

<p>それでは分子腫瘍学特論、がん抑制遺伝子の講義を始めます。私は金沢大学がん研究所腫瘍遺伝学研究分野の大島といいます。この講義では、がん抑制遺伝子として、最初に単離、同定されました Rb 遺伝子について前半で話しまして、後半では大腸がんのがん抑制遺伝子として研究されております APC 遺伝子、その変異と発がんとの関係、あるいは APC の機能についてを中心に話を進めていきます。</p>	<p>Now, let's begin the lecture on tumor suppressor genes from the advanced theory of molecular oncology. My name is Oshima, and I am from the Kanazawa University Division of Genetics Cancer Research Institute. In this lecture, I will first talk about the Rb gene, which was first isolated and identified as a tumor suppressor gene. Then, in the second half of the lecture, I will focus on the APC gene, which has been studied as a tumor suppressor gene for colorectal cancer, and the relationship between its mutation and oncogenesis, or the function of APC.</p>
<p>がんというのは、いろいろながんに関連した遺伝子に変異がいくつか、複数積み重なることによって発生してくる病気であることがよく分かっております。したがって、がんは遺伝子の病気といわれているわけですが、がん関連遺伝子を大きく分けると、がん遺伝子とがん抑制遺伝子に分けることができます。</p>	<p>Cancer is well known to be a disease caused by the accumulation of mutations in various cancer-related genes. This is why cancer is referred to as a genetic disease, and cancer-related genes can be broadly divided into oncogenes and tumor suppressor genes.</p>
<p>この講義ではがん抑制遺伝子について話しますが、まず最初に簡単にがん遺伝子について話したいと思います。がん遺伝子は oncogene とも呼ばれるわけですが、その遺伝子の変異によって発がんを促進するという機能、function ですね、function を獲得するということから、gain of function と呼ばれることもあります。このスライドの左側の図は増殖シグナルを持つ模式化した図ですけれども、増殖シグナル、増殖因子であるリガンドが細胞表面の受容体、レセプターにシグナルを伝えて、結合しますと、レセプターである受容体は、そのコンフォメーションを変えて活性化し、その活性は細胞内のシグナル伝達因子に伝えられます。</p>	<p>In this lecture, I will talk about tumor suppressor genes. First, a brief discussion of oncogenes. Oncogenes are sometimes referred to as "gain of function," because they can obtain the function of promoting oncogenesis through their gene mutations. The left side of this slide shows a schematic diagram of growth signaling. When a ligand, which is a growth factor, transmits a signal to a receptor on the surface of a cell and binds to it, the receptor, which receives the information, changes its conformation. This results in activation, and this activation is transmitted to intracellular signaling factors.</p>
<p>そして、さらに活性化したシグナル伝達因子がこの細胞に増殖しなさいというシグナルを伝えるわけです。これは正常の状態でのシグナルトランスダクションになるわけですけれども、一方、右側の図ですが、その受容体、増殖シグナルの受容体が遺伝子に変異が入ることによって、アミノ酸の変異、変化が起こりまして、それによって、コンフォメーションが変わることによって、リガンドが結合しなくても恒常的に活性化した状態になってしまうことがあります。そうしますと、増殖因子であるリガンドが来ないにもかかわらず、この細胞には恒常的に増殖シグナルが入るわけです。</p>	<p>The activated signaling factors then in turn further communicate this signal to the cell, to proliferate. This is signal transduction in its normal state. Now, take a look at the figure on the right. When mutation occurs in the gene for a proliferative signal receptor, it causes amino acid mutations and changes in conformation, leading to constant activation without ligand binding. This means that the cell will receive a constant proliferative signal, even though the ligand, a growth factor, is not present.</p>
<p>また、その受容体自身はまったく正常であっても、その細胞内のシグナル伝達因子に遺伝子変異が入りますと、その上からシグナルが来ていないにもかかわらず、常に活性化された状態に変化してしまうことがあります。</p>	<p>In addition, even if the receptor itself is completely normal, gene mutations in intracellular signaling can cause the cell to be constantly activated, even with no signal from upstream.</p>
<p>このように増殖シグナルに関わる受容体やシグナル伝達</p>	<p>So a cancerizing cell is likely driven by the activity of oncogenes</p>

<p>因子が活性化型の変異が入ることによって、がん遺伝子として働き、それによって細胞ががん化するというふうを考えられます。その増殖シグナルに関わる受容体として有名なものとして、EGFR, epidermal growth factor receptor というものがありますし、またシグナル伝達因子としては、ras と呼ばれる重要なものがあります。</p>	<p>resulting from an activating mutation coming into the receptors and/or signaling factors involved in proliferation signals. One of the best known receptors involved for such proliferation signals is EGFR (epidermal growth factor receptor), and there is an important signaling factor known as ras.</p>
<p>ただ正常な状態では、これらの分子は普通の細胞増殖に関わっておりますので、その場合はがん遺伝子ではなくて、proto-oncogene というふうに呼ばれるわけです。で、大事なことは細胞のなかには対立染色体上に2コピーの遺伝子があるわけですね。ras も、EGF レセプターも2コピーあるわけですが、がん遺伝子の変異の場合はそのうちの片方だけに変異が入れば、それによって細胞ががん化するというところで優性形質のパターンを取ります。これに対して、がん抑制遺伝子のほうは2コピーとも変異する、あるいは活性を失うということによって、初めてがん化に細胞が変化していくので劣性形質であると考えることができます。</p>	<p>However, under normal conditions, these molecules are involved in normal cellular proliferation, so they are not called oncogenes, but proto-oncogenes. What is important here is that cells have two copies of each gene on their alleles. So, ras and EGFR have two copies, and in the event of mutations in oncogenes affecting only one of those copies, the cell becomes cancerous, showing a pattern of dominant traits. In contrast, tumor suppressor genes require mutation or loss of activity in both copies to drive the cell toward cancer for the first time; therefore, mutation is considered a recessive trait.</p>
<p>それではがん抑制遺伝子ですけれども、がん抑制遺伝子の概念というのはかなり古くから報告されておりました。一番最初の報告が今から約40年前、Henry Harris という人によって発表されました。で、Henry Harris は細胞融合の実験していたわけですが、その細胞を、異なる細胞を、センダイウイルスを感染させたり、あるいはリポソームで処理するなどによって、2つの細胞を融合させることができます。これを cell fusion と呼びますがけれども、この Henry Harris は動物に移植すると腫瘍を形成する、そういうがん細胞と正常の細胞、正常の線維芽細胞ですね、fibroblast を融合させる実験を行いました。</p>	<p>Let's move on to the tumor suppressor genes. The idea of these genes has been reported for a long time; the first such report was published by Henry Harris about 40 years ago. He experimented with cell fusion, through which two different cells can be fused together by infecting them with a Sendai virus or treating them with liposomes. Henry Harris conducted an experiment in which he fused cancer cells, which caused tumors when they were transplanted into animals, with normal fibroblasts.</p>
<p>で、この融合、cell fusion によって、できたハイブリッドの細胞が実はもはや動物に移植しても腫瘍を形成しなくなるということを発見したわけです。で、これはどのように解釈したらいいかといいますと、その正常細胞には実はがんにならないようにする遺伝子が存在していて、それがなくなることによって細胞ががん化するんだというふうに、Henry Harris は考えたわけですね。</p>	<p>He found that the hybrid cells produced through cell fusion no longer formed tumors when transplanted into animals. How can we interpret this? He thought that normal cells actually had genes that prevented them from becoming cancerous, and when these genes were lost, the cells became cancerous.</p>
<p>で、それはこの当時はまだがん遺伝子についても、よく分かっていない時期ですけれども、そのがん抑制遺伝子の概念として初めて報告されたものであって、なくなるとがん化する、そして fusion によって、それを戻すことによって、そのがんのフェノのタイプが正常に戻るということを見つけたわけで、これはがん抑制遺伝子の概念そのもの</p>	<p>At that time, oncogenes were still not well understood, but this was the first report on the concept of tumor suppressor genes, proposing the idea of genes that drive cells toward cancerization when they are lost, and to revert to normal phenotypes when they are returned through fusion. This is exactly the idea of a tumor suppressor gene, as we later found out. Thus, it is now well understood that tumor suppressor genes are recessive.</p>

