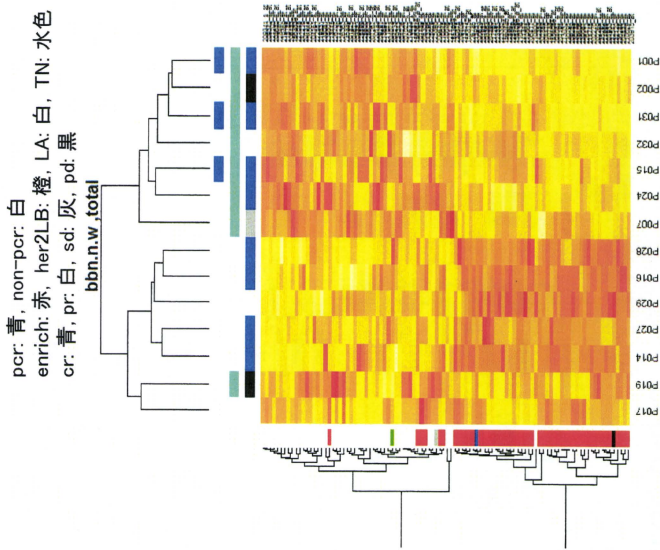
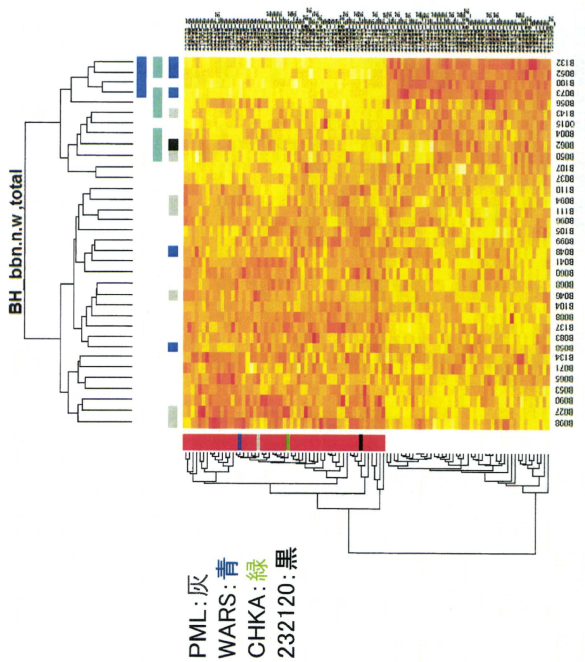


図19

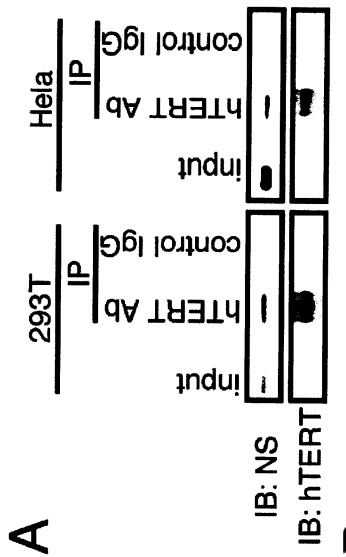
HER2陰性



テストデータ  
(N=60)

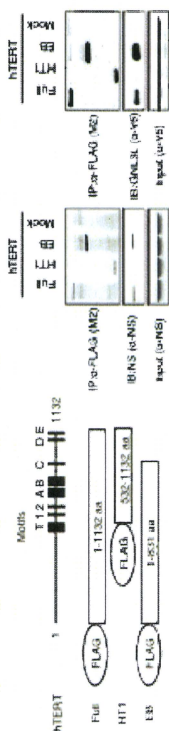


トレーニングデータ  
(N=120)

