

- ム、東京大学医科学研究所、2013年8月
- 17) 中野和民、安東友美、山岸誠、横山弘一、唐澤伸明、橋爪大明、高橋隆太郎、高橋碧、石田尚臣、大杉剛生、田中勇悦、David W. Brighty、渡邊俊樹、「ウィルス複製を有利にする HTLV-1 Rexの新たな機能の可能性と宿主細胞への影響」、第2回ATLシンポジウム、第6回HTLV-1研究会・シンポジウム、東京大学医科学研究所、2013年8月24日(2012年8月23日-8月25日) (シンポジウム発表)
- 18) 小林誠一郎、渡辺恵理、石垣知寛、中野和民、矢持忠徳、山岸誠、浅沼里実、大野伸広、湯地晃一郎、渡辺信和、東條有伸、渡邊俊樹、内丸薫、「HAS-Flow法を用いたHTLV-1キャリア／くすぶり型ATL境界の検討」、第6回HTLV-1研究会・シンポジウム、東京大学医科学研究所、2013年8月25日(2012年8月23日-8月25日) (口演発表)
- 19) 中川翔太、山岸誠、藤川大、中野和民、宇都宮與、内丸薫、渡邊俊樹、「成人T細胞白血病細胞におけるポリコムタンパク質の過剰発現機構の解析」、第6回HTLV-1研究会・シンポジウム、東京大学医科学研究所、2012年8月24日-8月25日(ポスター発表)
- 20) 酒井直規、山岸誠、藤川大、中野和民、宇都宮與、内丸薫、渡邊俊樹、「ATL細胞におけるp38シグナル伝達系の異常とNF-κB経路への影響」、第6回HTLV-1研究会・シンポジウム、東京大学医科学研究所、2012年8月24日-8月25日(ポスター発表)
- 21) 石垣知寛、小林誠一郎、渡辺恵理、佐藤奈津子、大野伸広、渡辺信和、内丸薫、東條有伸、中内啓光「ATLにおけるHAS-Flow法の臨床応用-12カラーの病態解析から4カラーの臨

床検査まで」、第23回日本サイトメトリー学会学術集会、東京、2013年6月

- 22) Ly BTK, Chi HT, Yamagishi M, Kano Y, Hara Y, Nakano K, Sato Y, Watanabe T, “Inhibition of FLT3 Expression by EGCG in FLT3 mutated-AML Cells”, 平成25年度東京大学医科学研究所研究成果発表会、東京大学医科学研究所、2013年5月30日-31日(ポスター発表)
- 23) Fujikawa D, Yamagishi M, Kurokawa N, Soejima A, Ishida T, Tanaka Y, Nakano K, Watanabe T, “HTLV-1 Tax disrupts the host epigenome by interacting with a Polycomb group protein EZH2”, 平成25年度東京大学医科学研究所研究成果発表会、東京大学医科学研究所、2013年5月30日-31日(ポスター発表) **ポスター賞**

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

産業財産権の名称: 患者検体を用いた HTLV-1 キャリア、成人 T 細胞白血病の発癌過程進行度又は悪性度の評価法

知財部管理番号: 25B132002-1

発明者: 渡辺信和、内丸薫、小林誠一郎

出願人: 国立大学法人 東京大学

出願番号: 特願 2013-034326

出願年月日: 2013年2月25日(国内出願)

2. 実用新案登録

なし

網羅的解析を基盤とした新規分子標的の探索

研究分担者 中内 啓光 東京大学大学院医学系研究科・教授

研究協力者 渡辺 信和 東京大学医科学研究所・
臨床FACSコアラボラトリー 特任准教授
石垣 知寛 東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センター・
クリニカルリサーチフェロー

研究要旨：

医学の進歩とともに血液腫瘍に対する化学療法は進歩してきた。しかし、血液腫瘍に対し化学療法を施行し、完全寛解に至った場合においても、その後再発する場面に直面することは決して少なくはない。血液腫瘍は均一な細胞集団と思われてきたが、現在では癌幹細胞 (Cancer Stem Cell、以下 CSC) を頂点としたヒエラルキーを持った heterogeneous な集団と考えられている。特に、成人 T 細胞白血病(ATL)は、抗癌剤治療に抵抗性の難治疾患であるが、治療抵抗性の原因の一つと疑われている CSC はいまだに同定できていない。また従来の研究では、CD4 陽性細胞全体の解析となっていることが多く、ATL 細胞に限定して詳しく細胞表面抗原を解析した研究はほとんどない。

本研究では、従来の CD4 ゲーティング法より詳細な、CD4+CD7N ゲーティング法や CD4+CADM1+ゲーティング法を用いて、ATL 細胞の細胞表面抗原を詳細に解析し、各分画の細胞増殖活性を評価することにより、治療抵抗性の原因の一つと疑われている CSC の同定や新たな診断法の確立を目指し、将来的には ATL に対するよりよい治療法の開発につなげることを目標としている。

A. 研究目的

ATL は、レトロウイルスであるヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) が原因となって発症する末梢性 T 細胞リンパ腫 (PTCL) である。PTCL は非ホジキンリンパ腫の中で予後不良の疾患であるが、急性型 ATL はその中で最も予後不良の疾患である。

急性型 ATL には mLSG15 療法等の複数の抗癌剤を組み合わせた多剤併用化学療法が行われる。しかし、多剤併用化学療法にて治療強度を増しているため、重症感染症や骨髄抑制をはじめとした副作用もより一層強く出現する。また、治療の奏効率も低く、早急な診断・革新的治療法の開発が急務である。抗 CCR4 抗体 (Mogamulizumab) に代表されるような、ATL 細胞で高率に発現しているような細胞表面抗原

に対する新たな分子標的療法の開発も必要であるが、さらには、癌幹細胞 (Cancer Stem Cell、以下 CSC) 特異的な細胞表面抗原に対する新たな分子標的療法の開発も期待される。

しかし、急性型 ATL の細胞表面抗原を詳細に解析した研究は極めて少なく、また、大部分の研究は CD4 陽性細胞を対象としており、健常な CD4 陽性細胞も評価対象に含まれ、ATL 腫瘍細胞に局限した研究ではない。

そのため、我々は、昨年度の研究において、急性型 ATL 患者の末梢血検体を用い、より細かなゲーティング (CD4+CD7N ゲーティング法) をした上で、より詳細に、ATL 細胞における細胞表面抗原の網羅的解析をおこなった。本年度は、その中から選び出された ATL 幹細胞抗原の候補の発現の有無で ATL 細胞を分離し、細

胞増殖活性を指標に、ATL 幹細胞の濃縮を試みた。

B. 研究方法

1) 患者検体の採取及び倫理面への配慮

東京大学医科学研究所附属病院ならびに研究協力病院の今村病院分院に入院し、下山分類により急性型 ATL と診断された患者より末梢血を採取（ヘパリン添加）した。

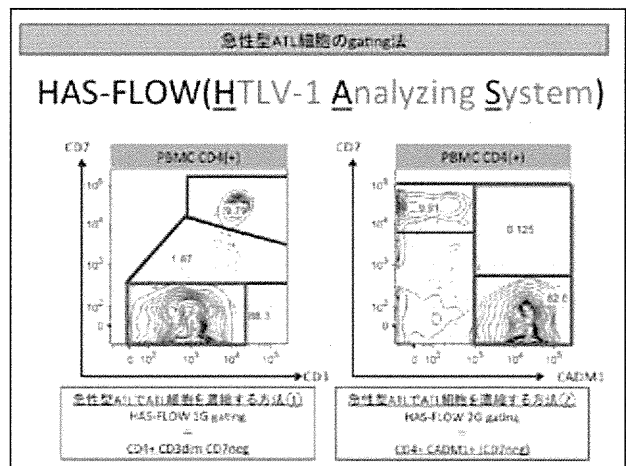
研究計画書は、臨床研究に関する倫理指針（平成 20 年厚生労働省告示第 415 号）、および東京大学医科学研究所で定めた倫理規定を遵守して作成し、研究開始前に、本研究所・倫理審査委員会に提出し、承認を得た。研究協力病院においても、研究開始前に倫理審査委員会に提出し、承認を得た。

