

inate cell debris. Cells were counted after an additional 5–7 d using a Z2 Particle Count and Size Analyzer (Beckman–Coulter) (2).

TGF- β Inhibitor. A total of 2.5×10^5 cells were plated in six-well plates. After incubation for 24 h, cells were treated with TGF- β inhibitor LY364947 (Cayman Chemical Company) or SD-208

(Sigma–Aldrich). After 24 h, cells were lysed with RIPA buffer, followed by SDS/PAGE and immunoblotting.

Proliferation Assay. To generate proliferation curves, 5×10^4 cells were plated in six-well plates in triplicate and counted in a Z2 Particle Count and Size Analyzer.

1. Masutomi K, et al. (2003) Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell* 114:241–253.

2. Masutomi K, et al. (2005) The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:8222–8227.

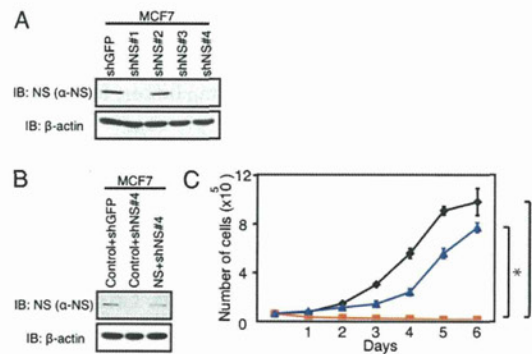


Fig. S1. Effects of NS-specific shRNA on short-term proliferation and rescue by exogenous NS. (A) Suppression of endogenous NS measured by immunoblotting. MCF7 cells were infected with a GFP-specific shRNA (control shRNA), three independent NS coding sequence-specific shRNAs (shNS1–3), or a NS 3'UTR-specific shRNA (shNS4). IB, immunoblot. (B) NS levels were measured by immunoblotting using anti-NS antibody. (C) Effects of NS-specific shRNA on short-term proliferation and rescue by expression of NS in MCF7 cells. Cells expressing a control vector and short hairpin GFP (black), a control vector, and shNS4 (orange), or exogenous NS and shNS4 (blue) are shown. Error bars indicate the mean \pm SD.

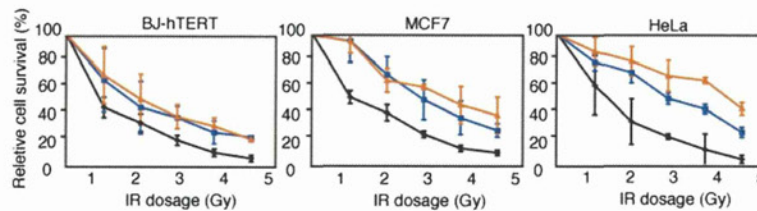


Fig. S2. Effects of overexpression of NS or GNL3L on clonogenic growth after γ -irradiation. Cells expressing a control vector (black), NS (blue), or GNL3L (orange) are shown. Three independently generated cell lines are shown. Error bars indicate the mean \pm SD. IR, irradiation.

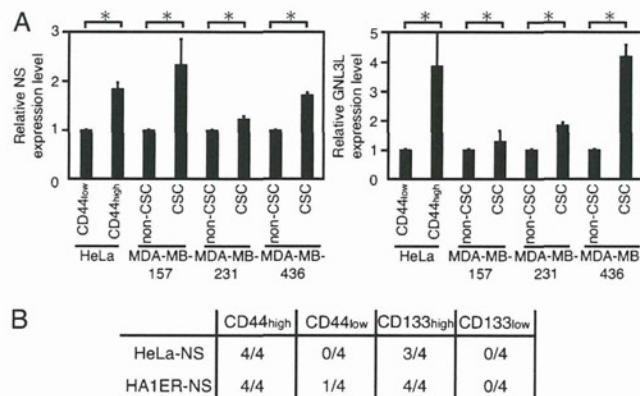


Fig. S3. Cancer stem cell markers induced by NS/GNL3L expression and enhanced tumorigenicity. (A) Expression of NS/GNL3L in fractionated cells [HeLa (CD44 high) or MDA-MB-157, MDA-MB-231, and MDA-MB-436 (CD44 high/CD24 low)]. CSC indicates CD44 high/CD24 low fraction, and non-CSC indicates CD44 low/CD24 high fraction. Expression levels of NS/GNL3L mRNA were measured by quantitative RT-PCR. The mean \pm SD for three independent experiments is shown. * $P < 0.05$. (B) CD44 high or CD133 high cells show increased tumorigenicity in HeLa-NS or HA1ER-NS cells. A total of 5×10^4 cells were injected per mouse.

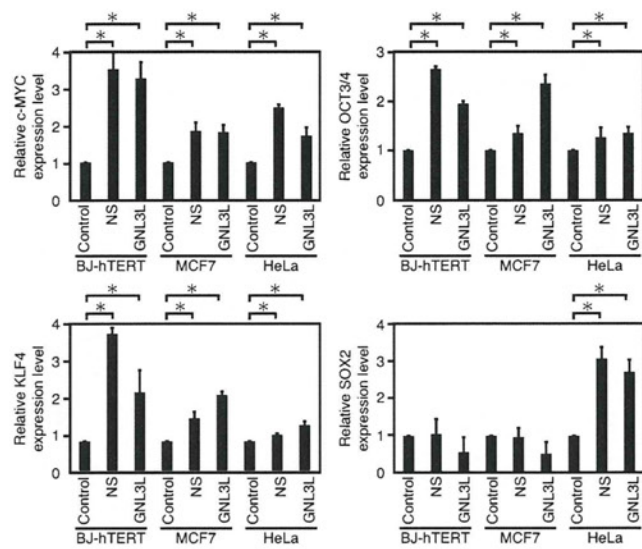


Fig. S4. Effects of overexpressing NS or GNL3L on the expression of *c-MYC*, *OCT3/4*, *KLF4*, and *SOX2*. Expression levels of *c-MYC*, *OCT3/4*, *KLF4*, and *SOX2* were measured by quantitative RT-PCR. The mean \pm SD is shown for three independent experiments. * $P < 0.05$.

