

表4 解析対象（組織型）

解析対象（組織型）	症例数	%
B. Malignant (Carcinoma)		
a. Invasive carcinoma	500	89.0
a1. Papillotubular carcinoma	126	22.4
a2. Solid-tubular carcinoma	202	35.9
a3. Scirrhus carcinoma	172	30.6
b. Special types	62	11.0
b1. Mucinous carcinoma	12	2.1
b2. Medullary carcinoma	0	0
b3. Invasive lobular carcinoma	29	5.2
b4. Adenoid cystic carcinoma	0	0
b5. Squamous cell carcinoma	5	0.9
b6. Spindle cell carcinoma	4	0.7
b7. Apocrine carcinoma	5	0.9
b8. Carcinoma with cartilaginous and/or osseous metaplasia	1	0.2
b9. Tubular carcinoma	0	0
b10. Secretory carcinoma	1	0.2
b11. Invasive micropapillary carcinoma	1	0.2
b12. Matrix-producing carcinoma	4	0.7
b13. Others	0	0

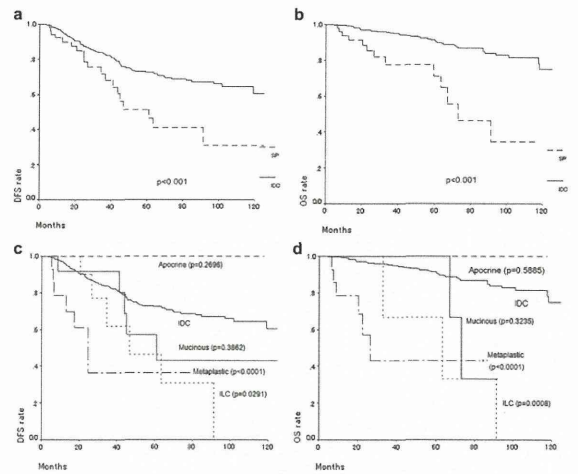


図3 浸潤性乳管がん（IDC）と他の亜型との生存期間の比較

トリプルネガティブ乳がんの特徴的なmetaplastic carcinomaや小葉がんの予後が有意に短かった。

表5 患者背景（N=365）

	No. of patients (%) (N = 369)
Age	
≤50	146 (40)
>50	223 (60)
Menopause	
Premenopausal	152 (41)
Postmenopausal	217 (59)
Invasive tumor size (cm)	
≤2.0	276 (75)
>2.0 to ≤5.0	89 (24)
>5.0	4 (1)
Histology	
Invasive ductal carcinoma (IDC)	302 (82)
Mucinous carcinoma	26 (7)
Invasive lobular carcinoma	22 (6)
IDC with predominantly intraductal component	17 (4)
Others (medullary, tubular)	2 (1)
Ki-67 (≥10 %)	

	No. of patients (%) (N = 369)
Positive	221 (60)
Negative	148 (40)
Ki-67 (≥14 %)	
Positive	163 (44)
Negative	206 (56)
Ki-67 (≥20 %)	
Positive	87 (24)
Negative	282 (76)
Histological grade	
1	104 (28)
2	175 (47)
3	88 (24)
Unknown	2 (1)
Nuclear grade	
1	156 (42)
2	103 (28)
3	109 (30)
Unknown	1 (0)
Lymphovascular invasion	
Positive	138 (37)
Negative	230 (62)
Unknown	1 (0)
Adjuvant chemotherapy	
Yes	153 (41)
CMF	100 (65) ^a
UFT	52 (34) ^a
CEF	1 (1)
No	217 (59)
Hormone therapy (tamoxifen)	

	No. of patients (%) (N = 369)
Yes	187 (51)
No	182 (49)

表 6: Ki-67 の 3 つのカットオフと組織学的グレードの関係

Ki-67 labeling index	Number of tumors (%)								
	Total	Histologic grade			p-value	Nuclear grade			p-値
		1	2	3		1	2	3	
Low (<10 %)	148	61 (41)	73 (49)	14 (10)	<0.001	98 (66)	33 (22)	17 (12)	<0.0001
High (≥10 %) ^a	221	43 (19)	102 (46)	74 (33)		58 (26)	70 (32)	92 (41)	
Low (<14 %) ^b	206	82 (40)	102 (50)	21 (10)		<0.001	126 (61)	52 (25)	
High (≥14 %) ^c	163	22 (13)	73 (45)	67 (41)	30 (18)		51 (31)	81 (50)	
Low (<20 %) ^b	282	97 (34)	144 (51)	40 (14)	<0.001	146 (52)	81 (29)	55 (19)	<0.0001
High (≥20 %)	87 ^c	7 (8)	31 (36)	48 (55)		10 (11)	22 (25)	54 (62)	
Total	369 ^a	104	175	88		156	103	110	

乳がん369症例を対象に、国内におけるKi-67の標準化を試みた。10, 14, 20%の3つのカットオフを設定し解析した結果、いずれのカットを用いても、組織学的悪性グレードとDFSに強い相関をみとめた。

HER4の発現量、及び、AKTのリン酸化(pAKT) ERKのリン酸化(pERK)は、日本人のトリプルネガティブ乳がん(TNB)において、強い予後良好因子であることが明らかとなった。PI3CA変異は35%と高頻度であるのに比較して、AKT1変異を1例もみとめなかった。このことは、西洋人種とアジア人種とでは、主となる遺伝子異常が異なる可能性が示唆された。

トリプルネガティブ乳がんの亜型の中で、metaplastic carcinomaや小葉がんは予後不良で、従来の抗悪性腫瘍薬に対する感受性に乏しい。一方、アポクリン癌に関しては、従来の抗悪性腫瘍薬に対する感受性に乏しいが、予後は良好であった。国内乳がんにおいて、Ki-67の標準化が可能であったが、TNBCにおける使用は慎重に行うべきである。

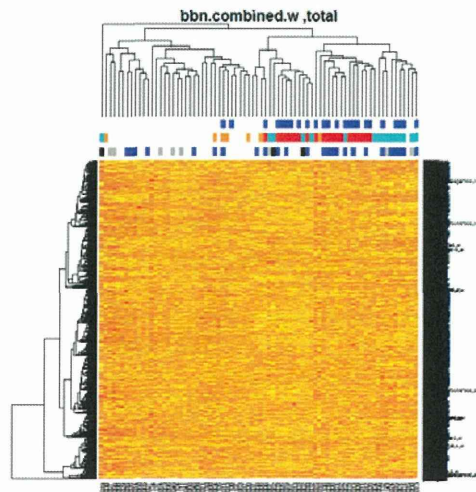
6) TNBのバイオマーカー(プロスペクティブ)