患者に研究内容、採血以上の危険はないこと、ならびに個人情報保護されることを文書で説明し、同意（インフォームド・コンセント）を得た後、採血した。

2) ATL 腫瘍細胞に局限して解析する方法

ATL における CSC が未だに同定できない理由の一つは、大部分の研究が依然として CD4 陽性分画を対象としていることにあると考えられる。CD4 陽性分画には ATL 腫瘍細胞以外にも正常なリンパ球も含まれているため、ATL 細胞を詳細に解析するためにはより正確に ATL 細胞を同定する必要がある。我々は、東京大学医科学研究所附属病院 血液腫瘍内科と共同研究のもとさらに研究を進めた。ATL 細胞はその全てが CADM1 を細胞表面抗原に発現していることが分かり、当研究室で新規に蛍光色素あるいはビオチン標識した抗 CADM1 抗体を作製し、マルチカラーフローサイトメトリーに用いることにより、より高度に CD4 陽性分画の中の ATL 腫瘍細胞を濃縮することが可能となった。TCR Vβ レパトアや inverse PCR 等を用いたクローナリティー解析や HTLV-1 プロウイルス量の測定から、急性型 ATL において HTLV-1 感染細胞や ATL 腫瘍細胞は CD4+CADM1+ の分画に高度に濃縮されることを見つけ、報告した（論文投稿中）。昨年度の研究では CD4+CD7N(HAS-FLOW 1G ゲーティング)を用いたが、本年度の研究ではより高精度な CD4+CADM1+ゲーティング(HAS-FLOW 2G ゲ

ーティング)を用いることとした（図 1）。
<図 1>



3) フローサイトメーターによる ATL 細胞における細胞表面抗原の解析と細胞分離

患者検体から、比重遠心法（Ficoll-Paque 法）を用いて単核細胞分画を分離した。Ice-cold PBS で細胞を洗浄後、抗ヒト CD3 抗体、抗ヒト CD4 抗体、抗ヒト CD7 抗体、抗ヒト CD14 抗体、抗ヒト CADM1 抗体(ビオチン標識)を用いて染色した。ビオチン標識の抗ヒト CADM1 抗体は当研究室にて用意した。これらの他に、昨年度の細胞表面抗原解析で抽出したマーカーを各々加えて染色した。4℃にて 20 分インキュベート後、Ice-cold PBS にて細胞を 1 回洗浄し、ストレプトアビジン-APC で 2 次染色し、Ice-cold PBS にて細胞を 1 回染色した。propidium iodide(PI)を添加した PBS に細胞を懸濁し、マルチカラーフローサイトメトリー FACS Aria² SORP(Beckton Dickinson 社)にて測定し、解析用ソフトウェア FlowJo(Tree Star 社)を用いて解析した。各評価抗原に対しては、適切なアイソタイプコントロールを別途用意し、陰性コントロールとした。死細胞、doublet、単球を厳密に取り除いた上で、ATL 細胞(CD4+CADM1+細胞)を取り出し、ATL 細胞が各マーカーの陽性分画と陰性分画に分かれる場合、各分画を FACS SORTING にて抽出した。

4) ATL 腫瘍細胞の細胞増殖活性を評価する方法

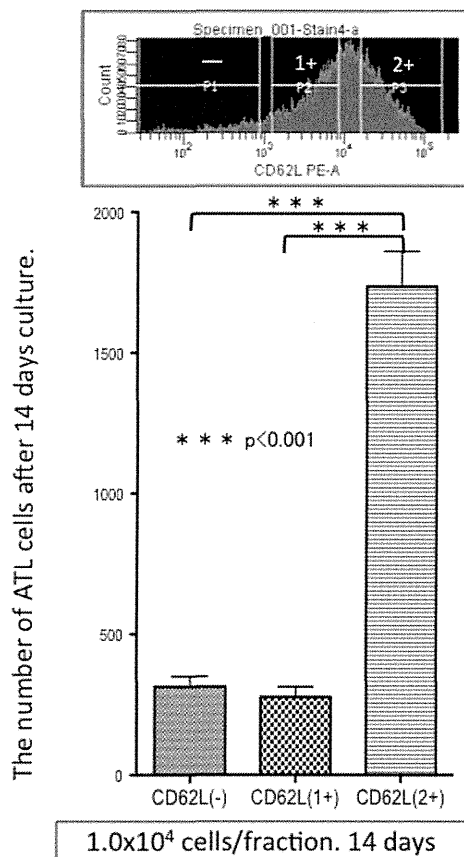
急性型 ATL 由来の腫瘍細胞は液体培養下では増殖できないが、MS-5（マウス骨髄間葉系細胞）との共培養において大部分の細胞が死滅するものの、一部の細胞が Cobble Stone（敷石）

様の形態をとりながら増殖する (Int J Hematol,2008;88:551-564)。その増殖する細胞が、ATL 癌幹細胞 (以下 ATL CSC)、あるいはそれに近い性質を持った細胞と考えている。ATL 腫瘍細胞を、マルチカラーフローサイトメトリーを用いて細胞表面抗原の発現レベルの違いにより分離・ソーティングして、MS-5 との共培養を行うことにより、ATL CSC が高度に濃縮される分画の同定を進めた。

C. 研究結果

昨年度の研究にてリストアップした 37 抗原 (平成 24 年度報告書/研究結果/グループ□-□) を、急性型 ATL の末梢血にて評価した。大部分の細胞表面抗原は、陽性分画も陰性分画も細胞増殖活性に有意差を生じなかった。一部の細胞表面抗原においては、その発現レベルにて ATL 細胞(CD4+CADM1+細胞)の細胞増殖活性に有意差を認めた。その中で、複数症例において再現性が確認されたのは CD62L であった。代表例を図 2 に示す。

<図 2>



CD62L 陽性と陰性分画に大きく分かれる症例では、CD62L 陽性分画の細胞増殖活性が高かった。また、ATL 細胞の大部分が CD62L を発現している症例もあったが、そのような症例では CD62L 強陽性分画が特に MS-5 上での増殖が高かった。CD62L 強陽性分画に ATL 幹細胞が高度に濃縮される可能性が示唆された。

また、共培養系において CD62L が細胞接着に有利に機能している可能性を考慮し、患者由来のプライマリーATL 細胞と MS5 との共培養に、細胞表面の CD62L をブロックすることが知られている抗 CD62L 抗体 (DREG-56 monoclonal antibody)を加え、CD62L を阻害したが ATL 細胞の増殖は抑制/阻害されなかった。

さらに、免疫不全マウスへの移植モデルを用いて、CD4+CADM1+CD62L 強陽性分画の IN VIVO における細胞増殖活性を、他の CD4+CADM1+分画と比較する形で評価をこころみていたが、患者検体のため採血量が限られ、移植細胞数が少なく、有意差を認めなかった (2014 年 1 月 / 当報告書作成時点)。

D. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohno N, Kobayashi S, Ishigaki T, Yuji K, Kobayashi M, Sato K, Watanabe N, Tojo A, Uchimaru K, Loss of CCR4 antigen expression after mogamulizumab therapy in a case of adult T-cell leukaemia-lymphoma. **British J. Hematol.** 163(5):683-5, 2013.
- 2) Kobayashi S, Tian Y, Ohno N, Yuji K, Ishigaki T, Isobe M, Tsuda M, Oyaizu N, Watanabe E, Watanabe N, Tani K, Tojo A, Uchimaru K. The CD3 versus CD7 Plot in Multicolor Flow Cytometry Reflects Progression of Disease Stage in Patients Infected with HTLV-I. **PLoS One.** 8(1):e53728, 2013
- 3) Ishigaki T, Isobe M, Kobayashi S, Yuji K, Ohno N, Watanabe N, Tojo A, Uchimaru K. Development of peripheral T-cell lymphoma not otherwise specified in an HTLV-1 carrier. **Int. J. Hematol.** 97(5): 667-672, 2013.

