

筑波大学

博士（医学）学位論文

マウスモデルを使用した VAV1 変異体の T 細胞性腫瘍発症におけるメカニズム

2021

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

福本 浩太

## 略語表

### 略語

Ac	Acidic
AITL	Angioimmunoblastic T-cell lymphoma
ALCL	Anaplastic large-cell lymphoma
ATL	Adult T-cell leukemia/lymphoma
Cbl-b	casitas B-lineage lymphoma-b
CCR4	C-C chemokine receptor type 4
CH	Calponin homology
CXCR3	C-X-C motif chemokine receptor 3
DH	Dbl homology
DN	Double negative
DNMT3A	DNA methyltransferase 3A
DP	Double positive
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinase 1/2
ETP	early T-lineage progenitors
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FTCL	follicular T-cell lymphoma
GEF	Guanine exchange factor
GSEA	Gene set enrichment analysis
HE	Hematoxylin-Eosin
ICN1	intracellular domain of NOTCH1
ICOS	inducible T-cell co-stimulator
IDH2	isocytate dehydrogenase 2
IGV	Integrative Genomic Viewer
ITK	interleukin-2 inducible T cell kinase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MSigDB	Molecular Signature Database
mTCR $\beta$	membrane T-cell receptor $\beta$
NFAT	nuclear factor of activated T cell
PCA	Principle component analysis
PCR	Polymerase chain reaction
PD-1	programmed cell death 1
PH	Pleckstrin homology
PLC $\gamma$ 1	Phospholipase C $\gamma$ 1

PTCL	Peripheral T-cell lymphoma
PTCL-NOS	Peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified
pVAV1	phosphorylated-VAV1
Rac1	RAS-related C3 botulinus toxin substrate 1
RHOA	ras homologue family member A
SCNAs	somatic copy number alterations
SH2/3	Src homology 2/3
SLP76	SH2 domain-containing leukocyte protein of 76kDa
SP	Single positive
SYK	spleen tyrosine kinase
TCR	T-cell receptor
TET2	Ten-Eleven Translocation-2
TFH	T follicular helper
TH1	type 1 helper T
TH2	type 2 helper T
T-LBL	T-cell lymphoblastic lymphoma
VAV1-Tg	VAV1-transgenic
V-Del	VAV1 p.165-174del
V-Fus	VAV1-STAP2
WES	Whole exome sequencing
WTA	Whole transcriptome analysis
ZF	Zinc finger

## 目次

第一章 序文	p.1
1-1 T 細胞性腫瘍の分類	p.1
1-2 T 細胞性腫瘍のゲノム異常	p.2
1-3 T 細胞性腫瘍における <i>VAV1</i> 遺伝子変異の頻度と機能	p.4
第二章 目的	p.7
第三章 方法	p.8
3-1 マウス	p.8
3-1-1 マウスモデル作製	p.8
3-1-2 ゲノム DNA 抽出	p.9
3-1-3 Polymerase Chain Reaction 法	p.10
3-1-4 <i>VAV1</i> 発現解析	p.11
3-1-5 Copy number 解析	p.14
3-2 Fluorescence activated cell sorting (FACS)解析	p.16
3-3 マウスの組織の処理	p.17
3-3-1 標本作製	p.17
3-3-2 T 細胞受容体刺激による <i>VAV1</i> のリン酸化の確認	p.19
3-3-3 T 細胞受容体刺激による naïve T 細胞分化の偏りの確認	p.21
3-3-4 細胞自律的な腫瘍増生能の確認	p.22
3-4 腫瘍サンプルを用いた次世代シーケンス	p.23
3-4-1 全トランスクリプトーム解析 (WTA)	p.23

3-4-2	全エクソンシーケンス解析 (WES)	p.26
第四章	結果	p.28
4-1	<i>Trp53</i> アレルノックアウトマウスにおける VAV1 変異体の発現	p.28
4-2	<i>Trp53</i> <sup>-/-</sup> <i>VAV1-Tg</i> および <i>Trp53</i> <sup>-/-</sup> マウスの腫瘍細胞の細胞自律的な腫瘍増生能の確認	p.33
4-3	<i>Trp53</i> <sup>-/-</sup> <i>VAV1-Tg</i> マウスの腫瘍細胞の遺伝子発現プロファイル	p.34
4-4	腫瘍未発症時点におけるマウスの T 細胞遺伝子プロファイル	p.37
4-5	VAV1 変異体を発現する腫瘍のクローン構造	p.38
4-6	ブロモドメイン阻害剤による <i>Trp53</i> <sup>-/-</sup> <i>VAV1-Tg</i> 腫瘍細胞を有するマウスの生存期間の延長	p.40
第五章	考察	p.42
第六章	結語	p.47
第七章	謝辞	p.48
第八章	参考文献	p.49
第九章	図説明文	p.55
第十章	表	p.64
第十一章	図	p.68

## 1. 序文

### 1-1. T 細胞性腫瘍の分類

本邦においてリンパ系腫瘍全体のうち T 細胞性腫瘍の発症頻度は約 10% であり、前駆リンパ系腫瘍と成熟リンパ系腫瘍に大別される。前駆リンパ系腫瘍にあたる腫瘍は T 細胞性リンパ芽球性リンパ腫 (T-LBL) と称され、縦隔腫瘍と骨髄浸潤を伴い、若年男性に好発する。また、T 細胞性リンパ系腫瘍のうち成熟リンパ系腫瘍、末梢性 T 細胞リンパ腫 (Peripheral T-cell lymphoma; PTCL) は、病理学および臨床的特徴に基づいて末梢性 T 細胞リンパ腫、非特定型 (Peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified; PTCL-NOS)、血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫 (angioimmunoblastic T-cell lymphoma; AITL)、成人 T 細胞白血病/リンパ腫 (adult T-cell leukemia/lymphoma; ATL)、未分化大細胞リンパ腫 (anaplastic large-cell lymphoma; ALCL) などの約 30 種類に分類されることを WHO から提案されている。<sup>1</sup>