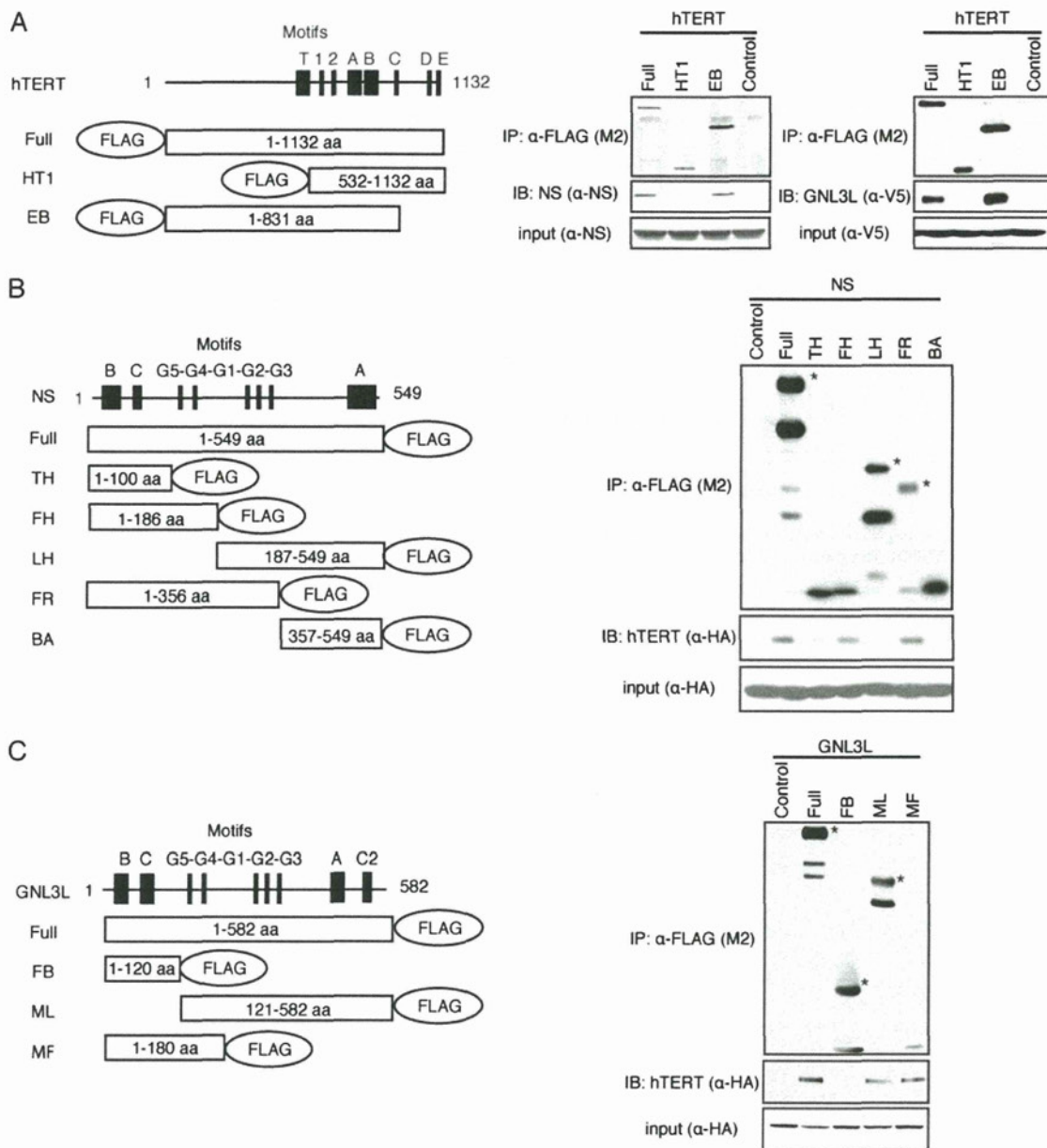


Fig. S5. Mapping the binding sites of hTERT and NS/GNL3L. (A) Mapping the binding site of NS or GNL3L on hTERT. Conserved telomerase-specific motifs are represented by boxes. A schematic presentation of full-length FLAG-epitope-tagged hTERT (Full) and truncation mutants (HT1 and EB) is shown. FLAG-tagged hTERT proteins were transiently expressed in 293T cells, and immune complexes were isolated using anti-FLAG-M2 antibody. Immune complexes were subjected to SDS/PAGE, followed by immunoblotting with the FLAG-M2 antibody (Upper) and with NS-specific or V5-specific antibodies (Lower). IB, immunoblot; IP, immunoprecipitate. The binding site of hTERT was mapped on NS (B) and GNL3L (C). A schematic representation of full-length FLAG epitope-tagged NS/GNL3L (Full) and truncation mutants (NS; TH, FH, LH, FR and BA, GNL3L; FB, ML and MF) is shown, where consensus motifs are represented by boxes. FLAG-tagged NS or GNL3L and hTERT-HA were transiently coexpressed in 293T cells, and immune complexes were isolated using anti-FLAG-M2 antibody and immunoblotted with the FLAG-M2 antibody (Upper) or an anti-HA antibody (Lower). In B and C, asterisks indicate the migration of the truncation mutants. Other signals are degradation products.

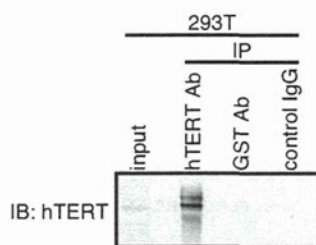


Fig. S6. Specificity of the anti-hTERT antibody (Rockland). hTERT complexes from 293T cells were purified with an anti-hTERT antibody (Rockland), anti-GST antibody (as an irrelevant antibody), or control IgG and subjected to SDS/PAGE and immunoblotting with the Rockland anti-hTERT antibody. IB, immunoblot.

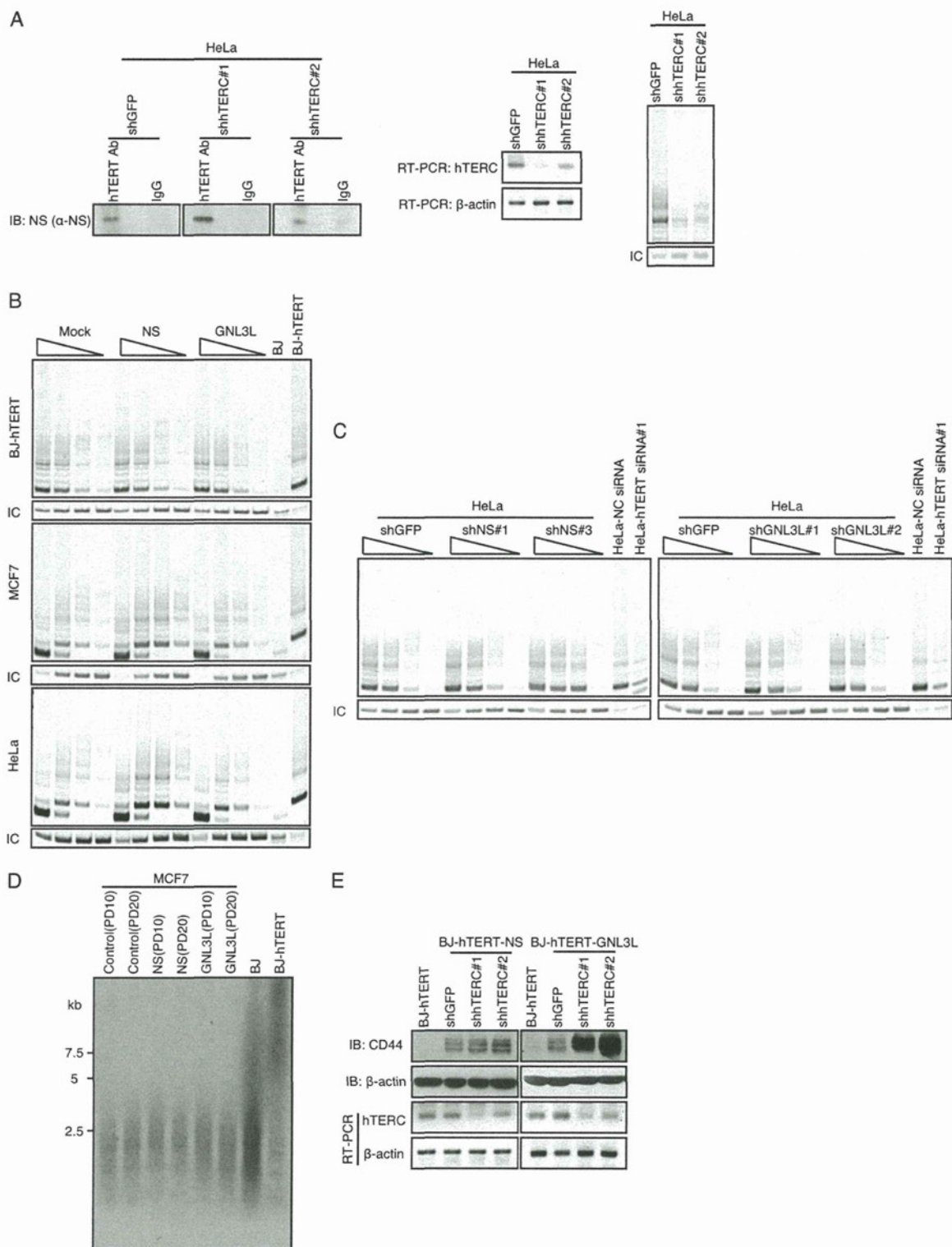


Fig. 57. hTERT-NS complex does not influence telomere maintenance. (A) *hTERC* is dispensable for the hTERT-NS interaction. hTERT complexes were isolated from HeLa cells stably expressing either a control vector or two independent *hTERC*-specific shRNAs. NS was assessed by immunoblotting with an anti-NS antibody. IB, immunoblot. (B) Effects of overexpressing NS or GNL3L on telomerase activity. IC, internal control. Dilutions of extract are shown with triangles (serial dilution was performed by 1/4 from 1 to 0.016 μ g). In this assay, the internal control competes with telomerase substrates, and therefore increases with the dilution of the extract. (C) Effects of suppressing NS or GNL3L on telomerase activity in HeLa cells. (D) Effects of overexpressing NS or GNL3L on telomere length in MCF7 cells. Telomere length was measured by telomere restriction fragment Southern blotting. (E) *hTERC* is dispensable for NS/GNL3L-induced increase in CD44 expression levels. BJ-hTERT-NS cells or BJ-hTERT-GNL3L cells stably expressing either a control vector or two independent *hTERC*-specific shRNAs were immunoblotted for CD44.

Table S1. Primers used in this study for RT-PCR

Target	Primer sequence	No. cycles
hTERC	F: 5'-TCTAACCTAACTGAGAAGGGCGT-3' R: 5'-TGCTCTAGAATGAACGGTGAAGG-3'	25
c-MYC	F: 5'-TACCCTCTCAACGACAGCAGCTCGCCCAAGTCCT-3' R: 5'-TCTTGACATTCTCCTCGGTGCCGAGGACCT-3'	25
OCT3/4	F: 5'-GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGG-3' R: 5'-CTTCCCTCCAACCAGTTGCCCAAAC-3'	28
KLF4	F: 5'-ACGATCGTGCCCGGAAAAGGACC-3' R: 5'-TGATTGTAGTGCTTCTGGCTGGGCTCC-3'	25
SOX2	F: 5'-AATGTTTTAATATTTGCAAGCAACTTTTGT-3' R: 5'-ACAGCTACGAAAATAAAGGGGGAAAACCT-3'	28
TWIST	F: 5'-CGGGTCATGGCTAACGTG-3' R: 5'-CAGCTTGCCATCTGGAGTC-3'	28 or 35
hTERT	F: 5'-CGGAAGAGTGTCTGGAGCA-3' R: 5'-GGATGAAGCGGAGTCTGGA-3'	30
β -actin	F: 5'-CAAGAGATGGCCACGGCTGCT-3' R: 5'-TCCTTCTGCATCCTGTCGGCA-3'	25

F, forward; R, reverse.

Table S2. Primers used in this study for quantitative RT-PCR

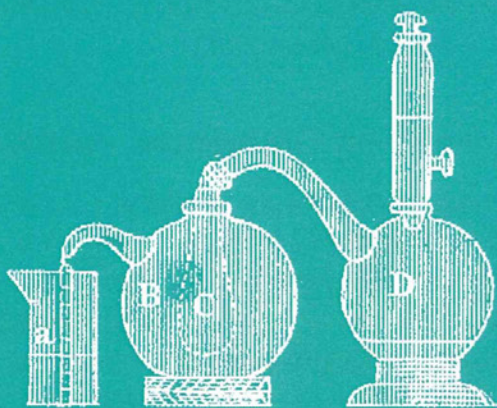
Target	Primer sequence
NS	F: 5'-TATCCATGGGGCTTACAAGG-3' R: 5'-CTGGACTTCGACAGCAAG-3'
GNL3L	F: 5'-CGACTTTTGGTGGTTGATGT-3' R: 5'-CCCATCATAAGTAGAGGTGCATT-3'
c-MYC	F: 5'-CACCAGCAGCGACTCTGA-3' R: 5'-GATCCAGACTCTGACCTTTTGC-3'
OCT3/4	F: 5'-GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGG-3' R: 5'-CTTCCCTCCAACCAGTTGCCCAAAC-3'
KLF4	F: 5'-CCATCTTTCTCCACGTTTCG-3' R: 5'-AGTCGCTCATGTGGGAGAG-3'
SOX2	F: 5'-TGGGTTCCGGTGGTCAAGT-3' R: 5'-TGATCATGTCCCGGAGGT-3'
GAPDH	F: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA-3' R: 5'-GAAGATGGTGTGGGATTTC-3'

F, forward; R, reverse.

