

「Two-hit theory と今日的課題」

日時 平成 16 年 11 月 12 日(金) 午後 1:00~5:30

場所 国立京都国際会館

企画・司会 武藤 誠 [(専門委員会 委員) 京都大学 大学院医学研究科 教授]

- 1:00 開会挨拶 西川 伸一 [(専門委員会 委員長) 理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター 副センター長]
- 受賞者紹介 武藤 誠
- 1:15 受賞者講演 アルフレッド・ジョージ・クヌッドソン Jr.
「Lessons from Hereditary Cancer」(家族性腫瘍の研究とその成果)
- 2:15 講演 樋野 興夫 [順天堂大学 医学部 教授
(財)癌研究会 癌研究所 実験病理部 部長]
「2 ヒットの実証 遺伝性腎がんモデル」
- 2:55 休憩
- 3:10 講演 武藤 誠
「家族性大腸腺腫症のマウスモデルを用いた、クヌッドソン “2 ヒット説”の“第二ヒット”の解析：新しい分子機構と癌悪性化に及ぼす意義について」
- 3:50 講演 武田 俊一 [京都大学 大学院医学研究科 教授]
「逆遺伝学的手法を用いた、複製にリンクした DNA 修復機構の解析」
- 4:30 講演 鈴木 拓 [札幌医科大学 医学部 助手]
「エピジェネティックな異常とジェネティックな異常は協調してヒト大腸発癌を促進する：2 ヒットの新たなメカニズム」
- 5:10 全体討議
- 5:30 閉会

主催 / 財団法人 稲盛財団

後援 / 京都府 京都市 NHK

協賛 / 日本癌学会 日本細胞生物学会 日本生化学会 日本分子生物学会 日本免疫学会

TWO GENETIC HITS TO CANCER : PAST, PRESENT AND FUTURE

1:00 pm - 5:30 pm, November 12, 2004 (Fri.)

Kyoto International Conference Hall

Coordinator and Moderator

Makoto Mark Taketo (Member, Kyoto Prize Selection Committee; Professor, Graduate School of Medicine, Kyoto University)

- 1:00 **Opening Address**
Shin-Ichi Nishikawa (Chairman, Kyoto Prize Selection Committee; Deputy Director, Center for Developmental Biology, RIKEN)
Introduction to Laureate
Makoto Mark Taketo
- 1:15 **Laureate Lecture**
Alfred George Knudson, Jr.
“Lessons from Hereditary Cancer”
- 2:15 **Lecture**
Okio Hino (Professor, School of Medicine, Juntendo University; Chief, Department of Experimental Pathology, Cancer Institute)
“Hereditary kidney cancer models fitting Knudson's 2 hit”
- 2:55 **Intermission**
- 3:10 **Lecture**
Makoto Mark Taketo
“Characterization of “the second hit” in mouse models of familial adenomatous polyposis: New molecular mechanisms and implication to cancer progression”
- 3:50 **Lecture**
Shunichi Takeda (Professor, Graduate School of Medicine, Kyoto University)
“Reverse genetic analysis of DNA repair and recombination pathways in the chicken B lymphocyte DT40”
- 4:30 **Lecture**
Hiromu Suzuki (Instructor, School of Medicine, Sapporo Medical University)
“Epigenetic and genetic events cooperate to promote human colorectal tumorigenesis: A new mechanism of ‘the second hit’ ”
- 5:10 **Q & A Session**
- 5:30 **Closing**

Organized by Inamori Foundation

Supported by Kyoto Prefectural Government, Kyoto City Government, and NHK

Cooperated by Japan Society for Cell Biology, The Japanese Biochemical Society, Japanese Cancer Association, Japanese Society for Immunology, and The Molecular Biology Society of Japan

受賞者講演要旨

アルフレッド・ジョージ・クヌッドソン Jr. 博士

フォックス・チェイス癌センター 上級顧問

家族性腫瘍の研究とその成果

ほとんどの癌には遺伝性と非遺伝性がある。遺伝性である家族性腫瘍の患者は全体から見れば少数だが、家族への影響や、ごく一般的な非遺伝性の癌にも共通する点が多いことから、大変重要な存在となっている。