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)。

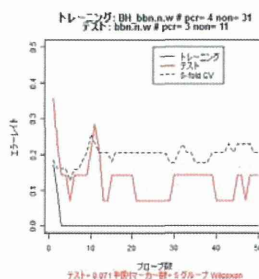
HER2陰性乳がんを対象とした判別解析では、pCRを予測する遺伝子群として、subtype(Luminal A に対しTNBであること)に加え、STAT, PML, WARS, CHKAなどが同定された(テストエラー7%:図2)。Gene Ontology解析、KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)のデータベース解析を行った。このことにより、HER2陰性乳がんに関しては、関連する遺伝子のパスウェイマップを作成することが可能であった(図3)。クラスタリング解析の精度を検証するため、トレーニングデータ(N=120)とテストデータ(N=60)を比較した。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

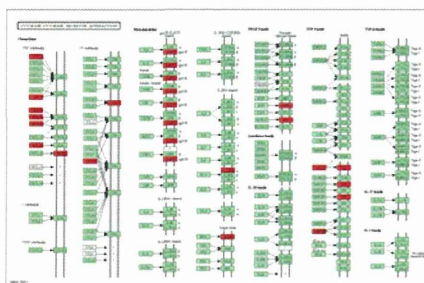
図2 HER2陰性乳がんを対象とした判別解析



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)



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陰性乳がんで多く見られ、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

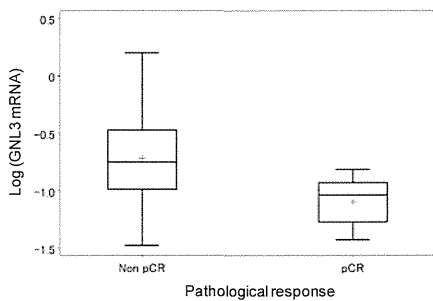


表1 pCRと相関する因子(多変量解析)

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/IIIA1	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

TNBC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)の登録を終了した。登録190例の内、バイオマーカー研究解析可能症例は約100例である。Preliminaryな結果であるが、BRCA1の発現量が低いほうが、CBDCAの上乗せ効果が高い傾向にあった。現在、症例数と追加して検証を試みている。

D. 考察

トリプルネガティブ乳がん(TNB)は、エストロゲン受容体、HER2受容体の両方が陰性の乳がんの総体であり、非常にヘテロな集合体であることが予想される。本研究班の、様々な取り組みを結果により、大きく3つのグループに分類されることが示唆された。1つ目は、1)Basal marker陽性TNBであり、エベロリムスに対する感受性は非常に高い結果となった。TNBに対して高感受性を示す分子標的薬剤がほとんどない現状では、この結果は期待できるものである。2つ目は、2)BRCAの機能が低下したTNBであり、PARP阻害剤に高い感受性を示した。TNB臨床検体を用いた解析では、TNBではBRCA1のメチル化が高頻度に存在していることが判明し、必ずしも、BRCA胚細胞変異がある「家族性乳がん」でなくとも、PARP阻害剤などのDNA修復酵素を標的分子とした薬剤が期待できることが予想された。3つ目は、3)がん幹細胞、EMT-richなTNBであり、従来型の抗がん剤、シグナル伝達系タンパク質阻害剤、PARP阻害剤などにもきわめて抵抗性である。これらの創薬に直結する機能的な分類が次第に判明してきたことは、本研究班の大きな成果である。

テロメラーゼは発がん過程に関与すると同時に幹細胞機能維持に関わることが示唆されている。本研究では、これまで知られていなかった複合体としてhTERT/NS/BRG1を同定した。この複合体はがん幹細胞の機能維持に直接的に関わることが示された。加えて、この複合体はM期に紡錘糸に局在し、M期の正常な進行に寄与していることが示された。次に、NSを過剰発現させたTNBCの人工がん幹細胞モデルを作成し、抗がん剤感受性のアッセイ系を確立した。さらに、hTERT定量のための新規ELISA系を確立し、細胞株におけるhTERT蛋白の定量が可能であることが確認できた。今後は、臨床検体を用いてNS/GNL3Lの発現状況と臨床経過の相関を検討することが重要と考えられる。また、M期をタ

ターゲットとした薬剤（エリブリン等）を中心に、TNBC 人工がん幹細胞モデル等を用いてスクリーニングを行っていく。さらに、TNBC患者の血清において、hTERT定量を行い、診断、治療効果判定、再発の早期スクリーニングなどへの応用を目指す。

本研究において、*BRCA1/2*、*PTEN*、*CLDN1* 及び *CLDN2* 遺伝子のプロモーター領域について、qMSP 測定による DNA メチル化解析を行なった。その結果、*BRCA1* プロモーター領域の高メチル化が TNBC に特異的に存在するのを見いだした。TNBC では、*BRCA1* の生殖細胞系列変異が多く、体細胞と突然変異はごく低頻度であることが知られている。(Gonzalez-Angulo, *Clin. Cancer Res.*, 2011). 今回の検討により、*BRCA1* の不活化の原因にエピジェネティックな機構が深く関与しており、これは TNBC に特異的に存在することが明らかとなった。一部の乳がん、低レベルながらもわずかに上昇しているメチル化が認められる(図4)。このメチル化は、がん細胞のほんの一部で起こっているメチル化と考えられ、がん全体の性質を反映している可能性は低い。多くの報告において、定性的な MSP 法を用いて高いメチル化の頻度を検出している (Veeck, *J. Clin. Oncol.*, 2010; Stefansson, *Epigenetics*, 2011; Gacem, *Cancer Epidemiology*, 2012)。定性的 MSP 法は PCR での増幅断片の有無で判定するが、サイクル数を増加させることにより、ごく僅かに存在するメチル化 DNA も容易に増幅させることができるため、このよう低レベルのメチル化を示した検体を陽性と判定している可能性が高い。一方、本研究で行なっている qMSP 法は、解析サンプル中のメチル化されている DNA の割合を高精度に測定でき、腫瘍の性質を反映したメチル化異常を判定することが可能となる。これまで、多くの論文で *BRCA1* のメチル化解析の報告がなされているが、上述の定量性の問題に加え、解析領域がプロモーター領域ではなく、エクソン 1 内部である論文が極めて多い。DNA メチル化による遺伝子サイレンシングには、転写開始点から約 200bp 上流に渡るヌクレオソーム非存在領域でのメチル化が関係していることが知られている。従って、転写抑制に関わるメチル化を解析するためには、この領域にプライマーを設計することが非常に重要である。*PTEN* 遺伝子についても同様であり、乳がん