Table S3. Sequences used for shRNAs in this study

shRNA	Sequence
shNS1	5'-CCGGGCACTGTCTGAGGAGACTACAActcgagTGTAGTCTCCTCAGACAGTGCtttttg-3' 5'-aattcaaaaaGCACTGTCTGAGGAGACTACAActcgagTGTAGTCTCCTCAGACAGTGC-3'
shNS2	5'-CCGGGCACTGCAGATTGTCCCTTAGctcgagCTAAAGGGACAATCTGCATGCTtttttg-3' 5'-aattcaaaaaGCATGCAGATTGTCCCTTAGctcgagCTAAAGGGACAATCTGCATGC-3'
shNS3	5'-CCGGGGAGGCTCTTAGGGAAGCctcgagGCTTCCCTAAGAAGAGCCTCctttttg-3' 5'-aattcaaaaaGGAGGCTCTTAGGGAAGCctcgagGCTTCCCTAAGAAGAGCCTCC-3'
shNS4	5'-CCGGGCTAAACTGTTCTGTATAActcgagTTATACAGAGAACAGTTTAGCtttttg-3' 5'-aattcaaaaaGCTAAACTGTTCTGTATAActcgagTTATACAGAGAACAGTTTAGC-3'
shGNL3L1	5'-CCGGGCAATCGAGAGGCTGAATTActcgagTAATTCAGCCTCTCGATTGGCtttttg-3' 5'-aattcaaaaaGCCAATCGAGAGGCTGAATTActcgagTAATTCAGCCTCTCGATTGGC-3'
shGNL3L2	5'-CCGGCCAAACCAATACCCTCTATTctcgagAATAGAGGGTATTGGGTTTGGtttttg-3' 5'-aattcaaaaaCCAAACCAATACCCTCTATTctcgagAATAGAGGGTATTGGGTTTGG-3'
shBRG11	5'-CCGGCCCGTGGACTCAAGAAGATAActcgagTATCTTGAAGTCCACGGGtttttg-3' 5'-aattcaaaaaCCCGTGGACTCAAGAAGATAActcgagTATCTTGAAGTCCACGGG-3'
shBRG12	5'-CCGGGCGCAGACTGTGATCATTctcgagAAATGATCACAGTGTCTGCCGtttttg-3' 5'-aattcaaaaaCGGCAGACTGTGATCATTctcgagAAATGATCACAGTGTCTGCCG-3'
shhTERC1	5'-TTGTCTAACCTAACTGAGAActcgagTTCTCAGTTAGGGTTAGACAAtttttg-3' 5'-aattcaaaaaTTGTCTAACCTAACTGAGAActcgagTTCTCAGTTAGGGTTAGACAA-3'
shhTERC2	(1)

1. Li S, et al. (2004) Rapid inhibition of cancer cell growth induced by lentiviral delivery and expression of mutant-template telomerase RNA and anti-telomerase short-interfering RNA. *Cancer Res* 64:4833-4840.



正常細胞では細胞分裂のたびに染色体末端のテロメアは不完全な複製のために短縮し，このテロメア末端複製問題が細胞の老化と深く関与していることが知られている。一方で，テロメア長の維持を担う酵素であるテロメラーゼは90%以上のがん細胞で高発現し，末端複製問題を回避することでがん細胞の不死化に関与していると考えられている。ヒトテロメラーゼは，触媒サブユニットである hTERT (Human Telomerase Reverse Transcriptase) と，鋳型 RNA である hTERC (Human Telomerase RNA component) を必要最小ユニットとし，hTERT の RNA 依存性 DNA ポリメラーゼ (RNA-dependent DNA polymerase; 逆転写酵素) 活性によりテロメア末端にテロメア配列を付加することが知られて

テロメラーゼ：テロメア伸長反応と新たな機能

木下圭太，毎田佳子，増富健吉

独立行政法人国立がん研究センター研究所

いる (図1)。このようにテロメア伸長をつかさどる逆転写酵素であるテロメラーゼの研究の歴史を振り返ると，RNA 研究と切り離すことができない。RNA を内在する複合体であるテロメラーゼの逆転写酵素としての特徴は RNA により規定，制御されていることがわかる。今回は RNA 結合複合体としてのテロメラーゼがどのようにして同定されたか，また近年のテロメラーゼ研究の新たな流れについて紹介する。

Telomere terminal transferase から reverse transcriptase へ

テロメラーゼは1985年 Greider と Blackburn により，原生動物において初めて発見された酵素であり，当

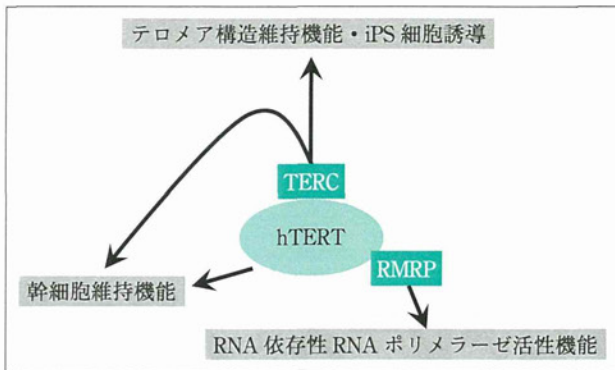


図1 ■ hTERTの機能と hTERT 結合 RNA

テロメラーゼ機能をもつ hTERT は TERC と結合することによりテロメア構造維持に寄与する。近年、hTERT がテロメア構造維持作用を介して iPS 細胞の誘導に関与することや、成体の組織幹細胞の機能維持、さらに RMRP と結合することにより従来の機能とは異なる RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性を示すことが明らかになっている。

初は telomere terminal transferase と記載され、染色体末端のテロメアに「terminal transferase」活性を利用して DNA を付加していく酵素と考えられていた⁽¹⁾。1989年に Morin により HeLa 細胞内にヒトで初めてテロメラーゼ複合体が発見された際にも、依然として「the human telomere terminal transferase enzyme」として報告されている⁽²⁾。すなわち、テロメラーゼは template independent terminal transferase 活性により染色体末端にテロメア DNA を付加すると考えられていた。しかし、この活性が RNase 処理により消失するという実験結果から、テロメラーゼ本体は RNA を内在する ribonucleoprotein ではないかとの仮説のもと、テロメラーゼを構成する RNA のクローニング競争が繰り返された。1989年に同じく Greider と Blackburn により原生動物のテロメラーゼ複合体に内在する RNA コンポーネントが同定され⁽³⁾、この発見により、テロメラーゼは RNA を内在する ribonucleoprotein 複合体であり、テロメアの伸長は内在する RNA を鋳型として染色体末端に相補的 DNA を付加する RNA 依存性 DNA ポリメラーゼ活性によるものであるという考えの基盤が形成された。その後、原生動物から哺乳動物まで、種を超えて保存されているテロメラーゼ複合体に内在する RNA コンポーネントが次々と同定され、TERC と命名された。これにより、テロメアを維持するテロメラーゼは、内在する RNA を鋳型として DNA を付加するテロメラーゼ逆転写酵素として種を超えて保存されているという仮説が立てられた。

Reverse transcriptase 触媒サブユニットの同定

続いて、クローニング競争の標的となったのは、テロメラーゼ逆転写酵素の触媒サブユニットである。テロメラーゼ逆転写酵素の触媒サブユニットとして、酵母では Est2 が知られていたこと、またテロメラーゼは種を超えて保存されているとの仮説から、Est2 のホモログとして、データベースを駆使したコンピュータ解析によりその遺伝子探索が行なわれた。その結果、1997年 Cech⁽⁴⁾ と Weinberg⁽⁵⁾ のグループが、それぞれ独立に、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素の触媒サブユニットのクローニングに成功した。当時、それぞれのグループが報告した触媒サブユニット (hTERT: Cech のグループ, hEst2: Weinberg のグループ) は、予想通り逆転写酵素としてのモチーフを有するレトロウイルス逆転写酵素などと近縁の酵素であることが明らかとなった (現在、これらは human telomerase reverse transcriptase (hTERT) として名称が統一されている)。このようにして、テロメラーゼは内在する RNA を鋳型として DNA を付加する RNA dependent DNA polymerase (逆転写酵素) であることが明らかとなった (図1)。

テロメラーゼと iPS 細胞の誘導、幹細胞の維持

このような変遷でテロメア伸長酵素としてのヒトテロメラーゼ研究が進められてきたが、近年、テロメラーゼ研究の新たな流れが報告されるようになってきた。これまでにもテロメラーゼにテロメア構造維持機構以外の機能が存在する可能性を示唆する報告はあったが⁽⁶⁾、中でも、前述したテロメラーゼ複合体の触媒サブユニットである TERT が iPS 細胞 (induced pluripotent stem cell; 人工多能性幹細胞) の誘導や幹細胞の機能維持に関わるのではないかという報告が相次いだ⁽⁷⁻⁹⁾ (図1)。