小児の網膜芽細胞腫は、家族性腫瘍の代表例である。患者の *RB1* 遺伝子はその対立遺伝子の片方に胚性（遺伝性）の突然変異を受けており（第 1 ヒット）、通常は複数の腫瘍が発生するが、腫瘍が一つも発生しない場合もある。腫瘍はもう片方の対立遺伝子に 2 番目の突然変異または喪失が起きること（第 2 ヒット）によって形成される。ヒトの個体レベルで見れば、その遺伝的形質は優性であるが、細胞レベルでは、その遺伝は劣性である。「2 ヒット説」は、後に *RB1* 遺伝子のクローニングや、ほとんどの腫瘍において 2 つの対立遺伝子はともに突然変異あるいは不活性化しているという報告によって支持された。つまり腫瘍形成のメカニズムは、遺伝性、非遺伝性の両方の癌に共通しているのである。

優性遺伝の癌の遺伝子で最初にクローニングされたのは *RB1* だが、その後、*RB1* 以外にも 50 種類ほどの遺伝子がクローニングされている。その多くは劣性遺伝子が関わる腫瘍化機構によるもので、「2 ヒット」の機構で直接生じた腫瘍は、しばしばアデノーマなどの良性腫瘍で、それが体細胞内の突然変異でさらに他の遺伝子に変異が蓄積して悪性腫瘍へと段階的に進展する。他にこのような遺伝子としてよく知られているのは、神経線維腫症 (*NF1*, *NF2*) や、家族性大腸ポリポーシス (*APC*)、乳癌 (*BRCA1*, *BRCA2*) の遺伝子などである。

劣性遺伝子が関与した発癌機構は、遺伝子産物である蛋白が質的、量的にすべて失われて腫瘍が形成されることを示唆しており、実際殆どの場合その通りである。ただし例外として、優性的に活性化した 4 つの癌遺伝子の関与が明らかになっている。劣性遺伝子のほとんどは癌抑制遺伝子であり、こうした遺伝子は全て、細胞内の 2 つの過程、すなわち細胞周期を通過して細胞が複製する機構と細胞死（アポトーシス）のいずれかを直接的あるいは間接的に調節している。つまり、こうした遺伝子に突然変異が起きると細胞増殖率が上がったり細胞の死亡率が下がったりする。ほとんどの劣性遺伝子は細胞表面と核を結ぶ信号伝達経路で間接的に作用するが、他方、劣性遺伝子のあるものはその機能の喪失が原因となって、自然発生の、あるいは環境因子で誘発される、DNA 複製のエラーを修復できない細胞を作り出してしまう。こうしてできた異常細胞では、突然変異率が急増し、その中には、癌の発症につながる増殖性をもたらすものもある。遺伝性癌における突然変異の仕組みは、非遺伝性癌と非常に共通するところがあるため、その研究によって癌の予防や治療のための標的分子（薬物）を同定するのに役立っている。

Abstract of the Laureate Lecture

Dr. Alfred George Knudson, Jr.

Senior Advisor, Fox Chase Cancer Center

Lessons from Hereditary Cancer

Nearly all cancers exist in both heritable and non-heritable forms. Collectively, the heritable examples constitute a minor, but important, fraction of all cancer - important for their effects on families and for their relevance to the more common non-heritable forms.

Retinoblastoma in children has served as a model for the heritable group of cancers. Affected persons typically carry a mutant *RBI* gene and usually have more than one tumor, but may develop no tumors. Mutation or loss of the second copy of the gene is necessary for tumorigenesis. For the person, inheritance is dominant; for the tumor, the mechanism is recessive. This hypothesis was conclusively supported by the subsequent cloning of *RBI* and the demonstration that in most tumors each allele of the gene is mutant or otherwise inactivated. The tumorigenic mechanism is similar for both the hereditary and non-hereditary forms.