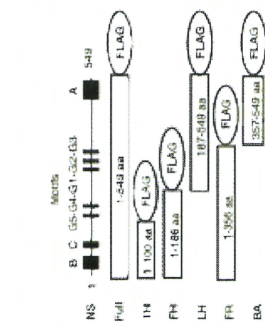


TERTとNSの内在性レベルでの物理的相互作用の共免疫沈降法による確認。

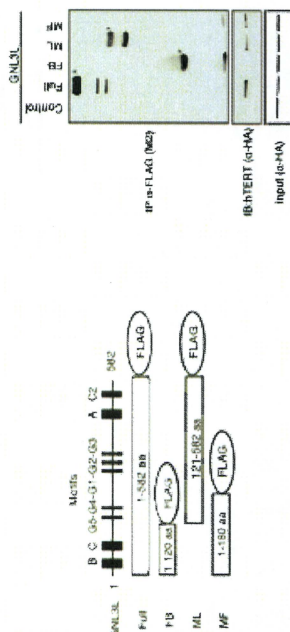
a



b

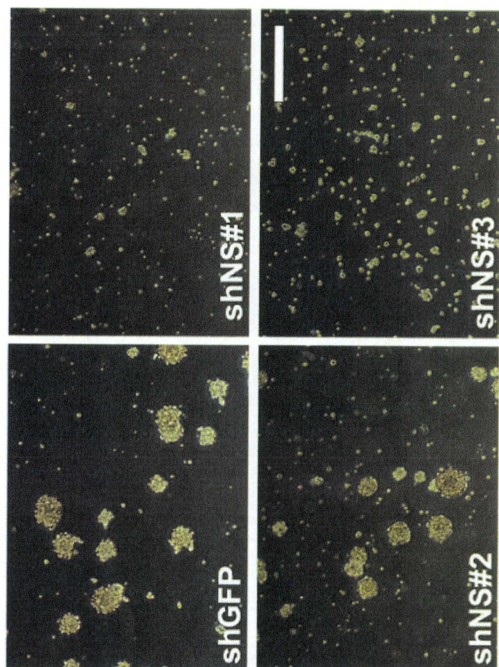
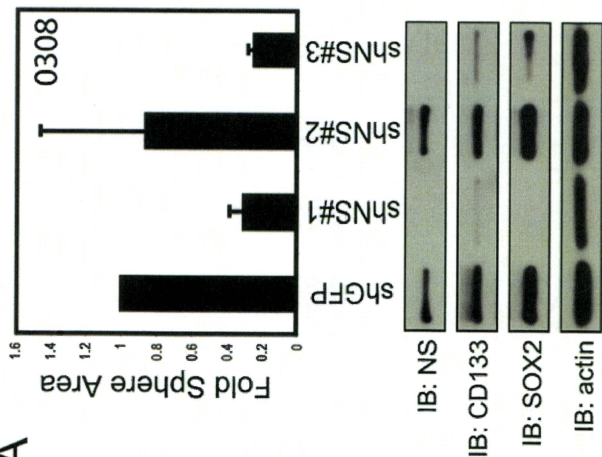


c

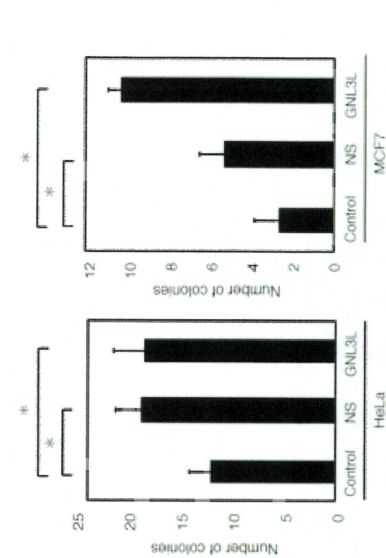
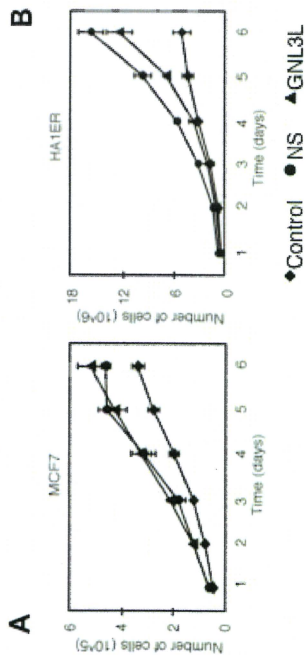


TERTとNS/GNL3Lの結合責任領域の決定。  
truncation mutantを過剰発現し免疫沈降後に結合責任領域を同定した。

A

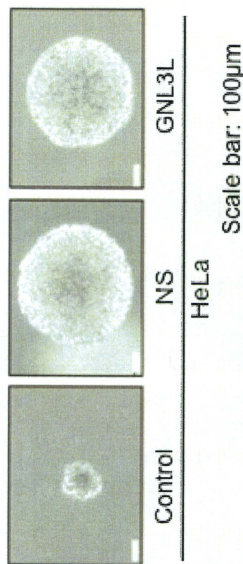


Glioblastomaのがん幹細胞を用いてNSの発現を抑制した。  
 球状形成能に及ぼす影響(棒グラフと細胞の写真)  
 およびがん幹細胞マーカーへの影響(ウェスタンブロットティング)を検討した。