<p>であるということが、あとから分かったわけです。で、このようにがん抑制遺伝子というのは劣性形質を示すことが今ではよく分かっています。</p>	
<p>それから何年か遅れまして、実際にがん抑制遺伝子が存在するんだということがいろんな研究によって分かかってまいりました。一番最初にごん抑制遺伝子について分かってきたのは、この網膜芽細胞腫 retinoblastoma という小児がんの原因遺伝子である Rb 遺伝子についてです。網膜芽細胞腫 retinoblastoma というのは約2万人に一人の割合で発症する、子どもに発症する網膜のがんでして、この写真にありますように、網膜のがん化して、がん細胞が増殖することによって、このように眼球のなかにがんが発生してしまいます。この retinoblastoma、網膜芽細胞腫には2つの発症パターンがあるということがよく分かっていました。一つはここに記載してありますように、unilateral retinoblastoma、ユニラテラル、すなわち片目だけにがんを発生する、retinoblastoma が発生するパターンです。</p>	<p>A few years later, various studies showed that tumor suppressor genes actually exist. The first tumor suppressor gene that we learned about was the Rb gene, which is the gene responsible for retinoblastoma, a childhood cancer. Retinoblastoma is a cancer of the retina, affecting children at a rate of about one in 20,000. As you can see in this picture, the retina becomes cancerous to proliferate cancer cells, resulting in the development of cancer in the eye. Retinoblastoma was well known to have two patterns of development. The first is unilateral retinoblastoma, as shown here, where the cancer develops in only one eye.</p>
<p>で、この患者さんたちは家族歴がなくて、すなわち親兄弟に同じような retinoblastoma を発症することはないことから、これは散発性のがんであると考えられました。またもう一つのパターンは、bilateral retinoblastoma と呼ばれるもので、両目、両側の目に網膜芽細胞腫が発祥する、そういうものです。この bilateral retinoblastoma の場合は家族歴があり、すなわち親や兄弟も同じような網膜芽細胞腫が発祥することから、こちらは遺伝性であると考えられていました。</p>	<p>Children who developed this disease had no family history — no parents or siblings developing similar retinoblastomas — so it was considered a sporadic cancer. The other pattern is called bilateral retinoblastoma, in which retinoblastoma develops in both eyes, or bilaterally. For bilateral retinoblastoma, children have a family history, and their parents or siblings also develop the same type of retinoblastoma. Thus, this pattern was considered hereditary.</p>
<p>そして、この retinoblastoma が実際にはがん抑制遺伝子の変異によって起こるのではないかということが予想されたわけですが、それを初めて言ったのが1971年ですが、Alfred Knudson という人が、小児科のお医者さんですけれども、論文で発表しました。で、このスライドの図は Knudson の論文から取ってきた非常に有名なものですが、このグラフは横軸が子どもの年齢、月齢を示しています。</p>	<p>Eventually, this retinoblastoma was hypothesized actually to be brought about by tumor suppressor gene mutations; this hypothesis was first published in a paper by a pediatrician named Alfred Knudson, in 1971. The figure shown on this slide is a very famous one, cited from the Knudson's paper, where the horizontal axis shows the age of the children, in months.</p>
<p>で、縦軸が別の blastoma、網膜芽細胞腫と診断された頻度を表しているわけですが、この青い直線のほうが bilateral retinoblastoma、すなわち遺伝性の網膜芽細胞腫です。で、ピンクの曲線のほうが unilateral retinoblastoma で、こちらは非遺伝性の散発性の網膜芽細胞腫です。で、これを見て分かりますように、遺伝性の retinoblastoma のほうは子どもたちのその年齢が上がるにしたがって、それと正比例するようにだんだん病気が</p>	<p>The vertical axis shows the frequency of retinoblastoma diagnosis. The blue line represents bilateral retinoblastoma (the hereditary retinoblastoma). The pink curve represents unilateral retinoblastoma (the non-hereditary, sporadic retinoblastoma). As you can see, hereditary retinoblastoma gradually develops in direct proportion to age as children grow older.</p>

<p>発症しているということが分かります。</p>	
<p>で、これはがんの発生はおそらく遺伝子の変異によって起こるということは想像されておりましたので、この四角で囲ってありますように、その遺伝性、パイラテラルは1回の遺伝子変異が必要。1回の遺伝子変異で retinoblastoma が発症するということが想像されました。といひますのは、その遺伝子の変異というのはまったくランダムに起こるものであって、確率論的に起こってくるわけですね。ですから、まったく同じ頻度で遺伝子変異が起こるとすると、どうしても1回の変異でがんが発生するとすると、年齢に正比例してがんが発症する、そういう直線が描けるわけです。</p>	<p>Because it was expected that the development of this cancer was probably caused by gene mutations, the hereditary (or bilateral) retinoblastoma was believed to require a single genetic mutation, and just a single genetic mutation could cause retinoblastoma, as shown in this box. This is because the mutation of the gene is completely random, and occurs on a stochastic basis. Thus, assuming that gene mutations occur at exactly the same frequency, and that a single mutation causes cancer, we can draw a straight line representing cancer development in direct proportion to age.</p>
<p>まさに、この bilateral retinoblastoma の発症は年齢に比例して発症している。ですから1回の遺伝子変異で発症するということが分かったわけです。それに対して、この散发性の unilateral retinoblastoma の場合、このように2次曲線を描いて、最初はなかなか発症してこないんですが、だんだん発症してくるようになってくる。すなわち、これは1回よりも多い genetic なイベントが発がん重要だということを示しています。で、この曲線のカーブから計算できるんですけども、実際には2回の遺伝子変異が必要だということが、この Knudson の計算により分かりました。</p>	<p>The onset of bilateral retinoblastoma was exactly proportional to age, supporting the hypothesis that a single genetic mutation causes the onset of cancer. On the other hand, sporadic unilateral retinoblastoma draws a quadratic curve, as shown in this figure: it rarely develops at first, but gradually increases. In other words, this indicates the importance of more than one genetic event for oncogenesis. How many events are required, then? We can calculate this from the curve; Knudson found that two gene mutations were necessary.</p>
<p>で、Knudson はこの現象から、おそらくがん抑制遺伝子というものが retinoblastoma の発症に関わっていて、遺伝性のもはその retinoblastoma の原因遺伝子の変異を親から受け継いでいて、その対立染色体上の正常な遺伝子の変異の、1回の変異でがんが発症するのではないかと、そして非遺伝性の場合には2コピーの正常な遺伝子を持っているにもかかわらず、それぞれが1回ずつ、すなわち2回の遺伝子変異が起こることによって、retinoblastoma が起こるのではないかと予想しました。</p>	<p>Based on this phenomenon, Knudson imagined that some kind of tumor suppressor genes were involved in the development of retinoblastoma; for hereditary retinoblastoma, a mutation in the causative gene for retinoblastoma would be inherited from a parent, and a single mutation in a normal gene on the allele would be sufficient to cause cancer, whereas for non-hereditary cases, two copies of the genes would normally be inherited from a parents, but a single mutation in each of those two copies (i.e. two mutations in total) would cause retinoblastoma.</p>
<p>これを Knudson の 2 hit theory、2ヒット説といひます。非常に有名な説であって、現在はこの retinoblastoma だけではなくて、ほとんどのがん抑制遺伝子にこの Knudson の2ヒット説が当てはまることが分かっています。</p>	<p>This is known as Knudson's two-hit theory. This is a very famous theory, and it is now known that Knudson's two-hit theory applies not only to retinoblastoma, but to almost all tumor suppressor genes.</p>
<p>それから15年の歳月が経ったあとで、ようやく網膜芽細胞腫 retinoblastoma の原因遺伝子が見つかりました。これは染色体13番状にある遺伝子で retinoblastoma から取って、Rb という名前が付けられています。Rb 遺伝子といわれています。遺伝性の retinoblastoma、bilateral retinoblastoma の場合、遺伝的に片親からその変異した Rb 遺伝子を受け継いでいます。ここにヘテロの状態で、</p>	<p>Fifteen years later, the gene responsible for retinoblastoma was finally found. This gene is located on chromosome 13, and is called the Rb gene, after retinoblastoma. In the case of hereditary, or bilateral, retinoblastoma, the mutated Rb gene is inherited from one parent. On this slide, the Rb gene is shown in the heterozygous state. In the process of cell division in the retina, if the normal Rb gene, the one without a mutation inherited from the parent, stochastically mutates as the second hit mutation, it becomes a retinoblastoma, as shown in the figure on the</p>

