁺ cells from the patients with active ulcerative colitis (UC), UC in remission, and HV were compared by quantitative real-time PCR. The expression of GRAIL in the patients with UC who maintained remission was significantly higher ($^*P = 0.0021$; $^bP = 0.0015$) than in patients with active UC or in HV. *B*: level of GRAIL expression in patients with active UC was analyzed according to disease extension. No significant difference was detected in the level of GRAIL expression between patients with pancolitis and those with left-sided disease (ns, not significant). The statistical significance of the difference between the medians was determined by the Mann-Whitney *U*-test.

duration of remission in the patients with UC after the treatment by CFLA. GRAIL expression was relatively higher in those who maintained long-term remission than those who encountered early relapse, although not statistically significant (Fig. 5). The average of GRAIL expression levels was 0.18 AU in patients who maintained remission less than 6 mo and was 1.95 AU in patients who maintained remission more than 6 mo.

DISCUSSION

Induction of clonal anergy in T cells is associated with global defects in T cell receptor (TCR) signaling, including reduced phosphorylation of TCR- ξ and - ϵ chains, poor activation of p56^{lck}, 70-kDa zeta-associated protein (Zap70), Ras, c-JNK, ERK, and defective transactivation at the *IL2* gene by NF- κ B, activating protein 1 (AP-1), and NF-AT(19). E3 ubiquitin ligases, such as GRAIL, Itch, and c-Cbl, have been shown to be involved in the process of T cell anergy in animals (1, 19, 24). In this study, we found that GRAIL, Itch, and c-Cbl mRNA and protein were highly expressed on anergic human CD4⁺ T cells. These E3 ubiquitin ligases appear to reflect the status of T cell anergy not only in mice but also in human CD4⁺ T cells. We found that GRAIL is dominantly expressed in CD4⁺ T cell subsets, whereas Itch and c-Cbl are also expressed in CD4⁺ cells. Recently, Jagged-1-induced Notch signaling in human CD4⁺ T cells has been shown to be associated with upregulation of GRAIL, but not with expression of Itch or c-Cbl (12). In addition, the expression pattern on naive and memory T cells was different among GRAIL, Itch, and c-Cbl. These results suggest that the expression of these different E3 ligases is regulated differently among the T cell subsets.

We demonstrated that GRAIL expression in CD4⁺ T cells of patients with UC in remission was significantly higher than that in patients with active UC or in HV (Fig. 3A). Because the anergic CD4⁺ T cells express high levels of GRAIL (Fig. 1), it is possible that patients in remission have more profoundly anergic CD4⁺ T cells than do patients with active UC or HV. In addition, because the level of GRAIL expression was not significantly different regardless of the inflamed location (Fig. 3B) or activity of UC, low GRAIL expression is suggested to be involved even in the mild inflammation of UC. The expression of Itch and c-Cbl in UC patients in remission was relatively higher than in patients with active UC and in HV; this result further supports the involvement of anergy in the remission of UC. It was difficult to evaluate the status of T cell anergy in patients with UC because the antigen(s) responsible for the induction of inflammation in UC is (are) unknown. However, our data, in addition to other previous information about E3 ligases (1, 19), suggest that analyzing the E3 ubiquitin ligases will provide information about T cell anergic status. In addition to the driving property of GRAIL to remission of UC, GRAIL might be important for maintaining remission of UC. Considering clinical relevance of maintaining remission in UC, we further examined GRAIL level and duration of the remission in the patients treated with CFLA. Although the number of the subjects was limited to confirm this hypothesis, the expression of GRAIL was relatively higher in UC patients who maintained long-term remission than those who encountered early relapse. These preliminary results suggest the association of GRAIL with remission of UC, which remained to be investigated in further study involving the larger number of patients with UC.

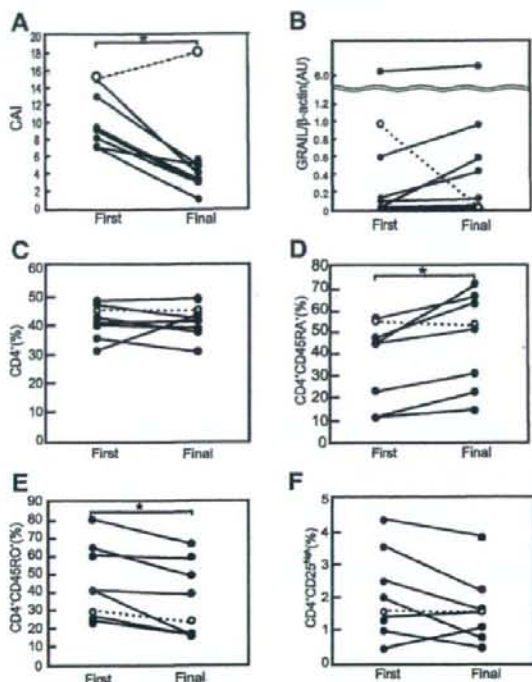


Fig. 4. Changes in clinical activity index (CAI), GRAIL, and other surface markers at the initial and the final treatment. A: CAI was evaluated at the initial and final centrifugal leukocytapheresis (CFLA). B: mRNA levels of GRAIL in CD4⁺ T cells isolated during the initial and the final CFLA were determined by quantitative RT-PCR. Flow cytometry was performed for CD4⁺ T cells (C), CD45RA⁺ naive T cells (D), CD45RO⁺ memory T cells (E), and regulatory CD4⁺CD25^{high} T cells (F). The ○ corresponds with Case No.8 in Table 2 who did not respond with CFLA. The statistical significance of the differences between the means was determined by the Wilcoxon signed-rank test. **P* < 0.05; bars indicate means ± SE of the mean.