**C**

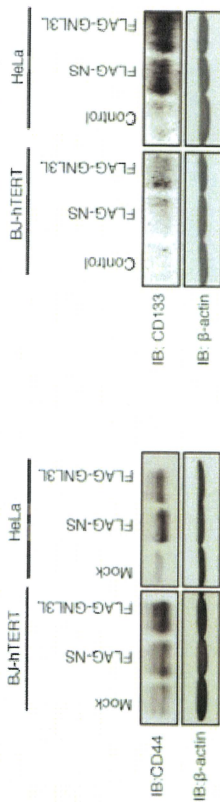
Number of injected cells	HeLa		HA1ER	
	Control	NS	NS	GNL3L
2000000	5/5	5/5	5/5	5/5
20000	0/5	5/5	0/5	5/5
2000	0/5	5/5	0/5	5/5
200	0/5	4/5	0/5	4/5



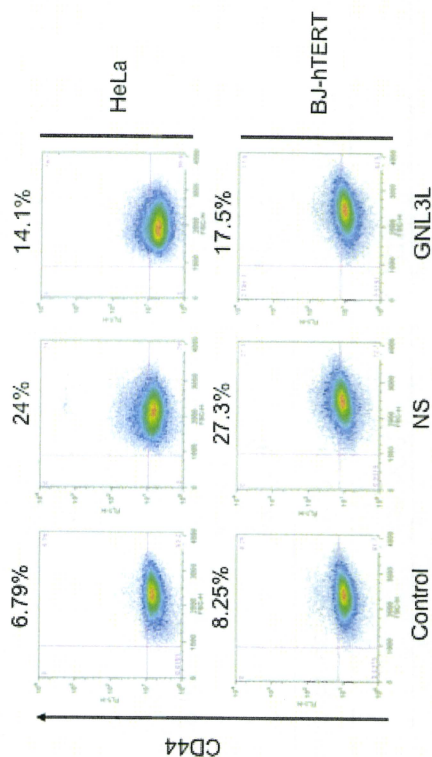
NS/GNL3Lを過剰発現した際の造腫瘍能に及ぼす影響。  
増殖能(A)コロナー形成能(B)と免疫不全マウスでの移植実験(C)