2. 学会発表

(国内学会)

- 1) 石垣知寛、小林誠一郎、大野伸広、中野伸亮、宇都宮興、渡辺信和、内丸薫、東條有伸、中内啓光、“Comprehensive analysis of surface antigens on ATL cells and search for ATL-initiating cell markers”、第75回日本血液学会学術集会、北海道、2013年10月13日
- 2) 石垣知寛、小林誠一郎、大野伸広、内丸薫、東條有伸、中内啓光、渡辺信和、“フローサイトメトリーを用いた成人 T 細胞白血病(ATL)の新規臨床検査法 HAS-Flow の確立”、第60回日本臨床検査医学会学術集会、神戸、2013年11月3日
- 3) 石垣知寛、小林誠一郎、渡辺恵理、佐藤奈津子、大野伸広、渡辺信和、内丸薫、東條有伸、中内啓光、“ATL における HAS-Flow 法の臨床応用～12 カラーの病態解析から 4 カラーの臨床検査まで～”、第23回日本サイトメトリー学会学術集会、東京、2013年6月22日、口演
- 4) 石垣知寛、小林誠一郎、渡辺恵理、中野和民、佐藤奈津子、大野伸広、渡辺信和、内丸薫、渡邊俊樹、東條有伸、中内啓光、“Establishment of a novel flow cytometric

method for evaluation of adult T-cell leukemia.”、第13回東京大学生命科学シンポジウム、東京、2013年6月8日、ポスター

- 5) 石垣知寛、小林誠一郎、渡辺恵理、佐藤奈津子、在家裕司、大野伸広、東條有伸、中内啓光、内丸薫、渡辺信和、“HAS-Flow 法で広がる ATL におけるフローサイトメトリーの臨床応用”、第1回病態解析研究会、東京、2013年3月15日、口演

E. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

産業財産権の名称:患者検体を用いた HTLV-1 キャリア、成人 T 細胞白血病の発癌過程進行度又は悪性度の評価法

知財部管理番号:25B132002-1

発明者:渡辺信和、内丸薫、小林誠一郎

出願人:国立大学法人 東京大学

出願番号:特願 2013-034326

出願年月日:2013年2月25日(国内出願)

2. 実用新案登録

特になし

網羅的解析を基盤とした新規分子標的の探索

研究分担者 小川 誠司 京都大学 腫瘍生物学・教授

研究要旨：

ATLはレトロウイルスであるHTLV-1に感染した不死化T細胞が数十年という長い潜伏期間の後に発症する多段階発癌のモデルが示唆されているが、その遺伝子異常はほとんど明らかとなっていない。本分担研究においては、高速シーケンス技術を用いた全エクソン解析による網羅的な遺伝子変異解析により ATL 腫瘍化に関与する多岐にわたるゲノム異常を同定した。最も特筆すべきは、近年他の末梢性 T 細胞性腫瘍でトピックになっている RHOA 変異が含まれていたことである。RHOA は RAS などの低分子量 G 蛋白質の一種であり、AITL においてそのほとんどは G17 が V に変わる変異であったのと比較し、ATL で認められた RHOA 変異は G17V が少数で、GTP 結合ポケット全域にわたって広く変異が分布し、C16R 変異が最多であった。AITL で認められる G17V は dominant negative に働くことが示されているが、興味深いことに C16R では細胞の形態変化やアクチン染色の結果から G17V と異なる振る舞いをする可能性が示されている。すなわち同じ末梢性 T 細胞型リンパ腫という分類内に生ずる RHOA の変異は、病型によって変異の分布が大きく異なるもののいずれも GTP 結合領域に集中することが示された。今後、ATL における RHOA 変異の GTP/GDP 結合に関わる詳細な機能解析や表面抗原による腫瘍化した T 細胞の起源の決定により、腫瘍化に関わるメカニズムを解明する予定である。

A. 研究目的

成人 T 細胞白血病(ATL)は HTLV-1 のキャリアに発症する末梢性 T 細胞腫瘍である。有効な治療法や発症予防法は現時点で知られておらず予後は極めて不良である。日本では推定 120 万人のキャリアから今後 5-10 万人の ATL 新規発症が予測されており、本疾患に対する画期的な治療法及び発症予防技術の開発を行うことは極めて重要かつ緊急の課題である。

本分担研究は、ATL の早期診断・画期的根治療法開発のための基盤構築に向けて、ATL 患者中の腫瘍細胞及びがん幹細胞特性を有する細胞群について、高速シーケンス技術を用いたゲノム解析を行い、特性を明らかにすることで新規分子標的となり得る分子を同定することを目的とする。

B. 研究方法

本分担研究では、ATL 患者中の腫瘍細胞やがん幹細胞の特性をゲノムの視点から明らかにするために、マイクロアレイ技術・高速シーケンス技術を用いたゲノム異常の解析を行う。(1)腫瘍特異的な変異を同定するためには患者固有の多型を除外する必要があるため、ATL 患者 3 例について腫瘍検体と同一患者からの正常検体を Agilent 社の Sureselect を用いて全エクソン領域を濃縮し、次世代シーケンサー HiSeq (Illumina 社) を用いて網羅的な遺伝子変異解析を行った。(2)全エクソン解析より得られた複数の遺伝子異常の中から、すでに末梢性 T 細胞性腫瘍で高頻度に変異が認められる 5 つの遺伝子 (RHOA, TET2, DNMT3A, IDH1/2) に着目し、205 症例の異なるコホートにおいて標的ディープシーケンシング法を用いて高感度に変異解析を行った。(3)同定された RHOA 変異に着目し、変異体が入ったベクターを構築し、3T3

などの細胞株への導入実験を行った。

(倫理面への配慮)

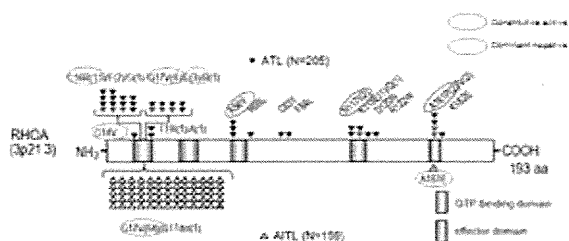
本研究は京都大学の京都大学医の倫理委員会で承認を得ている(承認番号:第G608号)。本分担研究で用いた検体はインフォームドコンセントを得た後に連結可能匿名化を施して検討に用いた。

C. 研究結果

(1) 急性型、リンパ腫型、慢性型それぞれ1例ずつ計3症例について解析を行った。腫瘍側、正常側それぞれ平均して115回、104回の読み取り深度であり、解析の感度は十分と考えられた。ペアの正常検体と比較することで最終的に検証された329個の腫瘍特異的な変異が同定された。