It is also necessary to analyze the expression of the E3 ligases in the colonic mucosa to further clarify the roles of the E3 ligases in the mucosal T cell anergy. However, we could not detect the E3 ligase mRNA expressions either from intestinal biopsy samples or from peripheral blood samples from patients with Crohn's disease by the conventional method. Evaluation of the E3 ligases in the mucosa and blood samples of Crohn's disease by modified methods is ongoing.

It was expected that CD4⁺ T cells of HV show higher levels of anergic status than that of patients with active UC. However, in this study, GRAIL expression in CD4⁺ T cells of HV was not significantly higher than that of patients with active UC. One potential explanation is that HV do not encounter anergic or pathogenic stimulation from the environment. The exact mechanisms regulating the expression levels of the E3 ligases are unknown and need further investigation.

In addition to the observation of high GRAIL expression in patients with UC in remission, GRAIL expression was significantly increased after treatment in patients with active UC whose CAI scores improved after treatment with CFLA and

prednisolone. Previous reports demonstrated that the number of memory CD4⁺CD45RO⁺ T cells of patients with UC decreases after leukocytapheresis with the use of a leukocyte removal filter (2). We obtained similar results showing a significant decrease in memory CD4⁺CD45RO⁺ T cells and significant increase in naive CD4⁺CD45RA⁺ T cells at the final CFLA compared with the initial CFLA (Fig. 4, D and E). However, we observed no significant difference in the expression of GRAIL between memory and naive CD4⁺ T cells. It is also reported, in patients with IBD, CD4⁺CD25^{high} Tregs increase during remission but decrease during active disease (18). Therefore, it was speculated that Tregs were attributed for decrease in the CAI scores after the CFLA. However, we found that the percentages of CD4⁺CD25^{high} T cells before and after CFLA were not significantly different. In addition, GRAIL expression was not significantly different between CD4⁺CD25⁺ T cells and CD4⁺CD25⁻ T cells. These results suggest that GRAIL expression increased in patients with UC independently of the proportion of naive, memory, and Tregs.

We also found some differences in the expression of the E3 ligases between humans and mice. High GRAIL expression was reported for murine CD4⁺CD25⁺ T cells (17). However, our observations indicate that GRAIL expression in human CD4⁺CD25⁺ T cells was not higher than that in CD4⁺CD25⁻ T cells (Fig. 2C). In human CD4⁺ T cells, there was no significant difference in the levels of GRAIL expression between naive and memory CD4⁺ T cell subsets (Fig. 2B). In contrast, GRAIL expression in murine memory CD4⁺ T cells was significantly higher than that in naive CD4⁺ T cells (S. Egawa, unpublished observations). The E3 ligase expression variations could be caused by species-specific differences or by differences in antigen exposure between humans and mice, since mice used for experimentation are exposed to a limited number of antigens in pathogen-free animal facilities.

Our present study demonstrated that GRAIL was upregulated in human CD4⁺ T cells following the induction of anergy in vitro, and GRAIL expression was enhanced in patients with remission stage of UC compared with patients with active disease. Previous basic research has shown that the anergic phenotype can be obtained by introducing GRAIL into murine T cells (27), indicating that GRAIL is not only a marker for T

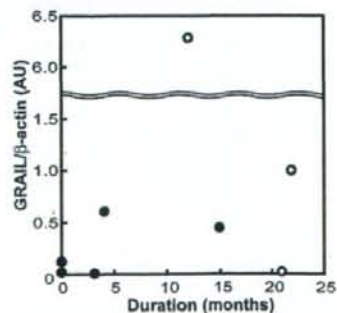


Fig. 5. Correlation of GRAIL expression and duration of maintaining remission. The duration of maintaining remission in patients with UC after the treatment by CFLA was determined. ○, patients who continued to maintain remission at the time of the analysis; ●, patients who relapsed before the analysis.

cell anergy but also plays a key role in inducing anergy in CD4⁺ T cells. Taken together, GRAIL is suggested to be useful to reflect the status of human T cell anergy in UC and also to be a potential therapeutic target of UC.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Drs. Katsuhisa Noda, Yasukazu Goto, Hiroshi Aketa, Masako Sato, Takatoshi Nawa, Kumiko Morikawa, and Maiko Murata for helping to collect materials in the Osaka Rosai Hospital. We thank the members of Blood Dialysis Center in Osaka University Hospital for their kind help.

GRANTS

This work was supported by Grant in Aid from the Japan Society for the Promotion of Science (Grant no. 19590721).