において高メチル化の頻度が高いことが数多く報告されているが、定量性の問題、及び、解析領域の問題により、それらの報告では *PTEN* 遺伝子のサイレンシングに関わるメチル化を観察していない可能性が高い。

BRCA1/2 を欠失した細胞株が PARP 阻害剤に高感受性であることが示されて以来、抗がん剤としての PARP 阻害剤が注目されている。しかし、TNBC では、Phase III の臨床試験で有効性は示されなかった

(O' Shaughnessy, *J. Clin. Oncol.*, 2011)。この試験では TNBC を特に層別化しておらず、*BRCA1* のメチル化をマーカーに用いて症例を選別することにより、有効性を示せる可能性がある。

当院でほぼ均一な方法で治療が行われ、ほぼ均一な基準で診断が行われ、長期フォローアップされたリンパ節転移陰性浸潤性乳がん530例において、TN乳がんの比率と他群に比べての予後を算出した。TN乳がんは14%で海外の比率や国内多施設の比率とほぼ同様であった。TN乳がんは予後不良とされているが今回の検討では、luminalに比べれば相対的に予後不良であるが、10年無再発生存率は78.2%、乳がん特異的10年生存率は87.5%と、欧米に比べかなり高かった。今回の検討では、TN乳がんにおいて術前化学療法抵抗性のマーカーとして検討すべき候補として、*BRCA1* 関連分子、トランスポーター分子、上皮間葉移行関連分子、卵巣明細胞腺がん関連分子、などを選び検討した。これらの中から、有意なマーカーが出てくることが期待される。また研究所への協力、基盤整備も進み、TN乳がんの基礎研究進展に役立つと考えられる。TN乳がんは単一の種類のがん種からなるのではなく、数種類の生物学的特性が異なった乳がんが含まれていることが示唆されている。組織形態学的に、TN乳がんは通常非定型髄様癌、中心部に広範な無細胞領域を有する癌、アポクリン癌などの割合が高く、化生癌の比率は5~10%程度にとどまるが、PD例での比率は非常に高くなっていた。他施設の研究から分子レベルでTN乳がんを5型ほどに亜分類可能というデータがあるが、この中のある特定の亜型が化学療法に抵抗性を獲得しやすいあるいは元来抵抗性である可能性があり、化生癌と広範な壊死を示す充実腺管癌に特徴的な分子変化を見出せる可能性がある。

トリプルネガティブ乳がんに対しては現在のところ

有効な治療がなく、予後不良のサブタイプであることが知られている。これまでに我々は、TN乳がん細胞株は、他のがん種と比較して、everolimusに高い感受性を示し、特にbasal-likeサブタイプにおいてその効果が顕著であることを報告した。本年度は、その効果を腫瘍移植モデルで検証し、また投与後のAKT分子の反応性により感受性が変化する可能性を見出した。

HER4の発現量、及び、AKTのリン酸化(pAKT) ERKのリン酸化(pERK)は、日本人のトリプルネガティブ乳がん(TNB)において、強い予後良好因子であることが明らかとなった。PI3CA変異は35%と高頻度であるのに比較して、AKT1変異を1例もみとめなかった。このことは、西洋人種とアジア人種とでは、主となる遺伝子異常が異なる可能性が示唆された。

大規模レトロスペクティブ研究により、Tumor-infiltrating lymphocytes (TIL)の発現量が、TNBに対する術前化学療法完全寛解(pCR)に相関することを見出した。

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。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。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)の登録を終了した。登録190例の内、バイオマーカー研究解析可能症例は約100例である。Preliminaryな結果であるが、BRCA1の発現量が低いほうが、CBDCAの上乗せ効果が高い傾向にあった。

E. 結論

テロメラーヌ逆転写酵素(hTERT)が新規結合パートナーであるNucleostemin (NS) およびクロマチンリモデリング因子であるBRG1と複合体を形成しがん幹細胞の機能維持に関わること、この複合体がM期の進行に関わることを示した。また、NSを過剰発現させた人工がん幹細胞モデルを用いた、抗がん剤感受性のアッセイ系を確立した。さらに、hTERTの定量のための新規ELISAを開発した。今後は、臨床検体への幅広い応用を目指していく。臨床検体を用いてNS・TWISTの発現量の上昇

が臨床検体におけるがん幹細胞形質と相関することを示唆した。TNBCの予後不良形質もNS・TWISTの発現量と相関する可能性がある。NSはがん幹細胞機能維持分子群のひとつであり、がん幹細胞機能維持分子群はM期の正常な進行に寄与していることから、TNBCの予後不良形質にもがん幹細胞機能維持分子群がM期に重要な機能を果たしている可能性がある。NS/GNL3Lを過剰発現させた人工がん幹細胞モデルを用いた、抗がん剤感受性のアッセイ系を確立したので、今後は、このアッセイ系等によりM期をターゲットとした薬剤を中心にスクリーニングを行う。

トリプルネガティブ乳がんに対してはeverolimusが有効であり、特にbasal-likeサブタイプに対し効果がある。これらのeverolimusに感受性を示すサブタイプは、薬剤暴露後にAKTのリン酸化反応が認められず、この差が、感受性に関わっている可能性が示唆された。

日本人のTNBで同一の治療法を受けた均質な集団における遺伝子解析の報告は少なく、今後のTNBの治療戦略の上で重要な基礎データとなる。PI3CA変異は、PI3K阻害剤、AKT阻害剤の薬剤感受性の予測マーカーとして既に報告されており、今回の結果は、これら分子標的薬剤の日本での開発において、貴重なデータとなる。

BRCA1プロモーター領域のメチル化はTNBCに特異的に存在し、その頻度は24%だった。BRCA1のメチル化を正確に測定することは、乳がんの性質を知る上で重要である。又、PARP阻害剤の感受性マーカーとなりうる。

