

- (2012年8月23日-8月25日) (シンポジウム発表)
- 16) 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(2013年8月23日-8月25日)
 - 17) 若林翼、矢持忠徳、矢持淑子、佐々木陽介、Sanaz Firouzi、瀧本雅文、渡邊俊樹、「成人T細胞白血病(ATL)における、がん幹細胞微小環境の組織病理学的同定の試み」、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23日-8月25日
 - 18) 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ー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
 - 19) 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シグナル伝達の異常とNF- κ B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)
 - 20) 若林翼、矢持忠徳、矢持淑子、佐々木陽介、Sanaz Firouzi、瀧本雅文、渡邊俊樹、「成人T細胞白血病/リンパ腫(ATLL)における、がん幹細胞微小環境の組織病理学的同定の試み」、第102回日本病理学会総会、ロイトン札幌、札幌、2013年6月6日-6月8日(ポスター発表)
 - 21) 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 **ポスター賞**
 - 22) Firouzi Sanaz, 青木桜、鈴木穰、矢持忠徳、中野和民、中井謙太、菅野純夫、渡邊俊樹、"Development of a new high-throughput method to investigate T-cell-clonality and integration site preference among HTLV-1 infected individuals", 平成24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、2012年5月31日-6月1日(ポスター発表)
 - 23) 山岸誠、中野和民、宇都宮與、山口一成、内丸薫、小川誠司、渡邊俊樹、「成人T細胞白血病から明らかになった新たなクロストーク: Polycomb-miR-31-NF- κ B経路の異常とがん」、平成24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、2012年5月31日-6月1日(ポスター発表)
 - 24) 矢持忠徳、守田洋平、矢持淑子、佐々木陽介、渡辺信和、Sanaz Firouzi、内丸薫、宇都宮與、渡邊俊樹、「成人T細胞白血病におけるtumor initiating cellの探索の試み」、第5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26日(2012年8月25日-8月26日)(口演発表)
 - 25) 笹島悟史、中野和民、内丸薫、渡邊俊樹、「成人T細胞白血病(ATL)における新規TIAM2変異体の同定と遺伝子発現の解析」、第5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26日(2012年8月25日-8月26日)(ポスター発表)
 - 26) 藤川大、山岸誠、黒川直也、副島あい、石田尚臣、中野和民、渡邊俊樹、「HTLV-1タンパク質TaxとPolycombタンパク質との新規相互作用がT細胞に与える影響の解析」、第5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26日(2012年8月25日-8月26日)(ポスター発表)
 - 27) 矢持忠徳、守田陽平、矢持淑子、サナズフィルジ、佐々木陽介、渡辺信和、内丸薫、宇都宮與、渡邊俊樹、太田力、「成人性T細胞性白血病におけるがん幹細胞の同定への試み」、第71回日本癌学会学術総会、札幌、2012年9月20日(2012年9月19日-9月21日)(ポスター発表)
 - 28) 山岸誠、渡邊俊樹、「多機能性分子miR-31の発現低下とがん関連シグナル伝達」、第71回日本癌学会学術総会、札幌、2012年9月20日(2012年9月19日-9月21日)(口演発表)
 - 29) Yamagishi M, Takahashi R, Nakano K, Asanuma S, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimarui K, Ogawa S, Watanabe T, "Molecular hallmarks of adult T cell leukemia: miRNA epigenetics and emerging signaling abnormalities", 第74回日本血液学会学術集会、京都国際会議場、2012年10月19日(2012