REFERENCES

- Anandasabapathy N, Ford GS, Bloom D, Holness C, Paragas V, Serogy C, Skrenta H, Hollenhorst M, Fathman CG, Soares L. GRAIL: an E3 ubiquitin ligase that inhibits cytokine gene transcription is expressed in anergic CD4⁺ T cells. *Immunity* 18: 535–547, 2003.
- Andoh A, Tsujikawa T, Inatomi O, Deguchi Y, Sasaki M, Obata H, Mitsuyma K, Fujiyama Y. Leukocytapheresis therapy modulates circulating T cell subsets in patients with ulcerative colitis. *Ther Apher Dial* 9: 270–276, 2005.
- Ayabe T, Ashida T, Kohgo Y. Centrifugal leukocyte apheresis for ulcerative colitis. *Ther Apher* 2: 125–128, 1998.
- Blumberg RS, Saubermann LJ, Strober W. Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease. *Curr Opin Immunol* 11: 648–656, 1999.
- Boussiotis VA, Freeman GJ, Berezovskaya A, Barber DL, Nadler LM. Maintenance of human T cell anergy: blocking of IL-2 gene transcription by activated Rap1. *Science* 278: 124–128, 1997.
- Duchmann R, May E, Heike M, Knolle P, Neurath M, Meyer zum Buschenfelde KH. T cell specificity and cross reactivity towards enterobacteria, bacteroides, bifidobacterium, and antigens from resident intestinal flora in humans. *Gut* 44: 812–818, 1999.
- Elson CO, Cong Y, McCracken VJ, Dimmitt RA, Lorenz RG, Weaver CT. Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunity* 20: 260–276, 2005.
- Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance. *Immunity* 20: 232–259, 2005.
- Hustad CM, Perry WL, Siracusa LD, Rasberry C, Cobb L, Cattanaeh BM, Kovatch R, Copeland NG, Jenkins NA. Molecular genetic characterization of six recessive viable alleles of the mouse agouti locus. *Genetics* 140: 255–265, 1995.
- Jenkins MK, Pardoll DM, Mizoguchi J, Chused TM, Schwartz RH. Molecular events in the induction of a nonresponsive state in interleukin 2-producing helper T-lymphocyte clones. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 5409–5413, 1987.
- Knoflach P, Park BH, Cunningham R, Weiser MM, Albini B. Serum antibodies to cow's milk proteins in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterology* 92: 479–485, 1987.
- Kostianovsky AM, Maier LM, Baecher-Allan C, Anderson AC, Anderson DE. Up-regulation of gene related to anergy in lymphocytes is associated with Notch-mediated human T cell suppression. *J Immunol* 178: 6158–6163, 2007.
- Kraus TA, Toy L, Chan L, Childs J, Mayer L. Failure to induce oral tolerance to a soluble protein in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 126: 1771–1778, 2004.
- Kruijs W, Schreiber S, Theuer D, Brandes JW, Schutz E, Howaldt S, Krakamp B, Hamling J, Monnikes H, Koop I, Stolte M, Pallant D, Ewald U. Low dose balsalazide (1.5 g twice daily) and mesalazine (0.5 g three times daily) maintained remission of ulcerative colitis but high dose balsalazide (30 g twice daily) was superior in preventing relapses. *Gut* 49: 783–789, 2001.
- Langdon WY, Hartley JW, Klinken SP, Ruscetti SK, Morse HC 3rd. v-cbl, an oncogene from a dual-recombinant murine retrovirus that induces early B-lineage lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1168–1172, 1989.
- Macian F, Garcia-Cozar F, Im SH, Horton HF, Byrne MC, Rao A. Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. *Cell* 109: 719–731, 2002.
- MacKenzie DA, Schartner J, Lin J, Timmel A, Jennens-Clough M, Fathman CG, Serogy CM. GRAIL is up-regulated in CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cells and is sufficient for conversion of T cells to a regulatory phenotype. *J Biol Chem* 282: 9696–9702, 2007.
- Maul J, Loddenkemper C, Mundi P, Berg E, Giese T, Stallmach A, Zeitz M, Duchmann R. Peripheral and intestinal regulatory CD4⁺ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 128: 1868–1878, 2005.
- Mueller DL. E3 ubiquitin ligases as T cell anergy factors. *Nat Immunol* 5: 883–890, 2004.
- Priault G, Nagler-Anderson C. Mucosal immunity and allergic responses: lack of regulation and/or lack of microbial stimulation? *Immunity* 18: 206–218, 2003.
- Rachmilewitz D. Coated mesalazine (5-aminosalicylic acid) vs. sulphasalazine in the treatment of active ulcerative colitis: a randomised trial. *BMJ* 298: 82–86, 1989.
- Sartor RB. Induction of mucosal immune responses by bacteria and bacterial components. *Curr Opin Gastroenterol* 17: 555–561, 2001.
- Schwartz RH. T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 21: 305–334, 2003.
- Serogy CM, Soares L, Ranheim EA, Su L, Holness C, Bloom D, Fathman CG. The gene related to anergy in lymphocytes, an E3 ubiquitin ligase, is necessary for anergy induction in CD4 T cells. *J Immunol* 173: 79–85, 2004.
- Sloan-Lancaster J, Evavold BD, Allen PM. Induction of T-cell anergy by altered T-cell-receptor ligand on live antigen-presenting cells. *Nature* 363: 156–159, 1993.
- Soares L, Serogy C, Skrenta H, Anandasabapathy N, Lovelace P, Chung CD, Engleman E, Fathman CG. Two isoforms of otubain 1 regulate T cell anergy via GRAIL. *Nat Immunol* 5: 45–54, 2004.
- Takahashi I, Iijima H, Katashima R, Itakura M, Kiyono H. Clonal expansion of CD4⁺ TCRbeta⁺ T cells in TCR alpha-chain-deficient mice by gut-derived antigens. *J Immunol* 162: 1843–1850, 1999.
- Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 10: 1969–1980, 1998.
- VanDemark AP, Hill CP. Structural basis of ubiquitylation. *Curr Opin Struct Biol* 12: 822–830, 2002.