**A**



**B**

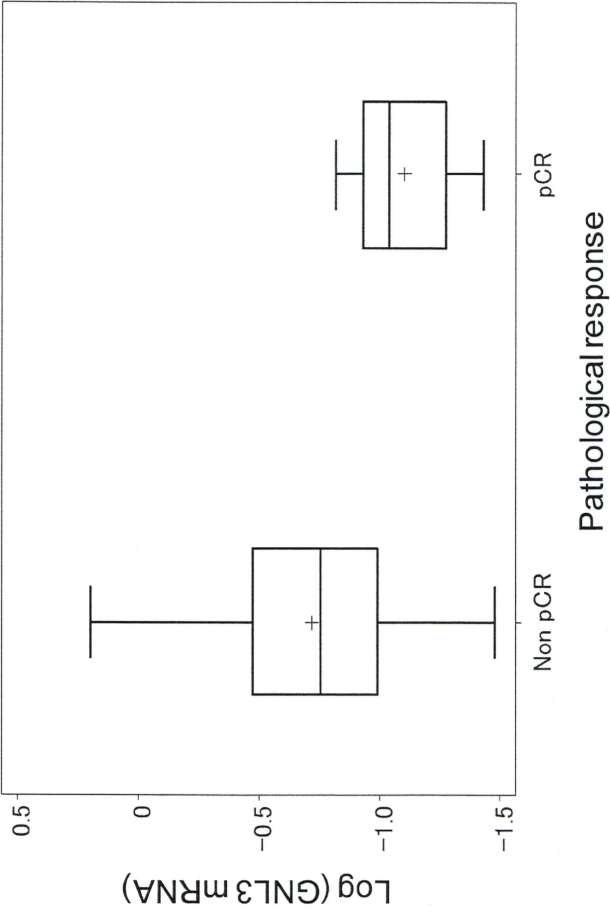


NS/GNL3Lを過剰発現した際のがん幹細胞マーカーへの影響。  
ウェスタンブロッティング (A)とFACS(B)にて確認。

## Patient's Characteristics

Variables	non-pCR (n=36)	pCR (n=9)	p
Age	48 (23 to 75)	49 (33 to 68)	0.371
Performance Status			
0	32 (88.9)	8 (88.9)	1
1	4 (11.1)	1 (11.1)	
Stage			
I/IIA/IIIB/IIIA	30 (83.3)	7 (77.8)	0.652
IIIB/IIIC/IV	6 (16.7)	2 (22.2)	
Tumor size			
<5	23 (63.9)	7 (77.8)	0.695
>5	13 (36.1)	2 (22.2)	
Histology			
ILC	0 (0.0)	1 (11.1)	0.142
Papillo-tubular	6 (16.7)	0 (0.0)	
Scirrhous	10 (27.8)	1 (11.1)	
Solid-tubular	14 (38.9)	4 (44.4)	
Others	4 (11.1)	1 (11.1)	
Unknown	2 (0.1)	2 (22.2)	
Hormone			
negative	15 (41.7)	8 (88.9)	0.022
positive	21 (58.3)	1 (11.1)	
HER2			
negative	28 (77.8)	6 (66.7)	0.666
positive	8 (22.2)	3 (33.3)	
Grade			
1 or 2	16 (44.4)	1 (11.1)	0.122
3	20 (55.6)	8 (88.9)	

Correlation between nucleostemin mRNA level and pathological response





## Correlation with pCR (multivariate analysis)

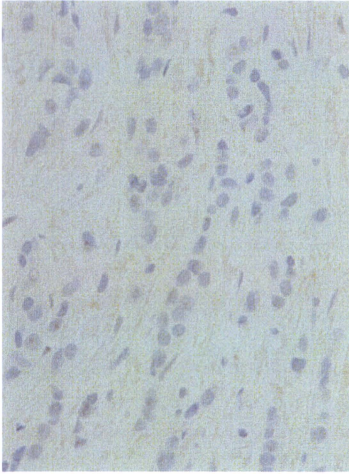
Variables	OR	95%CI	P
Log(GNL3)	0.04	0.00	0.98
Hormone receptor	1		
1 unit gain			0.049
negative	1		
positive	0.12	0.01	2.48
HER2	1		
negative	1		0.171
positive	0.38	0.05	3.10
Histological grade 1 or 2	1		
3	1.73	0.07	44.18
Stage	1		
I/IIA/IIIB/IIIA	1		0.742
IIIB/IIIC/IV	2.17	0.14	32.84
Tumor size	1		
<5	1		0.576
>5	0.19	0.01	2.74
			0.220

The factors that may relate to nucleostemin mRNA level

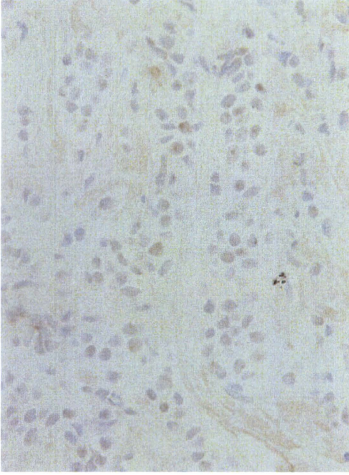
Variables	Coefficient	95%CI	P	
Hormone receptor				
negative				
positive	0.07	-0.22	0.36	0.625
negative				
positive	-0.14	-0.44	0.15	0.341
Histological grade				
1 or 2				
3	-0.16	-0.46	0.13	0.280
Stage				
I/IIA/IIIB/IIIA				
IIIB/IIIC/IV	0.06	-0.26	0.38	0.715
Tumor size				
<5				
>5	-0.10	-0.36	0.16	0.438