PTCL-NOS は、PTCL のうち約 30% を占め、他の疾患単位のいずれにも属さない PTCL と定義されていた。<sup>1</sup> 近年、病理学および発現の特徴により、この PTCL-NOS の中で、転写因子である T-bet およびその標的であるケモカインレセプターである C-X-C motif chemokine receptor 3 (CXCR3) などの発現を認める 1 型ヘルパー T (type 1 helper T; TH1) 細胞を起源とする PTCL-TBX21 や、転写因子である GATA3 およびその標的であるケモカインレセプターの C-C chemokine receptor type 4 (CCR4) などの発現を認める 2 型ヘルパ

一T (type 2 helper T; TH2) 細胞を起源とする PTCL-GATA3 などの腫瘍細胞の起源によってさらに細分化することが、Iqbal らによって提案されている。<sup>2,3</sup>

#### 1-2. T 細胞性腫瘍のゲノム異常

PTCL-GATA3 では、CDKN2A/B-TP53 の経路および PTEN-PI3K の経路を標的とする腫瘍抑制遺伝子の欠損または変異、さらには STAT3 および MYC 領域の増幅などの異常が報告されている。一方 PTCL-TBX21 では、細胞障害性エフェクター遺伝子を標的とする体細胞コピー数多型異常 (SCNA) が少ないことを報告されている。PTCL-TBX21 と PTCL-GATA3 を比較すると PTCL-GATA3 の方で予後が悪いことがわかっている。<sup>4</sup>

元来 TFH 細胞による腫瘍と考えられていた AITL は、T 濾胞ヘルパー細胞 (T follicular helper cell: TFH) を起源とする Nodal T-cell lymphoma with TFH phenotype というサブグループに含まれ、そのサブグループには他に、follicular T-cell lymphoma (FTCL), nodal peripheral T-cell lymphoma (PTCL) with TFH phenotype が含まれるとされる。<sup>1</sup> Nodal T-cell lymphomas with TFH phenotype においてはエピゲノム調節因子をコードする *Ten-Eleven Translocation-2 (TET2)*、*DNA methyltransferase 3A (DNMT3A)*、*isocytate dehydrogenase 2 (IDH2)* 遺伝子に変異が高頻度に認められ、<sup>5-7</sup> さらに当研究室を含むいくつかのグループで疾患特異的に *ras homologue family member A (RHOA)* 変異 (p.Gly17Val) が同定された。<sup>8-10</sup> 転写因子である FOXP3 を発現する制御性 T 細胞を起源とする ATL はゲノム異常が複雑であり、ケモカイン受容体をコードする *CCR4* 遺伝子や *CCR7* 遺伝子に高頻度に変



異を認めている。<sup>11</sup>また、免疫逃避に関わるゲノム異常の頻度が高く、*PD-L1* 遺伝子の 3'UTR の構造異常も報告された。<sup>12</sup>ALCL は、*NPM-ALK* 融合遺伝子変異を多く認め、<sup>1</sup>その *NPM-ALK* の下流シグナルとして *STAT3* 経路の活性化が知られている。<sup>13</sup>*NPM-ALK* 陰性症例では *DUSP22* 領域の転座を認めることが報告されている。<sup>14</sup>

また、これらの疾患群に共通して *interleukin-2 inducible T cell kinase* (*ITK*) と *spleen tyrosine kinase* (*SYK*) の融合遺伝子である *ITK-SYK*<sup>15</sup> や *FYN*<sup>9</sup>、*PLCG1*<sup>16</sup>、*CARD11*<sup>11,17</sup>、*IRF4*<sup>11</sup>、*VAV1*<sup>11,16,18-21</sup> などといった T 細胞受容体 (T-cell receptor; TCR) シグナル分子をコードする遺伝子の異常が報告されている。このことは TCR シグナルの役割である T 細胞の分化や増殖などの機能に深く関わっている分子の異常により、PTCL が発症しているものと考えられている。

一方で、前駆リンパ系腫瘍である T-LBL では、*CD34* や *CD13*・*CD33* などの前駆細胞の表面抗原と *CD4* や *CD8* などの発現を認めていない Early T-lineage progenitors (ETP) LBL、*CD4* *CD8* を発現し *CD1a* を発現している early cortical stage、*CD4* *CD8* を発現し *CD3* を発現している late cortical stage などの腫瘍細胞の起源の分化段階によって 3 段階に分類することが提案されている。<sup>22</sup>それぞれの段階において、*TCR* 遺伝子座の一つと転写因子をコードする遺伝子が融合していることが報告されており、ETP サブタイプではほとんどが *LYL1*、early cortical stage では *TLX1*・*TLX3*・*HOXA*、late cortical stage では *TAL1* との融合が知られている。<sup>23</sup>また、そのほかにも ETP サブタイプは

*NOTCH1*・*FBXW7*変異や *CDKN2A* の欠失などの頻度が少なく、*NRAS*・*KRAS*・*JAK1*・*JAK3*などの RAS シグナルを調節する遺伝子の活性化型変異や、*EZH2*や *SETD2*・*EP300*などのヒストン修飾遺伝子の不活性化型変異を認めていた。<sup>24,25</sup> それ以外の T-LBL では *NOTCH1*・*FBXW7*の変異や *CDKN2A* の欠失に加え、early cortical stage では *NUP214-ABL1* の転座、late cortical stage では *PTEN* の変異が報告されている。<sup>22</sup>

### 1-3. T 細胞性腫瘍における *VAV1* 遺伝子変異の頻度と機能

当研究グループの先行研究および複数のグループから様々な PTCL において *VAV1* 遺伝子の変異が報告された。<sup>18</sup> その頻度は ATL で 18 %、<sup>11</sup>ALCL で 11 %、PTCL-NOS では 7~11 %、<sup>19-21</sup>Nodal T-cell lymphomas with TFH phenotype では 5 %と報告されている。<sup>16,18</sup> 一方で、前駆リンパ系腫瘍である T-LBL においては、ヒトの腫瘍細胞では *VAV1* 遺伝子の変異はほとんど認められていないが、T-LBL のマウスモデルでは *VAV1* が腫瘍抑制因子として機能しているという報告もある。<sup>23,26</sup>