Although *RBI* was the first dominantly heritable cancer gene to be cloned, approximately 50 others have since been cloned, including nearly all of the well known examples of such genes. The great majority demonstrate a recessive tumorigenic mechanism, although the characteristic "two-hit" tumors are often benign precursors of malignant tumors that acquire other somatically mutant genes as well. Well known examples are the genes for neurofibromatosis (*NF1 and NF2*), familial polyposis coli (*APC*), and breast cancer (*BRCA1 and BRCA2*).

A recessive mechanism implies that tumorigenesis results from loss of function, which is indeed the case, although four exceptions have proved to involve dominantly active oncogenes. The vast majority of the recessive genes are tumor suppressors. All of these directly or indirectly regulate one of two cellular processes: passage through the cycle of cell replication, or cellular apoptosis; i.e., their mutants permit an increased cell birth rate or a decreased cell death rate. Most of them act indirectly in signal transduction pathways that connect the cell surface to the nucleus. For another category of recessive genes the loss of activity produces a cell that fails to repair errors in DNA replication that occur spontaneously or are induced by environmental agents. The resultant crippled cell then undergoes mutations at greatly increased rates; some of these impart a growth advantage that leads to cancer. The mechanisms of inherited mutations are highly relevant to non-hereditary cancers, and provide targets for prevention and treatment.

企画・司会・講演・受賞者紹介

武藤 誠

京都大学 大学院医学研究科 教授

講演要旨

**家族性大腸腺腫症のマウスモデルを用いた、クヌッドソン “2 ヒット説 ” の
“ 第二ヒット ” の解析：新しい分子機構と癌悪性化に及ぼす意義について**

クヌッドソン博士の「2 ヒット説」では、「ヒット」は単に「突然変異」とだけ記されていたが、その後の解析でこれらは点突然変異、欠失、挿入、組換えなど多様な変化が含まれることが分かった。

我々は家族性大腸腺腫症の原因遺伝子をマウスで変異させたモデルマウスを作出しポリープ形成が *Apc* 遺伝子の LOH による第 2 ヒットで起こることを示した。その後、この LOH はリボソーム DNA 域の組み換えで起こることが分かり、*Apc* 変異マウスに *Cdx2* 遺伝子変異を追加すると直腸域の細胞で組換え頻度が増して染色体が不安定になり、直腸ポリープ症になることを見出した。第 2 ヒットにおけるヒトの癌発生機構との関連を考察したい。

Coordinator, Moderator, Lecturer and Introduction to Laureate

Makoto Mark Taketo

Professor, Graduate School of Medicine, Kyoto University

ABSTRACT

Characterization of "the second hit" in mouse models of familial adenomatous polyposis: New molecular mechanisms and implication to cancer progression

In the original "two-hit" hypothesis by Dr. Knudson, both the first and second hits were defined as "mutations". These mutational events included various types of changes (point mutations, short insertions and deletions, as well as large interstitial deletions, and recombinations).

We have studied the LOH mechanism in the mouse *Apc* locus whose mutations cause intestinal polyposis similar to human familial adenomatous polyposis (FAP). We first constructed *Apc*⁷¹⁶ mutant mice in which one of the *Apc* alleles were mutated by knockout mutation. While homozygotes were embryonically lethal, heterozygous mice developed 300-600 polyps in the small intestine. In the polyp adenoma epithelium, *Apc* LOH was found in all polyps analyzed. In a subsequent FISH study, however, we found two spots of hybridization rather than just one, in every nucleus of the adenoma epithelium. These results suggested that the adenoma epithelial cells are homozygous for the mutant *Apc* allele. It was found that this was caused by recombination of the rDNA locus near the centromere of this chromosome, Chr18.