- 年10月19日—10月21日) (口演発表)
- 30) Yamagishi M, Katano H, Nakano K, Ota Y, Hishima T, Okada S, Watanabe T, “miRNA signature and its functional involvement in aggressiveness of diffuse large B cell lymphoma”, 第74回日本血液学会学術集会、京都国際会議場、2012年10月20日 (2012年10月19日—10月21日) (口演発表)
- 31) Asanuma S, Nakano K, Yamagishi M, Ogawa S, Yamaguchi K, Utsunomiya A, Watanabe T, “Aberrantly spliced Helios variants in ATL cells induce T cell proliferation”, 第74回日本血液学会学術集会、京都国際会議場、2012年10月20日 (2012年10月19日—10月21日) (ポスター発表)
- 32) 藤川大、山岸誠、黒川直也、副島あい、石田尚臣、中野和民、渡邊俊樹、「HTLV-1タンパク質TaxはPolycombタンパク質EZH2との相互作用を介してエピジェネティクスの脱制御を誘導する」、第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪国際会議場、2012年11月14日 (2012年11月13日—11月15日) (口演発表)
- 33) Firouzi S, Yamochi T, Lopez Y, Aoki S, Suzuki Y, Nakano K, Nakai K, Sugano S, Watanabe T, “Development of a New High-throughout Method to Investigate T-cell-clonality and Integration Site Preference among HTLV-1-infected Individuals”, 第35回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場、2012年12月14日 (2012年12月11日-12月14日) (ポスター発表)
- 34) 工藤 翔太, 岩成 宏子, 浜窪 隆雄, 児玉 龍彦, 松浦 正, 須藤 幸夫, 津本 浩平, “2種の異なる homo - dimer を形成する P - cadherin の物性, 構造, 機能解析”, 第 12 回日本蛋白質科学会年会、名古屋国際会議場、2012 年 6 月 20 日
- 35) 湯村 恭平, 宇井 美穂子, 岡本 未央, 土井 洋文, 杉山 暁, 浜窪 隆雄, 児玉 龍彦, 津本浩平, “低免疫原性ストレプトアビジンを用いた融合抗体の構築”, 第 12 回日本蛋白質科学会年会、名古屋国際会議場、2012 年 6 月 20-21 日
- 36) 木吉 真人, 岡本 未央, 中木戸 誠, Jose M. M. Caaveiro, 曾我 真司, 白井 宏樹, 河畑 茂樹, 中村 春木, 津本浩平, “抗原抗体相互作用における親和性創出機構の精密解析”, 第 12 回日本蛋白質科学会年会、名古屋国際会議場、2012 年 6 月 20-21 日
- 37) 木吉 真人, 岡本 未央, 中木戸 誠, 曾我 真司, 白井 宏樹, 河畑 茂樹, 中村 春木, 津本浩平, “抗原抗体相互作用における親和性創出機構の精密解析”, 第 6 回バイオ関連化学シンポジウム、北海道大学、2012 年 9 月 6-8 日
- 38) 湯村 恭平, 宇井 美穂子, 岡本 未央, 土井 洋文, 杉山 暁, 浜窪 隆雄, 児玉 龍彦, 津本浩平, “低免疫原性ストレプトアビジン変異体の機能検討”, 第 6 回バイオ関連化学シンポジウム、北海道大学、2012 年 9 月 6-8 日
- 39) 木吉 真人, 三浦 恵梨, 岡本 未央, 中木戸 誠, Jose M. M. Caaveiro, 曾我 真司, 白井 宏樹, 河畑 茂樹, 中村 春木, 津本浩平, “抗原抗体相互作用における親和性創出機構の精密解析”, 第85回日本生化学会大会、福岡国際会議場、2012年12月14-16日
- 40) 石垣知寛、小林誠一郎、大野伸広、中野伸亮、宇都宮與、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
- 41) 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
- 42) 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
- 43) 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
- 44) 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
- 45) 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, Toshiaki 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
- 46) 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 “TET2 mutations revealed by whole exome sequencing in adult T-cell leukemia” 第 71 回日本癌学会学術集会、ロイトン札幌、2012 年 9 月 20 日
- 47) 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 “TET2 mutations revealed by whole exome sequencing in adult T-cell leukemia” 第 74 回日本血液学会学術集会、京都国際会議場、2012 年 10 月 19 日
- 48) Asanuma S, Nakano K, Yamagishi M, Ogawa S, Yamaguchi K, Utsunomiya A, Watanabe T, “Aberrantly spliced Helios variants in ATL cells induce T cell proliferation”, 第 74 回日本血液学会学術集会、京都国際会議場、2012 年 10 月 20 日
- 49) 大野伸広、田野崎隆二、福田隆浩、井上明威、藤重夫、伊藤歩、小林真之、佐藤広太、城憲秀、川俣豊隆、湯地晃一郎、石垣智寛、小林誠一郎、渡辺信和、内丸薫、東條有伸。「Aggressive ATL 患者の治療選択における同種造血幹細胞移植の意義の検討」、第 75 回日本血液学会学術集会、札幌、2013 年 10 月
- 50) 佐藤奈津子、渡辺恵理、石垣知寛、小林誠一郎、大野伸広、崔日承、末廣陽子、鶴池直邦、内丸薫、渡辺信和、「フローサイトメトリーによる ATL 細胞の解析法とその臨床検査への応用」、第 75 回日本血液学会学術集会、札幌、2013 年 10 月
- 51) Eri Watanabe, Nobukazu Watanabe, Seiichiro Kobayashi, Kaoru Uchimaru, Youko Suehiro, Ilseung Choi, Naokuni Uike. “Analysis of ATL cells, Treg cells, NK cells and CCR4 expression using 12-color flow cytometry”, 第 75 回日本血液学会学術集会、札幌、2013 年 10 月
- 52) 城憲秀、大野伸広、小林真之、佐藤広太、川俣豊隆、石垣智寛、小林誠一郎、湯地晃一郎、内丸薫、東條有伸「当科におけるモガムリズムマブの使用経験」、第 75 回日本血液学会学術集会、札幌、2013 年 10 月。
- 53) Kobayashi S, Watanabe E, Ishigaki T, Ohno N, Yuji K, Nakano K, Yamochi T, Watanabe T, Watanabe N, Tojo A, Uchimaru K, “The CD7 vs CADM1 plot in FACS is useful for selection of advanced HTLV-1 carriers”, 第 75 回日本血液学会学術集会、ロイトン札幌、札幌、2013 年 10 月 11 日 (2013 年 10 月 11 日-10 月 13 日)
- 54) 川俣豊隆、大野伸広、佐藤広太、東條有伸、内丸薫、田野崎隆二、山野嘉久「リンパ腫型 ATL に対する造血幹細胞移植術後に生じ、中枢神経再発との鑑別を要した HAM 様脊髄炎の一例」、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
- 55) 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
- 56) 石垣知寛、小林誠一郎、大野伸広、渡辺恵理、田野崎隆二、渡辺信和、東條有伸、内丸薫 : TSLC1/CD7 を用いた造血細胞移植後の ATL 細胞のモニタリング 第 5 回 HTLV-1 研究会 2012 東京
- 57) 大野伸広、田野崎隆二、小林誠一郎、石垣知寛、渡辺信和、内丸薫 : 同種造血幹細胞移植を見据えた ATL の治療戦略：その後方視的解析 第 5 回 HTLV-1 研究会 2012 東京
- 58) Kobayashi S, Watanabe E, Ishigaki T, Ohno N, Yuji K, Tsukada Y, Ohmoto A, Shimada N, Watanabe N, Tojo A, and Uchimaru K. CD7 vs CADM1 in FACS reflects multi-step oncogenesis of ATL and discriminates HTLV-1 infected cells. 第 74 回日本血液学会学術集会 2012 京都国際会議場、2012 年 10 月 19 日
- 59) 石垣知寛、小林誠一郎、大野伸広、田野崎隆二、渡辺信和、内丸薫、東條有伸、中内啓光：Monitoring ATL cells after allogeneic hematopoietic stem cell

- transplantation with CADM1 and CD7. 第 74 回日本血液学会学術集会 2012 京都
- 60) 大野伸広、小林誠一郎、渡辺信和、石垣知寛、湯地晃一郎、東條有伸、内丸薫: CD3 と CD7 の展開による急性型 ATL 細胞の同定: 治療後の CD3dimCD7(-)分画のクローナリティ解析第 74 回日本血液学会学術集会 2012 京都
- 61) 長村蔵人、濱田和俊、秋山正基、飯島正文、中牧剛、矢持淑子. 慢性リンパ性白血病/小細胞性リンパ腫(CLL/SLL)に合併した毛包性ムチン沈着症の 1 例. 第 75 回日本皮膚科学会東京支部学術大会、京王プラザホテル、2012 年 2 月 18-19 日
- 62) 本間まゆみ、塩沢英輔、矢持淑子、瀧本雅文、太田秀一.B 細胞性リンパ腫における Skp2、p27 の発現に関する免疫組織化学的検討.第 101 回日本病理学会総会、京王プラザホテル、2012 年 4 月 26-28 日
- 63) 佐々木陽介、岸本浩次、北村隆司、本間まゆみ、野呂瀬朋子、塩沢英輔、矢持淑子、九島巳樹、光谷俊幸、瀧本雅文. 新たな時代を担う若手技師企画による診断困難症例の検討ボジキンリンパ腫再発との鑑別を要した濾胞性リンパ腫の一例.第 51 回日本臨床細胞学会秋期大会、朱鷺メッセ他、2012 年 11 月 9 日

(その他)

- 1) 渡邊俊樹、「HTLV-1 総合対策 3 年目の現状」、長崎県 ATL ウイルス母子感染防止に関する講習会、長崎県医師会館、長崎、2013 年 12 月 18 日(招待講演)
- 2) 渡邊俊樹、「診断と治療法開発につながる ATL の分子病態解明の試み」、長崎県産婦人科学会地方会、島原、長崎、2013 年 8 月 11 日(招待講演)
- 3) 渡邊俊樹、「ATL 多段階発癌の分子機構解明へのアプローチ」、第 1 回 ATL 疾患検討会、東京コンファレンスセンター・有明、東京、2013 年 7 月 13 日(招待講演)
- 4) 渡邊俊樹、「ATL 発症と病態の分子基盤解明