*VAV1* は分子量 95kDa のタンパク質であり、VAV ファミリーは *VAV1/2/3* からなる。VAV ファミリーは、低分子量 G 蛋白質の GDP を GTP に変換するグアニンヌクレオチド交換因子 (Guanine exchange factor: GEF) として働く。<sup>27</sup> *VAV1* は造血系の細胞に限局しており、calponin homology (CH) ドメイン、acidic (Ac) ドメイン、Dbl homology (DH) ドメイン、pleckstrin homology (PH) ドメイン、zinc finger (ZF) ドメイン、Src homology 3

(SH3) ドメイン、Src homology 2 (SH2) ドメインからなる。VAV1 は T 細胞において TCR 刺激を引き金として、LCK や FYN といった Src ファミリーキナーゼを介してリン酸化され、RAS-related C3 botulinus toxin substrate 1 (Rac1) などの小型 GTPase を活性化する GEF 依存性機能と、<sup>28-30</sup> アダプタータンパク質として SH2 domain-containing leukocyte protein of 76kDa (SLP76) や phospholipase C  $\gamma$  1 (PLC  $\gamma$  1) との相互作用し、nuclear factor of activated T cell (NFAT) や mitogen-activated protein (MAP) キナーゼ経路といった T 細胞の活性化や成熟に重要なシグナル伝達に関与する GEF 非依存性機能を持つ。<sup>31-33</sup> (図 1A) VAV1 の非活性化状態では Ac ドメインにある 3 つの Tyr142, 160, 174 が DH ドメインと接触し閉じた構造を形成することで、基質である RHO ファミリー低分子量 G タンパク質と DH ドメインの接触を阻害する。また、この構造はアミノ末端ドメインである CH ドメインと中心の触媒コア間の分子内相互作用により維持安定化されている。<sup>34,35</sup> Tyr174 がリン酸化されると、開いた構造となり DH ドメインを露出することで VAV1 の GEF 活性が引き起こされる。また、カルボキシ末端側の SH3 ドメインも VAV1 の GEF 活性制御に関与している。<sup>36</sup>

VAV1 欠損 T 細胞では T 細胞の分化や活性化の部分的な阻害が報告されており、<sup>37-39</sup> また、全ての VAV ファミリーの欠損マウスでは VAV1 単独欠損マウスに比較して、CD4・CD8 両陽性 (Double positive; DP) や、CD4 単独陽性 (Single positive; SP)、CD8 SP 胸腺細胞が顕著に減少し、Ca 流入や extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 活性化が失われることから、

VAV1 は T 細胞の分化や活性化に重要ではあるが、部分的に VAV2 および VAV3 と機能が重複しているとされていた。<sup>40</sup> 一方で、発がん物質を投与された VAV1 欠損マウスは CD8 SP、CD4・CD8 両陰性 (Double negative; DN)、あるいはその混合タイプの T-LBL を発症した。VAV1 蛋白質の C 末側 SH3 ドメインが NOTCH1 の細胞内ドメイン (intracellular domain of NOTCH1; ICN1) のユビキチン化に関与する casitas B-lineage lymphoma (Cbl) -b と結合し、ICN1 の分解を制御する重要な働きを示すことが報告された。<sup>26</sup>

PTCL における VAV1 遺伝子の変異は様々なパターンが報告されており、点突然変異は Ac・PH・ZF・SH3 ドメインに様々な遺伝子変異の集中した箇所であるホットスポットとして報告されている。その他の変異としては、Ac ( $\Delta$  165~174)、C 末端 SH3 ドメイン ( $\Delta$  778~786) で欠失変異が報告されており、また C 末端 SH3 ドメインを欠く VAV1 と様々な遺伝子との融合変異が報告されている。<sup>11,16,18-21</sup> (図 1B) PH または ZF ドメインの変異が下流のシグナルにどのように影響を与えるかは未だ不明であるが、Ac または SH3-SH2-SH3 ドメインのいずれかが変化すると、DH ドメインとの相互作用が損なわれ、自己抑制が阻害される。<sup>34,35</sup> この Ac あるいは SH3-SH2-SH3 ドメインの変異は、*in vitro* で TCR シグナルの過剰な活性化につながる。<sup>18</sup>

そこで、私は *in vivo* での腫瘍形成における VAV1 変異体の機能を解明することを目的に、CD2 プロモーター下において VAV1 変異体を発現する遺伝子改変マウスを作製した。

## 2. 目的

1. ヒト PTCL の腫瘍組織において同定された *VAV1* 変異の発現を有するマウスを作製し、そのマウスにおいて確認される腫瘍を解析し、T 細胞性腫瘍における腫瘍発症のメカニズムを発見する
2. *VAV1* 変異の発現を有するマウスから得られた腫瘍細胞を使用し、この変異体から誘導される新たなパスウェイをターゲットにした新規治療薬を発見する

### 3. 方法

#### 3-1 マウス

##### 3-1-1 マウスモデル作製

当研究室の先行研究で PTCL において同定された *VAV1* 変異 (p.165\_174del) (V-Del) と *VAV1-STAP2* 融合遺伝子 (V-Fus)<sup>18</sup> を、生命科学動物資源センターに依頼し、CD2 プロモーター下において発現させる VA ベクター<sup>41</sup> に挿入し、マイクロインジェクション法により C57BL/6 マウスの受精卵に導入して、T 細胞特異的に V-Del および V-Fus の変異体を発現するマウスを作製していただいた。

また、RIKEN BioResource Research Center (Ibaraki, Japan) より供与された腫瘍抑制因子をコードする *Trp53* 欠損マウス (*Trp53* KO) (Acc. No.CDB 0001K)<sup>42</sup> と交配することにより *VAV1* 変異の発現に加え *Trp53* 両アレル KO、片アレルノック KO のそれぞれの状態のマウス (*Trp53*<sup>-/-</sup>-V-Del / V-Fus、*Trp53*<sup>+/-</sup>-V-Del / V-Fus) を作製した。(図 2A) そのマウスにおける腫瘍形成を以下の 2 種類の方法で観察した。*Trp53*<sup>-/-</sup>の状態のマウスは自然発症を、*Trp53*<sup>+/-</sup>の状態のマウスは自然発症に加え、出生後 7~12 週の時点で 4Gy の放射線を照射し、*VAV1* 変異の発現の有無により腫瘍のタイプや発症までの