<p>その Rb 遺伝子が絵で描いてありますが、その網膜の細胞が分裂している過程で、その正常のほうの Rb 遺伝子、親から受け継いだミューテーションの入っていないほうの Rb 遺伝子に stochastic に、2nd hit mutation が入ってしまうと、この右側のように網膜芽細胞腫になってしまう。すなわち正常の Rb 遺伝子がなくなってしまう、網膜芽細胞腫が発症すると考えられます。</p>	<p>right. In other words, the normal Rb gene is lost, allowing retinoblastoma to develop.</p>
<p>すなわち、その somatic event は1回で、両側性の Rb 遺伝子の欠損が起こってしまう。そういうことです。一方、その unilateral の散発性の retinoblastoma の場合ですけれども、この場合は発症する子どもはもともとまったく Rb 遺伝子の変異を持っていないわけですね。ですから、2コピーの正常 Rb 遺伝子を持っています。しかし、これもまったく確率論的などころですが、たまたまその Rb 遺伝子、片っぽの Rb 遺伝子に変異が入ってしまうことがあります。しかし1コピーの正常 Rb 遺伝子が残っているうえ、この Rb 遺伝子は正常であるわけですけれども、また同じような確率で1個の Rb 遺伝子に変異が入った細胞で、もう1回 mutation が入ってしまうことがあり得るわけです。で、一つの細胞のなかで、first mutation があって、さらに 2nd hit mutation が入った場合に、この細胞が網膜芽細胞腫、がん化して、網膜芽細胞腫として、その腫瘍を形成してしまうわけです。したがって、その unilateral の場合は somatic event は2回必要であって、だからこそ、先ほどのグラフのように発症率は2次曲線を描くということと合致していることが分かってきました。</p>	<p>This means that a single somatic event causes the bilateral loss of the Rb gene. On the other hand, in the case of unilateral sporadic retinoblastoma, children who develop the disease do not have any mutation in their Rb gene. That means that they have two copies of the normal Rb gene. However, though — again, completely stochastically — a mutation might occur in the Rb gene, or one copy of the Rb gene, by chance. In that case, the other copy of the normal Rb gene remains, keeping the cell normal. However, it could be possible to have another mutation, again, stochastically, in a cell that already experienced one mutation in its Rb gene. So, if a cell has this first mutation and then a second-hit mutation, the cell turns cancerous and develops a tumor, forming retinoblastoma. Therefore, in unilateral cases of the disease, two somatic events are required, which explains why the incidence rate is consistent with the quadratic curve, as shown in the previous graph.</p>
<p>それでは、その Rb 遺伝子の 2nd hit mutation によって、なぜがんが発生するのでしょうか。それについて、少し考えてみたいと思います。Rb というのは、セルサイクルの制御に関わる重要な分子であることが分かっています。この図はセルサイクルを模式的に示したのですが、G1 期から S 期、G2 期、M 期と回って、最後は分裂していくわけですけれども、この細胞周期、セルサイクルは cyclin と CDK の複合体によって制御されていることがよく分かってきています。</p>	<p>So, why does the two-hit mutation of the Rb gene cause cancer? Let's discuss this a bit. It is well known that Rb is an important molecule involved in the regulation of the cell cycle. This figure shows the cell cycle schematically. The cell cycle starts in the G1 phase, then goes to the S phase, G2 phase, and M phase, then finally divides. This cell cycle is well known to be regulated by a complex of cyclin and CDKs.</p>
<p>特にこの図では G1 期について書いてありますけれども、G1 期全体を通して、cyclin D/CDK4/6 の complex が重要であり、その G1 の最後の late G1 では重要なチェックポイントがあって、そのチェックポイントを超えるためには、cyclin E/CDK2 の complex が重要な働きをします。で、このそれぞれの complex が実は Rb をリン酸化するということが分かってきています。</p>	<p>This figure shows the G1 phase in particular, and the cyclin D/CDK4/6 complex is important throughout this phase. At the late G1, there is an important checkpoint, where the cyclin E/CDK2 complex plays an important role to pass the checkpoint. Each of these complexes is known to actually be phosphorylate Rb.</p>

<p>Rbは通常の状態、まったく普通の状態では転写因子であるE2Fというものとbindingして、complexを形成しています。E2Fは、このチェックポイントを超えるために重要な転写因子であるわけですが、普段はRbに捕まって、その転写活性は抑えられているわけです。しかし、そのG1期にcyclin D/CDK4/6によって、リン酸化され、さらにチェックポイントの近くではcyclin E/CDK2のcomplexによって、そのhyperphosphorylationを受けます。</p>	<p>In the completely normal state, Rb binds to a transcription factor called E2F to form a complex. E2F is an important transcription factor for passing the checkpoint, but it is usually trapped by Rb, and its transcriptional activity is suppressed. However, during the G1 phase, E2F is phosphorylated by the cyclin D/CDK4/6 complex, and is hyperphosphorylated by the cyclin E/CDK2 complex near the checkpoint.</p>
<p>それによって、そのリン酸化をたくさん受けたRbはもはやE2Fとbindingすることができなくなって、E2Fが放出されるわけです。それによって、フリーになったE2Fは活性化して、その転写活性の亢進によって細胞周期はチェックポイントを超えて、S期に入るわけです。このようにRbは細胞周期の制御に非常に重要な役割を果たしているわけですが、この2 hit mutationによって、Rbがなくなってしまうと、そのcyclin E/CDK2、あるいはcyclin Dが活性化することがなくても、E2Fが恒常的に活性化してしまう。</p>	<p>As a result, Rb that has undergone a lot of phosphorylation can no longer bind to E2F, leading to the release of E2F. Consequently, the free E2F is activated, and the increased transcriptional activity causes the cell cycle to pass the checkpoint and move on to the S phase. In this way, Rb plays a very important role in the regulation of the cell cycle. So, if Rb is lost due to this two-hit mutation, E2F becomes permanently activated, even if cyclin E/CDK2 or cyclin D is not activated.</p>
<p>したがって、本来チェックポイントで細胞増殖しているサイクルが止まるべき、あるいはアポトーシスに行くべき細胞であっても、そのままE2Fが活性化しているために、セルサイクルが回轉し続けて、それによって、発がんするというふうと考えられているわけです。</p>	<p>Therefore, the mechanism of oncogenesis is considered a result of a seamless cell cycle driven by continuously activated E2F in the cell, which should have stopped its cellular proliferation cycle at the checkpoint, or gone into apoptosis.</p>
<p>それでは、その2 hit mutationがどのようにして起こるかということについて、分かっていることについて説明します。この左側に正常細胞とありますが、赤で示しているのが変異したRb遺伝子ですね。この親から遺伝された変異Rb遺伝子。青のほうは正常Rb遺伝子と考えてください。で、この青の正常Rb遺伝子がなくなると、retinoblastomaが起こるわけですが、一番考えやすいのは一番上にあります正常RB遺伝子のほうにもたまたまmutationが入ってしまう。それによって、正常なRbがなくなってしまうので、この細胞はretinoblastomaになるわけです。</p>	<p>Now, let me explain what we know about how the two-hit mutation occurs. The left side of this side shows a normal cell, and the mutated Rb gene is shown in red. Suppose the mutated Rb gene is inherited from the parent, and the blue one is the normal Rb gene. When the blue normal Rb gene is lost, retinoblastoma occurs. As shown at the top, the most likely scenario is the mutation of the normal RB gene by chance. As a result, there is no normal Rb gene there, so the cell becomes a retinoblastoma.</p>
<p>あるいはその正常Rb遺伝子、青で示した正常Rb遺伝子を含んだ、その染色体の領域を欠損してしまう場合、これは上から2番目のものですが、この染色体の欠損によって、やはり正常Rbがなくなってしまうと、retinoblastomaになってしまう場合、これも2ヒットのメカニズムの一つです。そして、また同じように重要なものとしては、そのmutationとか、deletionではなくて、細胞分裂の際に、それぞれの変異の入ったRb遺伝子の染色体</p>	<p>Or, as shown in the second figure from the top, if the chromosome region that contains the normal Rb gene (shown in blue) is deleted, the loss of this chromosome also results in no normal Rb there, leading to retinoblastoma, another mechanism of two-hit mutation. Another equally important mechanism to note is loss of heterozygosity. This mechanism is not based on mutation or deletion, but on cell division. During the process of cell division, the chromosome containing the mutated Rb gene and the one containing the normal Rb gene are both duplicated and distributed to the dividing cells. However, if this</p>

<p>も、正常 Rb 遺伝子を持った染色体も、duplicate して、それぞれ分裂した細胞に染色体を分配するわけですが、この分配が上手くいかないばあい、あるいはその細胞分裂、体細胞分裂のときに、mitotic recombination が起きてしまって、そして分裂してしまった場合、その変異 Rb 遺伝子がホモになってしまうケースがあり得るわけです。</p>	<p>distribution does not go properly, or if mitotic recombination occurs during somatic cell division, the mutant Rb gene may become homozygous.</p>
<p>その場合は同時にその分裂した相手側の細胞では Rb 遺伝子は実は正常でホモになってしまうわけですが、このホモで遺伝子の変異が入ってしまった細胞も当然、正常 Rb 遺伝子をもっていないので、それによって、retinoblastoma が発症してしまうわけです。</p>	<p>If this happens, then the other pair of Rb genes is also homozygous, but with normal Rb genes. So, the homozygous cell with the mutated genes does not have the normal Rb gene anymore, and retinoblastoma develops as a result.</p>
<p>このように、そのヘテロであった細胞がホモになってしまう、あるいは正常 Rb 遺伝子が deletion してしまって、変異 Rb 遺伝子だけ1個の染色体になってしまった場合、このようなケースをヘテロでなくなったということで、loss of heterozygosity と呼ばれます。これは、頭文字を取って、loss of heterozygosity は一般的に LOH と呼ばれるわけです。LOH はがん抑制遺伝子で非常によく使われる言葉で、がん抑制遺伝子でよく使われる言葉で、その言い方としては、この Rb 遺伝子は正常な Rb 遺伝子が LOH によって欠損することによって、retinoblastoma が発症したなどというふうにいうことができます。</p>	<p>When a heterozygous cell becomes homozygous, or when the normal Rb gene is deleted and only the mutated Rb gene is left on one chromosome, this is called loss of heterozygosity. This is commonly abbreviated "LOH." LOH is a very commonly used term regarding tumor suppressor genes. You might hear people say things like "this Rb gene was once normal, but was lost due to LOH, resulting in the development of retinoblastoma."</p>
<p>その Rb はさっき言いましたように、そのセルサイクルの制御に関連している分子であるので、網膜だけではなくて、すべての体のなかの臓器の体細胞のセルサイクルの制御にも関連しているはずで、それでは腫瘍は網膜だけで発症するのでしょうか。</p>	<p>As I mentioned earlier, Rb is a molecule involved in the regulation of the cell cycle, so it must also be related to the regulation of the cell cycle in somatic cells in all organs of the body, not just the retina. So, do tumors develop only in the retina, then?</p>
<p>それについて答えているのが、この論文の図表ですけれども、これは、このグラフは横軸が年齢です。縦軸がその発がん率、積算された発がん率が書かれているわけですが、青の線は bilateral retinoblastoma、すなわち遺伝性の網膜芽細胞腫で、1コピーの変異 Rb 遺伝子をすでに持っている、そういう患者さんたちです。で、ここで見て分かりますように、年齢がいくにしたがって、年齢と比例して、その発がんが増えてくる。がんの発生が増えてくるのが分かります。</p>	<p>The answer to this question can be found in the graph in this paper: The horizontal axis on this graph shows age. The vertical axis shows the incidence, estimated rate, of developing cancer. The blue line presents bilateral retinoblastoma, or hereditary retinoblastoma, in which the patients already have one copy of the mutated Rb gene. As you can see here, the incidence of oncogenesis increases in proportion to the age of patients.</p>
<p>これはやはり1回の stochastic な somatic な遺伝子変異で発がんしていることを示しているわけです。で、この発生しているがんですけれども、retinoblastoma だけではなくて、sarcoma、肉腫ですね。骨肉腫とか、あとは皮膚のメラノーマ、悪性の黒色腫であるとか、brain tumor の腫瘍とか、あらゆる臓器での発がんのリスクがこの遺伝性の</p>	<p>This indicates that cancer is caused by a single stochastic somatic gene mutation. The cancers developed are not only retinoblastoma, but also sarcoma, osteosarcoma, malignant skin melanoma, and brain tumors, so patients with retinoblastoma have a risk of cancer in all organs. On the other hand, at age 50, the patients with sporadic unilateral retinoblastoma have a 5.7% risk of developing cancer.</p>