- の試み」、第 11 回東海リンパ腫フォーラム学術講演会、ホテルキャスルプラザ、名古屋、2013 年 4 月 20 日(招待講演)
- 5) 渡邊俊樹、「HTLV-1 による ATL 発症機構の解明を目指して」、文部科学省特別研究経費研究推進「ATL 対策宮崎モデルの確立に向けて」特別講演会、宮崎大学医学部、宮崎、2012 年 5 月 9 日(招待講演)
- 6) 渡邊俊樹、「HTLV-1 による ATL 発症機構の解明を目指して-新規治療法開発への可能性」、平成 24 年度熊本大学名医に学ぶセミナー、熊本大学医学部、熊本、2012 年 5 月 30 日(招待講演)
- 7) 渡邊俊樹、「日本における HTLV-1/ATL 研究、対策の歴史、現状」、第 6 回北里血液学セミナー、北里大学病院、相模原、2012 年 6 月 6 日(招待講演)
- 8) 渡邊俊樹、「ATL 細胞における Polycomb-miRNA-NF-κB リンケージ新規治療法開発への新たな視点」、文部科学省新学術領域研究生命科学系 3 分野支援活動(がん、ゲノム、脳)合同シンポジウム、東京ステーションコンファレンス、2012 年 7 月 6 日
- 9) 渡邊俊樹、「HTLV-1 による ATL 発症機構の解明の現状-新規治療法開発への試み」、第 15 回北海道ウイルス感染症セミナーの会、北海道大学学術交流会館、札幌、2012 年 9 月 1 日(招待講演)
- 10) 渡邊俊樹、「成人 T 細胞白血病(ATL)における microRNA 発現異常とその意義」、平成 24 年度遺伝子病制御研究所研究集会、北海道大学医学部学友会館フラテ、札幌、2012 年 9 月 18 日(招待講演)

H. 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-kB経路の活性化	高久史麿、小澤敬也、坂田洋一、金倉 讓、小島勢二	Annual Review 血液 2014	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, <u>Ogawa S</u> (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, <u>Tsumoto K</u>	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
<u>渡邊俊樹</u>	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」	<i>血液内科</i>	68(1)	65-70	2014
<u>山岸 誠</u> 、 <u>渡邊俊樹</u>	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」	<i>血液内科</i>	66(3)	308-315	2013
Asanuma S, <u>Yamagishi M</u> (15人中2番目), <u>Yamochi T</u> (15人中8番目), <u>Uchimaru K</u> (15人中13番目), <u>Ogawa S</u> (15人中14番目), <u>Watanabe T</u> (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
Yumura K, Ui M, Doi H, Hamakubo T, Kodama T, <u>Tsumoto K</u> (7人中6番目), Sugiyama A	Mutations for decreasing the immunogenicity and maintaining the function of core streptavidin	<i>Protein Sci</i>	22(2)	213-221	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
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
Kobayashi S, Tian Y, Ohno N, Yuji K, Ishigaki T, Watanabe N, <u>Uchimaru K</u> (13人中13番目), et al.	The CD3 versus CD7 Plot in Multicolor Flow Cytometry Reflects Progression of Disease Stage in Patients Infected with HTLV-I.	<i>PLoS One</i>	8(1)	e53728	2013
Nishimura T, Kaneko S, Eto K, <u>Nakauchi H</u> (21人中21番目)	Generation of rejuvenated antigen-specific T cells by pluripotency reprogramming and dedifferentiation.	<i>Cell Stem Cell.</i>	12(1)	114-126	2013
Nakajima-Takagi Y, <u>Nakauchi H</u> (13人中11番目), Iwama A.	Role of SOX17 in hematopoietic development from human embryonic stem cells.	<i>Blood</i>	121(3)	447-458	2013
Shimizu T, Suzuki H, <u>Imai K</u> (14人中12番目), Tsukamoto T, Toyota M.	Methylation of a panel of microRNA genes is a novel biomarker for detection of bladder cancer.	<i>Eur Urol</i>	63(6)	1091-1100	2013
<u>Yamagishi M</u> , <u>Watanabe T</u>	New Paradigm of T cell Signaling: Learning from Malignancies (Review Article)	<i>J Clin Cell Immunol</i>	S12:00 7	doi:10.4172/2155-9899	2012
<u>Yamagishi M</u> , <u>Watanabe T</u>	Molecular Hallmarks of Adult T Cell Leukemia (Review Article)	<i>Front Microbiol</i>	3: 334	doi: 10.3389/fmicb.2012.00334	2012

Iwanaga M, <u>Watanabe T</u> , Yamaguchi K	Adult T-cell leukemia: a review of epidemiological evidence	Front Microbiol	3: 322	doi: 10.3389/fmicb.2012.00322	2012
<u>山岸 誠</u> 、 <u>渡邊俊樹</u>	特集：microRNAの発現制御の異常と疾患「成人T細胞白血病(ATL)におけるmicroRNAの発現異常」	細胞	44(10)	15-22	2012
<u>山岸 誠</u> 、 <u>渡邊俊樹</u>	総説「2.HTLV-1感染症とmiRNA」	ウイルス	62(1)	9-18	2012
Kudo S, Caaveiro JM, Miyafusa T, Sudou Y, Kodama T, <u>Tsumoto K</u> (10人中10番目)	Structural and thermodynamic characterization of the self-adhesive properties of human P-cadherin (Article)	Mol. Biosyst	8(8)	2050-2053	2012
Nishida C, Kusubata K, <u>Nakauchi H</u> (16人中14番目), Hattori K.	MT1-MMP plays a critical role in hematopoiesis by regulating HIF-mediated chemokine/cytokine gene transcription within niche cells.	Blood	119 (23)	5405-5416	2012
Tanaka T, Sato-Otsubo A, <u>Ogawa S</u> (22人中17番目) Saito MK.	Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery.	Blood	120(6)	1299-1308	2012
Nakamaki T, <u>Yamochi-Onizuka T</u> (12人中11番目), Ota H.	CD20 gene deletion causes a CD20-negative relapse in diffuse large B-cell lymphoma.	Eur J Haematol	89(4)	350-355	2012

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

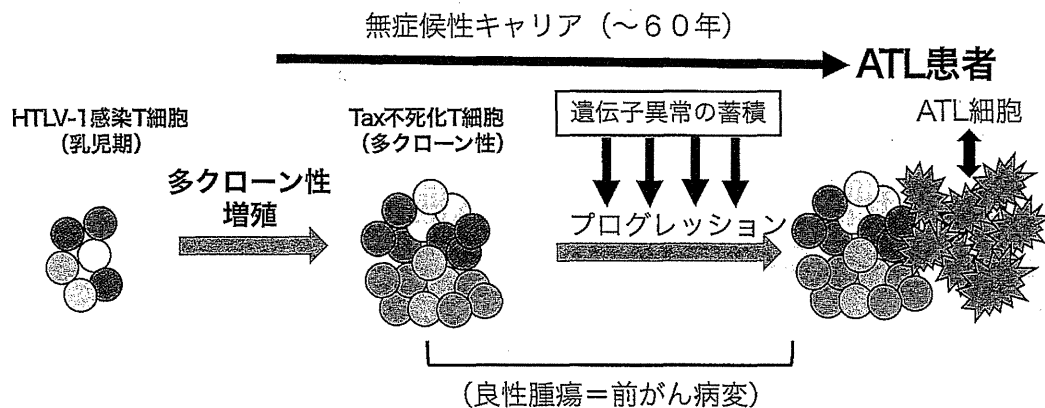


図1 HTLV-1感染細胞からATL細胞へ

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ッションにおける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関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