期間に違いがあるかを観察した。(図 2B)

### 3-1-2 ゲノム DNA 抽出

ゲノム DNA の抽出には、フェノール・クロロホルム抽出法あるいはアルカリ溶解法を用いて行った。

フェノール・クロロホルム抽出法では、Tail Lysis Buffer (50 mM Tris-HCL、100 mM NaCl、20 mM EDTA、1 % SDS) に Proteinase K を加え、切った尻尾を入れ 55°C 12 時間インキュベートした。溶出した液のみを取り出し、フェノール・クロロホルム溶液 (富士フイルム和光純薬株式会社、Osaka、Japan) を等量加え、遠心機で 21600 x g・5 分間・4 °C で遠心した。分離した上清を取り出し、もう一度繰り返した。4 °C の 99.5 % エタノール溶液 (富士フイルム和光純薬株式会社、Osaka、Japan) 900  $\mu$ l に 3 M 酢酸ナトリウム溶液を 45  $\mu$ l 加えた溶液を上清に加え 30 回ほど転倒混和し、遠心機で 21600 x g・5 分間・4 °C で遠心した。上清を取り除き、4 °C の 70 % エタノール溶液を 300  $\mu$ l 加え、もう一度 21600 x g・5 分間・4 °C で遠心した。出来たペレットを 30 分ほど風乾させた後、100~150  $\mu$ l の TE buffer で溶解した。

アルカリ溶解法では、50 mM 水酸化ナトリウム 180  $\mu$ l に切った尻尾を入れ、95 °C・10 分間インキュベートした。そこに 1 M Tris-HCL (pH 8.0) 20  $\mu$ l

加えて作製した。

### 3-1-3 Polymerase Chain Reaction 法

作製したマウスの変異導入された *VAV1* 変異の発現の有無を確認するため、*VAV1* の遺伝子配列情報を web サイトの Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>) から取得し、プライマーは primer blast (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) を用いて設計した。また、*Trp53* のアレルがノックアウトされているかを確認するため、購入した RIKEN BioResource Research Center (Ibaraki, Japan) から指定されている塩基配列のプライマーを購入した。(表 1)

*VAV1* の PCR 反応には KOD-FX-neo (東洋紡株式会社、Osaka, Japan) 0.2  $\mu$ l、2 $\times$  PCR Buffer for KOD-FX-neo 5  $\mu$ l、2 mM dNTPs 2  $\mu$ l、Forward  $\cdot$  Reverse Primer とともに 0.3  $\mu$ l (100 mM に調整されたものを 10 倍希釈して使用；蒸留水 45  $\mu$ l：プライマー原液 5  $\mu$ l)(株式会社ファスマック、Kanagawa, Japan)、蒸留水 (富士フイルム和光純薬株式会社、Osaka, Japan) 1.2  $\mu$ l、ゲノム DNA 1  $\mu$ l の合計 10  $\mu$ l を 0.2 ml Hi-8-Tube<sup>43</sup> に作った。反応は Veriti 96 well Thermal Cycler (Thermo Fisher SCIENTIFIC 株式会社、Massachusetts, United States of America) を用いて 2 step 法で行った。条件は①94  $^{\circ}$ C  $\cdot$  2 分間



→②98 °C・10 秒間→③68 °C・30 秒間（②と③を 30 回繰り返す）とした。

*Trp53* の PCR 反応は 3 step 法で行い、条件は①94 °C・5 分間→②94 °C・30 秒間→③57 °C・30 秒間→④72 °C・2 分間（②・③・④を 35 回繰り返す）→⑤72 °C・5 分間とした。Agarose S（株式会社ニッポンジーン、Tokyo、Japan）を用いて当研究室で作製した 2 %アガロースゲルに PCR 反応後の反応液を 10  $\mu$ l アプライし、BIO CRAFT MODEL BE-560 で約 10 分間 100 V の電圧で電気泳動した。泳動後ゲルをゲル撮影装置 TOYOBO FAS-III（日本ジェネティクス株式会社、Tokyo、Japan）で撮影し、目的のバンドを確認した。

#### 3-1-4 *VAV1* 発現解析

3-1-3 で示した PCR 法で *VAV1* 変異の発現を有するマウスを頸椎脱臼で安楽死させた後、脾臓を採取し細かくすりつぶし、得られた細胞液を塩化アンモニウム溶血剤によって溶血処理を行った。溶血処理を行った後、2.5 % Fetal calf serum（FCS）を加えた PBS で洗浄し、PE 標識抗 CD3 抗体と氷上で遮光しながら 30 分間インキュベートし反応させた。MACS Buffer（2 mM EDTA、0.5 % Bovine serum albumin、PBS）にて 2 回洗浄し、細胞数  $1 \times 10^7$  個につき 80  $\mu$ l の MACS Buffer で細胞懸濁液を作った。そこに細胞数  $1 \times 10^7$  個につき Anti-PE MicroBeads（Miltenyi Biotec、Nordrhein-Westfalen、Germany）を

20  $\mu$ l 入れ、よくピペッティングをして混合してから 4  $^{\circ}$ C  $\cdot$  15 分間でインキュベートした。細胞数  $1 \times 10^7$  個につき MACS Buffer を 1 ml 入れ、遠心機で 300  $\times$  g  $\cdot$  10 分間  $\cdot$  4  $^{\circ}$ C で遠心した。上清を取り除き、細胞数  $1 \times 10^8$  個につき MACS Buffer を 500  $\mu$ l で再懸濁した。MACS Column (Miltenyi Biotec, Nordrhein-Westfalen, Germany) を MACS Separator (Miltenyi Biotec, Nordrhein-Westfalen, Germany) にセットし、細胞懸濁液を MACS Column に入れ、PE 標識抗体で標識されていない細胞を通した。MACS Column を MACS Buffer 500  $\mu$ l で 3 回洗浄し、MACS Separator から MACS Column を外し、MACS Buffer 1 ml を入れ、プランジャーを使用し PE 標識抗体で標識されている CD3 陽性 T 細胞を回収した。目的の細胞が回収できていることを確認するため、それぞれ PE 標識抗体で標識されていない細胞、標識されている CD3 陽性 T 細胞を  $1 \times 10^6$  個ずつ回収し、FACS Aria II で解析を行った。回収した CD3 陽性 T 細胞の Total RNA を RNeasy mini kit (Qiagen, Limburg, the Kingdom of the Netherlands) を用いて精製した。