<p>retinoblastoma 患者の場合があります。一方、散発性の unilateral retinoblastoma の場合ですけれども、50歳での発がん率は5.7%となっています。</p>	
<p>このピンク色のラインですけれども、この5.7%という発がん率はほとんど健康人の発がんと同じ状況です。したがって、やはりその1コピー、もともと変異を持っていることによって、その発がんのリスクが上がっているということが分かったわけで、この解析結果から網膜だけではなくて、他のいろんな臓器においても、正常 Rb 遺伝子が2ヒット変異が入ったり、あるいは LOH によって欠損することによって腫瘍が発生する、そういうことが分かってきました。</p>	<p>This pink line shows the incidence of cancer development, but this 5.7% rate is about the same as the healthy population. Thus, it was found that the risk of oncogenesis increased as expected when there was one copy with the underlying mutation. The results of this analysis have shown that not only the retina, but also various other organs, can develop tumors when the normal Rb gene is mutated through two hits, or is defective due to LOH.</p>
<p>以上、Rb 遺伝子、がん抑制遺伝子として最初に見つけてきた遺伝子ですけれども、Rb 遺伝子について説明しましたが、現在報告されていて、よく研究されているがん抑制遺伝子のほとんどが、この Rb のように遺伝性の腫瘍性疾患から、その原因遺伝子として発見された、そういうものです。例えば、ここのテーブルにあります、後半お話ししますが、APC という遺伝子は家族性大腸腺腫瘍という、その腸管に、大腸にポリープやがんを発生する遺伝病ですけれども、その遺伝病の原因遺伝子として見つけてきたもので、この APC 遺伝子の変異によって、β-catenin のリン酸化、あるいは Wnt シグナルといった大腸がん発生に大事なシグナルが制御されていることがよく分かっています。</p>	<p>Thus far, I have talked about the Rb gene, the first gene discovered as a tumor suppressor gene. Most of the currently reported and best-studied tumor suppressor genes were discovered as the genes responsible for hereditary neoplastic diseases, just like Rb. For example, in this table here, the gene APC, which will be discussed later, was discovered as the causative gene for familial adenomatous polyposis of the colon, a genetic disease that causes polyps and cancer in the intestinal tract. It is well known that mutations in the APC gene affect the regulation of signals critical for the development of colorectal cancer, such as β-catenin phosphorylation and Wnt signaling.</p>
<p>また Von Hippel-Lindau 病という遺伝性の腎臓がんを発生する病気の原因遺伝子としては、VHL という遺伝子がありますけれども、この VHL という分子は HIF という低酸素で誘導される転写因子があるわけですが、この転写因子をユビキチン化するのに大事な分子です。</p>	<p>Additionally, the gene VHL is the causative gene for Von Hippel-Lindau disease, a hereditary kidney cancer. This VHL molecule is important for the ubiquitination of HIF, a transcription factor induced by hypoxia.</p>
<p>したがって、VHL は普段は HIF のユビキチン化を介して、HIF を分解させているわけですけれども、LOH、あるいは 2nd hit mutation によって、VHL がなくなってしまうと、その細胞では低酸素状態で HIF がどんどん発現して、蓄積して、それによって、さまざまな転写が活性化して、発がんに向かっていくと考えられるわけです。</p>	<p>VHL normally degrades HIF via ubiquitination of HIF, but if VHL is lost due to LOH or two-hit mutation, HIF is rapidly expressed and accumulated in the cells under hypoxic conditions, causing various transcription activations toward oncogenesis.</p>
<p>また神経線維腫症1型という遺伝病がありますけれども、この原因遺伝子として同定されたのが NF1 という遺伝子です。で、NF1 は、細胞内の増殖因子を伝える重要なシグナル伝達因子である Ras の活性を制御する Ras-GAP と呼ばれる分子そのものであることが分かったわけです。</p>	<p>Another example is a genetic disease called neurofibromatosis type 1, and a gene called NF1 has been identified as the causing gene for the disease. NF1 was found to be a molecule called Ras-GAP, which regulates the activity of Ras, an important signaling factor for communicating intracellular growth factors.</p>
<p>したがって、NF1 をやはり 2nd hit mutation、あるいは</p>	<p>Therefore, again, if the normal NF1 has been completely lost due to</p>

<p>LOHなどによって、まったく正常な NF1 がなくなってしまう細胞では Ras に、oncogene としての Ras に変異が入ったのを同じように、Ras の活性が恒常的に高くなってしまい、それによって、発がんするということが知られています。このように、多くのがん抑制遺伝子というのは同時に、遺伝性の腫瘍性疾患の原因遺伝子ともなっているわけです。</p>	<p>two-hit mutation or LOH, the activity of Ras becomes constantly high in those cells, as if Ras itself had mutated as an oncogene, leading to oncogenesis, causing cancer. Accordingly, many tumor suppressor genes can also simultaneously be the genes responsible for hereditary neoplastic diseases.</p>
<p>ここからは大腸がんのがん抑制遺伝子である APC について話をします。家族性大腸腺腫症、これは英語で Familial Adenomatous Polyposis、略して FAP と一般的に呼ばれますが、FAP の原因遺伝子として見つかったものです。FAP というのは常染色体優性遺伝の腫瘍性疾患であって、この左側の写真のように結腸、大腸に数百から数千個のポリープを自然発生します。</p>	<p>Now let's move on to APC, a tumor suppressor gene for colorectal cancer. This was discovered to be the gene responsible for Familial Adenomatous Polyposis, commonly called FAP for short. FAP is a neoplastic disease with autosomal dominant inheritance. It causes hundreds to thousands of spontaneous polyps in the colon and large intestine, as shown in the photo on the left.</p>
<p>で、ポリープがこんなにたくさんできるので、そのうちの複数、いくつかは必ず大腸がんになって発生する、そういう遺伝病です。右側は正常な結腸の粘膜をコントロールとして示しています。このような非常にシビアな症状のため、FAP の治療法というのは大腸の切除ということになっているわけです。</p>	<p>The nature of this genetic disease is to develop colorectal cancer: because so many polyps developed, some of them inevitably become malignant. The photo on the right shows the normal mucosa in the colon, as a control. Because of the severity of this condition, the treatment for FAP is resection of the colon.</p>
<p>この FAP 患者の原因遺伝子として、APC。APC というのは、Adenomatous polyposis coli で、これは大腸の腺腫性ポリープ症という意味ですが、これを略として APC という名前が付けられていますが、この APC 遺伝子が発見されて報告されたのは1991年で、アメリカの2つのグループから報告されました。それからまた数年経って、APC というのは実は β-catenin と結合するということが分かってきました。</p>	<p>The gene responsible for FAP is APC, which stands for “adenomatous polyposis coli.” The APC gene was first discovered and reported in 1991 by two groups in the United States. A few years later, APC was found to actually bind to β-catenin.</p>
<p>β-catenin は当時は、その E カドヘリンの裏打ちタンパクとして膜に局在して、膜に局在する分子と考えられていましたが、実は膜だけではなくて、そのあとだんだん分かってきました Wnt シグナルを伝える、その中心的な役割を果たす転写因子であることも分かってきたわけです。したがって、APC 遺伝子は Wnt シグナルと関係していることが明らかになってきました。</p>	<p>At the time, β-catenin was considered to be a membrane-localized molecule as a lining protein for E-cadherin, but in fact it was not just a membrane-localized molecule, but also a transcription factor that plays a central role in transmitting Wnt signaling, as we gradually learned afterward. Thus, the APC gene was found to have a relationship with Wnt signaling.</p>
<p>また、その臨床サンプルなどをいろいろ検査、解析していく過程で、APC 遺伝子は FAP の原因としてだけではなくて、ほとんどの散发性大腸がん、80%から90%以上の大腸がんでも広くその変異が認められました。したがって、このような事実から APC は大腸がん発生全般に関わるがん抑制遺伝子であると捉えられるようになったわけで</p>	<p>Additionally, during examinations and analyses of clinical samples, APC gene mutations were found not only as a cause of FAP, but also in most — 80% to 90%, or even more — sporadic colorectal cancers. Based on these findings, APC is now believed to be a tumor suppressor gene involved in the overall development of colorectal cancer.</p>