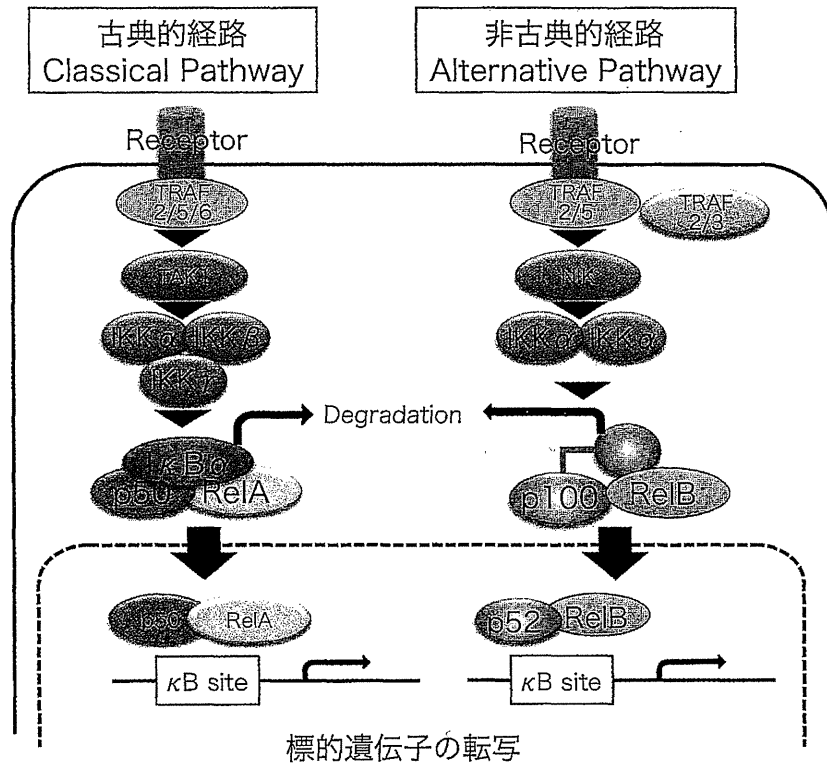


図2 NF- κ Bの2つの活性化経路

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

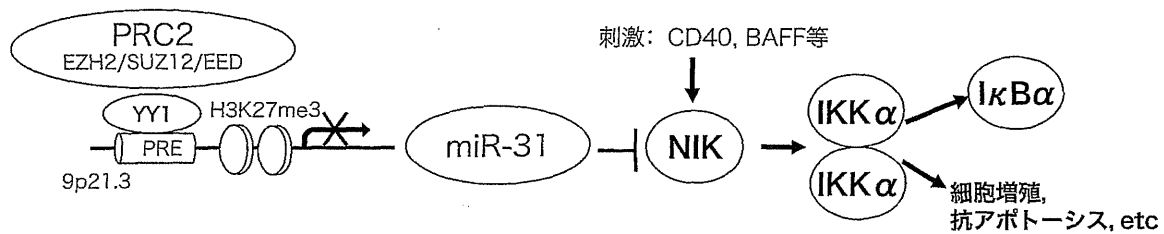


図3 ATL細胞におけるpolycomb-miR-31-NF- κ Bのリンケージ

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 Invest*. 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-ky@umin.ac.jp).

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



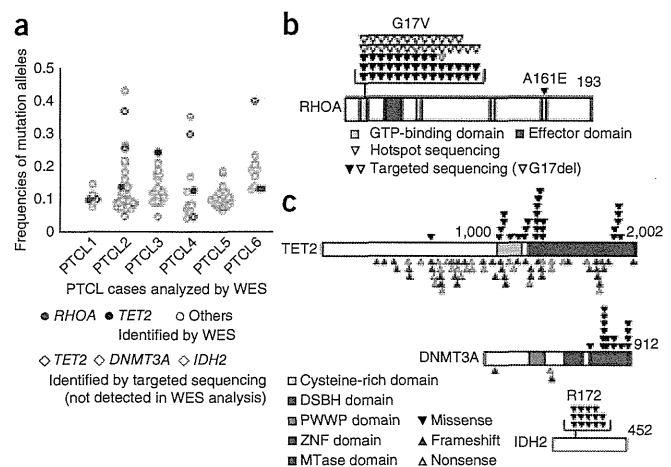


Figure 1 Discovery of a *RHOA* mutation encoding p.Gly17Val in PTCL by whole-exome sequencing. (a) Somatic mutations identified in three AITL and three PTCL-NOS samples are shown with the frequencies of mutation alleles plotted. Red and blue filled circles indicate the *RHOA* mutation encoding p.Gly17Val and *TET2* mutations, respectively. Mutations of *TET2*, *IDH2* and *DNMT3A* that were not found by whole-exome sequencing (WES) but were identified later by targeted deep sequencing are also depicted by open diamonds: blue, *TET2*; orange, *DNMT3A*; purple, *IDH2*. (b) Positions of *RHOA* alterations. Nucleotide-binding domains are represented by yellow boxes. The effector domain is represented by a red box. (c) Positions of alterations in the *TET2*, *DNMT3A* and *IDH2* proteins. Black, red and yellow arrowheads indicate missense, frameshift and nonsense mutations, respectively. The cysteine-rich and double-strand β -helix (DSBH) domains of *TET2* are represented by a yellow and a red box, respectively. proline-tryptophan-tryptophan-proline (PWWP), zinc-finger (ZNF) and methyltransferase (MTase) domains of *DNMT3A* are shown by light blue, blue and purple boxes, respectively.

deep sequencing of all coding sequences ($n = 79$) or the mutational hotspot (c.50G>T; p.Gly17Val) ($n = 80$) of *RHOA* (Supplementary Fig. 1 and Supplementary Table 3). *RHOA* mutations were found in 66 of the 159 specimens, with a much higher frequency in AITL (51/72; 70.8%) than PTCL-NOS (15/87; 17.2%) (Fig. 1b, Table 1 and Supplementary Table 4). We identified no *RHOA* mutations other than the c.50G>T (p.Gly17Val) mutation except for an in-frame deletion (c.49_51delGGA) resulting in a p.Gly17del (PTCL33) alteration and a missense SNV (c.482C>A) resulting in a p.Ala161Glu (PTCL59) alteration in cases negative for the p.Gly17Val alteration (Fig. 1b and Supplementary Table 4). We validated all low-frequency mutant *RHOA* alleles (frequency of 0.02–0.05) using an independent deep sequencing platform (Online Methods). No *RHOA* mutations encoding p.Gly17Val were found in other hematologic malignancies, including in myeloid neoplasms ($n = 142$), mature B cell neoplasms ($n = 91$) and mature T cell neoplasms other than AITL and PTCL-NOS ($n = 11$) (Table 1), suggesting that the *RHOA* mutation encoding p.Gly17Val is highly specific to AITL and PTCL-NOS among hematologic malignancies.