IHC score of nucleostemin

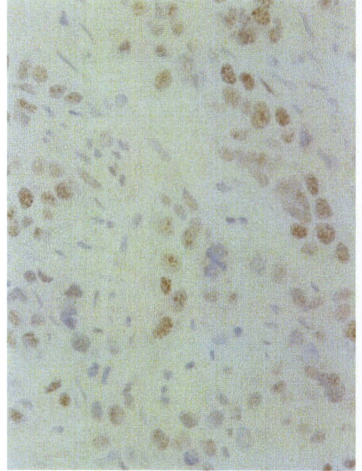
NS score 1+



NS score 2+



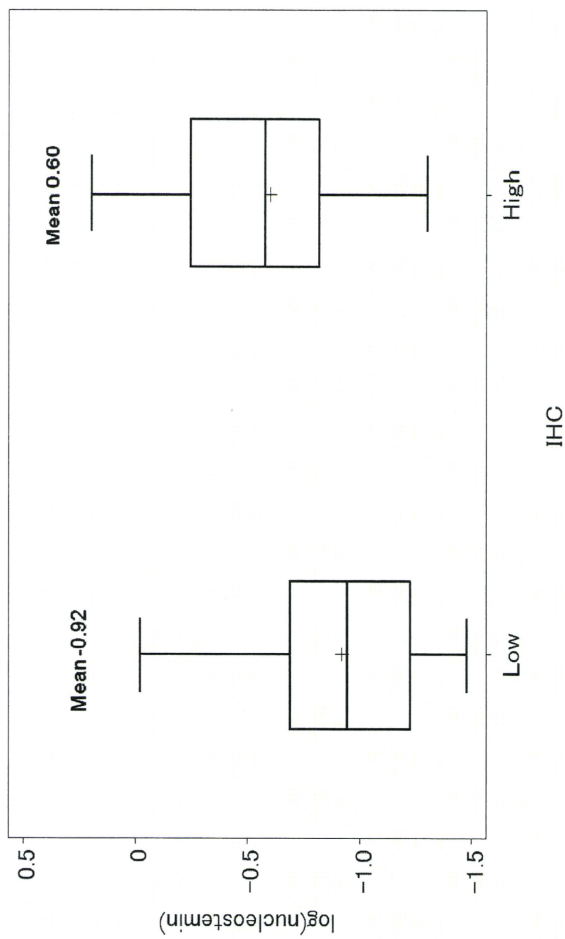
NS score 3+

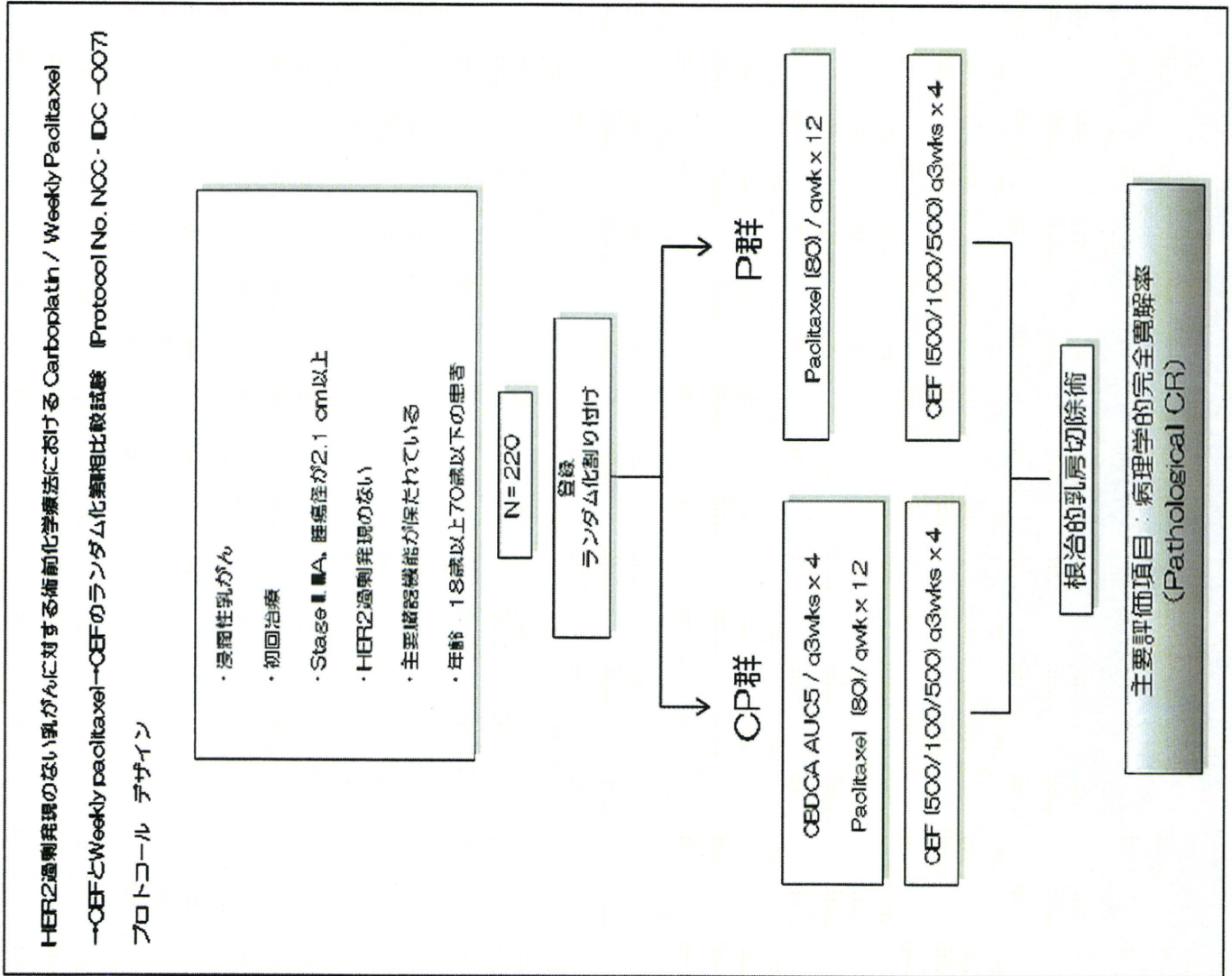


IHC score of nucleostemin and subtype

	N	IHC score			
		0	1+	2+	3+
ER+ and/or PgR+, HER2-	23	1	9	5	8
ER+ and/or PgR+, HER2+	1	1	-	-	-
ER- and/or PgR-, HER2+	9	1	4	4	-
ER-, PgR-, HER2-	12	-	-	6	6