<p>す。</p>	
<p>それでは、APC とはどのような機能を持ったものでしょうか。その APC は2843アミノ酸から成る巨大な分子で、分子量は300キロダルトンを超えます。ここにそのモチーフを示した模式図を説明しておりますが、大事なのはその分子の真ん中ら辺にあります β-catenin の結合領域です。また β-catenin とそのちょっと後ろにある axin の結合領域、これも非常に重要なモチーフになるわけです。</p>	<p>So, what are the functions of APC? APC is a large molecule, consisting of 2,843 amino acids, with a molecular weight of over 300 kilodaltons. The important part is the binding region of β-catenin, located in the middle of the molecule in this motif, as depicted schematically. The binding region of β-catenin and axin behind it are also a very significant motif.</p>
<p>で、FAP の患者で、その遺伝的に変異が認められているのは、そのほとんどが翻訳終止コドンの入るナンセンス mutation であって、Truncation mutation であるわけですが、その変異が入る領域というのはほとんどがこの N 末は3分の1ぐらいのところには塊っています。したがって、この mutation の入った、変異の入った APC から遺伝子から出てくる変異 APC タンパクというものは、もはや β-catenin や axin と結合できない、そういう異常な分子となるわけです。また散発性大腸がんでも、このような同じような領域で多く変異が見つかっています。</p>	<p>Most of the gene mutations observed in FAP patients are truncation mutations, which are nonsense mutations that include a translation termination codon, and most of these mutations are located in the region around one third of the way from the N-terminus. Thus, the mutant APC protein, coming out from the mutated APC gene, is an abnormal molecule that can no longer bind to β-catenin or axin. In sporadic colorectal cancer, many mutations have also been found in this same region.</p>
<p>そこで、その APC が Wnt シグナルのカスケードにおいて、いったいどういう役割を果たしているかということについて、少し話をしたいと思います。Wnt というのは Wnt と書きますが、これはリガンドの名前であって、Wnt は Frizzled receptor、Frizzled といわれる受容体と結合して細胞のなかにシグナルを伝えます。</p>	<p>Now, let's discuss a bit about the role of APC in the Wnt signaling cascade. Wnt is the name of the ligand, and Wnt binds to the Frizzled receptor to transmit signals into the cell.</p>
<p>で、このスライドは Wnt が OFF の状態です。Wnt がまだ細胞を刺激していない状態を示していますが、そういう状態では APC は axin、β-catenin と complex を作って、そこに GSK3 β というリン酸化酵素が来て、GSK3 β によって、β-catenin がリン酸化を受けます。</p>	<p>In this slide, Wnt is OFF. Wnt has not stimulated the cell yet, but in this state, APC produces a complex with axin and β-catenin, and then a phosphoenzyme called GSK3β comes to the complex, to phosphorylate β-catenin.</p>
<p>で、リン酸化された β-catenin はユビキチンの経路で分解される。すなわち Wnt が OFF の状態では β-catenin は常に分解されているわけで、そのリン酸化、GSK3 β によるリン酸化のために、APC、あるいは axin は足場として働いているということになります。</p>	<p>The phosphorylated β-catenin is degraded by the ubiquitin pathway. In other words, when Wnt is OFF, β-catenin is constantly degraded, and APC or axin acts as a scaffold for phosphorylation by GSK3β.</p>
<p>次に Wnt リガンドが細胞膜の Frizzled receptor にくっついた場合ですね。その Wnt が ON になった場合、どうなるか。その場合は、その APC、axin、β-catenin、GSK3 β のこの complex が形成が阻害され、それによって GSK3 β が β-catenin をリン酸化できなくなってしまう。</p>	<p>Next, what happens when the Wnt ligand attaches to the Frizzled receptor on the cell membrane, and Wnt becomes ON? In that case, the formation of the complex of APC, axin, β-catenin, and GSK3β is inhibited, which prevents GSK3β from phosphorylating β-catenin.</p>
<p>その結果、β-catenin は細胞内に安定化して蓄積して、蓄積した β-catenin は核へ移行して、ここに書いてありま</p>	<p>As a result, β-catenin is intracellularly stabilized and accumulated, and the accumulated β-catenin is transferred to the nucleus, where it forms a</p>

<p>すように、TCF という分子と complex、複合体を形成して、転写因子として働くこととなります。で、この β-catenin、TCF の転写因子によって発現誘導される遺伝子は現在、ほとんど80個以上知られていますが、これらがその Wnt シグナルの標的遺伝子と考えられているわけです。ここで示したのが、いわゆるカノニカルな Wnt シグナルと呼ばれるものです。</p>	<p>complex with the molecule TCF, as described on the slide; it acts as a transcription factor. At present, more than 80 genes are known to be induced by these β-catenin or TCF transcription factors, and are considered to be the target genes of the Wnt signal. These are what are known as the canonical Wnt signals, shown here.</p>
<p>それでは APC に mutation が入った場合、何が起こるのでしょうか。APC に mutation が入った場合、その Wnt がいない場合、細胞外に Wnt リガンドがない場合ですね。Wnt が OFF の場合でも、APC はその GSK3β による β-catenin リン酸化の足場を提供しているわけですから、APC がないと GSK3β は β-catenin をリン酸化することができません。そうすると、Wnt シグナルが入ってこないにもかかわらず、β-catenin は安定化して、安定化した β-catenin は核へ移行して、転写因子として働いてしまう。</p>	<p>So, what happens when mutations occur in the APC? That is to say, when APC mutates with no extracellular Wnt ligand. Even when Wnt is OFF, the APC provides a scaffold for β-catenin phosphorylation by GSK3β, and thus without APC, GSK3β cannot phosphorylate β-catenin. Hence, β-catenin is stabilized despite the absence of Wnt signaling, and the stabilized β-catenin is transferred to the nucleus, to act as a transcription factor.</p>
<p>すなわち Wnt シグナルが ON になるわけです。したがって、APC の変異、2 hit mutation というのは、Wnt リガンドに非依存的に Wnt シグナルを ON にする、そういう役割を持っているということが想像できました。</p>	<p>In other words, the Wnt signal becomes ON. Therefore, the APC mutation, or two-hit mutation, was assumed to have the role of making the Wnt signal ON independent of the Wnt ligand.</p>
<p>このように、in vitro の実験結果から、がん関連遺伝子が、がん遺伝子や、がん抑制遺伝子が発がんに関与しているということが推測されるわけですが、これが本当ががんの原因になっているかということを証明するためには遺伝子改変マウスを作って、遺伝学的に証明する必要があります。</p>	<p>As we have seen, these findings from in vitro experiments suggest the involvement of cancer-related genes, oncogenes, and tumor suppressor genes in oncogenesis, but in order to determine whether or not these genes actually cause cancer, it is necessary to genetically prove this by creating genetically modified mice.</p>
<p>がん遺伝子の場合、その最初に話したように、Gain of Function なので、その活性化型の変異がん遺伝子をトランスジェニックマウスを作って、強制発現させることによって、それでそこに腫瘍が発生するかどうかということを確認すれば証明することができます。一方、がん抑制遺伝子は、Loss of Function で 2 hit mutation が必要です。</p>	<p>As for oncogenes, as I mentioned earlier, it is a gain of function, so we can prove that by creating transgenic mice with the activated mutant oncogene, and forcibly expressing it to see if a tumor develops there. On the other hand, the tumor suppressor gene is a loss of function, requiring a two-hit mutation.</p>
<p>ですから、このマウスが持っている2コピーの遺伝子を、候補となる2コピーの遺伝子を欠損させ、そのノックアウトマウスを作って、腫瘍性病変が発生するかどうかということを確認する必要があります。</p>	<p>Accordingly, it is necessary to create knockout mice for this by deleting two copies of the mouse's candidate gene, then seeing whether or not neoplastic lesions develop.</p>
<p>現在、自然科学の研究方法で、ノックアウトマウスというのは一般的な方法論になっていますが、ここでちょっとだけ簡単に、ノックアウトマウスの作成方法について解説をします。この左上の絵にありますように、ある目的の遺伝子をノックアウトしたいという場合、この遺伝子はゲノム上に</p>	<p>Knockout mice are now a common methodology in natural science research, so allow me to briefly explain how to create knockout mice. Suppose we want to knock out a gene of interest. As you can see in the upper left figure, the gene is scattered across several exons in the genome.</p>