TNBが、1) EGFRやサイトケラチン5/6などの上皮系マーカーが陽性な腫瘍、2) BRCA1の異常がある腫瘍、3)がん幹細胞マーカー陽性、EMTの形質をもつ腫瘍の3つに大きく分類されることが示唆された。このことは、今後のTNBの創薬を効率的に行う上で土台となるデータとなる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ando Y, Maida Y, Morinaga A, Burroughs AM, Kimura R, Chiba J, Suzuki H, Masutomi K, Hayashizaki Y. Two-step cleavage of hairpin RNA

- with 5' overhangs by human DICER. *BMC Molecular Biology* 2011;12:6
2. Maida Y, Masutomi K. RNA-dependent RNA polymerase in RNA silencing *Biological Chemistry* 2011; 392: 299-304
 3. Okamoto N, Yasukawa M, Nguyen C, Kasim V, Maida Y, Possemato R, Shibata T, Ligon KL, Fukami K, Hahn WC, Masutomi K. Maintenance of tumor initiating cells of defined genetic composition by nucleostemin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108(51):20388-93
 4. Ono M, Tsuda H, Yunokawa M, Yonemori K, Shimizu C, Ando M, Tamura K, Kinoshita T, Fujiwara Y. Prognostic impact of Ki-67 labeling indices with three different cut-off values and histological and nuclear grades in hormone-receptor-positive, HER2-negative, node-negative invasive breast cancers. *Breast Cancer*, in press
 5. Kurebayashi J, Kanomata N, Shimo T, Yamashita T, Aogi K, Nishimura R, Shimizu C, Tsuda H, Moriya T, Sonoo H. Marked lymphovascular invasion, progesterone receptor negativity and high Ki67 labeling index predict poor outcome in breast cancer patients treated with endocrine therapy alone. *Breast Cancer*, in press
 6. Nagatsuma AK, Shimizu C, Takahashi F, Tsuda H, Saji S, Hojo T, Sugano K, Fujii H, Fujiwara Y. Impact of recent parity on histopathological tumor features and breast cancer outcome in premenopausal Japanese women. *Breast Cancer Res. Treat.* 2013; 138(3): 941-950.
 7. Ono M, Tsuda H, Shimizu C, Yamamoto S, Shibata T, Yamamoto H, Hirata T, Yonemori K, Kouno T, Ando M, Tamura K, Katsumata N, Kinoshita T, Fujiwara Y. Tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012; 132(3): 793-805.
 8. Iwase H, Kurebayashi J, Tsuda H, Ota T, Kurosumi M, Miyamoto K, Yamamoto Y, Iwase T. Clinicopathological analyses of triple-negative breast cancer using surveillance data from the Registration Committee of the Japanese Breast Cancer Society. *Breast Cancer* 2010; 17(2): 118-124.
 9. Kobayashi T, Tsuda H, Moriya T, Yamasaki T, Kikuchi R, Ueda S, Yamamoto J, Matsubara O. Expression pattern of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) chemokine in invasive breast cancer is correlated with estrogen receptor status and patient prognosis. *Breast Cancer Res. Treat.* 2010; 123(3): 733-745.
 10. Tanabe Y, Hashimoto K, Shimizu C, Hirakawa A, Harano K, Yunokawa M, Yonemori K, Katsumata N, Tamura K, Ando M, Kinoshita T, Fujiwara Y. Paclitaxel-induced peripheral neuropathy in patients receiving adjuvant chemotherapy for breast cancer. *Int J Clin Oncol.* 2013 18:132-138.
 11. Nagao T, Kinoshita T, Hojo T, Tsuda H, Tamura K, Fujiwara Y. The differences in the histological types of breast cancer and the response to neoadjuvant chemotherapy: the relationship between the outcome and the clinicopathological characteristics. *Breast.* 2012 21:289-295.
 12. Yunokawa M, Koizumi F, Kitamura Y, Katanasaka Y, Okamoto N, Kodaira M, Yonemori K, Shimizu C, Ando M, Masutomi K, Yoshida T, Fujiwara Y, Tamura K. Efficacy of everolimus, a novel mTOR inhibitor, against basal-like triple-negative breast cancer cells. *Cancer Sci.* 2012 Sep; 103:1665-1671.
 13. 木下圭太、毎田佳子、増富健吉テロメラーゼ：テロメア伸長反応と新たな機能化学と生物 *48(11):780-784, 2010*
 14. 岡本奈緒子, 増富健吉 TERT, がん性幹細胞を標的としたがん治療の可能性 *腫瘍内科 6(1):59-64, 2010*

2. 学会発表

国際学会

1. Okamoto N, Yasukawa M, Nguyen C, Possemato R, Fukami K, Hahn WC, Masutomi K. "Induction of tumor initiating cell behavior of defined genetic composition by a complex composed of nucleostemin, hTERT and BRG1" Keystone Symposia "Stem Cells, Cancer and Metastasis" Keystone, Colorado, March 6 - March 11, 2011
2. Eguchi T, Yoshida H, Taniguchi H, Masutomi K, Shimoda T, Yamada Y. "Immunohistochemical analysis of CD133/44 expression in surgical specimens of squamous cell carcinoma of the esophagus after neoadjuvant chemotherapy" AACR 101st Annual meeting 2010, Walter E. Washington D.C. April 17-21, 2010.
3. Okamoto N, Yasukawa M, Nguyen C, Possemato R, Fukami K, Hahn WC, Masutomi K. "A complex of hTERT, Brg1 and the nucleolar GTP-binding proteins GNL3L and nucleostemin regulates tumor initiating cell behavior" Cold Spring Harbor Asia Conferences "James Watson Symposium on Cancer" Suzhou, China April 6 - 11, 2010.
4. Tsuda H, Yoshida M, Miyagi-Maeshima A, Sasaki-Katsurada Y. Mucinous breast carcinoma associated with lobular neoplasia: A potentially characteristic subset with abnormality of cell adhesion and polarity molecules, and lack in neuroendocrine differentiation. 102nd Annual Meeting of the United States and Canadian Academy of Pathology (USCAP), Mar 2-8, 2013, Baltimore, MD.
5. Tamura K, Koizumi F, Fujiwara Y. et al. Gene expression profiles predict pathological complete response to standard neoadjuvant fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide and paclitaxel with or without trastuzumab in early breast cancer. Poster session #5176, 16th The European Multidisciplinary Cancer Congress, Stockholm