次に逆転写反応により cDNA を合成した。random hexamer (ThermoFisher SCIENTIFIC 株式会社, Massachusetts, United States of America) 1  $\mu$ l、10 mM dNTP mix (ThermoFisher SCIENTIFIC 株式会社, Massachusetts, United States of America) 1  $\mu$ l、各 total RNA 11  $\mu$ l の計 13  $\mu$ l を 0.2 ml Hi-8-

Tube に分注し Veriti 96 well Thermal Cycler で 65 °C ・ 5 分間反応させ、その後 5×First Strand buffer (ThermoFisher SCIENTIFIC 株式会社、Massachusetts、United States of America) 4 μl、0.1 M DTT (ThermoFisher SCIENTIFIC 株式会社、Massachusetts、United States of America) 1 μl、RNaseOUT (ThermoFisher SCIENTIFIC 株式会社、Massachusetts、United States of America) 1 μl、SuperScriptIII(ThermoFisher SCIENTIFIC 株式会社、Massachusetts、United States of America)1 μl の計 7 μl をサンプル毎に入れた。RT-PCR の条件は①25 °C ・ 5 分間→②50 °C ・ 50 分間→③70 °C ・ 15 分間とした。最後に RNaseH (ThermoFisher SCIENTIFIC 株式会社、Massachusetts、United States of America) を 1 μl ずつ入れ、37 °C ・ 20 分間反応させることで RNA を分解した。

次に合成した cDNA の *VAV1* の発現量を調べるため、定量 PCR を行った。最初に各サンプルを 1:10、1:100、1:1000 に希釈した。次に氷上にて、マスターミックスを作製した。*VAV1* 測定用の組成は FastStart Universal Probe Master (ROX) (F.Hoffmann-La Roche, Ltd、Basel-Stadt、Switzerland)10 μl、20×Taqman® Gene Expression Assays (Thermo Fisher SCIENTIFIC 株式会社、Massachusetts、United States of America) 1 μl、蒸留水 4 μl、続いて内部標準測定用(18s ribosomal RNA)の組成は FastStart Universal Probe Master

(ROX) 10  $\mu$ l、Ribosomal RNA Primer 1.25  $\mu$ l (Forward・Reverse Primer ともに 10  $\mu$ M のものを 10 倍希釈して使用)、Ribosomal RNA Probe (VIC™ dye) 1.25  $\mu$ l、蒸留水 4.25  $\mu$ l とした。マスターミックスを PCR プレート (ナカライテスク株式会社、Kyoto、Japan) にアプライした。次に希釈したサンプル、スタンダードサンプル (Jurkat 細胞を使用)、negative control の蒸留水を加えて軽く遠心した。7500 Fast System (Thermo Fisher SCIENTIFIC 株式会社、Massachusetts、United States of America) を用い、条件は①50 °C・2 分間→②95 °C・10 分間→③95 °C・15 秒間→④60 °C・1 分間 (③・④を 40 回繰り返し) とした。解析は 7500 software v2.0.5 を使用した。

VAV1 変異の発現は、それぞれ高発現・中発現・低発現の 3 つの系統を定義し、それぞれの系統を交配により増殖させた。

### 3-1-5 Copy number 解析

前述した 3-1-4 で VAV1 の発現量を確認し、それぞれ VAV1 変異の高発現・中発現・低発現と定義した系統のマウスの尻尾からフェノール・クロロホルム法により DNA を抽出した。抽出した DNA をテープ型電気泳動システム 2200 TapeStation (Agilent Technologies 株式会社、California、United States of America) を用いて Quality Check と定量を行った。

次に遺伝子導入された1細胞あたりの VAV1 のコピー数を調べるため、定量 PCR を行った。野生型 VAV1 を挿入した VA ベクターのプラスミドをコントロールとし、内部標準測定用として actin のプライマーを使用した。最初にコントロールのプラスミドを 20 ng/ $\mu$ l に希釈し、抽出した尻尾の DNA をそれぞれ 2.5 ng/ $\mu$ l に希釈した。次に氷上にて、マスターミックスを作製した。

VAV1 測定用の組成は FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (F.Hoffmann-La Roche, Ltd, Basel-Stadt, Switzerland) 10  $\mu$ l、3-1-3 で使用した VAV1 のプライマー Forward・Reverse 0.4  $\mu$ l ずつ、蒸留水 4.2  $\mu$ l、続いて内部標準測定用(actin)の組成は FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (F.Hoffmann-La Roche, Ltd, Basel-Stadt, Switzerland) 10  $\mu$ l、actin のプライマー Forward・Reverse 0.4  $\mu$ l ずつ、蒸留水 4.2  $\mu$ l とした。マスターミックスを PCR プレート (ナカライテスク株式会社、Kyoto, Japan) にアプライした。次に希釈したサンプル、コントロールサンプル、negative control の蒸留水を加えて軽く遠心した。7500 Fast System (Thermo Fisher SCIENTIFIC 株式会社、Massachusetts, United States of America) を用い、条件は①50 °C・2 分間→②95 °C・10 分間→③95 °C・15 秒間→④60 °C・1 分間 (③・④を 40 回繰り返し) とした。解析は 7500 software v2.0.5 を使用した。