<p>いくつかのエクソンで散らばっているわけです。</p>	
<p>で、この特定のエクソンのなかに、例えば、ネオマイシンの耐性遺伝子のような、薬剤耐性遺伝子を挿入し、そういう Vector を、Vector のプラスミドを作って、それを ES 細胞ですね、embryonic stem cells ですね、胚由来の万能細胞です、に電氣的に導入してやると、頻度は非常に低いですが、10のマイナス6乗、あるいはマイナス7乗の確率で、その相同組み換えが起こって、ES 細胞の染色体上で目的遺伝子のエクソンに、Neo ネオマイシン耐性遺伝子のようなものが挿入される、そういう細胞を取ることができるわけです。</p>	<p>If we insert a drug resistance gene, such as a neomycin resistance gene, into one of these specific exons, create a vector plasmid, and then electrically introduce it into ES cells (embryonic stem cells, i.e. embryonic-derived pluripotent cells), homologous recombination occurs, though at a very low frequency, with a probability of 10^{-6} or 10^{-7}, and a neomycin-resistant gene is inserted into the exon of the target gene on the chromosome of the ES cell.</p>
<p>このマウスの胚前期と呼ばれる胚、blastocyst とも呼ばれますが、この blastocyst に ES 細胞を顕微鏡下でインジェクションしてやって、そのインジェクションした胚前期の胚、blastocyst にもう1回仮親の子宮に移植してやると目的の ES 細胞から発生したマウス、ノックアウトマウス、キメラマウスができるわけです。で、このキメラマウスを交配して目的のノックアウトマウスの系統を樹立するわけですが、私たちもこの APC 遺伝子が cloning されたあとで、この方法論を使って、APC 遺伝子のノックアウトマウスを作りました。</p>	<p>The ES cells created in this way can be injected under a microscope into a fertilized mouse egg or embryo at the blastula stage (3.5 days after fertilization), and the blastocyst is transplanted into the uterus of a foster mother, creating a knockout mouse, or chimeric mouse. These chimeric mice are then mated to establish the desired strain of knockout mice. After the APC gene was cloned, we also used this methodology to create APC gene knockout mice.</p>
<p>で、この図にありますように、作ったのは716番目のコードンの直後にタンパク翻訳が終止するタイプの変異を挿入したマウスです。716アミノ酸で転写が、翻訳が止まってしまうので、APC Δ 716マウスと呼んでいます。で、この716番目でのこういう変異というのは FAP、および散発性の大腸がん認められる変異領域に含まれているわけです。</p>	<p>As shown in this figure, we created mice with a mutation that terminates protein translation immediately after the 716th codon. We call them APCΔ716 mice, because transcription and translation stop at the 716 amino acid.</p> <p>This mutation at the 716th amino acid is observed in the mutation region found in FAP and sporadic colorectal cancer.</p>
<p>また、この変異 APC 蛋白はその β-catenin や、axin と結合することはできません。そして、この APC Δ 716マウスを交配して、まずホモで APC 遺伝子を欠損したマウスを作ろうとしますと、これは生まれてきませんでした。これは胎生で致死であって、APC 遺伝子というのはどうもその発生で臓器を形成する過程で重要なようです。</p>	<p>In addition, this mutant APC protein cannot bind to β-catenin or axin. Our first attempts to create a homozygous mouse lacking the APC gene, by pairing these APCΔ716 mice, were not successful. This was lethal in embryo, suggesting the importance of the APC gene in the process of organ formation during development.</p>
<p>余談になりますけれども、ほとんどのがん抑制遺伝子はノックアウトマウスを作ったときにホモを作ろうとすると、それは致死であって、がん抑制遺伝子はなくなるとがんになります、embryo の段階でなくなると臓器が形成されないなどの非常に重要な役割を担っている遺伝子であると考えられるわけです。そして、この APC Δ 716マウスのヘテロのマウスですね。ヘテロは正常に生まれるわけです。</p>	<p>Incidentally, when we try to create homozygous knockout mice, most of the tumor suppressor genes are lethal. The loss of those tumor suppressor genes results in the development of cancer, but if they are lost during the embryonic stage, the organs do not form properly, demonstrating the critical role of these genes. So, back in this APCΔ716 mouse, this is heterozygous. The heterozygous mice are born normally.</p>

<p>このマウスを解析していきますと、腸管全域に腫瘍を自然発生しました。この左側の写真は十二指腸であって、夥しい数のポリープが発生しているのがよく分かります。で、真ん中は大腸。APC Δ 716マウスの大腸で、ポリープの数はあまり多くありませんが、非常に大きな腫瘍を形成します。</p>	<p>When analyzing these mice, we found that they spontaneously developed tumors throughout the intestinal tract. The photo on the left shows the duodenum, and you can clearly see the development of a great number of polyps. The photo in the middle shows the large intestine of an APCΔ716 mouse: there are not many polyps, but a very large tumor has formed.</p>
<p>右側は病理切片の H&E 染色ですが、病理学的にもその異形成を呈する腫瘍上皮細胞で構成された腸管ポリープを発生していて、これはヒトの大腸ポリープと非常によく似ていました。すなわち APC Δ 716マウスは FAP と類似しており、このマウスの作成によって、APC 遺伝子の変異という事実が腸管に腫瘍を発生する原因となっているということが遺伝学的に証明されたわけです。</p>	<p>The photo on the right is an H&E staining of pathological sections, showing intestinal polyps composed of tumor epithelial cells with pathological dysplasia, very similar to human colon polyps. In other words, APCΔ716 mice are similar to FAP, and the creation of these mice provided genetic evidence that mutations in the APC gene are responsible for the development of intestinal tumors.</p>
<p>そこで、APC Δ 716マウスに発生する腸管腫瘍病変を丹念に、詳細に調べていきますと、これは経時的に変化するポリープの数を示したグラフですけれども、横軸がやはり週齢です。マウスの週齢を示しています。縦軸が個体あたりの発生したポリープの数を示しています。これを見て分かりますように、3週齢ぐらいから開けていったわけですが、週齢に比例して、正比例して、直線的に腸管の腫瘍が増加しているということがよく分かります。</p>	<p>So, we closely, carefully examined the intestinal tumor lesions that occurred in the APCΔ716 mice. Here is a graph showing the number of polyps over time, where the horizontal axis is the age of mice, and the vertical axis is the number of polyps per animal. We opened the mice starting around three weeks of age. As you can see, the number of tumors in the intestinal tract clearly increased in direct linear proportion to the age of the mice.</p>
<p>これは先ほど示しました bilateral retinoblastoma と同じであって、どういうことかといいますと、somatic に起こる、確率論的に起こる1回のイベントでポリープが形成されているということを示しているわけです。で、これをサポートするエビデンスとしては、この色の別はポリープの大きさを区別しているわけですが、この一番薄い黄緑で示したのは直径0.5ミリ以下で一番小さなポリープなわけですが、この小さなポリープはどの週齢でマウスを解剖して解析してみても、同じ数だけ発生している。ということは常に一定の頻度で新しい腫瘍ができ続けている。このマウスはでき続けているということを示しているわけです。</p>	<p>This is the same as with bilateral retinoblastoma, which I showed you earlier. What this means is that the polyps are formed by a single somatic, stochastic event. The evidence to support this is the size and rate of polyp development. Look at the different colors in this graph. They indicate the sizes of the polyps, and the smallest polyps, no more than 0.5 mm in diameter, are shown in light yellow-green. No matter when mice were dissected, the same number of small polyps was observed, regardless of the age of the mice. This means that new tumors continue to form at a constant rate.</p>
<p>さて、このような事実からも体細胞で一定頻度で起こる 2nd hit、おそらく APC の 2nd hit が腫瘍を発生させる原因であるということが想像できました。</p>	<p>Based on these findings, the second hit of APC, which occurs at a certain frequency in somatic cells, was considered to be the possible cause of tumor development.</p>
<p>そこで、これは若い APC Δ 716マウスの小腸を詳細に調べている図を示していますが、左側が実体顕微鏡を少し倍率を上げて見えています。ここに写っているのは腸管の絨毛です。正常の絨毛がたくさんありますが、そのなかに黄色い矢印で示したものの、膨れた腫脹した絨毛が見られますが、これが実体顕微鏡下で見つけることができる</p>	<p>This slide shows the small intestine of a young APCΔ716 mouse in detail, with a somewhat higher magnification using stereomicroscope shown to the left. These is the villi of the intestine. In addition to many normal villi, you can also see some swollen, balloon-like villi, marked with yellow arrows. These are microadenomas, the smallest tumor lesions that can be found under a stereomicroscope. The photo on the right shows a histological slide prepared from this lesion.</p>