国内学会

1. 増富健吉 (招待講演) がん幹細胞と放射線療法抵抗性 第69回日本癌学会総会 2010年9月22日～24日、大阪 (口頭発表)
2. 岡本奈緒子、安川麻美、Christine Nguyen、Kasim Vivi、深見希代子、William C. Hahn、増富健吉 hTERT、BRG1、核小体GTP結合タンパク質 GNL3L/NSからなる複合体は腫瘍形成能を制御する 第69回日本癌学会総会 2010年9月22日～24日、大阪 (口頭発表)
3. 増富健吉 (招待講演) ヒトRNA依存性RNAポリメラーゼとクロマチン構造維持 第2回日本RNAi研究会 2010年8月27日～28日、広島
4. 増富健吉 (招待講演) テロメラーズ、がん幹細胞、転移 第19回日本がん転移学会学術集会・総会 2010年6月16日～17日、金沢
5. 増富健吉 (招待講演) Human RNA dependent RNA polymerase and chromatin structure 第62回日本細胞生物学会大会 2010年5月19日～20日、大阪
6. 大岡静衣、岡本奈緒子、木下圭太、安川麻実、増富健吉 4T9pI-8 Tumor initiating cell maintenance and heterochromatin establishment during mitotic phase. 第34回分子生物学会年会 2011年12月13日～16日 神奈川 (口頭発表、ポスター発表)
7. 大岡静衣 がん幹細胞機能維持に関わる分子群のイメージング解析 第4回 NanoBio若手ソーシャルネットワークワーキングシンポジウム 2011年6月3日～4日 札幌 (口頭発表)
8. Naoko Okamoto, Tomoyasu Kato, Masayuki Yoshida, Satoko Yamaguchi, Mami Yasukawa, Keita Kinoshita, Kiyoko Fukami, Hitoshi Tsuda, Kenichi Masutomi. Analysis of cancer stem cell markers in ovarian cancers. 第71回 日本癌学会学術総会 2012年9月19日～21日 札幌 (口頭発表)

9. 大河内(高田)江里子, 橋本淳, 津田均, 宮本和明, 田村研治, 牛島俊和. トリプルネガティブ乳がんではBRCA1プロモーターの高メチル化が高頻度に認められる. 第71回日本癌学会学術総会, 2012年9月
 10. 津田均. Intrinsic subtype分類の病理学的考え方(Histological significance of intrinsic subtype classification). 第10回日本臨床腫瘍学会学術集会、国内合同シンポジウム、2012. 7. 26~28、大阪
 11. Ono M, Tsuda H, Shimizu C, Yunokawa M, Yonemori K, Ando M, Tamura K, Katsumata N, Kinoshita T, Fujiwara Y. Long-term prognostic factors of node-negative invasive breast cancer of luminal subtype: A comparison between histological grades and molecular markers including Ki67 and HER2 第9回日本臨床腫瘍学会学術集会、2011. 7. 21~23、横浜
 12. 小野麻紀子、津田均、清水千佳子、平岡伸介、田村研治、山本春風、米盛勸、安藤正志、勝俣範之、木下貴之、藤原康弘. トリプルネガティブ乳癌(TNBC)における病理学的治療効果予測因子. 第69回日本癌学会学術総会、2010. 9. 22~24、大阪
 13. 小野麻紀子、津田均、清水千佳子、平岡伸介、田村研治、山本春風、平田泰三、米盛勸、河野勤、安藤正志、勝俣範之、木下貴之、藤原康弘. トリプルネガティブ乳癌(TNBC)における病理学的治療効果予測因子: 組織亜型と腫瘍浸潤リンパ球. 第18回日本乳癌学会学術総会、2010. 6. 24~25、札幌
 14. Tamura K, Koizumi F, Fujiwara Y. et al. Gene expression profiles predict pCR to neoadjuvant CEF with or without trastuzumab in early breast cancer. 第70回日本癌学会学術集会総会, E-1021, Nagoya 3-5, October, 2011.
 15. Yunokawa M, Tamura K, Koizumi F, Fujiwara Y. et al. Efficacy of everolims, a novel mTOR inhibitor, against basal-like triple negative breast cancer cells. 第9回日本臨床腫瘍学会, WS-1-8, Yokohama 21-23 July 2011.
 16. Tamura K, Koizumi F, Fujiwara Y. et al. Gene expression profiles predict pCR to neoadjuvant CEF with or without trastuzumab in early breast cancer. 第70回日本癌学会学術集会総会, E-1021, Nagoya 3-5, October, 2011.
 17. Tamura K, Koizumi F, Fujiwara Y. et al. Gene expression profiles predict pCR to neoadjuvant CEF with or without trastuzumab in early breast cancer. 第70回日本癌学会学術集会総会, E-1021, Nagoya 3-5, October, 2011.
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)
1. 特許取得

抗がん剤に対する感受性診断法(平成23年10月18日) 国立がん研究センター整理番号: 2011-9, 大阪大学との共同出願

II. 研究成果の刊行に関する一覧

別紙 4

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Masutomi K, Hahn WC.	Chapter 8 :Off-telomerase function of telomerase		Telomerases: Chemistry, Biology and Clinical Applications	John Wiley & Sons	米国	2012	201-212