### 3-2 Fluorescence activated cell sorting (FACS)解析

マウス生後8週以降4週経過毎、あるいは体重減少・衰弱・呼吸回数の上昇などの症状が見られた際にサンプルの採取を行った。末梢血はマウスの頸静脈をランセットで穿刺し EDTA-2Na（富士フイルム和光純薬株式会社、Osaka、Japan）の抗凝固剤の入った 1.5 ml エッペンチューブに末梢血を採取した。マウスを頸椎脱臼で安楽死させた後、両足から大腿骨・頸骨を、脾臓・胸腺・肝臓・肺・リンパ節などを採取した。骨髄細胞は大腿骨・頸骨から取り出し、脾臓・胸腺などの臓器は細かくすりつぶし、得られた細胞液を 22 G の針のついたシリンジで吸引と輩出を繰り返し、末梢血は 3~4 回、その他の細胞は 1 回塩化アンモニウム溶血剤によって溶血処理を行った。溶血処理を行った後、2.5 % FCS を加えた PBS で洗浄し、洗浄後のペレットにそれぞれ解析を行う細胞種類の抗体を組み合わせ、氷上で遮光しながら 30 分間インキュベートした。反応後洗浄処理を行い、7-AAD（Thermo Fisher SCIENTIFIC 株式会社、Massachusetts、United States of America）を添加した FCS-PBS をそれぞれ 100  $\mu$ l ずつ加え、ナイロンメッシュを通じて 1.2 ml マイクロチューブに移し、FACS Aria II で解析した。解析を行った細胞種類と抗体の組み合わせは表に示す。（表 2）

### 3-3 マウスの組織の処理

#### 3-3-1 標本作製

マウスから採取した脾臓・胸腺・肺・肝臓・リンパ節の一部は 10 %ホルマリン PBS 溶液で固定し、組織標本作製室に提出し Hematoxylin-Eosin (HE) 染色された組織標本を作製してもらった。また、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を pH9.0 の Tris-EDTA 溶液に入れ、室温 20 分~40 分間で賦活化した後、抗マウス CD3 抗体 (1:50, Clone: SP7, abcam 株式会社、Cambridgeshire、United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland)、CD4 抗体 (1:500, Clone: EPR19514, abcam 株式会社、Cambridgeshire、United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland)、CD8a 抗体 (1:500, Clone: EPR20305, abcam 株式会社、Cambridgeshire、United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland) CD45R (B220) ビオチン化抗体 (1:400, Clon: RA3-6B2, BD Bioscience、New Jersey、United States of America)、または phospho-VAV1 (Tyr174) 抗体 (1:100, Clone: polyclonal, Thermofisher SCIENTIFIC 株式会社、Massachusetts、United States of America) を加え室温で 30 分間あるいは 4 °C で一晩インキュベートした。二次抗体は、抗マウス CD3・CD4・CD8a 抗体に関しては EnVision+ System-HRP, Labelled Polymer (Rabbit) (Agilent technologies 株式会社、California、United States of

America)、抗マウス CD45R 抗体に関しては ImmPRESS HRP Anti-Rat IgG Polymer (VECTOR LABORATORIES、California、United States of America)、抗 phospho-VAV1 抗体に関しては SignalStain Boost IHC Detection Reagent (HRP, Rabbit) (Cell Signaling TECHNOLOGY、Massachusetts、United States of America) を用い室温で 30 分間インキュベートした。HE 染色および免疫組織化学染色された標本はオールインワン蛍光顕微鏡 BZ X710 (KEYENCE JAPAN、Osaka、Japan) で撮影した。

また、凍結組織切片標本を作製するため、マウスから採取したサンプルは 4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液 (富士フイルム和光純薬株式会社、Osaka、Japan) でまず 4 °C・1 時間固定し、新たな 4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液に入れ直して 4 °C・4 時間再度固定、その後 PBS で洗浄してから 30%スクロース溶液に 4 °C・12 時間以上インキュベートした。組織片を溶液から取り出し、水分を完全に拭き取ってから Optimal Cutting Temperature (O.C.T.) コンパウンド (サクラファインテックジャパン株式会社、Tokyo、Japan) に組織片を包埋し、液体窒素で凍結した。それぞれのブロックはクリオスタットを用い 5 μm 切片にスライスし、1 時間乾燥させた後、抗マウス CD3 抗体 (1:500, Clone: 17A2, BioLegend、California、United States of America)、cMyc 抗体 (1:100, Clone: Y69, abcam 株式会社、



Cambridgeshire, United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland) を加え、4 °Cで一晩インキュベートした。それぞれの二次抗体を 1:20000 に希釈し、室温で 60 分間インキュベートした。DAPI (Vectashield Mounting Medium; VECTOR LABORATORIES, California, United States of America) でインキュベートした後、染色されたサンプルを TCS SP5 共焦点レーザー走査型顕微鏡 (Leica Microsystems, Tokyo, Japan) で撮影した。

### 3-3-2 T細胞受容体刺激による VAV1 のリン酸化の確認

マウスから採取した脾臓を細かくすりつぶし、得られた細胞液を 22 G の針のついたシリンジで吸引と排出を繰り返し、1 回塩化アンモニウム溶血剤によって溶血処理を行った。溶血処理を行った後、EasySep Mouse CD4 Naïve T Cell Isolation Kit (STEMCELL Technologies, British Columbia, Canada) を用いて脾臓から CD4 陽性ナイーブ T 細胞を分取した。EasySep Buffer (1 mM EDTA、2 % FCS、PBS) に細胞を  $1 \times 10^8$  個/mL になるように溶解し、Rat serum (STEMCELL Technologies, British Columbia, Canada) を 50  $\mu$ l/mL 加え、Isolation Cocktail (STEMCELL Technologies, British Columbia, Canada) を 50  $\mu$ l/mL 加え室温で 7.5 分間インキュベートした。次に Depletion Cocktail (STEMCELL Technologies, British Columbia, Canada)

を 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  加え室温で 2.5 分間インキュベートした。その後、RapidSpheres (STEMCELL Technologies、British Columbia、Canada) を 75  $\mu\text{L}/\text{mL}$  加え 2.5 分間インキュベートした。最後に混合液を計 2.5 mL になるよう EasySep Buffer を加え、EasySep Magnet (STEMCELL Technologies、British Columbia、Canada) にチューブを入れ 2.5 分間インキュベートした。上清を別のチューブへ移し上清中に含まれている CD4 陽性ナイーブ T 細胞の細胞数をカウントした。1 x 10<sup>4</sup> 個の細胞を RPMI-1640 Medium (Sigma-Aldrich、Missouri、United States of America) に 1 % Penicillin-Streptomycin (PS) (富士フイルム和光純薬株式会社、Osaka、Japan)、1 % ピルビン酸ナトリウム (ThermoFisher SCIENTIFIC 株式会社、Massachusetts、United States of America)、1% nonessential amino acids (ThermoFisher SCIENTIFIC 株式会社、Massachusetts、United States of America)、1 % HEPES (ThermoFisher SCIENTIFIC 株式会社、Massachusetts、United States of America)、50  $\mu\text{M}$  2-メルカプトエタノール (富士フイルム和光純薬株式会社、Osaka、Japan) を加えた培地 100  $\mu\text{l}$  で懸濁し、96 well のプレートに入れ、5 % CO<sub>2</sub>・37 °C のインキュベーター内で 2 時間培養した。上記培地にさらに 20 % FCS、40 ng/ml リコンビナントマウス IL-2 (富士フイルム和光純薬株式会社、Osaka、Japan) となるように添加された培地 100  $\mu\text{l}$  を用い、Dynabeads Mouse T-Activator