2009年 Marion らは、マウスの体細胞から作製した iPS 細胞において、TERT の誘導とともにテロメア伸長が起こり、それが多能性の獲得と相関することを見いだした⁽⁷⁾。マウス胎仔繊維芽細胞 (MEF) に Oct-3/4, Sox2, Klf4, c-Myc の 4 因子を導入することにより誘導した iPS 細胞、または c-Myc を除いた 3 因子を導入することにより誘導した iPS 細胞ではともにテロメラーゼの再活性化が見られ、iPS 作製の由来となった MEF よりもテロメア長が伸長していることが確認された。しかし、この iPS 細胞のテロメア長は、由来となった MEF のテロメア長よりは長いものの、遺伝的に同じ性質を有すると考えられている胚性幹 (ES) 細胞と比べると短いこと

が確認された。ところが、非常に興味深いことに、この iPS 細胞を培養し続けると ES 細胞とほぼ同等のテロメア長をもつようになることが確認されている。このことは、テロメア伸長反応の大部分はリプログラミング後に起こるということを強く示唆するものであり、iPS 細胞の未分化状態維持にテロメラーゼが関与していることが示唆される。

また彼らは、iPS 細胞の誘導にテロメラーゼ活性が必須であることを、テロメラーゼ活性に不可欠な RNA コンポーネントである TERC をノックアウトしたマウスを用いて解析した。まず、テロメア長が十分である第 1 世代の *Terc*^{-/-} マウス由来の MEF から iPS 細胞を複製したところ、野生型 MEF を用いた場合と同等の効率で iPS 細胞が誘導できることを確認した。しかし、この第 1 世代 *Terc*^{-/-} マウス由来の iPS 細胞ではテロメア伸長が見られなかったことから、iPS 細胞誘導後のテロメア伸長反応はテロメラーゼによるものと推測することができる。さらに、前述のように第 1 世代の *Terc*^{-/-} マウス由来の MEF から iPS 細胞を誘導することができた一方で、第 2・3 世代の *Terc*^{-/-} マウス由来の MEF から iPS 細胞誘導を試みたが、その誘導効率は劇的に減少することが確認された。これらの結果は、テロメラーゼ活性のない MEF におけるテロメア短小化が iPS 細胞の誘導を抑制する原因であることを示唆している。しかし、iPS 細胞誘導効率が低い第 2 世代の *Terc*^{-/-} マウスと *Terc*^{-/+} マウスを掛け合わせた第 3 世代 *Terc*^{-/+} マウス由来の MEF では iPS 細胞誘導効率は回復することが確認され、iPS 細胞の誘導効率はテロメラーゼ活性に依存することが強く示唆されている。

また、2005 年 Sarin らは、マウステロメラーゼの触媒サブユニットである mTERT を毛囊のバルジ領域幹細胞に特異的に発現させることで、著しい体毛の成長を示すことを見いだした⁽⁹⁾。毛囊は成長期 (anagen)、退行期 (catagen)、休止期 (telogen) を経て、バルジ領域幹細胞へのシグナル刺激によって休止期から成長期へと移行し体毛が合成される。TERT はこの休止期のバルジ領域幹細胞で機能し、毛囊を速やかに成長期へと移行させ、体毛の顕著な成長をひき起こす。この現象にはテロメラーゼ活性に不可欠な TERC の存在が必要でないことから、TERT のテロメラーゼ活性以外の新規機能、とりわけ幹細胞機能維持における TERT の重要性が示された。さらに同じグループは、この体毛の顕著な成長が、TERT とクロマチンリモデリング複合体の構成因子である BRG1 による Wnt/ β -catenin/Myc シグナル伝達経路の活性化によるものであることを明らかにした^(10,11)。こ

れら一連の報告は、TERT がテロメア構造維持機能とは別に幹細胞機能制御に直接的に関わっていることを示した重要な報告といえる。同様の発見は同時期に他のグループからも報告されているが、一方はこの機能にテロメラーゼの RNA コンポーネントである TERC が必要であると主張し⁽⁸⁾、別のグループは幹細胞機能維持には TERC は必要なく、従来から知られるテロメラーゼ複合体の機能とは独立した機能であると主張している⁽⁹⁾。この点は非常に重要な問題であるが、現時点では明確な答えは出ていない (図 1)。また、mTERT ノックアウトマウスと mTERC ノックアウトマウスで同じ表現型が認められることから⁽¹²⁾、はたして TERT が TERC と独立した機能を本当に有するかどうかなお多くの議論があり、今後も引き続き解析が必要である。

このような背景のもと、近年 TERT の新規機能を制御する新たなパートナーの存在が示唆されている⁽¹³⁾。最近では、Fu らが TERT 複合体の精製を行ない、従来同定されていなかったタンパク質分子群を複体内に同定し注目されている⁽¹⁴⁾。これらのタンパク質群の中には、幹細胞機能維持に関わることが示唆される分子と近縁のタンパク質なども存在し、これらの生物学的な意義の解析は非常に興味深い。さらに TERC にかわり TERT と結合し得る RNA の同定の試みは、RNA を制御する TERT の新たな機能の発見につながった⁽¹⁵⁾。

■ テロメラーゼである TERT の新規機能の発見：RNA 依存性 RNA ポリメラーゼとして機能する hTERT

近年、RNA は遺伝子発現を多様なメカニズムで制御することが明らかとなってきた。その中核となる分子が二本鎖 RNA である。RNA サイレンシングは 20~30 塩基長の小さな RNA による遺伝子発現抑制機構であるが、RNA サイレンシングを起こす代表的な分子に siRNA (small interfering RNA) があり、内因性の siRNA は長鎖二本鎖 RNA の切断によって合成される^(16,17)。一本鎖 RNA を鋳型に二本鎖 RNA を合成する RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RNA-dependent RNA polymerase: RdRP) は内因性 siRNA の合成に関わる重要な分子として植物や線虫、分裂酵母などのモデル生物での発現が知られていたが、哺乳類では RdRP の存在は立証されていなかった。TERT の新規機能について検討を行っていた筆者らは、TERT が系統遺伝学的⁽⁴⁾ および構造学的⁽¹⁸⁾ に RNA ウイルスの RdRP と近縁にあることに注目し、hTERT が RdRP として機能するのではないかと推測して解析を行なった。

まず、hTERC に代わる新規 hTERT 結合 RNA を検

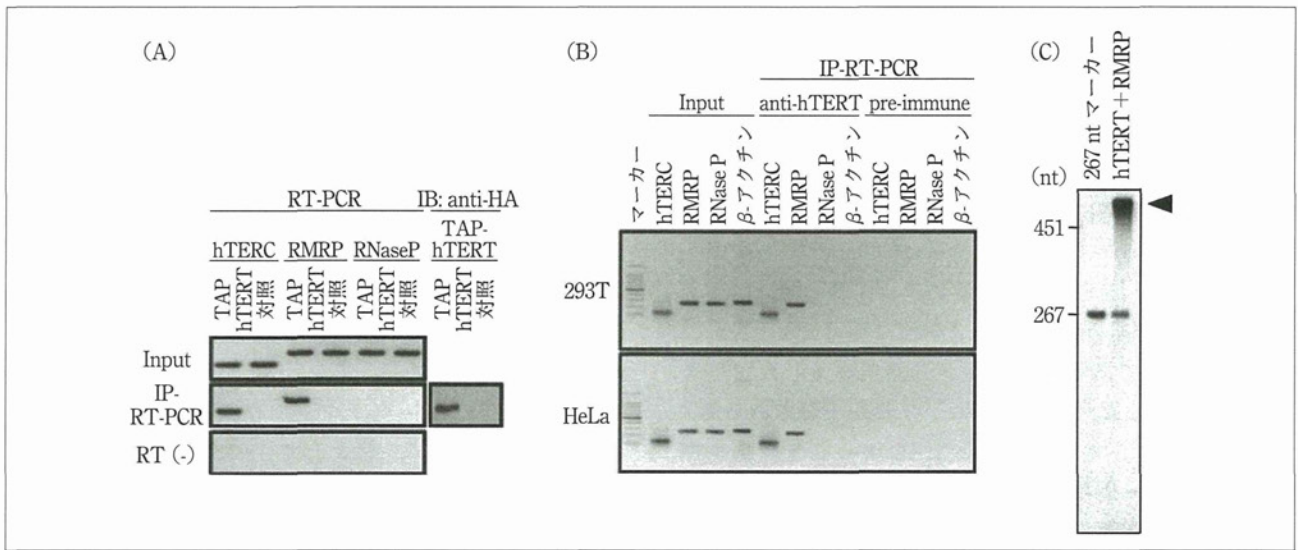


図2 ■ hTERT-RMRP 複合体は RdRP 活性を有する (文献 15 より転載・改変)

過剰発現させた hTERT (A) および内在性 hTERT (B) の免疫沈降により hTERT と RMRP との結合が確認された。 (C) hTERT を用いた *in vitro* RdRP assay によって 267 塩基の RMRP (センス鎖) から合成された長鎖ヘアピン型 RNA (矢印)。合成ヘアピン型 RNA は RMRP のセンス配列とアンチセンス配列をとともに含み、RMRP の約 2 倍の長さをも有する。

索し、RMRP (RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease) を同定した (図 2-A, B)。RMRP は 267 塩基の snoRNA (small nucleolar RNA) に分類される non-coding RNA であり、低身長を主症候とする遺伝子性疾患である軟骨毛髪低形成 (Cartilage and Hair Hypoplasia) の原因遺伝子であることが報告されている⁽¹⁹⁾。hTERT と RMRP との複合体の RNA 合成能について *in vitro* での解析を行なったところ、この複合体は長鎖 RNA の合成が可能であることがわかった (図 2-C)。そこで hTERT と RMRP により合成される長鎖 RNA について詳細に検討した結果、hTERT は RMRP (センス鎖) を鋳型として RMRP の相捕鎖 (アンチセンス鎖) を合成し、合成された RNA は長いヘアピン型の二本鎖 RNA であることがわかった。つまり、hTERT は一本鎖 RNA を鋳型に二本鎖 RNA を合成する RdRP 活性を有することが証明されたのである。