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版 年
Ando Y, Maida Y, Morinaga A, Burroughs AM, Kimura R, Chiba J, Suzuki H, <u>Masutomi K</u> , Hayashizaki Y	Two-step cleavage of hairpin RNA with 5' overhangs by human DICER	BMC Molecular Biology	12	12:6	2011
Maida Y, <u>Masutomi K</u>	RNA-dependent RNA polymerase in RNA silencing	<i>Biological Chemistry</i>	392	299-304	2011
Okamoto N, Yasukawa M, Nguyen C, Kasim V, Maida Y, Possemato R, Shibata T, Ligon KL, Fukami K, Hahn WC, <u>Masutomi K</u> .	Maintenance of tumor initiating cells of defined genetic composition by nucleostemin.	Proc Natl Acad Sci U S A.	108(51)	20388-9 3	2011
木下圭太、毎田佳子、増 <u>富健吉</u>	テロメラーゼ：テロメア伸長 反応と新たな機能	化学と生物	48	780-784	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
岡本奈緒子, 増富健吉	TERT,がん性幹細胞を標的としたがん治療の可能性	腫瘍内科	6	59-64	2010
Ono M, <u>Tsuda H</u> , Yunokawa M, Yonemori K, Shimizu C, Ando M, Tamura K, Kinoshita T, Fujiwara Y.	Prognostic impact of Ki-67 labeling indices with three different cut-off values and histological and nuclear grades in hormone-receptor-positive, HER2-negative, node-negative invasive breast cancers	Breast Cancer	In press		
Kurebayashi J, Kanomata N, Shimo T, Yamashita T, Aogi K, Nishimura R, Shimizu C, <u>Tsuda H</u> , Moriya T, Sonoo H.	Marked lymphovascular invasion, progesterone receptor negativity and high Ki67 labeling index predict poor outcome in breast cancer patients treated with endocrine therapy alone.	Breast Cancer	In press		
Nagatsuma AK, Shimizu C, Takahashi F, <u>Tsuda H</u> , Saji S, Hojo T, Sugano K, Fujii H, Fujiwara Y.	Impact of recent parity on histopathological tumor features and breast cancer outcome in premenopausal Japanese women.	Breast Cancer Res. Treat.	138(3)	941-950	2013
Ono M, <u>Tsuda H</u> , Shimizu C, Yamamoto S, Shibata T, Yamamoto H, Taizo Hirata, Yonemori K, Kouno T, Ando M, Tamura K, Katsumata N, Kinoshita	Tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer.	Breast Cancer Res. Treat.	132(3)	793-805	2012
Iwase H, Kurebayashi J, Tsuda H, Ota T, Kurosumi M, Miyamoto K, Yamamoto Y, Iwase T.	Clinicopathological analyses of triple-negative breast cancer using surveillance data from the Registration Committee of the Japanese Breast Cancer Society.	Breast Cancer	17(2)	118-124	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kobayashi T, Tsuda H, Moriya T, Yamasaki T, Kikuchi R, Ueda S, Yamamoto J, Matsubara O.	Expression pattern of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) chemokine in invasive breast cancer is correlated with estrogen receptor status and patient prognosis.	Breast Cancer Res. Treat.	123(3)	733-745	2010
Ueda S, Tsuda H, Saeki T, Fukatsu K, Osaki A, Shigekawa T, Ishida J, Tamura K, Abe Y, Omata J, Moriya T, Yamamoto J.	Early reduction in standardized uptake value after one cycle of neoadjuvant chemotherapy measured by sequential DG PET/CT is an independent predictor of pathological response of primary breast cancer.	Breast J.	16(6)	660-662	2010
温泉川真由、小泉史明、田村研治.	：【乳癌 基礎と臨床の架け橋】 臨床生物学的特性 乳癌のcirculating endothelial cell(解説/特集)	最新医学	65	1455-1465	2010
Tanabe Y, Hashimoto K, Shimizu C, Hirakawa A, Harano K, Yunokawa M, Yonemori K, Katsumata N, Tamura K, Ando M, Kinoshita T, Fujiwara Y.	Paclitaxel-induced peripheral neuropathy in patients receiving adjuvant chemotherapy for breast cancer.	Int J Clin Oncol.	18	132-138	2013
Nagao T, Kinoshita T, Hojo T, Tsuda H, Tamura K, Fujiwara Y.	The differences in the histological types of breast cancer and the response to neoadjuvant chemotherapy: the relationship between the outcome and the clinicopathological characteristics.	Breast.	21	289-295	2012

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yunokawa M, Koizumi F, Kitamura Y, Katanasaka Y, Okamoto N, Kodaira M, Yonemori K, Shimizu C, Ando M, Masutomi K, Yoshida T, Fujiwara Y, Tamura K.	Efficacy of everolimus, a novel mTOR inhibitor, against basal-like triple-negative breast cancer cells.	Cancer Sci.	103	1665-1671	2012

III. 研究成果の刊行物・別刷

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Two-step cleavage of hairpin RNA with 5' overhangs by human DICER

Yoshinari Ando¹, Yoshiko Maida², Ayako Morinaga¹, Alexander M Burroughs¹, Ryuichiro Kimura³, Joe Chiba³, Harukazu Suzuki¹, Kenkichi Masutomi^{2,4}, Yoshihide Hayashizaki^{1*}

Abstract

Background: DICER is an RNase III family endoribonuclease that processes precursor microRNAs (pre-miRNAs) and long double-stranded RNAs, generating microRNA (miRNA) duplexes and short interfering RNA duplexes with 20~23 nucleotides (nts) in length. The typical form of pre-miRNA processed by the Drosha protein is a hairpin RNA with 2-nt 3' overhangs. On the other hand, production of mature miRNA from an endogenous hairpin RNA with 5' overhangs has also been reported, although the mechanism for this process is unknown.

Results: In this study, we show that human recombinant DICER protein (rDICER) processes a hairpin RNA with 5' overhangs *in vitro* and generates an intermediate duplex with a 29 nt-5' strand and a 23 nt-3' strand, which was eventually cleaved into a canonical miRNA duplex via a two-step cleavage. The previously identified endogenous pre-miRNA with 5' overhangs, pre-mmu-mir-1982 RNA, is also determined to be a substrate of rDICER through the same two-step cleavage.

Conclusions: The two-step cleavage of a hairpin RNA with 5' overhangs shows that DICER releases double-stranded RNAs after the first cleavage and binds them again in the inverse direction for a second cleavage. These findings have implications for how DICER may be able to interact with or process differing precursor structures.

Background

DICER plays a key role in RNA interference pathways through the biogenesis of microRNA (miRNA) and small interfering RNA (siRNA) [1-3]. Most miRNA genes are transcribed as long primary transcripts (pri-miRNAs) where stem-loop structures with mature miRNA sequences embedded in the arm of a stem are cleaved by the Drosha nuclear microprocessor complex releasing a precursor miRNA (pre-miRNA) hairpin [4,5]. The cleavage site is determined mainly by the distance (~11 bp) from the stem-single stranded RNA junction of pri-miRNA and most pre-miRNAs have 2 nt-3' overhangs [6]. Pre-miRNAs, exported into the cytoplasm by Exportin-5 and Ran-GTP [7], are processed by the RISC loading complex (RLC) into 20~23 nt duplexes where the RNase III enzyme DICER plays a central role together with the double stranded (ds) RNA-binding proteins TRBP and PACT and the

miRNA-associated RNA-induced silencing complex (miRISC) core component Argonaute-2 (AGO2) [8-10]. miRNA duplexes processed by RLC are finally loaded to miRISC as a double stranded-structure [11] and separated into the functional guide strand, which is complementary to the target, and the passenger strand, which is subsequently degraded [12,13]. Strand selection of the functional guide strand by AGO2 depends on the thermodynamic stabilities of the base pairs at the 5' ends of the two strands [12,14,15]. Duplexes of siRNA or miRNA produced by DICER can be loaded in either direction to Argonaute [16-18]. Indeed, the mature miRNA either in the 5' or 3' strands can be harboured from pre-miRNA [19-21]. On the other hand, endogenous human AGO2 can bind directly to pre-miRNAs in DICER-knockout cells [22]. Recently, it was reported that human DICER is not essential for loading dsRNAs to AGO2 but functions in pre-selection of effective siRNAs for handoff to AGO2 [23].