CD3/CD28 for T-Cell Expansion and Activation (ThermoFisher SCIENTIFIC 株式会社、Massachusetts、United States of America) 2  $\mu$ l/well になるよう懸濁し加え、刺激を加えてから 1 分後、2 分後、5 分後に細胞を回収した。回収した細胞は Phosflow Lyse/Fix Buffer (BD Bioscience、New Jersey、United States of America) および Phosflow Perm Buffer III (BD Bioscience、New Jersey、United States of America) により処理され、細胞表面抗原抗体と Alexa Fluor 488 で標識された抗ヒト/マウス phospho-VAV1 抗体 (abcam 株式会社、Cambridgeshire、United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland) で染色し、FACS AriaIII で解析した。解析を行った細胞種類と抗体の組み合わせは表に示す。(表 3)

### 3-3-3 T 細胞受容体刺激によるナイーブ T 細胞分化の偏りの確認

3-3-2 で示した方法で CD4 陽性ナイーブ T 細胞を回収し、 $2.5 \times 10^5$  個の細胞を RPMI-1640 Medium (Sigma-Aldrich、Missouri、United States of America) に 10 % FCS、1 % Penicillin-Streptomycin (PS) (富士フイルム和光純薬株式会社、Osaka、Japan)、1 % ピルビン酸ナトリウム (ThermoFisher SCIENTIFIC 株式会社、Massachusetts、United States of America)、1 % nonessential amino acids (ThermoFisher SCIENTIFIC 株式会社、

Massachusetts、United States of America)、1 % HEPES (ThermoFisher SCIENTIFIC 株式会社、Massachusetts、United States of America)、50  $\mu$ M 2-メルカプトエタノール (富士フイルム和光純薬株式会社、Osaka、Japan) を加えた培地 500  $\mu$ l で懸濁し、48 well のプレートに入れ、Dynabeads Mouse T-Activator CD3/CD28 for T-Cell Expansion and Activation (ThermoFisher SCIENTIFIC 株式会社、Massachusetts、United States of America) 25  $\mu$ l/well になるように加え、5 % CO<sub>2</sub>・37 °C のインキュベーター内で培養した。培養開始してから 2 日後に培地を半分ほど新規培地に入れ替え、5 日後・7 日後に細胞数をカウントし、1 x 10<sup>6</sup> 個/mL になるように再調整し 24 well のプレートに播種し直した。8 日後、刺激された細胞を回収し、細胞表面抗原を一次抗体で染色した後、Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (ThermoFisher SCIENTIFIC 株式会社、Massachusetts、United States of America) を用い細胞を処理し、Alexa Fluor 488 で標識された抗ヒト/マウス GATA3 抗体 (ThermoFisher SCIENTIFIC 株式会社、Massachusetts、United States of America) で染色し、FACS AriaIII で解析した。解析を行った細胞種類と抗体の組み合わせは表に示す。(表 3)

#### 3-3-4 細胞自律的な腫瘍増生能の確認

マウスから得られた腫瘍細胞の細胞数をカウントし、 $2 \times 10^7$  個を PBS 200  $\mu$ l に懸濁し、放射線 2 Gy を照射した免疫不全マウス BALBc/nude（日本チャールスリバー株式会社、Kanagawa、Japan）に腹腔内投与した。腹腔内投与を行ってから腫瘍発症や、死亡するまで観察し、採取した血液や得られた腫瘍細胞は前述した方法で血算・細胞表面マーカーの解析、標本作製を行った。また、一次移植で得られた腫瘍細胞をさらに二次移植したヌードマウスを用い、2 % DMSO/30 % PEG300/5 % Tween80 となるよう蒸留水（富士フイルム和光純薬株式会社、Osaka、Japan）に懸濁し、JQ1（Selleck chemicals、Texas、United States of America）を溶解させ 3 mg/kg を 2 日に 1 回腹腔内投与し、VAV1 変異の発現の有無により治療の効果に違いがあるかを観察した。

### 3-4 腫瘍サンプルを用いた次世代シーケンス

#### 3-4-1 全トランスクリプトーム解析（WTA）

腫瘍未発症のマウスの脾臓から CD4 陽性 T 細胞を FACS Aria II で分取し、Total RNA を RNeasy mini kit（Qiagen、Limburg、the Kingdom of the Netherlands）を用いて精製した。精製中、RNase-Free DNase Set（Qiagen、Limburg、the Kingdom of the Netherlands）を用い 3 回 DNase 処理を行い十分 DNA 除去を行った。Agilent 2100 バイオアナライザ電気泳動システム

(Agilent technologies 株式会社、California、United States of America) により RNA サンプルの質と量を測定し、SMARTer Stranded Total RNA-Seq Kit v2-Pico Input Mammalian (TAKARA HOLDINGS 株式会社、Kyoto、Japan) のプロトコルに則り、cDNA ライブラリ作成を行った。

また、マウスから得られた腫瘍細胞の Total RNA を RNeasy mini kit (Qiagen、Limburg、the Kingdom of the Netherlands) を用いて精製した。Agilent 2100 バイオアナライザ電気泳動システム (Agilent technologies 株式会社、California、United States of America) により RNA サンプルの質と量を測定し、RNA Integrity Number が 8.0 未満のものはサンプル調整から除外した。TruSeq® RNA Sample Preparation (Illumina 株式会社、California、United States of America)、NGS MagnaStand 8Ch (日本ジェネティクス株式会社、Tokyo、Japan)、SuperScript™ II Reverse Transcriptase (ThermoFisher SCIENTIFIC 株式会社、Massachusetts、United States of America)、Agencourt AMPure XP (BECKMAN COULTER Life Science、California、United States of America) を用いて cDNA ライブラリの作製を行った。