Recently, we introduced additional mutation of homeobox gene *Cdx2* into *Apc*⁷¹⁶ mice, constructing compound heterozygotes. Interestingly, these mice developed numerous polyps in distal colon where majority of human cancer develop. Analysis of the polyp adenoma cells revealed unusually high rate of anaphase bridge formation, a hallmark of chromosomal instability (CIN). Through further analysis, we found that the CIN is caused by activation of the mTOR pathway, followed by acceleration of the G1 to S transition in the cell cycle. These results indicate that CIN stimulates the rate of recombination at the centromeric rDNA locus, and increases the *Apc* LOH frequency. Thus, recombination at the rDNA locus appears to be one of the driving forces of tumorigenicity in mouse colon. Possible roles of recombination in the second hit of carcinogenesis in human cancer will be discussed.

講演

樋野興夫

順天堂大学 医学部 教授

(財)癌研究会 癌研究所 実験病理部 部長

講演要旨

2ヒットの実証 遺伝性腎がんモデル

発がん研究戦略は、「がんの原因論」を明確にし、「がんの制御」の根拠を示し、「がん進展阻止」の実際を示すことにある。発がん過程の特異点(表現型)の分子を明らかにし、ヒトがんの予防、治療に資するものである。

我々は、2つの遺伝性腎がんラット(Eker & Nihon)の原因遺伝子 (Tsc 2 & Bhd)を同定した。

Tsc2 遺伝子機能としての、signaling pathway (Akt-mTOR-S6K)の同定は、具体的なヒト結節性硬化症の分子標的に基づいた臨床治療の方向性を示す。mTOR 阻害剤である、Rapamycin による分子標的治療の実際を検討した。

Bhd 遺伝子導入 Nihon ラットを作製し rescue に成功した。ヒト BHD 症候群のモデルであることが判明した。

多段階腎発がんが発現する Erc & Niban 産物の抗体を作製した。Erc 産物は分泌蛋白であった為、ELISA 法を開発した。ヒトがん患者血清に応用が出来ることが示された。Niban 産物は、初期病変から強く発現し、機能としてはストレス蛋白の可能性が示された。ヒト腎がんでも発現がみられた。ストレス蛋白と発がんとの関係に興味ある。

Lecturer

Okio Hino

Professor, School of Medicine, Juntendo University

Chief, Department of Experimental Pathology, Cancer Institute

ABSTRACT

Hereditary kidney cancer models fitting Knudson's 2 hit

Cancer is a heritable disorder of somatic cells. Environment and heredity both operate in the origin of human cancer. The Eker (Tsc 2 mutant) rat model of hereditary renal carcinoma (RC) is an example of Mendelian dominantly inherited predisposition to a specific cancer in an experimental animal.

Carcinogenesis looks like an opened Japanese fan, because initiated cells grow in several directions and tumors suggest the edge of the fan having many gene abnormalities. To search for such alterations, we identified genes (Nihan & Erc) that were expressed more abundantly in renal tumors than in the normal kidney.

Recently, we discovered a new hereditary renal carcinoma in the rat in Japan, and the rat was named the "Nihon" rat and its predisposing (Nihon/BHD) gene could be a novel renal tumor suppressor gene. Nihon rat model might help to understand TSC related renal carcinogenesis. Interestingly, both human homologue of Eker and Nihon genes cause hamartomas.

講演

武田俊一

京都大学 大学院医学研究科 教授

講演要旨

逆遺伝学的手法を用いた、複製にリンクした DNA 修復機構の解析

染色体 DNA には、紫外線、電離放射線等の外的（環境）要因や細胞内代謝産物などの内的要因によって大量の DNA 損傷が起こる。損傷の種類が多様さに対応して、損傷を修復する機構にも複数の互いに独立した修復経路が存在する。我々は、遺伝子ノックアウトを効率良く実現できるニワトリ B リンパ細胞株、DT40 を使い、各 DNA 修復経路のミュータントを系統的に作製することによって、各経路の、細胞増殖における役割を解析してきた。増殖細胞では、重大な損傷は DNA 複製のときに起こる。その理由は、複製ポリメラーゼがきわめて高い正確性をもつ代償として、少しでも構造異常がある鋳型鎖で複製が停止し、最終的に停止部位で染色体断裂が発生するからである。酵母における複製停止を解除する機構として、構造異常がある鋳型鎖でもバイパス DNA 合成できる特殊なポリメラーゼと、相同組換えとが知られていた。我々は、相同 DNA 組換えが十分機能しないと染色体断裂が多発することから、相同 DNA 組換えは細胞増殖に必須の働きをすることを示した。同様に、バイパスポリメラーゼが欠損すると染色体の構造異常が発生する。ゆえに相同 DNA 組換えとバイパスポリメラーゼとは、染色体断裂を防ぐことによって発がんを抑制する。