Human DICER is a ~220 kDa protein consisting of several domains; an N-terminal DExH-box RNA helicase-like domain, a DUF283 domain, a PAZ domain,

* Correspondence: yoshihide@gsc.riken.jp

¹RIKEN Omics Science Center, 1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama 230-0045, Japan

Full list of author information is available at the end of the article

two RNase III domains (RIIIa and RIIIb), and a dsRNA binding motif domain (DARM) [24]. The two RNase III domains of DICER form a single dsRNA processing center via intramolecular dimerization which together cleave the opposite strands of the dsRNA, generating dinucleotide-long 3' overhangs on both ends [25]. The crystal structure of Dicer from *Giardia intestinalis* showed that the hydrophobic pocket of the PAZ domain was responsible for the binding of the 3' dinucleotide overhangs of the substrate and the connector helix between the PAZ domain and RNase III domain functioned as a molecular ruler measuring the distance from the 3' end of pre-miRNA to the cleavage site [26,27]. However, 3'-dinucleotide dsRNA overhangs are not essential for binding with DICER [28]. When the 3' overhang is removed, DICER can still cleave dsRNA through interaction with the remaining 5' overhang [28]. This is consistent with MacRae *et al.* who found that the recombinant Dicer protein of *Giardia intestinalis* could cleave the dsRNA with 5' overhangs [27]. However, they used perfectly matched dsRNAs with no gap, which might resemble an endogenous siRNA precursor. An additional study by Flores-Jasso *et al.* showed that human recombinant DICER protein could nick either strand of a mononucleotide-5' overhanged pre-miRNA with some strand preferences [29]. Despite this, the detailed step mechanism for pre-miRNA cleavage, especially for the pre-miRNA with 5' overhangs, is not yet elucidated.

An alternative nuclear pathway of pre-miRNA biogenesis was described where a short intron with a hairpin can be spliced and debranched into pre-miRNA hairpin mimics (mirtrons) [30-32]. This processing pathway uses intron splicing machinery instead of the Drosha endonuclease; miRNA precursors generated from intronic sequences (debranched mirtrons) are believed to be incorporated into the canonical miRNA pathway as a substrate of DICER. Interestingly, mouse pre-mir-1982 is a mirtron with an 11 nt tail at the 5' end [33], although most mammalian mirtron are hairpin structures with single nucleotide overhangs at both ends [32-34]. Mature mouse miR-1982* miRNA emerges without 11 nt-5' overhangs from deep sequencing data of murine cells [33,35] while the elimination mechanism of this 11 nt-5' tail is still unknown.

In this paper, we investigated the detailed processing pattern of hairpin RNAs containing 5' overhangs by human recombinant DICER. We show here that human recombinant DICER is able to process hairpin RNA with 5' overhangs and two-step cleavage by DICER forms the mature miRNA duplex from the hairpin RNAs. Additionally, pre-mmu-mir-1982 RNA, which is a natural hairpin RNA with 5' overhangs, is also

processed by a two-step cleavage mediated by human recombinant DICER protein *in vitro*.

Results and Discussion

Processing of the pre-miRNA by recombinant DICER protein

We prepared purified recombinant DICER1 (rDICER) protein containing a FLAG-tag at the N-terminus (see Figures 1A and 1B). This rDICER does not contain known DICER-binding partners, AGO2 and TRBP (see Figure 1C). In order to confirm activity, we attempted to cleave pre-miRNA hairpin RNA using the rDICER. Forty-five pmol of pre-mir-21 RNA (see Figure 2A) was incubated with 2 pmol of the purified rDICER at the indicated times followed by purification. The reacted RNA substrates were subjected to Northern blotting using probe-1, corresponding to the antisense sequence of bases 2-22 of pre-mir-21 (see Figure 2A). A single band, 23 nucleotides in length, appeared after 20 min incubation and gradually increased. Thus, the purified rDICER possessed reasonable pre-miRNA processing activity to produce ~23 nt mature miRNA *in vitro* (see Figure 2B).

Processing of the hairpin RNA with 5' overhangs, RNA-I, by recombinant DICER protein

Using this rDICER, we performed a cleavage assay on a designed pre-miRNA mimic of hairpin RNA with trinucleotide-5' overhangs (RNA-I, see Figure 3A) to analyze whether DICER could process a hairpin RNA with 5' overhangs. The cleavage products were detected by Northern blotting using three different probes, probe-1, probe-2 and probe-3, corresponding to antisense