<p>最も小さな腫瘍病変、微小腺腫です。Microadenoma とも呼んでいますが、この場所を病理組織標本を作ってみますと、右のようになります。</p>	
<p>これが微小腺腫の病理像ですが、外側に正常の絨毛の上皮細胞の層がありますが、その内側にですね、粘膜固有層のところに明らかに異形を呈している。核の配列が乱れている腫瘍細胞が増殖しているのが分かります。しかも、これが正常のクリプトに連続しているので、今まさに発生し始めた腸管の腫瘍の小さなものであるということが分かるわけです。</p>	<p>This is the pathology of a microadenoma. Though the outer strata with epithelial cells of villi is normal, the inner view is obviously dysmorphic, as we can see from the proliferation of tumor cells with disarranged nuclei around the mucosal lamina propria. Moreover, these cells are continuous with the normal crypts, indicating that they are just starting to develop from these tiny tumors in the gut lumen.</p>
<p>で、こういう病理組織標本から細胞を集めてきて遺伝子を調べてみると、100%の高率で正常 APC 遺伝子が LOH によって欠損しているということが分かりました。すなわち APC Δ716 マウスでも LOH によって、正常 APC 遺伝子がなくなる。それによって、腫瘍が発生しているということが分かったわけです。</p>	<p>Upon collecting cells from these histological slides to examine their genes, we found deletion of normal APC genes due to LOH with a high rate of 100%. In other words, it became clear that the APCΔ716 mice also lost their normal APC gene due to LOH, resulting in the development of tumors.</p>
<p>ここに APC Δ716 マウスの解析から分かってきた、その腫瘍発生機序を模式的に示しています。この一番左上から見ていただきたいんですけども、これは小腸を模式的に示していますが、緑色のところが未分化の細胞が入っているクリプトの領域で、青いところが分化した絨毛で構成される、分化した上皮細胞で構成される絨毛のところなんです。</p>	<p>Here is a schematic representation of the tumor-generating mechanism revealed by the analysis using APCΔ716 mice. Start in the top left. This is the small intestine, drawn schematically. The zones colored in green are the crypts containing undifferentiated cells, and the ones colored in blue are the villi, composed of differentiated epithelial cells.</p>
<p>で、APC 遺伝子にヘテロで変異が入っても、その腸管の構造形成にはまったく問題がありません。しかし、このクリプトの増殖性の細胞で分裂のときに正常 APC 遺伝子が LOH によって欠損してしまうと、そのような細胞では Wnt シグナルが恒常的に活性化し、ここではピンク色の細胞で描いてありますが、そのような細胞はどんどん増殖を続けて、この上の右側のような microadenoma を形成し、さらに増殖を続けていくことによって、この下の段の右側のような大きなポリープを形成するようになるわけです。</p>	<p>Even if the APC gene is affected by heterozygous mutation, there will be no problems with the structural formation of the intestinal tract. However, if the normal APC gene is lost due to LOH during mitosis in the proliferative cells of the crypt, Wnt signaling is activated constantly in these cells, and they will continue to proliferate, forming microadenomas as shown in the top right, in pink. Any further proliferation then leads to the formation of large polyps, as shown in the bottom right.</p>
<p>したがって、Wnt シグナルの恒常的な亢進が腸管腫瘍発生の直接的な原因であるということがこの研究から分かってきたわけです。</p>	<p>Consequently, the study demonstrated that the constant increase in Wnt signaling was the direct tumor-generating cause in the gut lumen.</p>
<p>それでは、Wnt シグナルというのは何をしているのでしょうか。どうして、Wnt シグナルが亢進すると腫瘍が発生するのか。それを知るためには正常の腸上皮細胞における Wnt シグナルの役割を知る必要があります。</p>	<p>What, then, does Wnt signaling do? Why does oncogenesis occur with increased Wnt signaling? To understand this, we must first understand the role of Wnt signaling in normal intestinal epithelial cells.</p>
<p>このスライドでも、これは小腸の模式図ですけども、上の青い細胞は絨毛のところの分化した上皮細胞の領域を示していて、下の点線で囲ってあるところは、その未分化</p>	<p>This is a schematic diagram of the small intestine. The upper blue zones are differentiated villi epithelial cells, and the lower dotted box indicates the crypt zone, composed of undifferentiated epithelial cells. Stem cells</p>

<p>の上皮細胞で構成されているクリプトの領域です。で、このクリプトには stem cells といわれる幹細胞がいるわけです。そこを拡大しておりますが、stem cells が未分化性を維持されるためには実はその周囲のニッチといわれる領域にある細胞、ニッチ細胞というところから Wnt が分泌されて、それによって、Wnt シグナルが活性化していることが重要と考えられています。</p>	<p>are located in this crypt. Here is a zoomed-in picture. In order for stem cells to maintain their undifferentiated state, the activated Wnt signaling is considered important, after having been secreted from the peripheral cells, which are called niche cells.</p>
<p>したがって、Wnt シグナルというのは未分化性を維持するのに重要な細胞です。シグナルになるわけです。で、現在まだニッチ細胞は特定されていませんが、この辺の未分化の細胞で Wnt が亢進していることが分かっています。</p>	<p>Thus, Wnt signaling is significant for maintaining the undifferentiated state of stem cells. To date, the niche cells have not yet been identified, but Wnt is known to get enhanced in undifferentiated cells around this zone.</p>
<p>で、この活性化している Wnt シグナルは分裂して、だんだん分化していくにしたがって、だんだんそのシグナル強度が弱くなっていくわけですが、APC 遺伝子の 2 hit mutation によって、恒常的に Wnt シグナルが活性化してしまうと、そういう細胞はこの stem cells、ずっと stem cells の状態が維持されてしまって、その未分化な状態がずっと続いてしまうわけですね。これは、すなわち腸管の上皮細胞の腫瘍がそのままであると考えられます。</p>	<p>Upon cell division and differentiation, the activated Wnt signaling normally gradually diminishes. However, if Wnt signaling is constantly activated through a two-hit mutation of the APC gene, these cells will be left as stem cells, maintaining their undifferentiated state for a long time. Hence, this is the very oncogenesis itself of intestinal epithelial cells.</p>
<p>ここで多段階発がんの話をしませんが、大腸がんというのはこの図で示していますように、正常の腸上皮から異形成の病変ができて、最初、腺腫、ポリープ、これは adenoma といいますね。それがだんだん悪性になって、浸潤性のがん、carcinoma へ進行することが知られています。</p>	<p>Now, I will talk a bit about multistep oncogenesis. This slide shows colorectal cancer. Its mechanism is known to start as a dysplastic lesion from the normal intestinal epithelium, initially as an adenoma or polyp, and then it gradually becomes malignant and progresses to carcinoma, an invasive cancer.</p>
<p>これを adenoma-carcinoma sequence と呼ばれるわけですが、この adenoma から carcinoma へ移行するステップ。腺腫、癌腫、そして浸潤したり、転移したりするそれぞれのすべてのステップに特異的な遺伝子変異が対応していると考えられています。</p>	<p>This is called the adenoma-carcinoma sequence. During this sequence, each and every step from adenoma to carcinoma, or each activity, such as invasion and metastasis, is considered to correspond with specific gene mutations.</p>
<p>で、このような遺伝子変異が多段階に蓄積することによって、大腸がんが発生すると考えられています。で、これまでの臨床組織標本の解析やノックアウトマウス、トランスジェニックマウスを用いた研究によって、この図で示したような大腸がんの多段階発がんが考えられています。で、この図では赤字でがん遺伝子、青い字でがん抑制遺伝子を示していますが、まず正常の粘膜上皮に APC 遺伝子の 2 hit mutation が入ると、Wnt シグナルが亢進して、それによって未分化性が維持されます。これによって、まずポリープが発生するわけですね。</p>	<p>So the accumulation of such gene mutations, over multiple steps, is likely responsible for the development of colorectal cancer. Based on the analyses of clinical tissue samples, as well as studies using knockout and transgenic mice, the multi-step oncogenesis of colorectal cancer is considered to be as shown in this figure. Here, oncogenes are shown in red, and tumor suppressor genes in blue. When the two-hit mutation of the APC gene attacks the normal mucosal epithelium, Wnt signaling is enhanced, thereby maintaining the undifferentiated state of the cells. This causes polyps to develop as the first step.</p>
<p>で、その初期の adenoma の細胞が増殖していく過程で、</p>	<p>In the process of proliferation of these early adenoma cells, activating</p>

<p>ras などの増殖因子のシグナル伝達因子に活性化の変異が入る、oncogene な変異が入ると、さらに細胞増殖率が亢進するわけです。で、このポリープがさらに late adenoma として大きく成長していくわけですが、その過程で Smad4 と呼ばれる tumor suppressor、がん抑制遺伝子にやはり 2 hit mutation が入ってしまうと、この Smad4 というのは TGF-β のシグナルトランスダクションの重要な因子であって、TGF-β というのは実は腸上皮の分化を誘導する因子なので、この Smad4 がなくなることによって、TGF-β に対する、その分化のシグナルに対して完全に耐性になってしまい、より悪性になるわけですね。</p>	<p>mutations or oncogenic mutations occur in the signaling factors of growth factors, such as ras, to further increase the rate of cellular proliferation. These polyps then grow further as late adenomas, and in the process, a tumor suppressor gene called Smad4 may be mutated through two-hit mutations. This Smad4 is important for TGF-β signaling transactions, and TGF-β is actually a factor that induces intestinal epithelial differentiation. Thus, if this Smad4 is lost, cells become completely resistant to TGF-β signaling to differentiate, leading them to become even more malignant.</p>
<p>これによって、がんが発生すると考えられます。もちろん、ここで P53 などの変異が入って、より悪性のがんが起これると考えられます。少し oversimplification かもしれませんが、ここに示した APC、K-ras、Smad4、P53 などが、その大腸がんの多段階発がん非常に有名な4つの遺伝子の変異のセットになると考えていいと思います。</p>	<p>This is believed to be the cause of developing cancer. When other mutations such as p53 come in, then naturally, the disease may become more malignant. This slide may be a bit of an oversimplification, but it shows the very famous set of four genetic mutations that are involved in the multistep oncogenesis of colorectal cancer: APC, K-ras, Smad4, and P53.</p>
<p>そこで少し注意していただきたいのが、その多段階発がんを考えるとときに良性のポリープの細胞が全体をだんだん悪性化して、全体のがんになっていくとは考えないでください。そうではなくて、この図でもう1回説明しますが、この図は上からだんだん下に行くにしたがって、だんだん悪性化していくことを示していますが、この丸一つずつが一つの上皮細胞と考えてください。</p>	<p>Meanwhile, for multi-step oncogenesis, try not to think of it in terms of the cells of a benign polyp gradually becoming malignant and turning into a whole cancer. Instead, as I explain once again using this figure, think of each of these circles as a single epithelial cell. In this figure, the top circles are normal, but some of them gradually become malignant toward the bottom.</p>
<p>で、一番上の場合ですね、APC 遺伝子の 2 hit mutation が入る。そうすると、赤でもマークしたように、Wnt が亢進した initiative な mutation によって、その未分化性を維持し、そういう細胞はグロースアドバンテージが得られるので増殖するわけです。で、この細胞がだいたい10の6乗ぐらいまで細分する過程において、いろんな遺伝子に散発的に mutation が入っていくわけですが、そのなかでたまたま K-ras に oncogenic な mutation が入ることが出てくる可能性があります。</p>	<p>In the case of the cell at the top, when the two-hit mutation of the APC gene attacks the cell, the cell maintains its undifferentiated state through Wnt-enhanced initiative mutation, as indicated in red, and these cells proliferate because they have a growth advantage. In the process of subdividing these cells to 10⁶, mutations are sporadically introduced into various genes, and among these, oncogenic mutations may be introduced into K-ras by chance.</p>
<p>それを緑で示していますが、その K-ras mutation が重なると、さらに増殖の advantage、有利なグロースアドバンテージが出るので、この細胞がまたクローナルにまた expand する。その expand する過程で、この集団のなかで Smad4 に mutation が入る細胞が出てくると、この mutation によって、ここまでの細胞はみんな TGF-β によって分裂が止まるセンシティブだったわけなんです、そのあと、Smad4 なくなることによって、TGF-β に対しても耐性になって、さらに悪性のがんができてくると考えら</p>	<p>This second mutation is shown in green. When these K-ras mutations overlap, they provide an additional growth advantage, so these cells will further expand clonally. During the expansion process, if any of the Smad4 genes in this population mutate, this mutation affects cells that were previously sensitive to TGF-β (to stop them from dividing), causing them to become resistant to TGF-β, hence forming even malignant cancer.</p>