IV がんの原因

A	がんと環境因子	鈴木敬一郎	60
	はじめに		60
	1 化学発がんの基礎と発がん物質の代謝		62
	2 いろいろな環境因子とがん		70
	まとめ		78
B	ウイルスによるがん	上田啓次	80
	1 ウイルス感染とがん		80
	2 ヒトパピローマウイルス (HPV)		84
	3 エプスタイン-バーウイルス (EBV)		86
	4 カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV)		88
	5 B型肝炎ウイルス (HBV) と C型肝炎ウイルス (HCV)		90
	6 ヒトT細胞白血病ウイルス I (HTLV-I)		92
	おわりに		92
C	がんと放射線	池田義孝	96
	はじめに		96
	1 放射線とは		97
	2 放射線の作用の物理的過程		99
	3 電離放射線の標的分子に対する作用：化学的過程		102
	4 紫外線の生体分子に対する作用		105
	5 がん化に至るプロセス：生物学的過程		106
	おわりに		110

B ウイルスによるがん

1 ウイルス感染とがん

a ウイルス感染によるがんの発見

ウイルス感染とがんとの関連は1908年にデンマークの病理学者によりニワトリの白血病が“filterable agents (濾過性因子)”によることが示されたことに端を発します。その3年後にはラウス (Peyton Rous) がニワトリのサルコーマがウイルスにより伝染性に形成されることを報告しています。現在ではこの現象はレトロウイルス発がんであることは周知のことですが、がん原遺伝子の発見、細胞がん化の機構解明にきわめて重要な発見でした¹⁾。しかし、がんが伝染性であるという概念は基本的には肯定されず、特にヒトのがん発症へのウイルスの関与は1964年にバーキットリンパ腫 (Burkitt lymphoma: BL) 細胞内のエプスタイン-バーウイルス (Epstein-Barr virus: EBV) の発見まで待たなければなりませんでした。

現在ヒトのがんの15%前後(およそ100万~150万症例くらい)が何らかのウイルスもしくは感染性因子に起因すると考えられています。ヒト腫瘍ウイルスとしては表1に掲げたものが考えられます²⁻⁴⁾。また、昨今、ヒトポリオーマウイルスであるBKウイルスやJCウイルス、本来サルウイルスであるSV40 (simian virus 40) がある種の脳腫瘍や中皮腫の発症にかかわっているとの報告もみられますが、これらに関してはさらに厳密な解析が必要です。

b ウイルス感染と発がんとの関連性

ウイルス感染と発がんとの関連性の証明は広くヒト界に蔓延しているウイルスではきわめて難しい問題です。古典的にはコッホ (Koch) の原則が満たされていなければなりません (表 2)⁵⁾が、ヒトに感染するウイルスすべてに培養細胞系や小動物における感染系が存在するわけではなく、個体レベルでの実証は実際上不可能です。また、ウイルスによっては hit-and-run 的に相互作用するものもあると思われます。

現状では感染-疾患 (がん) の因果関係は科学的に妥当である機構が実験的に証明されていることに加え、疫学的に関連性、一貫性、特異性、時間的因果関係、量依存性などが証明される必要があります。

c ウイルスによる発がんメカニズム

ヒト腫瘍ウイルスによる発がんは持続感染や潜伏感染といった慢性感染症の結果として生じる経過の長い多段階プロセスです。この機構の解明は本来ヒトでは腫瘍を形成しない SV40、アデノウイルスによる *in vitro* での初代培養細胞を不死化する機構の解明にありました。それは SV40 の T 抗原 (T-Ag) やアデノウイルスの E1A あるいは E1B 遺伝子産物が細胞増殖を負に制御する遺伝子産物、pRb や p53 といった抑制性がん遺伝子と相互作用してその機能を不活化するという画期的な報告でした。ヒトパピローマウイルス (human papillomavirus: HPV) の E6 や E7 遺伝子にも同様の活性があることもまもなく示され、ヒト腫瘍ウイルスによるがん化機構の一般性を引き出しました。

最近ではシグナル伝達を含めた細胞周期の促進・抑制にかかわる因子の活性化・不活化、アポトーシスの抑制やテロメア伸長因子の活性化による細胞寿命の延長など、細胞の増殖性の獲得・維持に関する多くの報告があります^{2,3)}(図 1)。

表1 ヒト腫瘍ウイルス

ウイルス	ヒトパピローマウイルス (human papillomavirus : HPV)	エプスタイン-バーウイルス (Epstein-Barr virus : EBV)	カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス/ヒトヘルペスウイルス8 (Kaposi sarcoma-associated herpesvirus/ human herpesvirus 8 : KSHV/HHV-8)
特徴			
ゲノム(ウイルス粒子内)			
核酸	dsDNA/circular	dsDNA/linear ^{*1}	dsDNA/linear ^{*1}
サイズ(kb)	8	172	165
遺伝子数	8~10	~90	~90
感染細胞	角化上皮細胞 (粘膜, 皮膚)	口腔咽頭上皮 B細胞	血管内皮細胞 B細胞
生物学的特徴	分化応答型複製	B細胞の不死化 潜伏感染	血管内皮細胞の不死化 潜伏感染 宿主遺伝子ホモローク
蔓延率	非常に高い	非常に高い	低い
伝播様式	性的接触 皮膚接触	唾液	唾液? 性的接触
関連する疾患 (がん以外)	尋常性疣贅 性器疣贅 疣贅状表皮発育異常症	伝染性単核症	
関連するがん	子宮頸がん 皮膚がん 口腔咽頭がん	バーキットリンパ腫, 鼻咽頭腫, ホジキン病 T細胞リンパ腫, NK細胞リンパ腫	カポジ肉腫 PEL MCD
発がん性をもつ 遺伝子	E6, E7	LMP1	K1, vGPCR
がんにおける染色 体への組み込み	有(断片的)	無	無