次に、細胞内における hTERT の RdRP として機能について検討を行なった。hTERT と RMRP をともに発現している細胞から抽出した RNA を用いて行なったノーザンブロッティングにより、細胞内にも RMRP のセンス鎖+アンチセンス鎖からなる長鎖ヘアピン型 RNA の存在が確認された (図 3-A)。さらに、RMRP のアンチセンス鎖合成は、hTERT の発現のある細胞でのみ認められることがわかった。これらより、hTERT は細胞内でも RdRP 活性により RMRP のアンチセンス鎖を合成していることが示唆された。

さらに、hTERT がもつ RdRP 活性の生物学的意義を考える上で、興味深い現象が見つかった。ウイルスベクターを用いて RMRP の過剰発現を試みたところ、hTERT の発現のある細胞でのみ RMRP の細胞内総発現量が減少したのである (図 3-B)。さらに、hTERT の発現のない細胞に hTERT を導入すると RMRP の発現は減り、逆に hTERT を発現している細胞でその発現を抑制すると RMRP 発現量が増加した。これらの結果は、hTERT が RMRP に対し転写後抑制をかけている可能性を示唆していた。前述のように、RNA サイレンシングの主体は長い二本鎖 RNA から切り出された 20~30 塩基長の短い二本鎖 RNA である。そこで、hTERT の RdRP 活性によって合成された RMRP 由来の長鎖ヘアピン型 RNA も機能性の短い二本鎖 RNA へと切断されているのではないかと考え検討したところ、細胞内に RMRP に由来する 22 塩基の短い二本鎖 RNA が存在することを突き止めた (図 3-C)。この短い二本鎖 RNA は長鎖二本鎖 RNA を切断する Dicer に依存して発現しており、RNA サイレンシングを起こす際に結合する AGO 2 タンパク質とともに存在していることが確かめられた。以上の結果、テロメラーヌ逆転写酵素として知られた hTERT はテロメラーヌとは異なる RdRP 活性を有し、長鎖ヘアピン型 RNA の合成とそれに引き続く内因性 siRNA の合成を介して RNA サイレンシングに関与することが立証されたのである (図 3-D)。

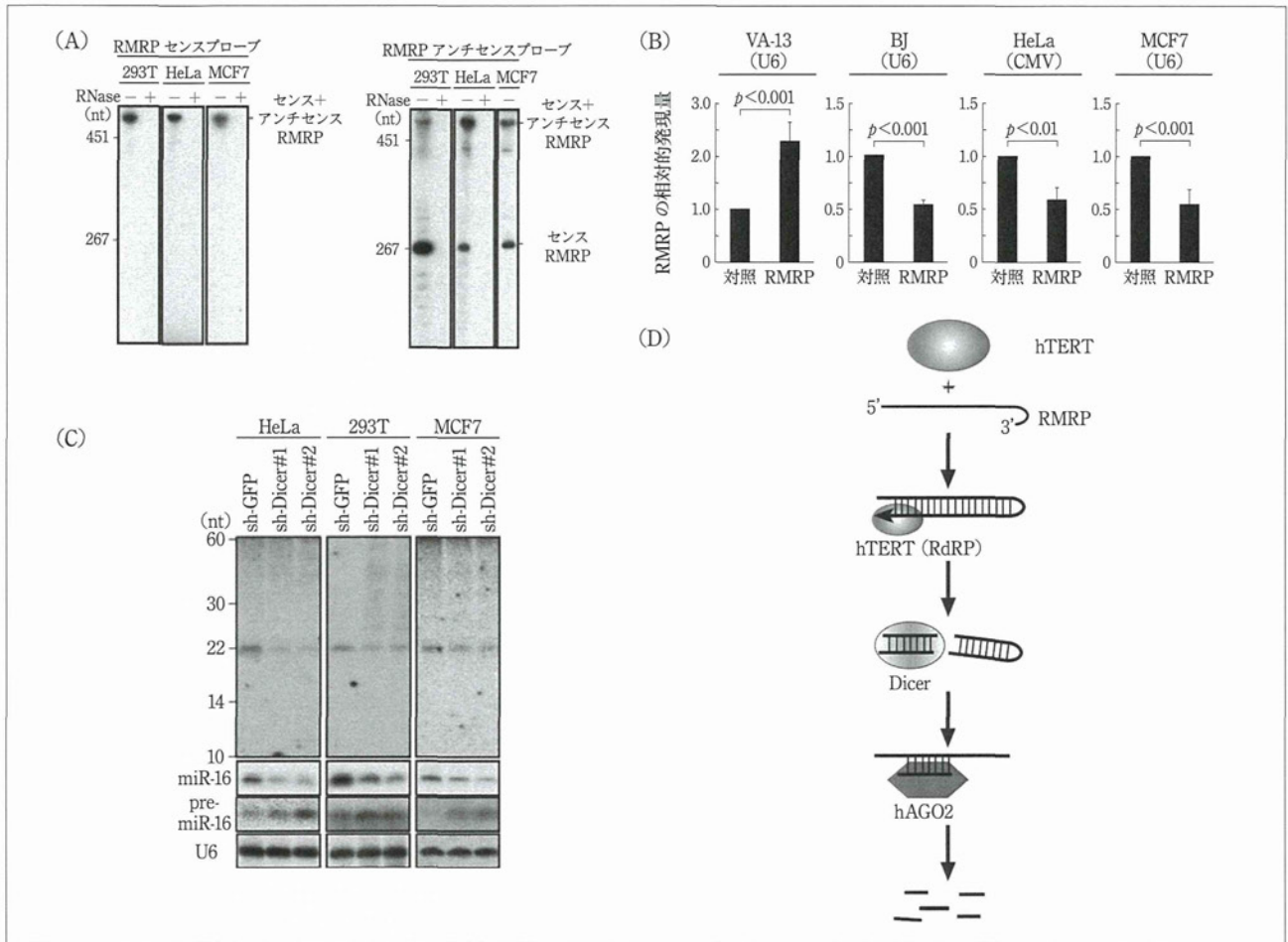


図3 ■hTERT のRdRP 活性と RNA サイレンシング (文献 15 より転載・改変)

(A) hTERT 発現細胞におけるセンス+アンチセンス型 RMRP の発現. (B) hTERT 発現細胞では RMRP 発現ベクターの導入により RMRP の総発現量が減少する. (C) Dicer 依存性に発現する RMRP 特異的な内在性 siRNA. (D) hTERT が仲介する RNA サイレンシングのモデル. hTERT は RdRP 活性により RMRP の相補鎖を合成. 合成されたヘアピン型二本鎖 RNA を Dicer が切断. 切り出された内在性 siRNA は hAGO2 に取り込まれ, 相補的な配列をもつ RNA の発現を抑制

おわりに

テロメラーゼとしての hTERT はこれまでも分子標的医療や再生医療分野などで臨床応用に向けた様々な研究がなされてきたが, テロメラーゼが新たな機能を有するとすれば, 多くの新発見が得られるはずである. 今回, hTERT の新規機能として RdRP 活性を見いだしたことにより, 癌細胞内での選択的 siRNA 合成技術や RNA の増幅技術など新たなアイデアが創出される可能性がある.

(おわり)

文献

- 1) C. W. Greider & E. H. Blackburn : *Cell*, **43**, 405 (1985).
- 2) G. B. Morin : *Cell*, **59**, 521 (1989).
- 3) C. W. Greider & E. H. Blackburn : *Nature*, **337**, 331 (1989).
- 4) T. M. Nakamura *et al.* : *Science*, **277**, 955 (1997).
- 5) M. Meyerson *et al.* : *Cell*, **90**, 785 (1997).
- 6) S. A. Stewart *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 12606 (2002).
- 7) R. M. Marion *et al.* : *Cell Stem Cell*, **4**, 141 (2009).
- 8) I. Flores *et al.* : *Science*, **309**, 1253 (2005).
- 9) K. Y. Sarin *et al.* : *Nature*, **436**, 1048 (2005).
- 10) J. Choi *et al.* : *PLoS Genet*, **4**, e10 (2008).
- 11) J. I. Park *et al.* : *Nature*, **460**, 66 (2009).
- 12) X. Yuan *et al.* : *Genes Cells*, **4**, 563 (1999).
- 13) E. H. Blackburn : *Nature*, **436**, 922 (2005).
- 14) D. Fu & K. Collins : *Mol. Cell*, **28**, 773 (2007).
- 15) Y. Maida *et al.* : *Nature*, **461**, 230 (2009).
- 16) K. Okamura *et al.* : *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.*, **9**, 673 (2008).
- 17) H. Siomi *et al.* : *Nature*, **457**, 396 (2009).
- 18) A. Gillis *et al.* : *Nature*, **455**, 633 (2008).
- 19) M. Ridanpaa *et al.* : *Cell*, **104**, 195 (2001).