## Correlation between mRNA level and IHC score of nucleostemin







## II. 研究分担報告書

#### 研究要旨

TNBに対する前向き臨床試験（プロスペクティブ試験）より得られた乳がん組織、及び、末梢血液検体を用い、抗悪性腫瘍薬の効果を規定するバイオマーカーの同定を試みた。

原発性乳がん180症例を対象とし、術前化学療法の前向き試験を施行した。術前針生検で得られた乳がん組織よりRNAを抽出し、Affymetrix gene Chip U133 plus 2.0を用いた30000 probeマイクロアレイ解析を施行した。判別解析では、pCRを予測する遺伝子群として、STAT, PML, WARS, CHKAなどが同定された（テストエラー7%）。術前化学療法の前向き試験で得られた乳がん組織（65症例）を対象に、新規がん幹細胞マーカーであるNSのRNAの発現をreal time RT-PCR法を用いて測定し、pCRとの相関を検討した。NSのmRNA発現量が低いこととpCRとは、相関があり、多変量解析の結果でも臨床因子と独立した予測マーカーであった。

HER2過剰発現のない乳がんに対する術前化学療法におけるCarboplatin/Weekly Paclitaxel →CEFとWeekly Paclitaxel →CEFのランダム化第II相試験（医師主導治験）を開始した。

#### A. 研究目的

本研究班の目的の一つに、TNBを対象として、抗悪性腫瘍薬の効果を規定するバイオマーカーの同定がある。目的を達成するために、TNBに対する前向き臨床試験（プロスペクティブ試験）より得られた腫瘍検体（乳がん組織検体）、末梢血液検体を用いた、解析を行う。

#### B. 研究方法

1) TNBの術前化学療法のpCRを予測する遺伝子群の探索（RNAを用いた30000 probeマイクロアレイ解析）

原発性乳がんを対象とした、術前化学療法の前向き試験で得られた乳がん組織（180症例）よりmRNAを抽出し、Affymetrix gene Chip U133 plus 2.0を用いたマイクロアレイ解析を施行する。ホルモン感受性、HER2発現量の有無によるサブセットによるクラスター解析を行う。又、トレーニングデータ120例に対し、8700 probeを用い、Wilcoxonのp値で順位付けを行う。その後、上位のprobe を使いテストデータ

60例で判別の精度を評価した。評価法はSVM（線形判別式）を用い、判別式に使う遺伝子の個数は5-fold CVで決定する。

2) 乳がん組織検体でのNS発現量の測定（RT-PCR、免疫組織染色）

原発性乳がんを対象とした、術前化学療法の前向き試験で得られた乳がん組織（65症例）を対象に、新規がん幹細胞マーカーであるNSのRNAの発現をreal time RT-PCR法を用いて測定し、pCRとの相関を検討する。

3) HER2過剰発現のない乳がんに対する術前化学療法におけるCarboplatin/Weekly Paclitaxel →CEF Weekly Paclitaxel →CEFのランダム化第II相試験（医師主導治験）

HER2過剰発現のない乳がんを対象に、標準的治療レジメンにCarboplatinの上乗せ効果を検証する比較試験（目標200例；2011-；現在、登録中）である。これに連動する付随研究を計画する。付随研究の中で、乳がん検体の、BRCA1, ERCC1, XRCC1, p53, p63,

p73, NS + GNL3L, STAT3の発現量とPI3K変異を測定する。また、血液検体でSTAT3, IL-6, CXCL3, JAK2, IGF-BP7の発現量を測定する。又、Affymetrix - GeneChipを用いたマイクロアレイ発現解析を行う。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立がん研究センター中央病院、若しくは、多施設共同研究に関しては、四国がんセンター、大阪医療センター、東京都立駒込病院、愛知がんセンター、神奈川県立がんセンターの各々の倫理委員会の承認を得て実施する。また測定施設・解析施設にあっても、施設内の倫理委員会の承認を得た後、測定を実施する。研究代表者らの研究グループは、既に乳がん患者を対象としたファルマコゲノミクス研究を経験しており、検体の匿名化や管理法などの具体的方法は熟知している。臨床検体の処理・管理は国立がん研究センター中央病院支援施設内で行う。