^{*1}: 感染細胞内では環状, ^{*2}: 開環状 (relaxed circular), ^{*3}: ダイマー, ^{*4}: S 遺伝子はラージS, ミドルS, スモールSの3つがある。

(Rickinson AB, et al: Fields Virology, 5th ed, pp2655-700, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007⁴⁾より改変)

B型肝炎ウイルス (hepatitis B virus : HBV)	C型肝炎ウイルス (hepatitis C virus : HCV)	ヒトT細胞白血病ウイ ルスI (human T-cell leukemia virus type I : HTLV-I)
dsDNA/RC ^{*2} 3.2 4 ^{*4}	(+) ssRNA 9.4 9	(+) ssRNA ^{*3} 9.0 6
肝実質細胞	肝実質細胞	T細胞
持続感染 慢性炎症	高効率慢性化 持続感染 慢性炎症	T細胞不死化
高い(東南アジア, 中近 東, アフリカ)	高い	高い(日本, カリブ海沿 岸)
垂直感染 血行性, 性的接触	血行性, 性的接触	母乳 血行性, 性的接触
急性肝炎 慢性肝炎 肝硬変 肝がん	急性肝炎 慢性肝炎 肝硬変 肝がん	熱帯性産性麻痺/ HTLV-I 関連脊髄症 成人T細胞白血病
HBx	Core, NS3, NS4A, NS5A	Tax?
有(全長に近いものから 断片的なものまで)	無	有(プロウイルス)

表2 ウイルス感染と発がんの関連性の証明

コッホの原則	<ul style="list-style-type: none"> • 感染性因子は常にその疾患もしくは特徴的な病変に存在する。 • 感染性因子は感染個体から分離され培養系で増殖させうる。 • 分離・増殖された感染性因子による感受性個体を用いることによって病気・病変が再現される。 • 実験的に再現された病気・病変から同様の感染性因子が分離される。
現状で認められる関連性の証明	<ul style="list-style-type: none"> • ウイルス感染がある特異的な腫瘍の発生に関して疫学的な妥当性（関連性の強さ、普遍性、特異性、時間的因果関係、生物学的量依存性）が認められる。 • その特異的な腫瘍においてウイルスゲノムの存在が常に持続的に認められる。 • 培養細胞系においてウイルスゲノムあるいはその部分の導入により増殖活性の上昇が認められる。 • ウイルスの存在によりその特異的な腫瘍の増殖・がん化形質が引き出されることが証明されうる。

(Howley PM, et al: Fields Virology, 5th ed, pp2299-354, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007⁶⁾より改変)

2 ヒトパピローマウイルス (HPV)

a HPV と関連腫瘍

HPV は子宮頸がん、ある種の肛門部や皮膚がんといった扁平上皮がんの発生に密接にかかわっています。HPV には 130 種以上の亜型があって、そのなかで特定の亜型ががんとのかかわりが強く、特に HPV-16 や HPV-18 は子宮頸がんや肛門がんにおいて高危険株といわれています⁵⁾。

b HPV によるがん化機構

HPV は約 8 kb の環状二重鎖 DNA をゲノムとするウイルスで SV40 やポリオーマウイルスに類似しています。上皮基底細胞に感染し、ケラチン産生細胞への分化とともに上層に現れ、溶解複製が進行し、角質細胞から娘ウイルスが分泌されると考えられています。このウイルスは自己ゲノムの複製に必要なポリメラーゼをコードしてお