非常に興味深いことに他の末梢性Tリンパ系腫瘍で高頻度に変異しているRHOAの体細胞性変異が複数症例で同定された。

(2) 標的遺伝子の全コーディング領域をPCR増幅し次世代シーケンサーで解析したところ平均の読み取り深度は18,346回であった。全205症例で変異解析したところ、RHOAは42個、38症例(18.5%)に変異が認められた。AITLにおいてそのほとんどはG17がVに変わる変異であったのと比較し、ATLでの変異の分布は非常に特徴的であり、複数のGTP結合部位にわたっていた。AITLで認められるG17Vの変異は稀であり、C16Rが最多であった。



(3) DOX誘導系の3T3細胞において、G17V、G17E、A161Eは既知のDominantNegativeであるT19Nと同様の細胞形態(細胞が小さく丸くな

る)であり、アクチン染色ではアクチンファイバーの形成が阻害されており、RhotekinアッセイでもGTPの結合が低下していることから、AITLで高頻度のG17V同様、G17EやA161Eはdominant negativeに働くことが示された。一方、ATLで特に高頻度であったC16RやN117I、A161Pは、野生型と同様の細胞形態であり、アクチン染色ではアクチンファイバーの形成は阻害されず、RhotekinアッセイでもGTPの結合低下は認められなかった。すなわちこれらの変異はdominantnegativeとは異なるメカニズムで腫瘍化に関わっていることが示唆された。

D. 考察

ATLにおいてはRHOA変異が約20%に認められたが、AITLで顕著なG17Vは4例(1.9%)と稀であり、C16Rが最も高頻度であった。(11例;5.4%)

他の変異もGTP結合部位に分布しており、これらの結果からRHOA変異はATLの腫瘍化に直接関わっているが、AITLやPTCL-NOSといった他のT細胞性腫瘍とは異なるメカニズムが示唆された。G17V変異例とそれ以外の変異例で病型、予後などの臨床情報との相関について解析を行ったが有意な差は認められなかった。AITL/PTCL-NOSではRHOA変異はTET2変異と共存する相関が認められ、ATLではTET2変異が約10%存在していたもののRHOA変異との相関は認められなかった。

E. 結論

ATL含めた末梢T細胞性腫瘍の病態においてRHOA変異は非常にユニークな役割を担っていることを同定した。ATLにおいても他のT細胞性腫瘍のように高頻度にRHOA変異が認められるが、その分布や機能はAITLで特徴的なG17Vとは異なることが示唆された。今後は正常リンパ球や腫瘍化したT細胞におけるRHOAの正確な役割を解析することで、腫瘍化にどのように関わるのか解明することが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakata-Yanagimoto M, Enami T, Yoshida K, Shiraishi Y, Ishii R, Miyake Y, Muto H, Tsuyama N, Sato-Otsubo A, Okuno Y, Sakata S, Kamada Y, Nakamoto-Matsubara R, Tran NB, Izutsu K, Sato Y, Ohta Y, Furuta J, Shimizu S, Komeno T, Sato Y, Ito T, Noguchi M, Noguchi E, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Suzukawa K, Nanmoku T, Hasegawa Y, Nureki O, Miyano S, Nakamura N, Takeuchi K, Ogawa S, Chiba S. Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma. **Nat Genet**. 2014 Feb;46(2):171-5.
- 2) Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, Okuno Y, Bacher U, Nagae G, Schnittger S, Sanada M, Kon A, Alpermann T, Yoshida K, Roller A, Nadarajah N, Shiraishi Y, Shiozawa Y, Chiba K, Tanaka H, Koeffler HP, Klein HU, Dugas M, Aburatani H, Kohlmann A, Miyano S, Haferlach C, Kern W, Ogawa S. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. **Leukemia** 28(2): 241-247, 2014
- 3) Yoshida K, Toki T, Okuno Y, Kanezaki R, Shiraishi Y, Sato-Otsubo A, Sanada M, Park MJ, Terui K, Suzuki H, Kon A, Nagata Y, Sato Y, Wang R, Shiba N, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Muramatsu H, Hasegawa D, Nakamura K, Kanegane H, Tsukamoto K, Adachi S, Kawakami K, Kato K, Nishimura R, Izraeli S, Hayashi Y, Miyano S, Kojima S, Ito E, Ogawa S. The landscape of somatic mutations in Down syndrome-related myeloid disorders. **Nat Genet**. 2013 Nov;45(11):1293-9.
- 4) Kon A, Shih LY, Minamino M, Sanada M, Shiraishi Y, Nagata Y, Yoshida K, Okuno Y, Bando M, Nakato R, Ishikawa S, Sato-Otsubo A, Nagae G, Nishimoto A, Haferlach C, Nowak D, Sato Y, Alpermann T, Nagasaki M, Shimamura T, Tanaka H, Chiba K, Yamamoto R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Nakamaki T, Ishiyama K, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Chiba S, Mori H, Nakauchi H, Koeffler HP, Aburatani H, Haferlach T, Shirahige K, Miyano S, Ogawa S. Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. **Nat Genet** 45(10): 1232-1237, 2013
- 5) Asanuma S, Yamagishi M, Kawanami K, Nakano K, Sato-Otsubo A, Muto S, Sanada M, Yamochi T, Kobayashi S, Utsunomiya A, Iwanaga M, Yamaguchi K, Uchimaru K, Ogawa S, Watanabe T. Adult T-cell leukemia cells are characterized by abnormalities of Helios expression that promote T cell growth. **Cancer Sci**. 2013 Aug;104(8)
- 6) Sato Y, Yoshizato T, Shiraishi Y, Maekawa S, Okuno Y, Kamura T, Shimamura T, Sato-Otsubo A, Nagae G, Suzuki H, Nagata Y, Yoshida K, Kon A, Suzuki Y, Chiba K, Tanaka H, Niida A, Fujimoto A, Tsunoda T, Morikawa T, Maeda D, Kume H, Sugano S, Fukayama M, Aburatani H, Sanada M, Miyano S, Homma Y, Ogawa S. Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. **Nat Genet** 45(8): 860-867, 2013
- 7) Makishima H, Yoshida K, Nguyen N, Przychodzen B, Sanada M, Okuno Y, Ng KP, Gudmundsson KO, Vishwakarma BA, Jerez A, Gomez-Segui I, Takahashi M, Shiraishi Y, Nagata Y, Guinta K, Mori H, Sekeres MA, Chiba K, Tanaka H, Muramatsu H, Sakaguchi H, Paquette RL, McDevitt MA, Kojima S, Sauntharajah Y, Miyano S, Shih LY, Du Y, Ogawa S, Maciejewski JP. Somatic SETBP1 mutations in myeloid malignancies. **Nat Genet**. 45(8): 942-946, 2013
- 8) Shiraishi Y, Sato Y, Chiba K, Okuno Y, Nagata Y, Yoshida K, Shiba N, Hayashi Y, Kume H, Homma Y, Sanada M, Ogawa S, Miyano S. An empirical Bayesian framework for somatic mutation detection from cancer genome sequencing data. **Nucleic Acids Res**. 2013

Apr;41(7):e89.