According to the pathologic definition in the Online Methods^{5,9}, we classified 21 of 59 immunohistochemically characterized PTCL-NOS cases as T_{FH}-like PTCL-NOS cases. Thirteen of the 21 T_{FH}-like PTCL-NOS cases (61.9%) had the *RHOA* mutation encoding p.Gly17Val, whereas none of the remaining 38 PTCL-NOS cases had this mutation ($P < 0.001$) (Supplementary Table 5). Given that almost all AITL cases showed T_{FH}-like features, these findings implied a strong correlation between the *RHOA* mutation encoding p.Gly17Val and the T_{FH}-like phenotype of PTCL, similar to the correlation previously shown between *TET2* mutations and the T_{FH}-like phenotype of PTCL⁵. No clinical parameters were significantly different in

the mutation-positive and mutation-negative cases (Supplementary Fig. 5 and Supplementary Table 6).

To investigate the correlation between mutations in *RHOA* and other genes, we also resequenced *TET2*, *IDH1*, *IDH2* and *DNMT3A* in addition to *RHOA* in the subcohort of 79 PTCL (AITL, 46; PTCL-NOS, 33) cases (Supplementary Figs. 1 and 6). A total of 97 *TET2* mutations were identified in 54 of the 79 PTCL specimens (68.4%) (AITL, 38 (82.6%); PTCL-NOS, 16 (48.5%)). Similarly, we found *DNMT3A* mutations in 21 PTCL specimens (26.6%) (AITL, 12 (26.0%); PTCL-NOS, 9 (27.3%)). We identified *IDH2* mutations affecting Arg172 (p.Arg172Met, p.Arg172Thr, p.Arg172Ser, p.Arg172Lys and p.Arg172Gly) in 14 cases (17.7%) (AITL, 14 (30.4%); PTCL-NOS, 0 (0%)) (Figs. 1c and 2a, Supplementary Tables 7 and 8, and Supplementary Note). No *IDH1* mutations were identified. Several mutations in *TET2*, *IDH2* and *DNMT3A*, which had escaped detection in the whole-exome sequencing analysis, were newly identified in the same whole-exome sequencing cohort by this targeted resequencing. Our inability to detect these mutations using whole-exome sequencing might be explained by their low allelic mutational burdens and/or by low sequencing coverage in whole-exome sequencing (Fig. 1a). Unexpectedly, however, *TET2* and *DNMT3A* mutations with high-frequency alleles were also newly found in three and two cases, respectively (Fig. 1a). The cause of our inability to identify *TET2* and *DNMT3A* mutations by whole-exome sequencing might be the presence of substantial numbers of mutant reads in the reference bone marrow samples (Supplementary Fig. 7, Supplementary Tables 9 and 10, and Supplementary Note).

Remarkably, mutations in *RHOA*, *TET2* and *IDH2* showed strong correlations; all *RHOA*-mutated cases also had *TET2* mutations ($P < 0.001$), and all but one of the *IDH2* mutations were confined to tumors also having *RHOA* and *TET2* mutations ($P < 0.001$) (Fig. 2a and Supplementary Note). The predominant *TET2* alleles showed significantly higher allelic burden than mutant *RHOA* and *IDH2* alleles in most cases (*TET2* versus *RHOA*, $P < 0.001$; *TET2* versus *IDH2*, $P = 0.001$; Fig. 2b,c), whereas *RHOA* and *IDH2* mutations had similar allele frequencies (Fig. 2d). Skewed distributions of relative allele frequencies among these mutations strongly suggested that *TET2* mutations predated *RHOA* and/or *IDH2* mutations in most cases.

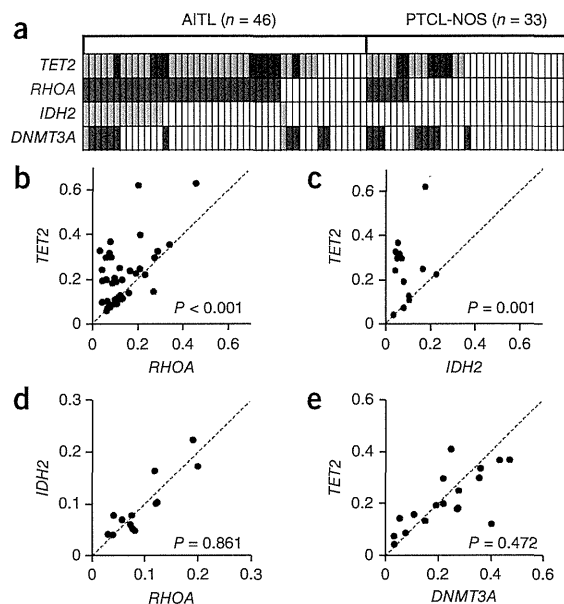
Table 1 *RHOA* mutation encoding p.Gly17Val in various hematologic malignancies

Disease	Number of mutated cases (%)
T cell malignancies	$n = 170$
AITL ^a	51/72 (70.8)
PTCL-NOS	15/87 (17.2)
with AITL features	13/21 (61.9)
without AITL features	0/38 (0)
ND ^b	2/28 (7.1)
Other T cell malignancies	0/11 (0)
B cell malignancies	$n = 91$
DLBCL	0/44 (0)
Follicular lymphoma	0/19 (0)
Other B cell malignancies	0/28 (0)
Myeloid malignancies	$n = 142$
AML	0/89 (0)
MDS	0/36 (0)
MPN	0/14 (0)
MDS/MPN	0/3 (0)

DLBCL, diffuse large B cell lymphoma; AML, acute myeloid leukemia; MDS, myelodysplastic syndrome; MPN, myeloproliferative neoplasm.

^aIncluding one case with *RHOA* p.Gly17del and one case with *RHOA* p.Ala161Glu.
^bNot determined.

Figure 2 Relationship between *RHOA*, *TET2*, *IDH2* and *DNMT3A* mutations in PTCL. (a) Distribution of mutations in *RHOA*, *TET2*, *IDH2* and *DNMT3A* in 79 PTCL (46 AITL and 33 PTCL-NOS) samples that were analyzed by targeted deep sequencing. Two or three distinct *TET2* mutations and two distinct *DNMT3A* mutations were identified in multiple samples. Dark blue and dark green indicate samples having a single *TET2* or *DNMT3A* mutation, respectively, and light blue and light green indicate samples having multiple *TET2* or *DNMT3A* mutations. (b–e) Comparison of the allele frequencies of two selected mutations in samples harboring mutations in *TET2* and *RHOA* (b), *TET2* and *IDH2* (c), *RHOA* and *IDH2* (d) and *TET2* and *DNMT3A* (e). Each axis shows the frequencies of the mutant alleles. When multiple mutations existed in a single gene, the frequencies of major alleles are indicated. Data were analyzed statistically by Wilcoxon rank-sum test.



Mutations in *DNMT3A* largely overlapped and had similar allelic burdens as *TET2* mutations (Fig. 2e), but their correlation with *RHOA* or *IDH2* mutations was much less clear (Fig. 2a).