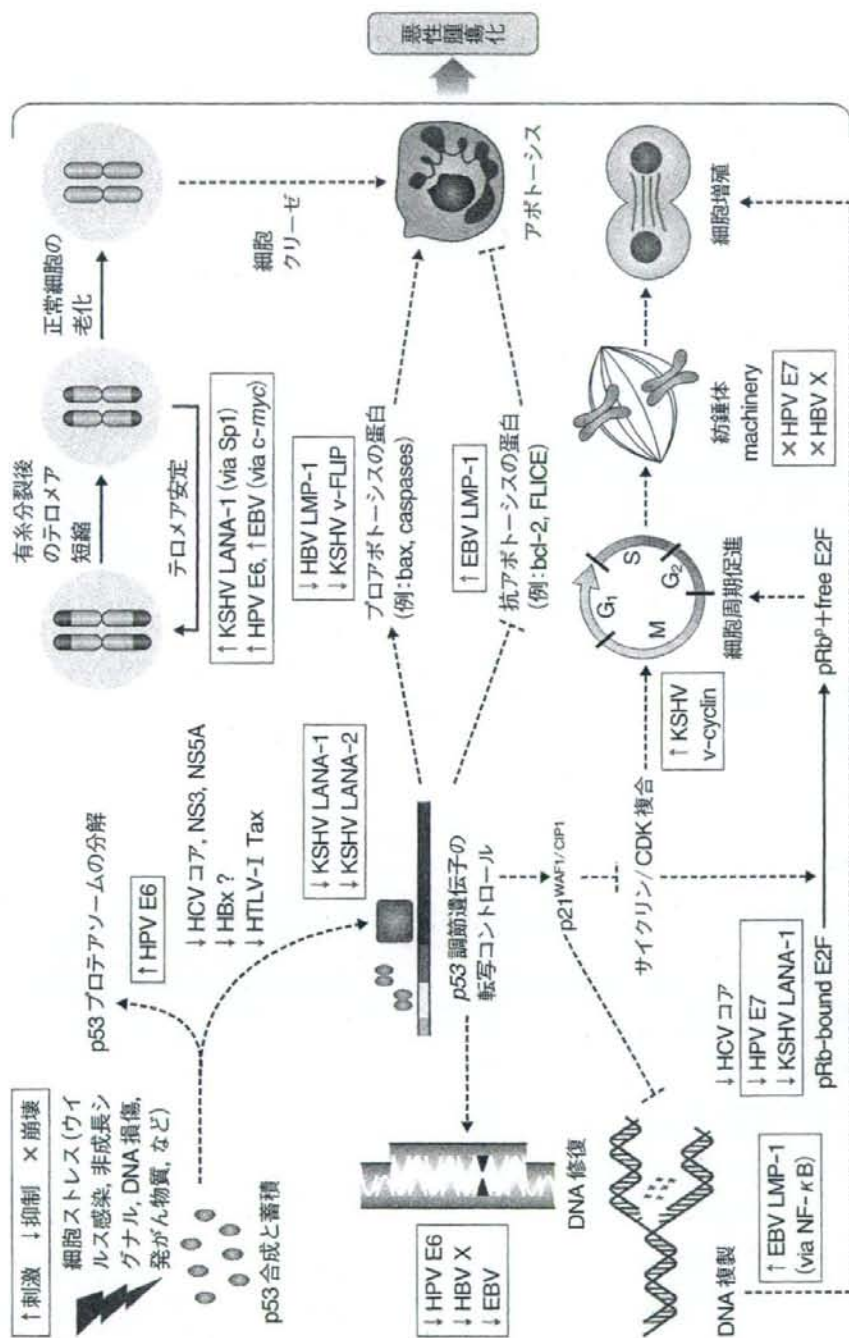


図1 ウイルスによるがん化に働くプロセス

(Moustalos G, et al: The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. Cell 1995; 80: 389-99 より改変)

らず、その複製は宿主細胞 DNA 合成を促進させることで達成されると考えられています。多くの子宮頸がんでは HPV ゲノムが断片的に宿主染色体に組み込まれますが、この過程でウイルス転写抑制遺伝子 E2 が失われることがウイルス発がん遺伝子として機能する E6 および E7 の発現上昇に寄与していることが重要であると考えられています⁵⁾。

高危険株 HPV の E6, E7 はより強いトランスフォーメーション活性をもつと思われ、初代培養細胞の不死化やトランスジェニックマウスにおける皮膚がんの発症が示されています。E6 はユビキチンリガーゼの 1 つである E6-AP と結合し、E6AP-E6-p53 複合体を形成して p53 をユビキチン化し、その分解にかかわることが示されています。また、E6 がテロメラーゼ活性を上昇させることも不死化に寄与していると考えられています。

E7 は低リン酸化型の pRb に結合してその転写因子 E2F への結合を阻害し、E2F が本来もつ S 期への進行に必要な遺伝子産物の発現を許可することが重要であると考えられています。加えて E7 はサイクリン A-、サイクリン E-依存性キナーゼを刺激し、一方でサイクリン依存性キナーゼ阻害因子である p21/WAF1 や p27/KIP1 を不活化することも知られています。

発がん過程における E6, E7 の活性は協調的であり、2 つの因子がともに存在することがより発がんへのプロセスを容易にしていると思われれます。

3 エプスタイン-バーウイルス (EBV)

a EBV と関連腫瘍

EBV は鼻咽頭腫 (nasopharyngeal carcinoma: NPC), バーキットリンパ腫, ホジキンリンパ腫や T 細胞リンパ腫, 移植後のリンパ腫, 胃がんの発症にかかわっていると考えられています⁴⁾。

NPCは中国南部、香港、シンガポールや台湾の広東人に発症頻度が高い上皮性の腫瘍ですが、北アメリカのエスキモー族や北アフリカでも比較的発生頻度が高いと考えられています。このほかの地域における発症頻度は低く、このことは遺伝的背景や環境因子が深く関わっていることを示しています。また、特に未分化型のNPCではそのほとんどにEBVが検出されます。

バーキットリンパ腫は*c-myc* 遺伝子座とイムノグロブリン重鎖あるいは軽鎖プロモーターとの染色体転座により*c-myc* 遺伝子の脱制御がみられることを特徴とする腫瘍で、おおむね20%のバーキットリンパ腫にEBVの感染が確認されます。この頻度にはかなりの地域差があり、アメリカではほんの5%程度にすぎませんが、EBV感染が風土病的にみられるアフリカやブラジルでは小児バーキットリンパ腫の90%に達します。

ホジキンリンパ腫は一種のB細胞増殖性疾患でリンパ球欠損型、結節硬化型、混合型の3つのタイプがあり、このなかでは前者に70~100%のEBVが検出されます。さらに胃がんの5~15%、TあるいはNK(ナチュラルキラー)細胞リンパ腫や移植後のリンパ球増殖症では90~100%にEBVが確認されるなど広く腫瘍性疾患とかわかっていることが示唆されています。

b EBVによるがん化機構

EBVは約170 kbの直鎖状二重鎖DNAをゲノムにもつγヘルペスウイルス属のウイルスです。一般に成人の90%以上でウイルス保有者となる広く蔓延しているウイルスの1つで、いったん感染が成立した後はB細胞に生涯潜伏感染し続けます。生活環として溶解複製と潜伏感染をもち、後者は発がんに発展する重要な感染状態と考えられます。EBVが関連する腫瘍はすべて潜伏感染状態にあり、限られたウイルス遺伝子(*EBNA1*, *EBNA2*, *EBNA3*, *EBNA-LP*, *EBERs*, *LMP1*, *LMP2*)のみが発現します⁴⁾。EBVはナイーブB