2. 学会発表
(国際学会)

- 1) Nagata Y, Sato A, Kon A, Okuno Y, Chiba K, Tanaka H, Shiraishi Y, Yoshida K, Sanada M, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Oshima K, Miyawaki S, Kitanaka A, Miyano S, Watanabe T, Ogawa S, "Whole exome analysis reveals spectrum of gene mutations in adult T-cell leukemia/lymphoma" 2013 AACR Annual Meeting, Washington, DC, 2013.4.8
- 2) Nagata Y, Sato A, Kon A, Okuno Y, Chiba K, Tanaka H, Shiraishi Y, Yoshida K, Sanada M, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Oshima K, Miyawaki S, Kitanaka A, Miyano S, Watanabe T, Ogawa S, "WHOLE EXOME ANALYSIS REVEALS MUTATIONS OF TET2 IN ADULT T-CELL LEUKEMIA/LYMPHOMA", The 18th Congress of the European

Hematology Association, Stockholm, 2013.6.14

(国内学会)

- 1) Yasunobu Nagata, Akira Kitanaka, Masashi Sanada, Aiko Sato-Otsu, Yusuke Okuno, Yuichi Shiraishi, Kenichi Chiba, Hiroko Tanaka, Ayana Kon, Kenichi Yoshida, Ken Ishiyama, Shuichi Miyawaki, Satoru Miyano, Toshiki Watanabe, Kazuya Shimoda, Seishi Ogawa "Genetic basis of adult T-cell leukemia/lymphoma", 第72回日本癌学会学術集会、パシフィコ横浜、2013年10月3日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

III. 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
渡邊俊樹 (分担執筆)	IV.リンパ球系 3. 成人T細胞白血病/リンパ腫におけるNF-κB経路の活性化	高久史磨、小澤敬也、坂田洋一、金倉 讓、小島勢二	Annual Review 2014 血液	中外医学社	東京	2014	147-152

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
Sakata-Yanagimoto M, Enami T, Yoshida K, Shiraishi Y, Ogawa S(36人中35番目), Chiba S, et al.	Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma.	<i>Nat Genet</i>	46(2)	171-5	2014
Kiyoshi M, Caaveiro JM, Miura E, Nagatoishi S, Nakakido M, Soga S, Shirai H, Kawabata S, Tsumoto K	Affinity improvement of a therapeutic antibody by structure-based computational design: generation of electrostatic interactions in the transition state stabilizes the antibody-antigen complex	<i>PLoS One</i>	9	e87099	2014
渡邊俊樹	特集：ATL/HTLV-1研究の最近の進展「miRNAを用いた成人T細胞白血病(ATL)がん幹細胞を標的とした新規治療法開発研究の現状」	血液内科	68 (1)	65-70	2014
山岸 誠、渡邊俊樹	特集：血液疾患におけるエピゲノム異常と治療「ATL発症におけるエピゲノム解析の進歩」	血液内科	66(3)	308-315	2013
Ohno N, Kobayashi S, Ishigaki T, Yuji K, Kobayashi M, Sato K, Watanabe N, Tojo A, Uchimaru K	Loss of CCR4 antigen expression after mogamulizumab therapy in a case of adult T-cell leukaemia-lymphoma.	<i>Br J Haematol</i>	163(5)	683-685	2013
Asanuma S, Yamagishi M(15人中2番目), Yamochi T(15人中8番目), Uchimaru K(15人中13番目), Ogawa S(15人中14番目), Watanabe T(15人中15番目), et al.	Adult T-cell leukemia cells are characterized by abnormalities of Helios expression that promotes T-cell growth	<i>Cancer Sci</i>	104(8)	1097-1106	2013

Ito T, <u>Tsumoto K</u>	Effects of subclass change on the structural stability of chimeric, humanized, and human antibodies under thermal stress	<i>Protein Sci</i>	22	1542-1551	2013
Tokunaga M, Mizukami M, Yamasaki K, <u>Tsumoto K</u> (10人中9番目), Arakawa T, et al.	Secretory production of single-chain antibody (scFv) in <i>Brevibacillus choshinensis</i> using novel fusion partner	<i>Appl Microbiol Biotechnol</i>	97	8569-8580	2013
Yoshida K, Toki T, Okuno Y, Kanezaki R, Shiraishi Y, Sato-Otsubo A, <u>Ogawa S</u> (33人中33番目), et al.	The landscape of somatic mutations in Down syndrome-related myeloid disorders.	<i>Nat Genet</i>	45(11)	1293-1299	2013
Makishima H, Yoshida K, Nguyen N, <u>Ogawa S</u> . (31人中30番目) Maciejewski JP, et al.	Somatic SETBP1 mutations in myeloid malignancies.	<i>Nat Genet</i>	45(8)	942-946	2013
Kon A, Shih LY, Minamino M, Sanada M, Shiraishi Y, Nagata Y, Yoshida K, Okuno Y, <u>Ogawa S</u> (41人中41番目), et al.	Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms.	<i>Nat Genet</i>	45(10)	1232 - 1237	2013

IV. 研究成果の刊行物・別刷

3. 成人 T 細胞白血病/リンパ腫における NF- κ B 経路の活性化

東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻病態医療科学分野教授 渡邊俊樹

key words microRNA, miR-31, polycomb, NF- κ B, epigenetics

動 向

ATL細胞における恒常的NF- κ B活性化は、1999年に最初にMoriらによって報告された。当初は、HTLV-1TaxのI κ B kinase (IKK) 活性化作用との関係が議論されたが、新鮮ATL細胞ではTaxが存在しないことが確認され、Tax非存在下でのNF- κ Bの強力な活性化が存在するという事実を元に、この活性化はATL細胞での分子異常を背景としたものであるとの共通の認識が得られた。しかし、ATL細胞を直接解析する必要等から、活性化の分子機構の理解には10年以上の時間を要した。2000年代には、NF- κ Bの活性化経路の詳細な解析、有効な薬剤の探索、実験動物系の確立による評価等が進められてきた。I κ B kinase (IKK) 阻害剤であるBay 11-17802やp65の核内移行を阻害するDHMEQによるATL細胞のNF- κ B活性抑制は、アポトーシスを誘導することが示された。多くのがんや血液系腫瘍ではNF- κ Bの活性化機構と考えられるゲノム変異が報告されたが、ATL細胞では不明である。一方、NIKの過剰発現の存在が恒常的なNF- κ B活性化のメカニズムと考えられた。しかし、NIK過剰発現機構は不明であった。筆者らは、2012年のCancer Cellにおいて、エピジェネティック制御異常を介したmiR-31発現低下(欠損)が、その

標的分子であるNIKの過剰発現をもたらす、ATL細胞における恒常的なNF- κ B活性化をもたらすという知見を報告した。miR-31の発現欠損は、ゲノムの欠損によると思われるものは10%程度であり、大多数の例では、ポリコームによるmiR-31遺伝子領域のヒストンH3K27トリメチル化を介して発現抑制されていることを示した。NF- κ B阻害剤はI κ B kinase (IKK) 阻害剤を中心に開発が進められてきたが、未だにkinase阻害剤では有望な薬物が報告されていない。著者らがその有効性を報告したDHMEQが、臨床応用されることを期待したい。一方、著者らの知見に基づく、ATL細胞へのmiR-31の導入によるNF- κ B阻害は新たな治療法として期待されるが、DDSの検討が課題である。

はじめに

成人T細胞白血病(ATL)はHTLV-1感染Tリンパ球の腫瘍化によって発症する予後不良の白血病・リンパ腫である。感染後50~60年の臨床的潜伏期間中にHTLV-1感染T細胞に複数の遺伝子異常が蓄積して発症する多段階発がんを示す(図1)¹⁾。