To determine the clonal structure of the *RHOA* mutation encoding p.Gly17Val and of other gene mutations, we isolated CD4⁺ T cells, a fraction enriched for tumor cells and other fractions, from the specimens of two cases (PTCL159 and PTCL160; Supplementary Figs. 8 and 9), and we analyzed mutations by targeted resequencing as well as by Sanger sequencing. In PTCL159 (PTCL-NOS in the skin), we found the *RHOA* mutation encoding p.Gly17Val, two *TET2* mutations and a *DNMT3A* mutation (Supplementary Fig. 8 and Supplementary Table 7). Somatic origin of these mutations was confirmed (Supplementary Fig. 8). We identified the *RHOA* mutation encoding p.Gly17Val in purified CD4⁺ cells but not in CD8⁺ cells. One of the two *TET2* mutations and the *DNMT3A* mutation were identified in both CD4⁺ and CD8⁺ cell fractions with apparently similar allelic burdens to each other in the two types of cells, whereas the remaining *TET2* mutation was found only in CD4⁺ cells and was absent in CD8⁺ cells (Supplementary Fig. 8). These observations suggested that the *RHOA* mutation encoding p.Gly17Val and one of the two *TET2* mutations were confined to CD4⁺ tumor cells, whereas the other *TET2* mutation and the *DNMT3A* mutation were shared by both CD4⁺ tumor cells and CD4⁺ and CD8⁺ reactive cells (Supplementary Fig. 8). In contrast, the *RHOA* mutation encoding p.Gly17Val and two *TET2* mutations identified in PTCL160 (AITL) were all confined to tumor cells (Supplementary Fig. 9, Supplementary Table 7 and Supplementary Note). These data indicate that the *RHOA* mutation encoding p.Gly17Val was a specific event in tumor cells. In contrast,

TET2 and *DNMT3A* mutations seemed to have taken place in either CD4⁺ tumor cells or early progenitor cells such as those that give rise to all hematopoietic cells, as previously described^{6,7}.

RHOA encodes a small GTPase, which has a highly conserved amino acid structure across species (Supplementary Fig. 10). *RHOA* operates as a molecular switch that regulates a wide variety of biological processes through cycling between an active (GTP-bound) state and an inactive (GDP-bound) state^{13,14}. *RHOA* is activated by specific guanine-exchange factors (GEFs) that catalyze the dissociation of GDP and the rebinding of GTP, and signaling is terminated by hydrolysis of GTP to GDP, a reaction that is stimulated by GTPase-activating proteins (GAPs)^{13,14}.

Three-dimensional model structures of the Gly17Val *RHOA* protein structure compromised binding to GDP and GTP^{15,16} (Supplementary Fig. 11 and Supplementary Note). In fact, when we expressed *RHOA* proteins in NIH3T3 cells, a substantial fraction of wild-type *RHOA* protein bound GTP or GTPγS in a rhotekin pull-down assay¹⁷, whereas no GTP- or GTPγS-bound form was pulled down for the Gly17Val *RHOA* mutant (Fig. 3a), suggesting severely reduced GTP and GTPγS binding by the Gly17Val mutant.

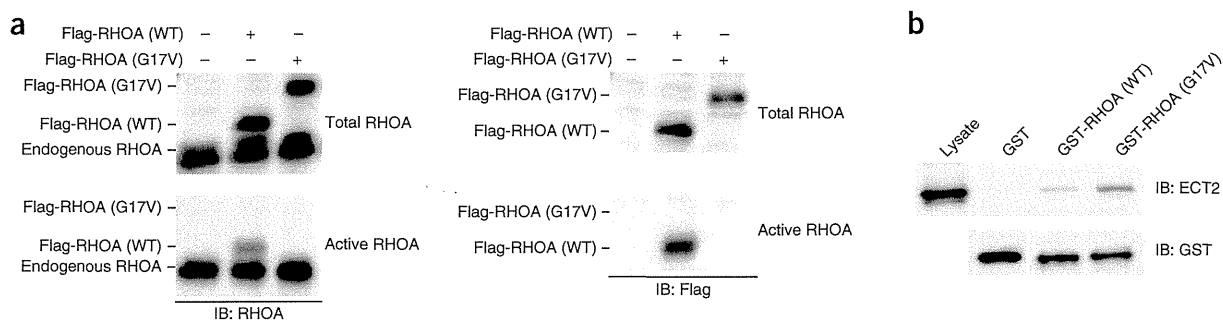


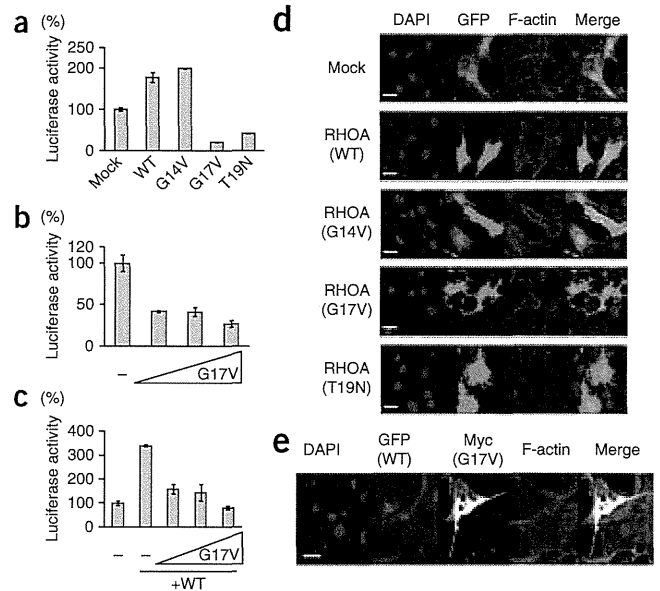
Figure 3 Dominant-negative effect of the Gly17Val *RHOA* mutant on wild-type *RHOA*. (a) Rhotekin pull-down assay for endogenous *RHOA* and exogenously expressed wild-type and Gly17Val *RHOA* in NIH3T3 cells. Extracts from NIH3T3 cells expressing Flag-tagged wild-type or Gly17Val *RHOA* were pulsed with GTPγS and incubated with glutathione Sepharose beads on which the RHO-binding domain of rhotekin fused to GST was immobilized, and precipitated protein was blotted with antibodies to *RHOA* (left) and Flag (right) to detect active *RHOA* specifically. IB, immunoblot; WT, wild type. (b) GEF-binding activity of wild-type and Gly17Val *RHOA*. Lysate from NIH3T3 cells, transiently expressing ECT2 with an N-terminal deletion, was incubated with Sepharose beads on which GST-fused wild-type or Gly17Val *RHOA* protein was immobilized, and precipitated protein was blotted with antibody to ECT2.