細胞を *in vitro* で不死化させますが, LMP1 (latent membrane protein 1) は *in vitro* における B 細胞の不死化に必須であることが示されています。LMP1 は複数の膜貫通領域をもち, C 末側でいくつかの TRAFs (tumor necrosis factor receptor associated factors) と相互作用し, NF- κ B (nuclear factor κ B) の高発現をもたらすと考えられています。また, A20, bcl-2, ICAM-1 などの抗アポトーシス因子や接着因子, IRF7 (interferon regulatory factor 7), MMP-9 (matrix metalloproteinase-9), FGF2 (fibroblast growth factor 2) の発現上昇や PI3K (phosphoinositol-3-kinase)/Akt 経路の活性化をもたらします。

このほか, EBNA2 は特異性の低い転写活性化因子でさまざまな宿主・ウイルス遺伝子を活性化するやはり B 細胞の不死化に必須な因子と考えられています。EBNA3A, 3C も B 細胞の不死化に必須で, 特に EBNA3C は *Ras* がん遺伝子と協調して不死化誘導することや Rb と相互作用してその活性を抑制することが示されています⁶⁾。

4 カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV)

a KSHV と関連腫瘍

カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (Kaposi sarcoma-associated herpesvirus : KSHV) (もしくは HHV-8) はカポジ肉腫から発見された 8 番目のヒトヘルペスウイルスで EBV と同様 γ ヘルペスウイルス属に属します⁷⁾。動物界に蔓延する多くの γ ヘルペスウイルスが腫瘍あるいは腫瘍様疾患と関連するように KSHV もカポジ肉腫 (KS), PEL (primary effusion lymphoma), MCD (multicentric Castleman disease) といった腫瘍あるいは腫瘍性疾患ときわめて密接に関連しています。

カポジ肉腫は古典的カポジ肉腫, AIDS 付随性カポジ肉腫, 風土病のカポジ肉腫, 医原性カポジ肉腫に分類されますが, どのタイプのカ

ポジ肉腫にも KSHV 感染が起因していると考えられています。PEL は B リンパ腫の一種で固形腫瘍を形成しない特異な臨床病理像を示します。PEL にはしばしば EBV が共感染していますが、KSHV の存在は不可欠です。MCD はインターロイキン6 (interleukin-6 : IL-6) などのサイトカイン依存性の反応性 B 細胞増殖性疾患で AIDS 付随性 MCD ではすべてに KSHV の感染が認められます。非 AIDS 付随性 MCD では 50 % 程度であることは KSHV の存在は MCD の発症に必須ではないことを示しますが、MCD 発症の本質に強くかかわっていることは事実であると思われる。

b KSHV によるがん化機構

先に述べましたように、KSHV は γ ヘルペスウイルスで約 160 kb のゲノムに 80 余の遺伝子をコードしています。これらのなかには宿主遺伝子由来と思われる細胞増殖やシグナリング、抗アポトーシス、免疫回避機構にかかわる遺伝子などが含まれています。そして遺伝子欠損組み換えウイルスを用いた解析は EBV ほど進展していませんが、カポジ肉腫の起源細胞と考えられる初代培養内皮細胞をトランスフォーメーションする活性や寿命を延長する活性が報告されています。また、EBV と同様、潜伏感染と溶解複製の 2 つの生活環をもち、やはり腫瘍細胞は潜伏感染状態にあり、非常に限られた遺伝子のみを発現しています。

KSHV の *K1* や *vGPCR* (viral G-protein coupled receptor) といった遺伝子が発がん活性をもつ遺伝子として報告されています。K1 は ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) を介した B 細胞シグナリングの活性化、Fas 誘導のアポトーシスの抑制、さらに VEGF (vascular endothelial growth factor) や MMP-9 を発現誘導することで細胞増殖へ導くと考えられています。vGPCR はホスホリパーゼ C (PLC) や PI3K 経路を活性化し多くのサイトカインの発現誘導にかかわると思われる。このほかにも vIRF (viral in-

terferon regulatory factor) による正常インターフェロン作動系の攪乱^{かんらん}, Kaposin/K12 による MAP 経路の活性化, 潜伏感染で発現している LANA (latency-associated nuclear antigen) による p53 や pRb の不活化, テロメラーゼ活性の上昇や vCyc による細胞周期の亢進, vFLIP によるアポトーシスの回避などさまざまな遺伝子が協調的に腫瘍化にかかわっているものと考えられます。

5 B型肝炎ウイルス(HBV)とC型肝炎ウイルス(HCV)

a HBVとHCVの関連腫瘍

B型肝炎ウイルス (hepatitis B virus: HBV) はヘパドナウイルス属の不完全二重鎖 DNA をゲノムとするウイルスですが, C型肝炎ウイルス (hepatitis C virus: HCV) は主に神経系に親和性をもつ脳炎ウイルスから構成されるフラビウイルス属の (+) 鎖一本鎖 RNA ゲノムをもつまったく異なったウイルスです (表1)。この2つのウイルスがほぼ特異的に肝細胞に感染し, その臨床的帰結として肝がんの発症にかかわることは今では当然ですが, 当初はきわめて意外でした。感染分布と肝がんの発症に関する疫学的な情報は, この2つのウイルスが肝がん発症に関与していることは間違いのないわけですが, 肝がん発症に肝炎という病態がきわめて重要な要素と考えられ, その意味で間接的にかかわっているとも考えられます^{8,9)}