感染細胞の腫瘍化において、ウイルス遺伝子の作用は多くの例で腫瘍化のイニシエーターとして機能していると考えられる。このような観点から

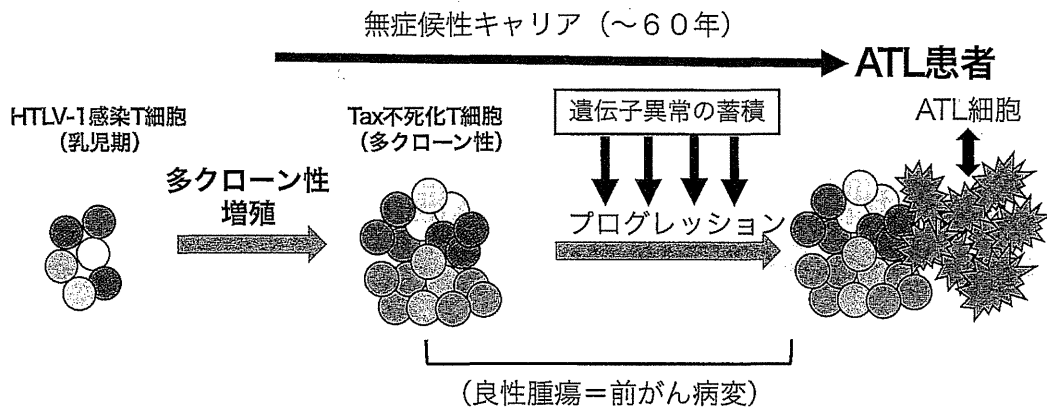


図1 HTLV-1感染細胞からATL細胞へ

HTLV-1感染初期にはウイルス遺伝子による宿主細胞への作用により細胞増殖が起こり、個々の感染細胞の数が増えてそれぞれクローンを形成する（多クローン性増殖）。数十年に及ぶキャリア状態は、大腸がんにおけるポリポージスの状態に似た前がん状態と考えられる。細胞への遺伝子異常の蓄積により、増殖能を獲得したクローンが拡大し、オリゴクローナルな状態を示すことがある。これらの変異の蓄積の結果、最終的に腫瘍化した細胞の増殖によってATLが発症する。

ATL細胞の分子病態を考えることは、感染後期に起こる腫瘍細胞の形成、維持、悪性化、薬剤耐性などの分子メカニズムを理解しようという試みであるが、残念ながらこのような研究は未だ発展途上であるといわざるを得ない。腫瘍化に関わる分子イベントの実態は、このように今後の解明に待たねばならないが、腫瘍化したATL細胞における分子異常に関しては多数の詳細な解析が蓄積されている。本稿においては、ATL細胞の増殖、細胞死抵抗性、および薬剤抵抗性に深く係わると考えられるNF- κ Bの恒常的な活性化について、その分子機構に関するこれまでの知見をまとめ、治療標的あるいは発症予防法開発の標的とした取り組みをまとめることにする。

A. NF- κ B活性化とリンパ系腫瘍

NF- κ B経路の概略を図2に示す。現在、classical pathwayとalternative pathwayの2つの活性化経路があり、それぞれ異なった受容体等から活性化シグナルが伝えられると考えられている。前者は、炎症性サイトカイン、抗原、細菌壁や

genotoxic stressなどであり、後者は一部のTNFレセプターファミリーによって活性化される。それぞれのシグナル伝達経路の概略は図にある通りであるが、要約すると、classical pathwayでは、p50/p65 (RelA) ヘテロダイマーの核内移行は、I κ B kinase (IKK) β およびNEMOに依存したI κ Bのリン酸化とそれに引き続くユビキチン化依存的な分解によって引き起こされる。一方、alternative pathwayでは、p52/RelB ヘテロダイマーの核内移行はI κ B kinase (IKK) β およびNEMOに依存しないp100のC末端側のリン酸化とそれに引き続くユビキチン化依存的な分解による。この系におけるtumor necrosis factor receptor superfamily associated factor (TRAF) 蛋白質ファミリーの機能に関してはまだ議論がある。発がんやがん細胞のプログレーションにおけるalternative pathwayの機能的役割は明確ではないが、リンパ系組織の器官発生には深く係わっていることが知られており、獲得免疫においては必須の経路である²⁾。

NF- κ B活性化とリンパ系腫瘍の知見を整理すると、ホジキンリンパ腫、ABC-DLBCLおよび

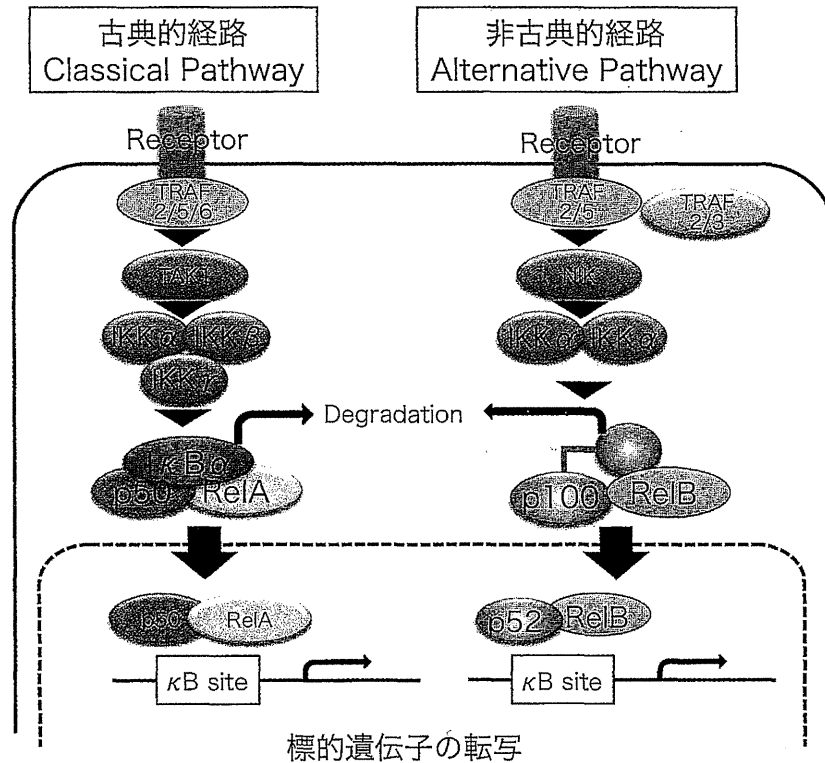


図2 NF- κ Bの2つの活性化経路
それぞれの経路を模式的に示した。詳細は別の総説を参照。

primary mediastinal B-cell lymphoma (PMBL) -DLBCL, MALTリンパ腫でNF- κ Bの活性化が認められる。多くの場合、膜レセプターからのシグナル伝達に関与する分子の遺伝子変異が原因とされており、詳細な解析がなされているが、これらのまとめは他の総説を参照願いたい³⁾。ホジキンリンパ腫に関しては、筆者らが遺伝子変異ではなく、CD30の過剰発現そのものがリガンド非依存的なシグナルを活性化していることを示している^{4,5)}。

B. ATL細胞におけるNF- κ B活性化

primaryのATL細胞におけるNF- κ Bシグナルの活性化は1999年に最初に報告された⁶⁾。この報告では、HTLV-1で不死化した細胞株および患者由来のATL細胞で、HTLV-1 Taxの発現の有無にかかわらず、全例で活性が認められることが示

された。EMSAによる解析では核内のDNA結合活性はp50とp65によるものと報告された。

HTLV-1の制御蛋白質Taxは、IKK γ (NEMO)との結合を介して強力なNF- κ B活性化作用を示す。このことから、ATL細胞におけるNF- κ B活性化もTaxの発現に依存するのではないかとの議論があったが、最終的に腫瘍化したATL細胞ではTaxが存在しない考えられる。実際、山岡らのグループはATL細胞ではTaxに依存しないIKKの活性化を報告した⁷⁾。その後、筆者らは、2005年に、個体内のATL細胞および非腫瘍化HTLV-1感染細胞におけるNF- κ Bの活性化の評価と新規NF- κ B阻害剤DHMEQの作用を解析した⁸⁾。この論文では、DHMEQがATL細胞に対してアポトーシスによる細胞死を誘導すること、および、個体内の非腫瘍化HTLV-1感染細胞でもNF- κ Bの活性化が認められ、DHMEQはこれらに対して選択的に細胞障害性を示すことを明