話 題

TERT, がん性幹細胞を標的とした がん治療の可能性*

岡本奈緒子*** 増富健吉**

Key Words : TERT, cancer stem cell, telomerase, EMT, RNAi

はじめに

正常組織において幹細胞と幹細胞から分化した細胞が、幹細胞を頂点とした分化の階層性を構築していることが知られている。がん組織においても、幹細胞性を持つ細胞がごく少数存在し、階層性のある、がんという不均一な組織を作り出すという仮説をがん性幹細胞仮説と呼び、近年この仮説を立証する報告が相次いでいる。

現在、早期発見や早期治療の進歩により多くの悪性腫瘍でその死亡率が減少している一方で、依然として難治性の悪性腫瘍の生存率はここ数十年大きな変化はみられていない。近年相次いで報告されている、「がん性幹細胞の存在」は、臨床における固形がん治療の考え方に大きな影響を及ぼしている。現在の一般的な抗がん剤治療は腫瘍細胞を抗がん剤によって縮小させることを基本としている。しかしながら、がん性幹細胞の概念では、がん性幹細胞が抗がん剤抵抗性を示す集団を形成すると考えられており¹⁾、すなわち、治療終了後も生き残ったがん性幹細胞により、再発・転移が引き起こされると考えられている。がん組織という不均一な集団中に低頻度存在するきわめて悪性度の高いがん性幹細胞の特徴を解析し、がん性幹細胞を治療標的とすることで、多くのがんの根治に繋がる治療法の開発が期待されている(図1)。本稿では近年

のがん性幹細胞に関する報告を含む現在までのがん性幹細胞仮説とその将来性について紹介する。

がん性幹細胞仮説

近年、幹細胞生物学の発展と自己複製能観察を可能とした新しい実験動物モデルの開発により、がん性幹細胞仮説をサポートする重要な実験が可能となった。1997年Dickらのグループはヒト急性骨髄性白血病の細胞のうちCD34⁺CD38⁻という表現型を持つごく少数のがん性幹細胞を免疫不全マウスであるNOD/SKIDマウスに移植すると、もとの白血病患者と同様の症状を発症することを報告した²⁾。これらの細胞は白血病細胞中に10,000分の1以下の確率で存在し移植により白血病患者と同様の症状を発症したことから、白血病細胞中のごく一部ががん性幹細胞であると考えられた。この報告をきっかけとして同様のアプローチにより2003年には乳がん³⁾と脳腫瘍におけるがん性幹細胞が⁴⁾、その後前立腺がん⁵⁾、大腸がん⁶⁾、頭頸部扁平上皮がん⁷⁾、膵臓がん⁸⁾などさまざまながんにおいてがん性幹細胞の存在を示唆する報告が相次いだ。また、最近の研究成果によると、がん性幹細胞の性質として、化学療法・放射線療法抵抗性⁹⁾、がん浸潤・転移への関与¹⁰⁾、ES細胞様の遺伝子発現パターン¹¹⁾などが報告されている(図2)。しかしながら、がん性幹細胞の機能維持機構の大部分が未解明

* TERT, cancer stem cell and therapy.

** Naoko OKAMOTO & Kenkichi MASUTOMI, M.D., Ph.D.: 独立行政法人国立がん研究センター研究所がん性幹細胞研究プロジェクト(〒104-0045 東京都中央区築地5-1-1); Cancer Stem Cell Project, National Cancer Center Research Institute, Tokyo 104-0045, JAPAN

*** 東京薬科大学ゲノム情報学研究室

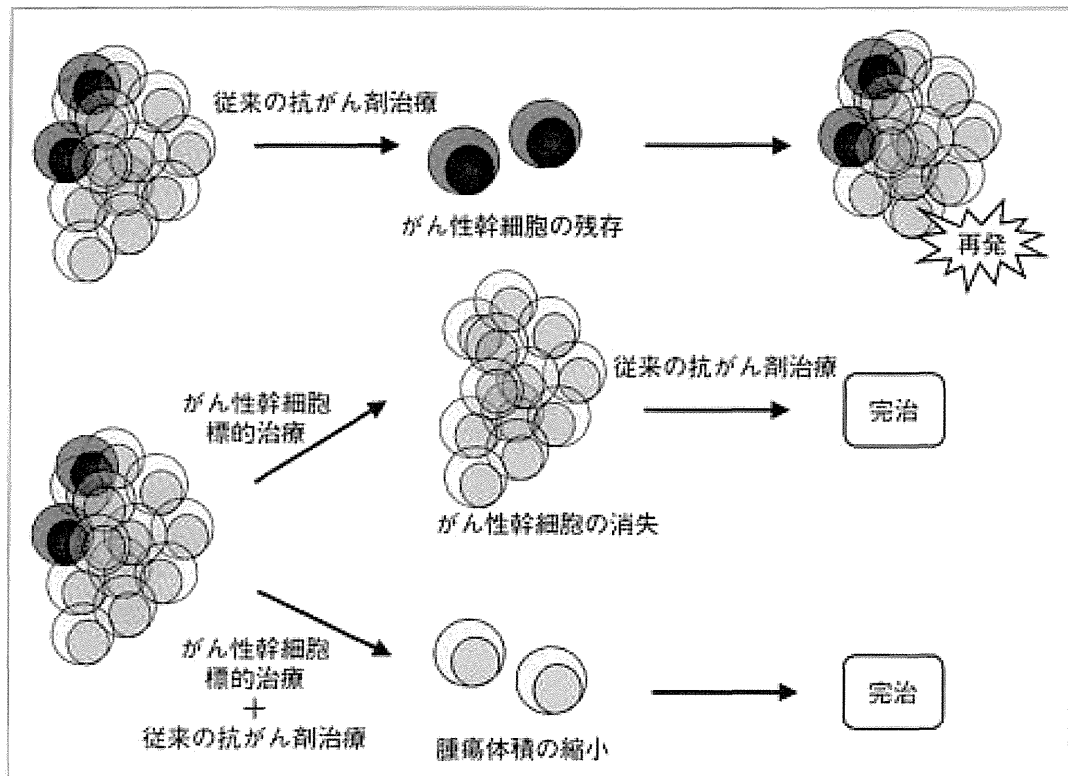


図1 「従来の抗がん剤治療」と「がん性幹細胞標的治療」の比較
 がん性幹細胞標的治療と従来の抗がん剤治療を併用することにより、再発のリスクを回避し、がんの根治を目指すことが可能となる。(Huntly BJ, et al. 2005 Nature Reviews Cancerより引用改変)

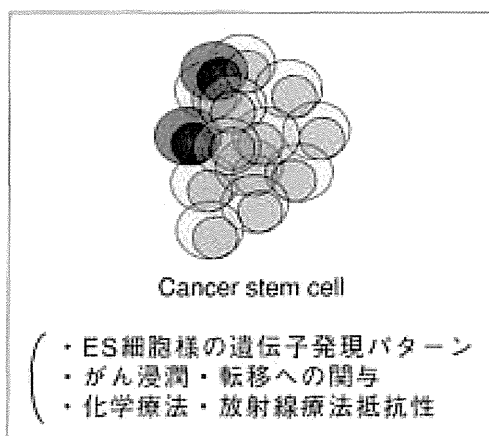


図2 がん性幹細胞の特徴
 がん性幹細胞の特徴を阻害する治療法の開発が、がんの根治を可能にすると考えられる。

であり、また人為的な遺伝子操作によるがん性幹細胞モデルの構築なども依然として報告されていない。われわれは、テロメア構造維持にかかわることで知られているテロメラーゼのがん性幹細胞機能維持における役割についての研究を行っていることからその概略を紹介する。

テロメラーゼの古典的機能と新規機能

正常細胞では細胞分裂のたびに染色体末端のテロメアDNAは短小化し、このテロメア末端複製問題が老化と深く関与していることが知られている。テロメア構造維持を担う酵素であるテロメラーゼは90%以上のがん細胞で高発現し¹³⁾、末端複製問題を回避することでがん細胞の不死化に関与していると考えられている。ヒトテロメラーゼは、触媒サブユニットであるhTERT (Human Telomerase Reverse Transcriptase)と、鋳型RNAであるhTERC (Human Telomerase RNA component)を必要最小ユニットとし、hTERTのRNA依存性DNAポリメラーゼ活性(逆転写酵素活性)によりテロメア末端にテロメア配列を付加することが知られている。しかし、近年になり従来から逆転写酵素として知られるTERTがテロメア構造維持機能というテロメラーゼの古典的機能以外の機能を持つという可能性が報告されるようになってきた¹³⁾⁻¹⁶⁾。ここではTERTの新規機能の例として2つの報告を紹介する。

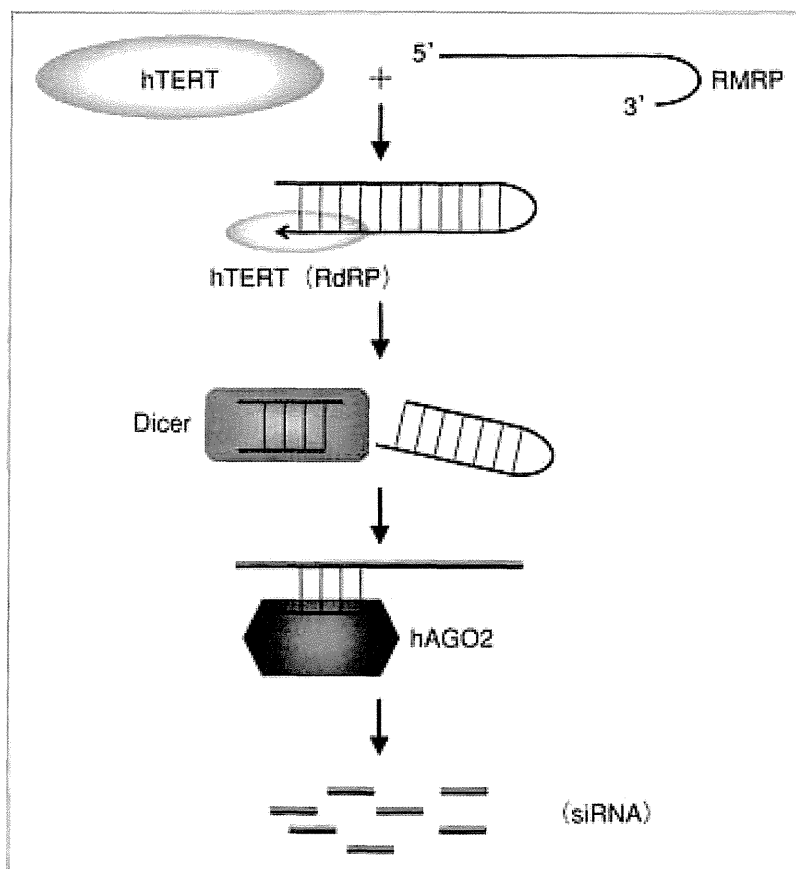


図3 hTERTによるRdRP活性の模式図

hTERTのRdRP活性により合成された長鎖2本鎖RNAはDicerによる切断を経てhAGO2を中心としたRISC複合体へ取り込まれ、相補的な配列を持つmRNAを分解する。(文献¹⁵⁾より引用改変)