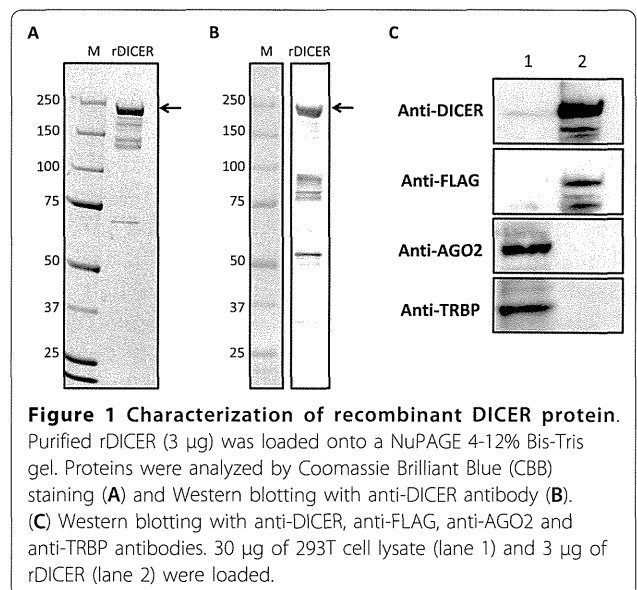
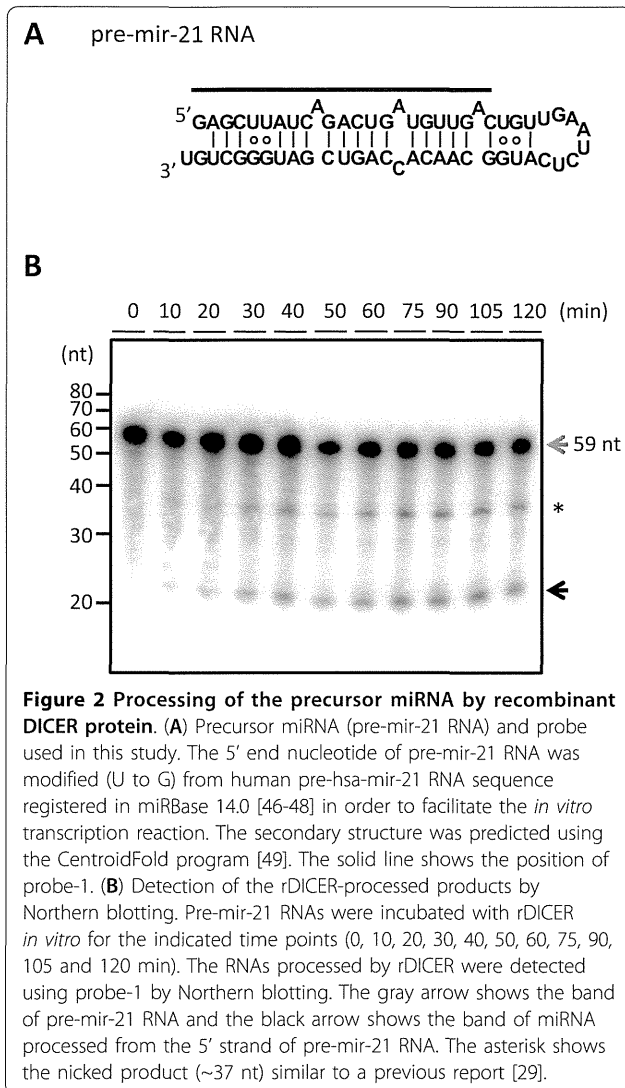


Figure 1 Characterization of recombinant DICER protein. Purified rDICER (3 µg) was loaded onto a NuPAGE 4-12% Bis-Tris gel. Proteins were analyzed by Coomassie Brilliant Blue (CBB) staining (A) and Western blotting with anti-DICER antibody (B). (C) Western blotting with anti-DICER, anti-FLAG, anti-AGO2 and anti-TRBP antibodies. 30 µg of 293T cell lysate (lane 1) and 3 µg of rDICER (lane 2) were loaded.



sequences of bases 11-32, bases 49-69 and bases 33-48 of RNA-I, respectively (see Figure 3A). Using probe-1, band 1 (~30nt) appeared after 20 min incubation and gradually increased through a 50 min-incubation. This processing pattern was similar to that of the around 23-nt product generated from native pre-miRNA by rDICER (see Figures 2B and 3B). After 40 min incubation, band 2 (~23nt) was detected and the abundance of band 2 increased in a time-dependent manner (see Figure 3B). Additionally, using probe-2, band 3 (~23nt) was detected from the 30-min incubation sample (see Figure 3C). Using probe-3, band 4 (~22nt) was detected from the 20-min incubation sample (see Figure 3D). The processing activity on the hairpin RNA with 5' overhangs is comparable to that for natural pre-miRNA. This means that hairpin RNA with 5' overhangs could also be a substrate for rDICER processing.

To analyze band 1 at a longer incubation time, the RNA-I was incubated with the purified rDICER and the cleavage reactions were performed for 30 min and 16 hours. Surprisingly, band 1 was detected at 30 min incubation but disappeared after 16-hours incubation. On the other hand, band 2 continued to accumulate (see Figure 3E). These results showed that band 1, which seems to be a product of first processing by rDICER, disappeared following an extended incubation time.

Next, to verify the size of the cleavage products of RNA-I, we cloned the 23-nt products after 16-hour rDICER incubation and sequenced them (see Table 1). Several clones were obtained from 5'-strand, 3' strand and loop region of RNA-I corresponding to bands 2-4 in Figure 3, respectively. The miRNA length heterogeneity generated by rDICER is consistent with the finding in the previous report [36]. Clones from the 5' strand lacking 6 or 7 nt the initial of the 5' end of RNA-I and clones from 3' strand lack the terminal 1 or 2 nt of the 3' end of RNA-I.

To analyze how band 1 is further processed, we labelled the 5' end of the RNA-I and incubated the samples with rDICER (see Figure 4A). Time course experiments and cloning results indicated that rDICER could process the 5'-labelled RNA-I at the 29-nt position from its 5' end (band 1) after 20 min incubation and subsequently cleave the 29-nt short RNA at the 6-nt position from its 5' end to 23-nt RNA (band 2) after 40 min incubation (see Figure 4A, 4B, and Table 1). This suggests dsRNAs with a 29 nt-5' strand and a 23 nt-3' strand are processed by rDICER from RNA-I at the first cleavage and released once from the enzyme. After this, rDICER binds the dsRNA again and, measuring from the 3' end of the 29-nt strand, generates 23-22 nt RNA duplexes via a second cleavage reaction (see Figure 5).

In this research, we found that hairpin RNA with trinucleotide-5' overhangs was cleaved into a 23-22 nt RNA duplex through two-step processing by rDICER. This could not be detected if we used only end-labelled RNA or label-incorporated RNA as a substrate for rDICER as reported previously [27,29]. In the first step, rDICER processes the hairpin RNA with 5' overhangs to dsRNA with 29 nt and 23 nt. Our results indicate the first processed dsRNA binds again in the inverse direction with the same or a different rDICER molecule and is again effectively cleaved. The results are consistent with the previous report that human DICER protein binds either 3' ends of dsRNA strand on the PAZ domain and cleaves dsRNA at the ~23 nt position from the binding end [25]. In the sequential process described here, dsRNAs with 29 nt and 23 nt gradually increased and then stabilized at a steady level, followed by rapid increase of 23-22 nt duplexes (see Figure 3B and 3C). This indicates that dsRNAs with 29 nt and 23 nt are