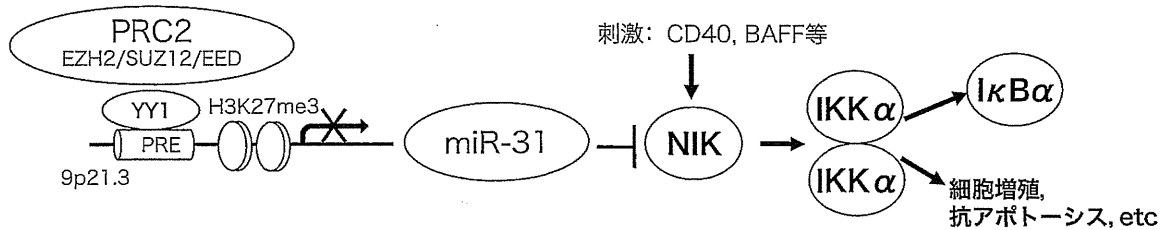


図3 ATL細胞における polycomb-miR-31-NF- κ B のリンケージ

我々が明らかにした，ポリコム-miR31-NF- κ B の関係を模式的に示す．ATL細胞におけるNF- κ B恒常的活性化の有力な基盤であると考えられる．

らかにした．さらに，EMSAによる解析で，ATL細胞における活性化NF- κ Bはp50/p65およびp52/RelBからなることを明らかにした．つまり，ATL細胞では，classical pathwayとalternative pathwayの双方の経路が活性化していることを示した．その後，山岡らのグループはATL細胞においてはNIKが過剰発現しており，その結果NIKが活性化しNF- κ B経路を活性化していることを示した⁹⁾．

次の疑問は，ATL細胞におけるNIKの過剰発現の分子機構である．2012年に筆者らは遺伝子発現の大規模解析の結果を基に，ATL細胞に特徴的なシグナル伝達系の異常の背景にはエピジェネティックな異常の蓄積があることを明らかにした．具体的には，ATL細胞におけるmiRNA発現解析から，miR-31が全例において発現抑制（ほとんど欠損）していること，miR-31の標的遺伝子の一つがNIKであることを明らかにし，miR-31発現低下⇒NIK過剰発現⇒NF- κ B経路活性化という関係を初めて見いだした．更に，miR-31の発現低下にPRC2によるH3K27のトリメチル化を介していることを明らかにした¹⁰⁾ (図3)．この知見は世界で初めて，PRC2-microRNA-NF- κ Bシグナル伝達のリンケージの存在を明らかにしたものである．更に，HTLV-1感染T細胞株のみならず，ex vivoのATL細胞にmiR-31を導入すると，NIKの発現低下，NF- κ Bの活性化の抑制，そしてATL細胞のアポトーシスが誘導

された．この結果は，ATL細胞におけるNF- κ B活性化の主要な分子機構がmiR-31の低下によるNIKの過剰発現によることを明確に示すものである．

C. ATL治療および発症予防介入の標的としてのNF- κ B

ATL細胞における恒常的なNF- κ B活性化が明らかになって以来，これを治療標的として，各種のNF- κ B阻害剤が検討されてきた．Dewanらは，NOG-SCIDマウスにED-40515 (-) 細胞株を移植し，IKK阻害剤Bay 11-7082を局所投与し腫瘍縮小効果とNF- κ BのDNA結合能の抑制を明らかにした¹¹⁾．Sandaらは，別のIKK阻害剤ACHPを用いてHTLV-1感染細胞株および新鮮ATL細胞に対するアポトーシス誘導を報告した¹²⁾．筆者らは，NF- κ B p65に結合してNF- κ B活性化を阻害するDHMEQを用いて，培養細胞株およびex vivoのATL細胞に対する作用を検討した．DHMEQはATL由来細胞株およびHTLV-1感染不死化細胞株に対して，強いNF- κ B阻害活性を示し，アポトーシスを誘導した．ex vivoのATL細胞株に対しても同様の作用を示し，正常Tリンパ球にはほとんど細胞障害性を示さなかった．SCIDマウス移植系を用い，DHMEQが有意に移植マウスの生命予後を延長させること，更にキャリアの末梢血中に存在するHTLV-1感染細胞

でNF- κ Bの活性化が既に認められること、キャリアのPBMCに対してDHMEQを処理すると、選択的にHTLV-1感染細胞が除去されることを示した。これらの結果は、DHMEQがATLの分子標的治療薬としての可能性を示すのみならず、ATLの発症予防薬としての可能性を明らかにした⁸⁾。

有効な薬物の検討には動物モデルが必要であるが、ATLの新鮮腫瘍細胞は免疫不全マウスへ移植することが難しいことが経験的に知られていた。HTLV-1感染T細胞株の一部は、SCIDマウスへ移植させることができるので、当初このモデルが利用された。Dewanらは皮下に細胞株を移植し、主に形成された皮下腫瘍を用いて薬効検定を行った¹¹⁾。これに対して、Ohsugiらは、SCIDマウスを用いて、抗マウスIL-2R β を事前投与してNK活性を抑制してからMT-2細胞を移植することで、再現性よく一定期間内にマウスが腫瘍死する系を立ち上げて、薬効を検証する新たな系として利用した¹³⁾。更に、この系ではHUT102細胞株も生着することを利用してDHMEQの効果を検証し、有効性を明らかにした¹⁴⁾。

筆者らは、miR-31発現欠損のあるATL細胞にmiR-31を補充することで特異的な細胞死を誘導する試みを進めている。ATL細胞特異的な導入を目指してATL細胞に発現する膜抗原に対する単鎖抗体にmiR-31を載せて特異的に導入する系の開発を試みているが、いくつかの解決すべき基礎的な課題を順に検討している段階である。正常細胞ではmiR-31の発現が高レベルで、miR-31を導入しても何の効果も示さないことは確認されていることから、これが成功すると、miRNAの特異的導入と作用の細胞特異性の2重の特異性が担保されることになると期待される。

文献

- 1) Yamagishi M, Watanabe T. Molecular hallmarks of adult T cell leukemia. *Front Microbiol.* 2012; 3: 334.
- 2) Inoue J, Gohda J, Akiyama T, et al. NF-kappa B activation in development and progression of cancer. *Cancer Sci.* 2007; 98: 268-74.
- 3) Lim KH, Yang Y, Staudt LM. Pathogenetic importance and therapeutic implications of NF- κ B in lymphoid malignancies. *Immunol Rev.* 2012; 246: 359-78.
- 4) Horie R, Watanabe T, Morishita Y, et al. Ligand-independent signaling by overexpressed CD30 drives NF- κ B activation in Hodgkin-Reed Sternberg cells. *Oncogene.* 2002; 21: 2493-503.
- 5) Horie R, Watanabe M, Ishida T, et al. The NPM-ALK oncoprotein abrogates CD30 signaling and constitutive NF- κ B activation in anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Cell.* 2004; 5: 353-64.
- 6) Mori N, Fujii M, Ikeda S, et al. Constitutive activation of NF- κ B in primary adult T-cell leukemia cells. *Blood.* 1999; 93: 2360-8.
- 7) Hironaka N, Mochida K, Mori N, et al. Tax-independent constitutive I κ B kinase activation in adult T-cell leukemia cells. *Neoplasia.* 2004; 6: 266-78.
- 8) Watanabe M, Ohsugi T, Shoda M, et al. Dual targeting of transformed and untransformed HTLV-1-infected T cells by DHMEQ, a potent and selective inhibitor of NF- κ B, as a strategy for chemoprevention and therapy of adult T-cell leukemia. *Blood.* 2005; 106: 2462-71.
- 9) Saitoh Y, Yamamoto N, Dewan MZ, et al. Overexpressed NF- κ B-inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells. *Blood.* 2008; 111: 5118-29.
- 10) Yamagishi M, Nakano K, Miyake A, et al. Polycomb-mediated loss of miR-31 activates NIK-dependent NF- κ B pathway in adult T-cell leukemia and other cancers. *Cancer Cell.* 2012; 21: 121-35.
- 11) Dewan MZ, Terashima K, Taruishi M, et al. Rapid tumor formation of human T-cell leukemia virus type 1-infected cell lines in novel NOD-SCID/gammac(null) mice: suppression by an inhibitor against NF-kappa B. *J Virol.* 2003; 77: 5286-94.