2005年Artandiらのグループはマウステロメラーズの触媒サブユニットであるmTERTを毛囊のバルジ領域幹細胞に特異的に発現させることで、著しい体毛の成長を示すことを見出した¹⁴⁾。毛囊は成長期(anagen)、退行期(catagen)、休止期(telogen)を経て、バルジ領域幹細胞へのシグナル刺激によって休止期から成長期へと移行し体毛が合成される。TERTはこの休止期のバルジ領域幹細胞で機能し、毛囊を速やかに成長期へと移行させ、体毛の顕著な成長をひき起こす。この現象にはテロメラーズ活性に不可欠なTERCの存在が必要でないことからTERTのテロメラーズ活性以外の新規機能とりわけ幹細胞機能維持におけるTERTの重要性が示された。さらに、同じく、Artandiらのグループはこの体毛の顕著な成長が、TERTとクロマチンリモデリング複合体の構成因子であるBRG1によるWnt/ β -catenin/Mycシグナル伝達経路の活性化によるものであるこ

とを明らかにした¹⁷⁾¹⁸⁾。これら一連の報告は、TERTがテロメア構造維持機能とは独立して幹細胞機能制御に直接的にかかわっていることを示した重要な報告と言える。

また、2009年、われわれの研究グループはRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を持つことが知られてきたTERTがRNA依存性RNAポリメラーゼとしての活性を持ち、内因性siRNA (small interfering RNA)の合成に寄与することを見出した¹⁵⁾(図3)。RNA干渉とは21~23ntの短いRNAであるsiRNAがAgoを中心としたRISC複合体に取り込まれ、相補的な配列を持つmRNAを分解することによって遺伝子発現を制御する機構である。この機構では長鎖2本鎖RNAがRNase IIIの一種であるDicerによって切断されることでsiRNAが合成される。TERTはタンパク質をコードしないnon-coding RNAの一種であるRMRP (RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease)

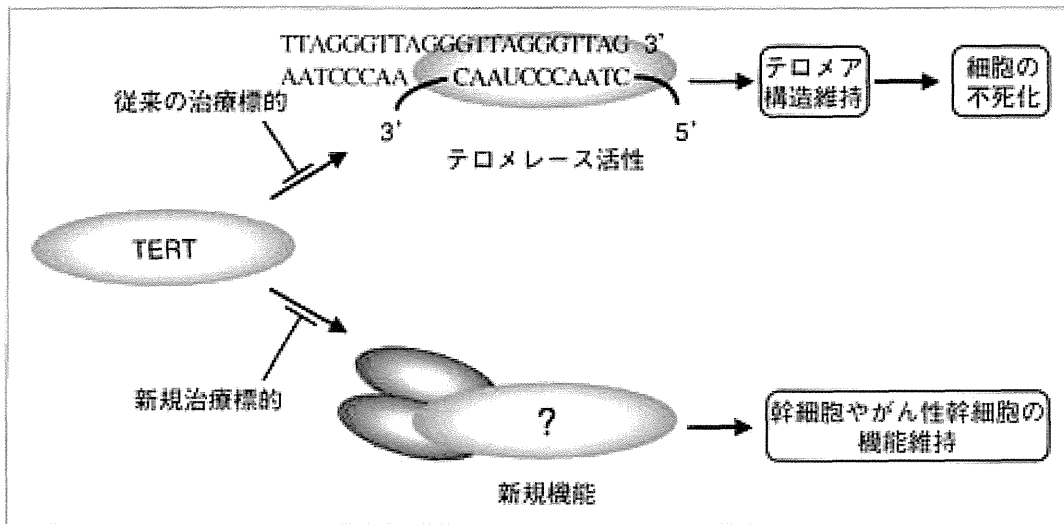


図4 テロメラーゼ新規機能を標的とした治療法の開発

テロメラーゼの新規機能解明により、従来のテロメラーゼ標的治療の弱点を克服した新しい治療標的の開発が期待される。

と結合し、自身のRNA依存性RNAポリメラーゼ活性によりその相補鎖を合成し長鎖2本鎖RNAとすることで、siRNAの合成経路の一部を担うことが明らかとなった。

がんとテロメラーゼ

現在までテロメア・テロメラーゼ研究とがん研究のかかわりの中で特に注目されてきた事実は、がん細胞で圧倒的にhTERTの発現量あるいはテロメラーゼ活性が高いという点である。これは「細胞分裂寿命を規定するテロメア長を長く維持するために、がん細胞では特異的に高いレベルのテロメラーゼ活性(ないしhTERTの発現)が認められる」という非常に明確なモデルに立脚している。しかし、この考えに立脚して開発されたテロメラーゼ阻害剤の効果発現は細胞分裂に伴うテロメアの短小化に依存しており、その発現までの遅延性という問題が存在した。すなわち、「不死化を司るためのテロメア長を維持するテロメラーゼを標的としたがん治療」であることは「テロメラーゼを阻害することによる効果が期待できるまでにテロメア短小化に要する時間がかかる」という内在的な問題を有するという弱点があった。つまり、がん研究におけるテロメアとテロメラーゼの関係は「がん治療における魅力的な標的」であると同時に「がん治療の弱点」であるという矛盾が認識されるようになってきた。

このような背景の中で、特に注目すべきはTERTの新規機能の存在である。前述のようにTERTの新規機能に関する報告が相次いでいるが、がん性幹細胞におけるhTERTの新規機能が解明されれば、従来の治療標的であったテロメラーゼのテロメア構造維持機能以外の新しい治療標的の開発に繋がることが期待される(図4)。事実、前立腺がんにおいてがん性幹細胞は通常のがん細胞と比較してより高いテロメラーゼ活性を持ち、テロメラーゼ阻害剤ががん性幹細胞のテロメア長の短小化に効果があるという報告も存在する¹⁰⁾。つまり、TERTのテロメア構造維持機構そして新規機能の阻害はがん性幹細胞治療への応用を可能とすると期待されている。

がん性幹細胞標的治療

前述したようにがん性幹細胞を標的とした治療法の開発は多くのがんの根治に繋がる可能性を持っており、図2で示したがん性幹細胞の性質を阻害することで、がん性幹細胞標的治療の開発が可能になると考えられる。ここでは代表的ながん性幹細胞の性質として①がん浸潤・転移への関与および②化学療法・放射線療法抵抗性を取り上げ、これらがん性幹細胞の性質を標的とした治療の可能性について言及する。

1. がん性幹細胞の「がん浸潤・転移への関与」を標的とした治療の可能性

がんの浸潤・転移を司る分子機序の一つとして、上皮間葉転換 (Epithelial-mesenchymal transition: EMT) があげられる²⁰⁾。たとえば、培養細胞ではTGF- β の添加によりEMTが誘導されることから、TGF- β の阻害剤はEMTを阻害する効果を持つことが期待される。現在までに慢性骨髄性白血病マウスモデルにおいて、TGF- β が白血病幹細胞の維持に重要な役割を果たし、TGF- β の阻害剤とイマチニブの併用により慢性骨髄性白血病が顕著に抑制されることが報告されている²¹⁾。また、不死化乳腺上皮細胞ではEMTによってできた間葉系細胞ががん性幹細胞の性質を持つことも報告されており²²⁾、これら白血病におけるがん性幹細胞標的治療に関する報告から、固形がんにおいても同様の効果が期待される。

2. がん性幹細胞の「化学療法・放射線療法抵抗性」を標的とした治療の可能性

化学療法抵抗性にはABC (ATP-binding cassette) transporterの高発現がかかわっていると考えられている²³⁾。ABC transporterの高発現は細胞内から効率的に抗がん剤を排出することから、ABC transporterの阻害剤はがん性幹細胞の化学療法抵抗性を阻害し、抗がん剤の効果を高める可能性が考えられる。また、がん性幹細胞が放射線治療抵抗性の原因であるとの考え方も存在するが、その分子機序として、放射線療法抵抗性にはがん性幹細胞のDNA損傷応答機構の充進がかかわっているとの報告もある²⁴⁾。多くの既存の抗がん剤はDNA損傷応答あるいはDNA修復と密接にかかわる薬剤であることから、たとえばピリミジン系代謝拮抗剤であるフルオロウラシルやTS-1などの核酸代謝関連抗がん剤あるいはトポイソメラーゼI阻害剤であるイリノテカンなどDNA損傷修復関連抗がん剤などの効果判定をがん性幹細胞へ治療応用という視点から再評価することは大きな意義を持つと考えられる。