臨床材料に関しては、疫学研究に関する倫理指針に従い、患者から文書による同意を得た臨床材料を使用し、手術材料等の残余材料の研究利用については、診断等に一切の不都合を来さないこと、連結可能匿名化を行った後に解析を行うこと等を実施した。

C. 研究結果

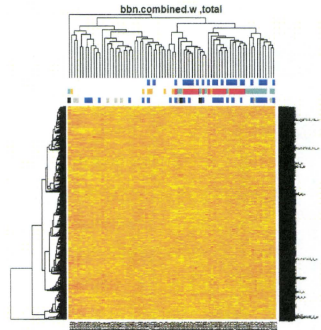
1) TNBの術前化学療法のpCRを予測する遺伝子群の探索 (マイクロアレイ解析)

トレーニングデータ120例、テストデータ60例の計180例の術前化学療法の症例を用いた。腫瘍検体にクラスタリングでは、比較的きれいにsubtype (enrich, HER2/Luminal B, Luminal A, TNB)に分かれることが確認できた (図1)。

HER2陰性乳がんを対象とした判別解析では、pCRを予測する遺伝子群として、subtype (Luminal A に対しTNBであること)に加え、STAT, PML, WARS, CHKAなどが同定された (テストエラー7%:図2)。Gene Ontology解析、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)のデータベース解析を行った。このことにより、HER2陰性乳がんに関しては、関連する遺伝子のパスウェイマップを作成することが可能であった (図3)。クラスタリング解析の精度を検証するため、トレーニングデータ (N=120) とテストデータ

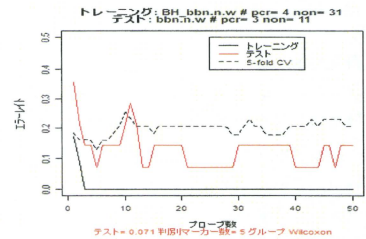
(N=60)を比較した。HER2陰性乳がんに関しては、トレーニングデータの発現パターンは、テストデータにて極めて忠実に再現された (図4)。

図1 腫瘍検体を用いたクラスタリング



pcr: 青, non-pcr: 白 enrich: 赤, her2LB: 橙, LA: 白, TN: 水色 cr: 青, pr: 白, sd: 灰, pd: 黒

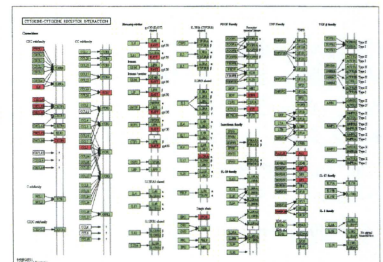
図2 HER2陰性乳がんを対象とした判別解析



判別に用いるマーカー

1. Subtype (TN=1, LA=0)
2. STAT
3. PML
4. WARS
5. CHKA

図3 パスウェイマップ (KEGGを用いた解析)



## 2) 乳がん組織検体でのNS発現量の測定

術前化学療法の前向き臨床試験より得られた乳がん組織45例を用いた。9例のpCRを得た。臨床背景との解析では、ホルモン陰性乳がんにおいて、陽性乳がんと比較してpCRが得られやすい結果となった。NSのmRNA発現量が低いこととpCRとは相関があった

(図4)。多変量解析の結果、NSのmRNA発現量が低いことは、ホルモン受容体の有無、HER2受容体の有無、組織学的グレード、病期、腫瘍径から独立するpCRを予測する分子マーカーであった(表1)。NSに対する特異抗体を用いてNSの乳がんでの発現量を免疫組織染色法により測定した。NSの免疫組織染色法によるタンパク発現量はHER2陰性乳がんが多く見られ、特に、TNBCにおいてはそれが顕著であった。又、同一サンプルにおける、NSのmRNA発現量とタンパク発現量とはよく相関した。

図4 NSのmRNA発現量とpCRの相関

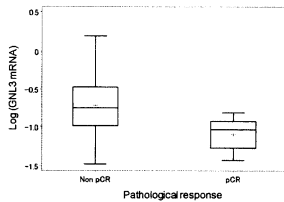


表1 pCRと相関する因子(多変量解析)

Variables	OR	95%CI	P
Log(GNL3) 1 unit gain	0.04	0.00 0.98	0.049
HR			
negative	1		
positive	0.12	0.01 2.48	0.171
HER2			
negative	1		
positive	0.38	0.05 3.10	0.366
Histological grade			
1 or 2	1		
3	1.73	0.07 44.18	0.742
Stage			
I/IIA/IIIB/IIIA	1		
IIIB/IIIC/IV	2.17	0.14 32.84	0.576
Tumor size			
<5	1		
>5	0.19	0.01 2.74	0.220