- 12) Sanda T, Asamitsu K, Ogura H, et al. Induction of cell death in adult T-cell leukemia cells by a novel I kappa B kinase inhibitor. *Leukemia*. 2006; 20: 590-8.
- 13) Ohsugi T, Yamaguchi K, Kumasaka T, et al. Rapid tumor death model for evaluation of new therapeutic agents for adult T-cell leukemia. *Lab In-*

vest. 2004; 84: 263-6.

- 14) Ohsugi T, Horie R, Kumasaka T, et al. In vivo antitumor activity of the NF- κ B inhibitor dehydroxymethylepoxyquinomicin in a mouse model of adult T-cell leukemia. *Carcinogenesis*. 2005; 26: 1382-8.

Somatic *RHOA* mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma

Mamiko Sakata-Yanagimoto^{1,22}, Terukazu Enami^{1,22}, Kenichi Yoshida^{2,3,22}, Yuichi Shiraishi⁴, Ryohei Ishii⁵, Yasuyuki Miyake¹, Hideharu Muto¹, Naoko Tsuyama⁶, Aiko Sato-Otsubo^{2,3}, Yusuke Okuno², Seiji Sakata⁷, Yuhei Kamada¹, Rie Nakamoto-Matsubara¹, Nguyen Bich Tran¹, Koji Izutsu^{8,9}, Yusuke Sato^{2,3}, Yasunori Ohta¹⁰, Junichi Furuta¹¹, Seiichi Shimizu¹², Takuya Komeno¹³, Yuji Sato¹⁴, Takayoshi Ito¹⁵, Masayuki Noguchi¹⁶, Emiko Noguchi¹⁷, Masashi Sanada^{2,3}, Kenichi Chiba⁴, Hiroko Tanaka¹⁸, Kazumi Suzukawa^{1,19}, Toru Nanmoku¹⁹, Yuichi Hasegawa¹, Osamu Nureki⁵, Satoru Miyano^{4,18}, Naoya Nakamura²⁰, Kengo Takeuchi^{6,7}, Seishi Ogawa^{2,3,23} & Shigeru Chiba^{1,21,23}

Angioimmunoblastic T cell lymphoma (AITL) is a distinct subtype of peripheral T cell lymphoma characterized by generalized lymphadenopathy and frequent autoimmune-like manifestations^{1,2}. Although frequent mutations in *TET2*, *IDH2* and *DNMT3A*, which are common to various hematologic malignancies^{3,4}, have been identified in AITL^{5–8}, the molecular pathogenesis specific to this lymphoma subtype is unknown. Here we report somatic *RHOA* mutations encoding a p.Gly17Val alteration in 68% of AITL samples. Remarkably, all cases with the mutation encoding p.Gly17Val also had *TET2* mutations. The *RHOA* mutation encoding p.Gly17Val was specifically identified in tumor cells, whereas *TET2* mutations were found in both tumor cells and non-tumor hematopoietic cells. *RHOA* encodes a small GTPase that regulates diverse biological processes. We demonstrated that the Gly17Val *RHOA* mutant did not bind GTP and also inhibited wild-type *RHOA* function. Our findings suggest that impaired *RHOA* function in cooperation with preceding loss of *TET2* function contributes to AITL-specific pathogenesis.

AITL accounts for approximately 20% of all T cell lymphoma cases¹. On the basis of gene expression profiling, the normal counterparts of AITL tumor cells are proposed to be follicular helper T cells (T_{FH} cells), a subset of helper T cells^{1,2}. Peripheral T cell lymphoma,

not otherwise specified (PTCL-NOS) represents a more heterogeneous category of mature T cell lymphomas, including a subset sharing some features of AITL^{5,9}.

To explore the relevant gene mutations responsible for the pathogenesis of AITL, we performed whole-exome sequencing¹⁰ of three AITL and three PTCL-NOS samples (Supplementary Table 1). Of the targeted sequence, 86.5% was analyzed by ≥ 20 independent reads on average (Supplementary Figs. 1 and 2). In total, we identified and confirmed 87 non-silent somatic mutations (4–27 (median of 12.5) per sample) by Sanger sequencing and/or deep sequencing (Fig. 1a and Supplementary Table 2), including 79 missense and 5 nonsense single-nucleotide variants (SNVs) and 1 non-frameshift and 2 frameshift deletions. The numbers of non-silent mutations were lower than reported in B cell neoplasms^{11,12}, although relatively low tumor contents, which were suspected owing to mutant allele frequencies of generally less than 0.25 (median of 0.11), could have compromised sensitivity in detecting mutations (Fig. 1a). Recurrent mutations were found in only one gene, *RHOA*, in which identical c.50G>T mutations predicted to result in a p.Gly17Val alteration were identified in one PTCL-NOS and three AITL specimens (Fig. 1a,b and Supplementary Fig. 3). No allelic imbalances were observed at the *RHOA* locus (Supplementary Fig. 4).

Prompted by this discovery, we screened *RHOA* mutations in an extended cohort of 72 AITL and 87 PTCL-NOS samples by

¹Department of Hematology, Faculty of Medicine, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan. ²Cancer Genomics Project, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan. ³Department of Pathology and Tumor Biology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan. ⁴Laboratory of DNA Information Analysis, Human Genome Center, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan. ⁵Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan. ⁶Division of Pathology, Cancer Institute, Japanese Foundation for Cancer Research, Tokyo, Japan. ⁷Pathology Project for Molecular Targets, Cancer Institute, Japanese Foundation for Cancer Research, Tokyo, Japan. ⁸Department of Hematology, Toranomon Hospital, Tokyo, Japan. ⁹Okinaka Memorial Institute for Medical Research, Tokyo, Japan. ¹⁰Department of Pathology, Toranomon Hospital, Tokyo, Japan. ¹¹Department of Dermatology, Faculty of Medicine, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan. ¹²Department of Hematology, Tsuchiura Kyodo General Hospital, Tsuchiura, Japan. ¹³Department of Hematology, Mito Medical Center, National Hospital Organization, Mito, Japan. ¹⁴Department of Hematology, Tsukuba Memorial Hospital, Tsukuba, Japan. ¹⁵Department of Hematology, JA Toride Medical Center, Toride, Japan. ¹⁶Department of Pathology, Faculty of Medicine, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan. ¹⁷Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan. ¹⁸Laboratory of Sequence Analysis, Human Genome Center, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan. ¹⁹Department of Clinical Laboratory, University of Tsukuba Hospital, Tsukuba, Japan. ²⁰Department of Pathology, Tokai University School of Medicine, Isehara, Japan. ²¹Life Science Center, Tsukuba Advanced Research Alliance, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan. ²²These authors contributed equally to this work. ²³These authors jointly directed this work. Correspondence should be addressed to S.C. (schiba-t@md.tsukuba.ac.jp) or S.O. (sogawa-ty@umin.ac.jp).

Received 13 May 2013; accepted 12 December 2013; published online 12 January 2014; doi:10.1038/ng.2872