b HBVによるがん化機構

HBVは逆転写を複製過程にもちますが, レトロウイルスのようにプロウイルスとしての宿主染色体への組み込み過程を生活環にもちません。しかしながら, モノクローナルなゲノムの断片の組み込みが肝がんで見られ, これによる染色体不安定性, プロモーター挿入によるがん原遺伝子の活性化が重要な鍵を握るだろうと想定されていました。しかしながら, ウッドチャック肝炎ウイルス (woodchuck hep-

atitis virus) や地リス肝炎ウイルス (ground squirrel hepatitis virus) ゲノム組み込みによる *N-myc* 遺伝子の活性化以外に特定のがん遺伝子が活性化されることは知られていません。HBV には有効なモデル感染系がないため解析は困難ですが、個々の遺伝子を単独で強制発現させたりすると細胞が変化したり個体レベルでは炎症につながり、これが肝がん発症に重要であるという研究結果が示されています。また、*X* 遺伝子 (*HBx*) のトランスジェニックマウスで肝がんが生じることが示されています。*HBx* は MAPK (Ras-Raf-mitogen-activated protein kinase) の活性化や XAP-1/UVDDDB と相互作用して NER (nucleotide excision repair) の阻害など多彩な機能が報告されています。

c HCV によるがん化機構

HCV は RNA ウイルスであり、組み込みによる影響はありませんが、HCV 持続感染により慢性的にウイルス抗原が産生されることが感染細胞に変化をもたらし、やがてはがん化につながると考えられます⁹⁾。HCV がもつ遺伝子のうちで特にコア抗原、NS3 と NS5A ががん化プロセスと密接にかかわっていると考えられます。コア抗原は *p53*、*p73* や *pRb* などの抑制性がん遺伝子と相互作用し、この活性を抑制したり MAPK 経路を活性化することなどが示されています。トランスジェニックマウスでは脂質代謝経路に影響を与えてアテロシスを起こし、がん化することが示されています。NS3 や NS5A にも *p53* と相互作用することが見いだされ同様の機構が想定されます。NS5A は Forkhead や GSK-3 と相互作用してこれらを不活化し、 β カテニンを蓄積し、Wnt/ β カテニン経路の活性化にかかわる報告が蓄積しつつあります。

6 ヒトT細胞白血病ウイルス I (HTLV-I)

a HTLV-Iの関連腫瘍

ヒトT細胞白血病ウイルスI (human T-cell leukemia virus type I: HTLV-I)はヒトに感染する2つのレトロウイルスのうちの1つで、感染者は日本南西部、カリブ海沿岸地域、アフリカ中央部、南アメリカ、ソロモン諸島で多くみられます¹⁰⁾。主にCD4陽性のメモリーT細胞に感染し、プロウイルスとして組み込まれます。感染者の2~6%で発症するといわれる腫瘍は成人T細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL)です。

b HTLV-Iによるがん化機構

ATLの発症にはHTLV-IのpXにコードされるp40^{tax}、ウイルス特有の転写因子が注目されています¹¹⁾。IL-2レセプターの α 鎖やGM-CSF、IL-3の発現を亢進させたり、p53、MAD1、RanBP1、TAX1BP2と相互作用して機能抑制し増殖能亢進、アポトーシス抑制、細胞周期チェックポイントの破綻、染色体不安定性などのがん細胞に特徴的な形質を引き出すとされています。トランスジェニックマウスでもATLでみられる恒常的NF- κ Bの活性化を伴うpre-T細胞性の腫瘍を形成することが報告されています。しかし、ATLの半数近くはp40^{tax}を発現しておらず発現のタイミングと腫瘍発生の時間的關係が議論されています。

おわりに

本稿では、現在ヒトの腫瘍発生にかかわるとされるウイルスによるがん化機構を簡単に述べてきました。相互作用する宿主因子には共通項も多くみられ、がん化の一般性を示していると思われませんが、こ

これらのウイルスに感染したすべてであるいは高頻度でがんを発症するわけではないことはウイルスそのものはがん発症因子のコファクターの1つであることを示しているにすぎません。

UV (紫外線) や遺伝的背景は HPV-5 や HPV-8 が関係していると考えられる皮膚がんの発生に重要なコファクターになっていると考えられます。たとえば疣贅状表皮発育異常症は遺伝的疾患で HPV の慢性感染に深くかかわっているものと考えられます。子宮頸がんにおいても遺伝的背景が重要であるという報告もあります。EBV によるパーキットリンパ腫や NPC の発生には風土病的要素があり環境因子の重要性を物語ります。免疫不全が多くにみられることは本来ヒトはウイルスによるがん発生を阻止する監視機構を備えていることを証明するものです。

ウイルス発がん機構の解明は不可思議な細胞増殖制御・がん発生の謎を解き明かす“ロゼッタストーン”であり、今後特にがん化の初期イベントとして何が起こっているのか、そしてそれがどのような機序でどのような方向へ向かうのかなど大きな疑問がウイルスによる発がん過程の研究から解き明かされることが期待されます。

(上田啓次)

◎引用文献

- 1) Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM, et al: DNA related to the transforming gene (s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 1976; 260: 170-3.
▶ウイルスがもつがん遺伝子がもともと宿主遺伝子であったことを証明した画期的論文。
- 2) Butel JS: Viral carcinogenesis: Revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease. *Carcinogenesis* 2000; 21: 405-26.
▶ウイルス発がんに造詣の深い筆者によるウイルス発がんの歴史、考え方が述べられた総論。
- 3) de Oliveira DE: DNA viruses in human cancer: An integrated overview on fundamental mechanisms of viral carcinogenesis. *Can Let* 2007; 247: 182-96.