## 3) TNBにおける白金製剤の有用性を検証と感受性を規定する分子マーカーの同定

HER2過剰発現のない乳がんに対する術前化学療法におけるCarboplatin/Weekly Paclitaxel→CEFとWeekly Paclitaxel→CEFのランダム化第II相試験(医師主導治験)を開始した。

現在、医師主導治験の登録数142例、付随研究の登録数82例である。(予定目標症例数:200例)

## D. 考察

プロスペクティブ研究により、NSのmRNA・タンパク発現量が、TNBのpCRと強い相関があることがわかった。本研究班の主目的である、抗悪性腫瘍薬に対する「効果予測バイオマーカー」の同定に繋がる成果である。又、マイクロアレイ解析においても、HER2陰性乳がんのpCRを予測する遺伝子として、STAT, PML, WARS, CHKAなどが同定された。今後、個々の遺伝子の機能とTNBの病態との関連性について研究を進める。

## E. 結論

STAT, PML, WARS, CHKAなどの遺伝子群、がん幹細胞マーカー(NS)は、TNBに対する抗悪性腫瘍薬の効果と予測するバイオマーカーの候補となる。

前向き研究の臨床検体を用いた解析は、バイオマーカーの特定に有用である。当該研究期間中に、TNBを対象としたPARP阻害剤を用いた前向き研究(未承認薬PARP阻害剤:Olaparib(アストラゼネカ社)とエリブリン(エーザイ:2011年上半旬、乳がん領域にて承認予定)の併用試験:医師主導治験)を計画している。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

- 論文発表
- 学会発表  
国際学会  
国内学会

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
研究分担報告書

研究分担課題 癌幹細胞の側面からの基礎研究とトランスレーショナル研究

研究分担者 増富 健吉

国立がん研究センター研究所 がん幹細胞研究分野 分野長

**研究要旨** がん幹細胞機能維持に必須の分子基盤を解明し、これらの因子群が臨床検体でいかなる挙動を示し治療効果判定や予後予測因子として利用できるかを解析することでがん幹細胞を標的とした診断治療法の開発を目指す。本年度は、発がん過程で重要な役割を担うことおよび幹細胞の機能維持にも関わることが知られているテロメレーズに注目しがん幹細胞機能維持に必須の複合体を同定した。テロメレーズ逆転写酵素 (hTERT) の新規結合パートナーであるnucleosteminおよびその類似タンパク質であるGNL3Lを複合体内に同定し、NucleosteminあるいはGNL3Lががん幹細胞の機能維持に必須であることを示した。

#### A. 研究目的

テロメレーズは細胞の不死化に重要な役割を担うことで発がんの分子機序に深く関わると同時に幹細胞の機能維持にも重要な役割を果たすことが知られている。しかしながらテロメレーズががん幹細胞の機能維持にどのように関わっているかに関しては十分な検討がなされていない。本年度の目的は、テロメレーズ触媒活性領域であるTERTが幹細胞因子であるnucleosteminおよびその類似タンパク質であるGNL3L（以下NS/GNL3Lと記載）が物理的に相互作用することを生化学的に立証し、この複合体ががん幹細胞の機能維持に関わることを細胞生物学的に確認する。このことにより、臨床検体を用いてNS/GNL3Lの発現の様式を解析することが治療効果判定や予後予測因子としての有用性を検討するという作業仮説を正当化する分子基盤を提供することを目指す。

#### B. 研究方法

TERT-NS/GNL3Lの物理的相互作用については共免疫沈降法を用いて確認した。さらに、TERT、NS/GNL3Lのそれぞれの結合責任領域をtruncation mutantの293T細胞での過剰発現系を用いての強免疫沈降法を用いて解析した。また、NS/GNL3Lが、がん幹細胞機能維持に関わることは、確立された脳腫瘍 (glioblastoma) がん幹細胞を用いてNSに対するshRNAでNS発現を人為的に抑制したさいがん幹細胞形質に及ぼす影響をみた。恒常的に細胞内でshRNAを発現させるために、NSに対するshRNAはレトロウイルスを用いて感染させた。また逆に、NS/GNL3Lを恒常的に過剰発現した際にがん幹細胞形質が獲得されるかに関して、colony formation assayと免疫不全マウスを用いての造腫瘍能を確認した。さらに、がん幹細胞のマーカーであるCD133やCD44の発現量に及ぼす影響も確認した。

（倫理面への配慮）特記事項なし。