LETTERS

Figure 4 Effects of the Gly17Val RHOA mutant on transcriptional regulation and actin cytoskeleton formation in NIH3T3 cells. (a–c) Effect of Gly17Val RHOA on the transcriptional activity of the SRF-RE. (a) Activity of the SRF-RE reporter in NIH3T3 cells expressing wild-type or mutant (Gly14Val, Gly17Val or Thr19Asn) RHOA protein. (b) Effect of increasing amounts (16, 48 or 144 ng/well) of Gly17Val RHOA on SRF-RE reporter activity in NIH3T3 cells. (c) Effect of increasing amounts (16, 48 or 144 ng/well) of Gly17Val RHOA on SRF-RE reporter activity enhanced by exogenously expressed wild-type RHOA. In each plot in a–c, the mean \pm s.d. of triplicate experiments is shown. A representative result from three independent experiments is shown. (d,e) Effect of Gly17Val RHOA on actin cytoskeleton formation. (d) F-actin staining with phalloidin (red) in NIH3T3 cells transiently transfected with vector expressing wild-type or mutant (Gly14Val, Gly17Val or Thr19Asn) RHOA. GFP is used as a marker for transduction with each cDNA. (e) NIH3T3 cells stably expressing wild-type RHOA were transfected with vector expressing Myc-tagged Gly17Val RHOA. Scale bars in d,e, 30 μ m.

Moreover, the Gly17Val RHOA mutant reduced GTP binding by both the endogenous and exogenous wild-type RHOA proteins in a dose-dependent manner (Supplementary Figs. 12 and 13), suggesting a dominant-negative nature for Gly17Val RHOA. This view was further supported by the finding that the Gly17Val RHOA mutant bound ECT2, one of the RhoGEFs, more tightly than wild-type RHOA, as was previously described for Gly17Ala RHOA¹⁸ (Fig. 3b and Supplementary Note). The Gly17del and Ala161Glu mutants also showed impaired binding capacity for GTP/GTP γ S and inhibited GTP binding by wild-type RHOA protein (Supplementary Fig. 14). Together, these results support the notion that the RHOA mutants contribute to the pathogenesis of PTCL through the inhibition of wild-type RHOA in a dominant-negative manner, although the amount of mutant RHOA protein seemed to be low in both NIH3T3 cells and primary AITL tumor cells (Supplementary Fig. 15, Supplementary Table 11 and Supplementary Note), for an unknown reason.

In accordance with these findings, unlike wild-type RHOA and mutant Gly14Val RHOA, the Gly17Val RHOA mutant did not activate transcription from the serum response factor-responsive element (SRF-RE)¹⁹ (Fig. 4a,b) and instead repressed transcription from SRF-RE activated by exogenously expressed wild-type RHOA (Fig. 4c), as did a known dominant-negative mutant of RHOA (Thr19Asn) (Fig. 4a and data not shown). Gly17Val as well as Thr19Asn RHOA also attenuated actin stress fiber formation in NIH3T3 cells, which was markedly induced by wild-type and Gly14Val RHOA²⁰ (Fig. 4d). Furthermore, the Gly17Val RHOA mutant inhibited the assembly of actin stress fibers in NIH3T3 cells



stably expressing wild-type RHOA (Fig. 4e). All these data suggest that the Gly17Val mutant functions in a dominant-negative manner with respect to wild-type RHOA.

To investigate the effect of wild-type and Gly17Val RHOA on T cells, we established Jurkat cells inducibly expressing wild-type or Gly17Val RHOA (Fig. 5a). When wild-type RHOA was expressed, the proliferation of Jurkat cells was significantly decreased (WT Dox (+) versus Mock DOX (+), $P < 0.001$, days 2–4; Fig. 5b), and G1-to-S cell cycle progression was suppressed (Supplementary Fig. 16). In contrast, inducibly expressed Gly17Val RHOA did not affect the growth or cell cycle progression of Jurkat cells (Fig. 5b and Supplementary Fig. 16). We further performed mRNA sequencing analysis to examine the effect of the RHOA mutation encoding p.Gly17Val on gene expression, using RNA prepared from Jurkat cells inducibly expressing wild-type or Gly17Val RHOA or mock-transfected cells, as well as RNA from NIH3T3 cells transiently expressing wild-type or Gly17Val RHOA or mock-transfected cells. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)^{21,22} demonstrated that the serum response factor (SRF) pathway, known to be activated under RHOA signaling²³, was significantly enriched at a false discovery rate (FDR) q value less than 0.25 for cells expressing wild-type RHOA versus mock-transfected cells in both Jurkat and NIH3T3 cells

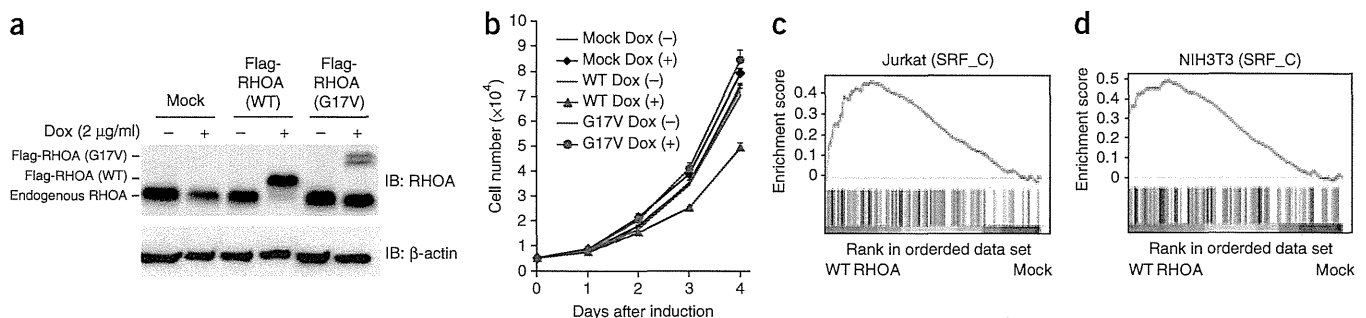


Figure 5 Effect of Gly17Val RHOA on T cells. (a) Doxycycline (Dox)-induced expression of wild-type and Gly17Val RHOA in Jurkat cells. A protein blot with antibody to RHOA is shown. β -actin is used as a loading control. (b) Proliferation of Jurkat cells inducibly expressing wild-type or Gly17Val RHOA. Absorbance (at 450 nm) was converted to cell number. The mean \pm s.d. of quadruplicate experiments is shown. A representative result from three independent experiments is shown. (c,d) GSEA for Jurkat cells inducibly expressing wild-type or Gly17Val RHOA or mock transfected and NIH3T3 cells transiently expressing wild-type or Gly17Val RHOA or mock transfected ($n = 2$ each). The SRF pathway was differentially enriched in both Jurkat cells (c) and NIH3T3 cells (d). SRF_C refers to the V\$SRF_C gene set.

(Fig. 5c,d and Supplementary Table 12). The SRF pathway was reported as an essential mediator of T cell development in the thymus^{24,25}, although we found no clue to its functional relevance in AITL development in the literature. We did not observe enrichment of the SRF pathway in either cell type expressing Gly17Val RHOA compared to mock-transfected cells or cells expressing wild-type RHOA. These findings further support the notion that Gly17Val RHOA is a loss-of-function mutant.