Lecturer

Shunichi Takeda

Professor, Graduate School of Medicine, Kyoto University

ABSTRACT

Reverse genetic analysis of DNA repair and recombination pathways in the chicken B lymphocyte DT40

DNA replication is a fragile process. The replication fork is frequently stalled at bases damaged by oxidation or radiation or by DNA and chromatin structures. The ability to complete DNA replication requires repair or bypass of the DNA lesions or else homologous recombination-related processes known as replication-restart. To understand function of homologous recombination and bypass pathways, we have made gene disrupted clones from the chicken DT40 B lymphocyte line. Depletion of Rad51, E. Coli RecA homolog, causes extensive chromosomal breaks and is lethal to the cells, indicating an essential role for homologous recombination in DNA replication. The bypass pathway employs a number of specialized DNA polymerases. We found that defects in some bypass polymerases also result in genome instability. These observations indicate critical roles for the recombination and bypass pathways in maintaining chromosomal DNA and thus preventing carcinogenesis.

講演

鈴木 拓

札幌医科大学 医学部 公衆衛生学講座 助手

講演要旨

エピジェネティックな異常とジェネティックな異常は協調してヒト大腸発癌を促進する： 2 ヒットの新たなメカニズム

遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化を代表とするエピジェネティックな異常は、2 ヒット説における新たな機構として定着しつつある。癌細胞において、片アレルの癌抑制遺伝子に変異あるいは欠失によって、他方は DNA メチル化によって不活化される例は数多く知られ、さらに癌抑制遺伝子の生殖細胞変異を有する個体において、DNA メチル化がセカンドヒットとして働くことも報告されている。DNA メチル化を受ける癌関連遺伝子のリストは年々増大しており、癌における遺伝子異常が多岐にわたっていることを示している。我々は新たな癌関連遺伝子のスクリーニング解析から、Wnt シグナル経路を制御する SFRP 遺伝子群が大腸癌において高頻度に DNA メチル化を受けていることを発見した。さらに我々は、SFRP 遺伝子不活化が大腸癌の最も代表的な癌抑制遺伝子である APC 遺伝子の変異による Wnt シグナル活性化を補完している可能性を示した。このことは、エピジェネティックな異常とジェネティックな異常とが協調して大腸発癌を促進していることを示唆している。

Lecturer

Hiromu Suzuki

Instructor, Department of Public Health, School of Medicine, Sapporo Medical University

ABSTRACT

Epigenetic and genetic events cooperate to promote human colorectal tumorigenesis : A new mechanism of "the second hit"

The epigenetic changes, in particular, aberrant promoter hypermethylation that is associated with inappropriate gene silencing, are now recognized as the alternative mechanisms of Knudson's two-hit model. Findings from several studies now show that tumors can maintain mutations in one allele of a gene while the other allele is hypermethylated, leading to the functional inactivation of the gene. In fact, when one of two alleles is mutated in the germ line of a patient with a familial form of cancer, hypermethylation is commonly seen as the second inactivating change. The list of genes inactivated by hypermethylation in cancer is growing, including genes which affect virtually every step in tumor progression. By using microarray based screening, we have identified frequent hypermethylation and silencing of the secreted frizzled-related protein (SFRP) genes in colorectal cancer. We now propose that genetic and epigenetic events cooperate to foster evolution of CRC, by showing that loss of SFRP function complements downstream APC mutation to allow constitutive Wnt signaling in colorectal cancer.