おわりに

ES細胞などの増殖能の強い幹細胞とがん性幹細胞の機能や遺伝子発現パターンには多くの類似点がある一方で、双方の分子基盤が必ずしも

単純に一致しているわけではないという点などは今後の研究課題として残るところである。固形がん幹細胞の研究も著しく進歩しており、がん性幹細胞標的治療の開発が近い将来実現することが十分期待できる。

文 献

- 1) Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 2005 ; 5 : 275-84.
- 2) Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997 ; 3 : 730-7.
- 3) Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 ; 100 : 3983-8.
- 4) Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003 ; 63 : 5821-8.
- 5) Richardson GD, Robson CN, Lang SH, et al. CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J Cell Sci* 2004 ; 117 : 3539-45.
- 6) Xin L, Lawson DA, Witte ON. The Sca-1 cell surface marker enriches for a prostate-regenerating cell subpopulation that can initiate prostate tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 ; 102 : 6942-7.
- 7) Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007 ; 445 : 111-5.
- 8) Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 ; 104 : 973-8.
- 9) Li C, Heidt DG, Dalerba P, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 2007 ; 67 : 1030-7.
- 10) Bailey JM, Singh PK, Hollingsworth MA. Cancer metastasis facilitated by developmental pathways : Sonic hedgehog, Notch, and bone morphogenic proteins. *J Cell Biochem* 2007 ; 102 : 829-39.
- 11) Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, et al. An

- embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet* 2008 ; 40 : 499-507.
- 12) Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994 ; 266 : 2011-5.
- 13) Flores I, Cayuela ML, Blasco MA. Effects of telomerase and telomere length on epidermal stem cell behavior. *Science* 2005 ; 309 : 1253-6.
- 14) Sarin KY, Cheung P, Gilson D, et al. Conditional telomerase induction causes proliferation of hair follicle stem cells. *Nature* 2005 ; 436 : 1048-52.
- 15) Maida Y, Yasukawa M, Furuuchi M, et al. An RNA-dependent RNA polymerase formed by TERT and the RMRP RNA. *Nature* 2009 ; 461 : 230-5.
- 16) Artandi SE, Alson S, Tietze MK, et al. Constitutive telomerase expression promotes mammary carcinomas in aging mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 ; 99 : 8191-6.
- 17) Choi J, Southworth LK, Sarin KY, et al. TERT promotes epithelial proliferation through transcriptional control of a Myc- and Wnt-related developmental program. *PLoS Genet* 2008 ; 4 : e10.
- 18) Park JI, Venteicher AS, Hong JY, et al. Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. *Nature* 2009 ; 460 : 66-72.
- 19) Marian CO, Wright WE, Shay JW. The effects of telomerase inhibition on prostate tumor-initiating cells. *Int J Cancer* 2010 ; 127 : 321-31.
- 20) Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol* 2003 ; 15 : 740-6.
- 21) Naka K, Hoshii T, Muraguchi T, et al. TGF-beta-FOXO signalling maintains leukaemia-initiating cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature* 2010 ; 463 : 676-80.
- 22) Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008 ; 133 : 704-15.
- 23) Martin V, Xu J, Pabbisetty SK, et al. Tie2-mediated multidrug resistance in malignant gliomas is associated with upregulation of ABC transporters. *Oncogene* 2009 ; 28 : 2358-63.
- 24) Bao S, Wu Q, McLendon RE, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 2006 ; 444 : 756-60.

* * *

Prognostic impact of Ki-67 labeling indices with 3 different cutoff values, histological grade, and nuclear grade in hormone-receptor-positive, HER2-negative, node-negative invasive breast cancers

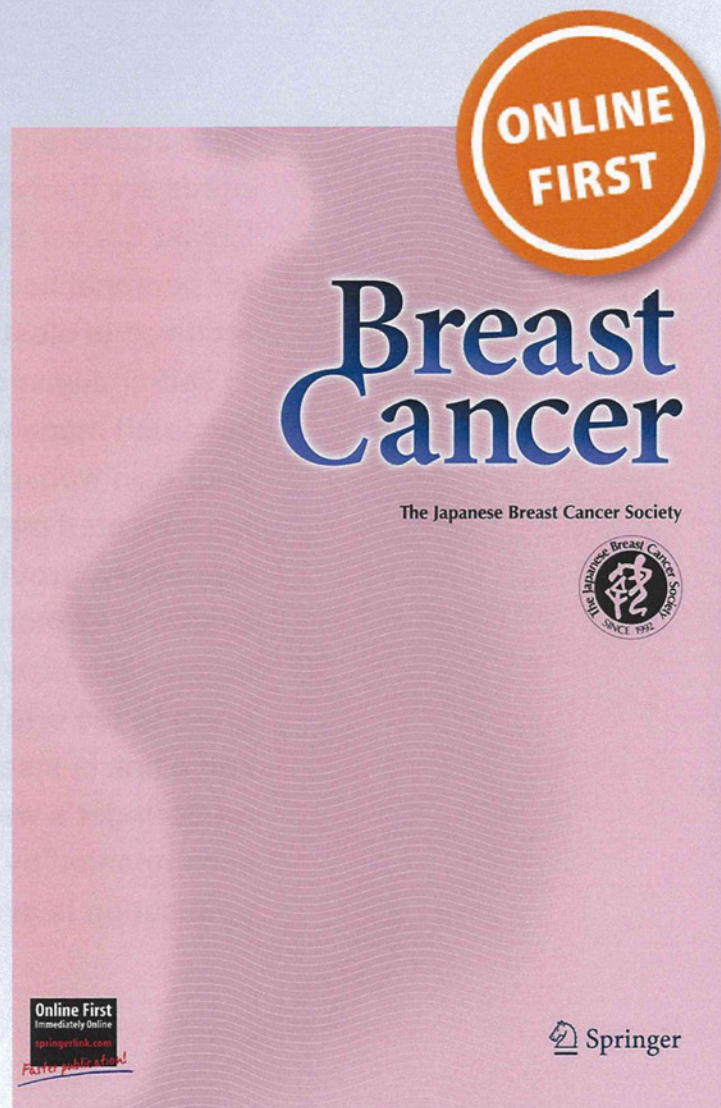
Makiko Ono, Hitoshi Tsuda, Mayu Yunokawa, Kan Yonemori, Chikako Shimizu, Kenji Tamura, et al.

Breast Cancer

ISSN 1340-6868

Breast Cancer

DOI 10.1007/s12282-013-0464-4



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by The Japanese Breast Cancer Society. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Prognostic impact of Ki-67 labeling indices with 3 different cutoff values, histological grade, and nuclear grade in hormone-receptor-positive, HER2-negative, node-negative invasive breast cancers

Makiko Ono · Hitoshi Tsuda · Mayu Yunokawa ·
Kan Yonemori · Chikako Shimizu · Kenji Tamura ·
Takayuki Kinoshita · Yasuhiro Fujiwara

Received: 17 January 2013 / Accepted: 18 March 2013
© The Japanese Breast Cancer Society 2013

Abstract

Background The criteria for classifying hormone receptor (HR)-positive/HER2-negative breast cancers into low-risk and high-risk subgroups remain undetermined. Supportive data for optimal criteria to identify tumors in the high-risk subgroup are necessary for Japanese patients with HR-positive/HER2-negative breast cancers.

Methods Using immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization, we identified 369 consecutive patients with HR-positive/HER2-negative, node-negative invasive breast cancers. We examined the prognostic impact of the Ki-67 labeling index (LI) based on 3 cutoff values, 10, 14, and 20 %, along with that of histological grade (HG) and nuclear grade (NG) by Cox's univariate and multivariate analyses.

Results The univariate analyses clearly showed that Ki-67 LI with any cutoff value divided the patients into distinct high-risk and low-risk groups, and that HG and NG were also powerful prognostic indicators. High Ki-67 LI with any cutoff value was strongly correlated with HG and NG, and when these parameters were included in the multivariate analyses, the impact of HG/NG was stronger than Ki-67 LIs. When the 10 % cutoff value was adopted, discordance between Ki-67 LI and grades was frequent in papillotubular-type invasive ductal carcinoma, predominantly intraductal carcinoma, and mucinous carcinoma.

Conclusions Any of the Ki-67 LI values, regardless of cutoff value, could be applicable for the classification of high-risk and low-risk HR-positive/HER2-negative, node-negative invasive breast cancers. Luminal A/B subtyping according to Ki-67 LI, or HG/NG, in combination with histological type, appeared to be able to create an optimum risk estimation system for patients with HR-positive/HER2-negative, node-negative invasive breast cancers in Japan.

M. Ono
Division of Molecular and Cellular Medicine, National Cancer Center Research Institute, Tokyo, Japan
e-mail: makono@ncc.go.jp

H. Tsuda (✉)
Department of Pathology and Clinical Laboratories, National Cancer Center Hospital, 5-1-1, Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan
e-mail: hstsuda@gmail.com; htsuda@ndmc.ac.jp

M. Yunokawa · K. Yonemori · C. Shimizu · K. Tamura ·
Y. Fujiwara
Department of Breast and Medical Oncology, National Cancer Center Hospital, Tokyo, Japan
e-mail: myunokaw@ncc.go.jp

K. Yonemori
e-mail: kyonemor@ncc.go.jp

C. Shimizu
e-mail: cshimizu@ncc.go.jp

K. Tamura
e-mail: ketamura@ncc.go.jp

Y. Fujiwara
e-mail: yfujiwar@ncc.go.jp

T. Kinoshita
Department of Breast Surgery, National Cancer Center Hospital, Tokyo, Japan
e-mail: takinosh@ncc.go.jp

Keywords Node-negative · Invasive breast cancer · Luminal subtype · Ki-67 · Histological/nuclear grade

Introduction

Breast cancer is the most common cancer in women. The mortality in Western countries is decreasing owing to early