The extremely high frequency and specificity of the RHOA mutation encoding p.Gly17Val in AITL and AITL-related PTCL cases unequivocally underscore its major role in the development of these subtypes of PTCL (Supplementary Fig. 17). The finding of somatic mutation of RHOA in lymphoma, particularly of a mutation with a loss-of-function and/or dominant-negative nature, was rather unexpected because the oncogenic potential of RHOA has been implicated in human cancers²⁶. However, several lines of evidence previously suggested a tumor-suppressive role for RHOA in T-lineage cells^{26,27}. Moreover, transgenic expression of C3 transferase, an inhibitor of the Rho family of proteins (RHOA, RHOB and RHOC) under the *Lck* promoter has been shown to induce thymic T cell lymphoma in mice²⁸. Our observations in Jurkat cells expressing wild-type RHOA are also along these lines. Clearly, further studies are warranted to clarify the molecular pathogenesis mediated by the unique RHOA mutation encoding p.Gly17Val in AITL and related PTCL, and such studies might have promising implications for the development of novel diagnostics and therapeutics.

URLS. European Genome-phenome Archive, <https://www.ebi.ac.uk/ega/>; Genomon-exome, <http://genomon.hgc.jp/exome/en/index.html>; Picard, <http://picard.sourceforge.net/>; dbSNP131, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>; 1000 Genomes Project, <http://www.1000genomes.org/>; MSigDB, <http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb>.

METHODS

Methods and any associated references are available in the online version of the paper.

Accession codes. Genome sequence data are available at the European Genome-phenome Archive under accession EGAS00001000557.

Note: Any Supplementary Information and Source Data files are available in the online version of the paper

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Y. Okoshi, N. Obara, Y. Yokoyama, H. Nishikii, N. Kurita and M. Seki for contributing to sample collection and banking. We also thank Y. Sakashita and T. Takahashi for technical assistance, and S. Narumiya and I. Kitabayashi for efficient discussion. This work was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research (KAKENHI) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (22134006 to S.O.; 22130002, 24390241, 25112703 and 25670444 to S.C.; 25461407 to M.S.-Y.) and was supported by the Sagawa Foundation for Promotion of Cancer Research, the Naito Foundation, the Mochida Memorial Foundation for Medical and Pharmaceutical Research (M.S.-Y.).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.S.-Y. prepared DNA samples, sorted the tumor cells, resequenced the samples, and sorted and integrated information. T.E. analyzed the function of wild-type and mutant RHOA. K.Y. resequenced the samples and contributed to the resequencing data analyses. Y. Shiraiishi, E.N., K.C., H.T. and S.M. performed bioinformatics analyses of the resequencing data. R.I. and O.N. created the model structure for mutant RHOA. Y.M., H.M., Y.K., R.N.-M., N.B.T., K.S., T.N., Y.H. and M.N. contributed to sample collection and preparation. N.T., S. Sakata, N.N. and K.T. immunostained specimens and performed pathohistological analyses. Y. Okuno and M.S. contributed to the resequencing. A.S.-O. and Yusuke Sato

contributed to mRNA sequencing. K.I., Y. Ohta, J.F., S. Shimizu, T.K., Yuji Sato and T.I. collected samples. M.S.-Y., T.E., K.Y., S.O. and S.C. generated figures and tables, and wrote the manuscript. All authors participated in discussions and interpretation of the data and results.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>.

1. Swerdlow, S.H. *et al.* WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues 4th edn, 306–311 (IARC Press, Lyon, France, 2008).
2. de Leval, L. *et al.* The gene expression profile of nodal peripheral T-cell lymphoma demonstrates a molecular link between angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and follicular helper T (TFH) cells. *Blood* **109**, 4952–4963 (2007).
3. Delhommeau, F. *et al.* Mutation in *TET2* in myeloid cancers. *N. Engl. J. Med.* **360**, 2289–2301 (2009).
4. Mardis, E.R. *et al.* Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N. Engl. J. Med.* **361**, 1058–1066 (2009).
5. Lemonnier, F. *et al.* Recurrent *TET2* mutations in peripheral T-cell lymphomas correlate with TFH-like features and adverse clinical parameters. *Blood* **120**, 1466–1469 (2012).
6. Quivoron, C. *et al.* *TET2* inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. *Cancer Cell* **20**, 25–38 (2011).
7. Couronné, L., Bastard, C. & Bernard, O.A. *TET2* and *DNMT3A* mutations in human T-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **366**, 95–96 (2012).
8. Cairns, R.A. *et al.* *IDH2* mutations are frequent in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood* **119**, 1901–1903 (2012).
9. Rodríguez-Pinilla, S.M. *et al.* Peripheral T-cell lymphoma with follicular T-cell markers. *Am. J. Surg. Pathol.* **32**, 1787–1799 (2008).
10. Yoshida, K. *et al.* Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* **478**, 64–69 (2011).
11. Chapman, M.A. *et al.* Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature* **471**, 467–472 (2011).
12. Morin, R.D. *et al.* Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature* **476**, 298–303 (2011).
13. Bustelo, X.R., Sauzeau, V. & Berenjano, I.M. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions *in vivo*. *Bioessays* **29**, 356–370 (2007).
14. Etienne-Manneville, S. & Hall, A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629–635 (2002).
15. Ihara, K. *et al.* Crystal structure of human RhoA in a dominantly active form complexed with a GTP analogue. *J. Biol. Chem.* **273**, 9656–9666 (1998).
16. Shimizu, T. *et al.* An open conformation of switch I revealed by the crystal structure of a Mg²⁺-free form of RHOA complexed with GDP. Implications for the GDP/GTP exchange mechanism. *J. Biol. Chem.* **275**, 18311–18317 (2000).
17. Reid, T. *et al.* Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and rhophilin in the rho-binding domain. *J. Biol. Chem.* **271**, 13556–13560 (1996).
18. Arthur, W.T., Ellerbroek, S.M., Der, C.J., Burrridge, K. & Wennerberg, K. XPLN, a guanine nucleotide exchange factor for RhoA and RhoB, but not RhoC. *J. Biol. Chem.* **277**, 42964–42972 (2002).
19. Cheng, Z. *et al.* Luciferase reporter assay system for deciphering GPCR pathways. *Curr. Chem. Genomics* **4**, 84–91 (2010).
20. Ridley, A.J. & Hall, A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**, 389–399 (1992).
21. Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 15545–15550 (2005).
22. Mootha, V.K. *et al.* PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat. Genet.* **34**, 267–273 (2003).
23. Hill, C.S., Wynne, J. & Treisman, R. The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* **81**, 1159–1170 (1995).
24. Mylona, A. *et al.* The essential function for serum response factor in T-cell development reflects its specific coupling to extracellular signal-regulated kinase signaling. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 267–276 (2011).
25. Fleige, A. *et al.* Serum response factor contributes selectively to lymphocyte development. *J. Biol. Chem.* **282**, 24320–24328 (2007).
26. Karlsson, R., Pedersen, E.D., Wang, Z. & Brakebusch, C. Rho GTPase function in tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1796**, 91–98 (2009).
27. Hébert, M. *et al.* Rho-ROCK-dependent ezrin-radixin-moesin phosphorylation regulates Fas-mediated apoptosis in Jurkat cells. *J. Immunol.* **181**, 5963–5973 (2008).
28. Cleverley, S.C., Costello, P.S., Henning, S.W. & Cantrell, D.A. Loss of Rho function in the thymus is accompanied by the development of thymic lymphoma. *Oncogene* **19**, 13–20 (2000).