れるわけです。	
<p>このように多段階発がんというのは、各ステップで、その mutation がたまたま入った1個の細胞が growth advantage を獲得して、クローナルに expansion する。その繰り返りであるということを理解してください。</p>	<p>So you can think of multi-step oncogenesis as a repetition of processes at each step, where a single cell happens to have the mutation, then acquires a growth advantage, expands clonally, and repeats the entire process in the following step.</p>
<p>それでは最後にですが、その Wnt と TGF-β ですね。その腸上皮細胞の分化と腫瘍化における Wnt と TGF-β について最後説明をいたします。この左側の模式図では先ほども示しましたが、クリプトの未分化性を維持するためには Wnt のシグナルが重要です。</p>	<p>Finally, I will discuss Wnt and TGF-β once again, in the differentiation and oncogenesis of intestinal epithelial cells. As shown earlier in this diagram on the left, Wnt signaling is critical for maintaining undifferentiated state in the crypt.</p>
<p>で、この未分化の細胞がだんだん分化していく過程で、Wnt シグナルが落ちていって、絨毛のほうに分化した細胞が移動すると、そこでは TGF-β のシグナルが入っているわけです。したがって、Wnt シグナルを活性化するような、亢進するような変異、あるいは TGF-β シグナルを遮断するような変異、これらのそれぞれが発がんに作用すると考えることができるわけです。</p>	<p>As these undifferentiated cells gradually differentiate, Wnt signaling drops off, and when the differentiated cells go toward the villi, TGF-β signaling is present there. Therefore, mutations that activate or enhance Wnt signaling, or mutations that block TGF-β signaling, can be both considered to have an effect on oncogenesis.</p>
<p>この右側にはその Wnt シグナルについて示していますが、この APC はそれがなくなることによって、β-catenin が安定化して、Wnt を亢進するので、APC はがん抑制遺伝子として知られているわけですが、axin も APC と同じように足場タンパクとして重要で、他のがんでは axin が tumor suppressor に関与している遺伝子といわれているわけです。</p>	<p>The figure on the right is about the Wnt signal. APC is known to be a tumor suppressor gene, because its loss stabilizes β-catenin to enhance Wnt. Axin is another important scaffolding protein, just like APC, and is considered to be the gene that plays a role in tumor suppression in other types of cancers.</p>
<p>また β-catenin のほうも、β-catenin 自身にリン酸化されないような mutation が入ると、β-catenin が oncogene として働いて、Wnt を亢進してしまう、そういうこともあります。また、この今、右に示しているのは TGF-β のシグナルですが、TGF-β は type I, type II のレセプターとくっつくと、Smad2、あるいは Smad3 がリン酸化され、それらが Smad4 と complex を作って、転写因子として働き、それが分化を促進するのに重要な遺伝子の発現を誘導するわけですが、</p>	<p>β-catenin can also act as an oncogene to enhance Wnt, when mutations are introduced to prevent β-catenin itself from phosphorylation. As for the TGF-β signals shown to the right, when it attaches to type I or type II receptors, Smad2 or Smad3 is phosphorylated, and they subsequently form a complex with Smad4 to act as a transcription factor, to induce gene expression that is important for promoting differentiation.</p>
<p>ですから Smad4 が 2 hit mutation が起こると、分化が抑制されて、がんが悪性化になるわけです。これと同じように type II レセプター自身もがん抑制遺伝子として、特に胃がんのがん抑制遺伝子として重要です。Smad2、あるいは Smad3 もがん抑制遺伝子として、その可能性があると、いろんな論文が発表されています。</p>	<p>So, when a two-hit mutation occurs in Smad4, differentiation is suppressed, leading to the cancer becoming malignant. Likewise, the type II receptor itself is also important as a tumor suppressor gene, especially in gastric cancer, and Smad2 and Smad3 have also been reported as possible tumor suppressor genes in the literature.</p>
<p>以上が、がん抑制遺伝子について、ずっと話してきましたが、ここでまとめをします。まず、がん抑制遺伝子は 2 コピーの正常遺伝子の双方が変異、あるいは欠損すること</p>	<p>So, allow me to now review today's discussion of tumor suppressor genes. First of all, tumor suppressor genes can cause cancer when both copies of the normal genes are either mutated or deleted. This important</p>

<p>で、がんが発生する。そういうものです。これは Knudson の2ヒット説として重要、有名であって、Rb だけに限ったものではなくて、APC でも、NF1 でも、みんなそうです。</p>	<p>fact is well known as Knudson's two-hit theory, and is not limited to only Rb, but also applicable to APC, NF1, and all others.</p>
<p>次のがん抑制遺伝子の産物である Rb という分子ですね。これは転写因子である E2F の活性を制御し、その結合によって制御しているために細胞周期を調整するのに重要なタンパクです。</p>	<p>Second, Rb, a product of the tumor suppressor gene, regulates the activity of the transcription factor E2F through binding, so it is important in regulating the cell cycle.</p>
<p>で、この Rb 遺伝子の 2 hit mutation によって、この制御が破綻して腫瘍が発生すると考えられています。また APC 遺伝子の 2 hit mutation によって、その細胞を未分化に維持しようという、Wnt シグナル、このシグナルが非常に亢進します。それが腸管腫瘍発生の直接的原因であるということが分かっています。</p>	<p>When a two-hit mutation occurs in the Rb gene, its regulation fails, likely leading to oncogenesis. In addition, a two-hit mutation of the APC gene greatly enhances the Wnt signal, which keeps the cells in an undifferentiated state. This is known to be the direct cause of intestinal oncogenesis .</p>
<p>これはマウスを用いた genetic な科学研究によっても証明されているものです。そして、この大腸がんというのは複数のがん遺伝子、あるいはがん抑制遺伝子の変異が多段階に蓄積して、それによって、各段階でクローナルな expansion があって、発生してくるものであるということが分かっています。</p>	<p>This has also been scientifically supported by genetic researchers, using mice. It has been revealed that colorectal cancer is caused by the accumulation of mutations in multiple oncogenes or tumor suppressor genes in multiple stages, and clonal expansion occurs at each stage.</p>
<p>そのなかでも APC 遺伝子の変異、これによる良性腫瘍、ポリープの形成というのが最も最上流に位置する変異であることも分かっています。そして最後に上皮細胞の分化促進因子である TGF-β シグナルですね。このシグナルは分化に重要なわけですが、このシグナルの伝達のコアになっている Smad4、Smad4 というエフェクターも大腸がん発生に関わる、がん抑制遺伝子として重要であって、これも 2 hit mutation によって、良性腫瘍は悪性のがんとして発生するということが分かっています。</p>	<p>Among these, mutations in the APC gene are found to be the most upstream mutations that can cause the formation of benign tumors and polyps. Finally, TGF-β signaling, a factor that promotes differentiation of epithelial cells, is important for differentiation, and Smad4, an effector that plays a central role in the transmission of this signaling, is another important tumor suppressor gene involved in the development of colorectal cancer. It is also known that a two-hit mutation causes benign tumors to develop into malignant cancers.</p>
<p>以上、そのがん遺伝子をはじめとして、がん抑制遺伝子の概念、そして Rb と APC の機能、そして大腸がんの発生について講義をしました。これで終わりにします。</p>	<p>So, to conclude, we have discussed the concept of tumor suppressor genes, including oncogenes, the functions of Rb and APC, and the development of colorectal cancer. Thank you.</p>