Agilent 2100 バイオアナライザ電気泳動システム (Agilent technologies 株式会社、California、United States of America) により作製した cDNA ライブラリサンプルの Quality Check と定量を行い、腫瘍未発症のマウスの脾臓から得

られた cDNA ライブラリは株式会社マクロジェン・ジャパン (Kyoto, Japan) の次世代シーケンサー HiSeqX (Illumina 株式会社, California, United States of America) で解析を行った。腫瘍細胞から得られた cDNA ライブラリは Nextseq High output 75 cycle (Illumina 株式会社, California, United States of America) を用い、つくば i-Laboratory 検査部の次世代シーケンサー NextSeq 500 で解析を行った。得られたデータの解析は mm10 マウスリファレンスゲノム上にシーケンシングリードをマッピングし行い、CLC Genomics Workbench version 9.5.1 (Qiagen, Limburg, the Kingdom of the Netherlands) を用いて定量化した。各群で有意に高発現を認める経路を同定するため、2 つ以上のサンプルで 1RPKM 以上発現している遺伝子について、Molecular Signature Database (MSigDB) 遺伝子セット (hallmark および C2: curated gene set: v7.0) を用いた Gene Set Enrichment Analysis (GSEA: v.4.0.1) (<http://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp>)<sup>44,45</sup> を行った。TH1・TH2 細胞の比較には MSigDB 遺伝子セットの GSE14308<sup>46</sup>、TFH・TH2 細胞の比較には MSigDB 遺伝子セットの GSE11924<sup>47</sup> を使用した。また、Gene Ontology enrichment analysis は Metascape (<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>)<sup>48</sup> を用いて行った。腫瘍細胞の TH2 および TFH 細胞の遺伝子群の発現を使用し層別化した図では、

MORPHEUS (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>) を用いて行った。

### 3-4-2 全エクソンシーケンス解析 (WES)

得られた腫瘍組織から QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Limburg, the Kingdom of the Netherlands) を用いて DNA を精製した。また、腫瘍を発症したマウスの尻尾から DNA を前述のフェノール・クロロホルム法で精製した。精製した DNA をテープ型電気泳動システム 2200 TapeStation (Agilent technologies 株式会社, California, United States of America) を用いて Quality Check を行い、最終 DNA 量を 200 ng、溶液量 50  $\mu$ l となるように TE Buffer (ThermoFisher SCIENTIFIC 株式会社, Massachusetts, United States of America) で調整した。microTUBE AFA Fiber Pre-Slit Snap-Cap (Covaris, Massachusetts, United States of America) にサンプルをアプライし、DNA Shearing システム S220 (Covaris, Massachusetts, United States of America) で DNA の断片化を行った。SureSelect<sup>XT</sup> Low Input Target Enrichment System for Illumina Paired-End Multiplexed Sequencing Library (Agilent technologies 株式会社, California, United States of America)、Agencourt AMPure XP を用いて cDNA ライブラリを作製した。テープ型電気



泳動システム 2200 TapeStation により作製した cDNA ライブラリサンプルの Quality Check と定量を行った。シーケンスは株式会社マクロジェン・ジャパン (Kyoto, Japan) で HiSeq X により 150 bp x 2 モードで行った。シーケンスデータの GRCm38/mm10 マッピングおよび体細胞変異解析は Genomon パイプライン (<https://github.com/Genomon-Project/GenomonPipeline>) のデフォルトパラメタを用いて行った。得られたデータは統計学的解析により Fisher's exact P-value < 0.01 かつ EB call P-value > 2.0 の変異のみを有意なものとして採用した。

遺伝子変異は Integrative Genomic Viewer (IGV) (BROAD: <http://www.broadinstitute.org/igv/home>) を用いた manual inspection を行った。全エクソンシーケンス解析データを用いたコピー数解析には、copywriteR (<https://github.com/PeeperLab/CopywriteR>) を、また、T 細胞受容体再構成の解析には、MiXCR (<http://mixcr.readthedocs.io/en/master/>) を用いて行った。

## 4. 結果

### 4-1 *Trp53* アレルノックアウトマウスにおける VAV1 変異体の発現

VAV1 変異遺伝子改変マウスを樹立するために、ヒト PTCL サンプルに由来する二つの VAV1 変異 cDNA、V-Del および V-Fus を CD2 プロモーター下において発現するマウスの作製を生命科学動物資源センターへ委託した。作製された VAV1 変異の発現を有するマウスは、定量 PCR により Jurkat 細胞における *Actβ* の発現と比較した VAV1 の発現量と比較し、VAV1 変異の発現を調べ、それぞれ高発現・中発現・低発現であったものの 3 つの系統を選定した。それぞれの 3 つの系統は遺伝子導入された 1 細胞あたりの VAV1 のコピー数を調べるため、定量 PCR を行った。それぞれの系統のマウスそれぞれ 3 匹ずつコピー数解析を行った結果を表 4 に示す。(表 4) このコピー数解析は、非ラジオアイソトープ法によるサザンブロットでも解析を行ったが、試行を繰り返したものの実験系の確立が出来ず断念した。世代数の違いによるコピー数の変動が、表現型の変化を起こす可能性もあるため、F2 世代のマウスの凍結胚の保存を行い、解析に関しては少なくとも大きく世代が異なるマウスを使用はせずに行った。

この結果からそれぞれのマウスの系統を高発現・中発現・低発現系統と定義し、特に高発現と定義された系統を繁殖させ解析を行った。また、ヒト PTCL、特に PTCL-GATA3 と定義されている疾患において、*TP53* 変異と VAV1 変異が共存していることが報告されており、<sup>4</sup> (図 2C) 腫瘍発症を促進

する目的も含めて V-Del・V-Fus と *Trp53*<sup>-/-</sup>マウスを交配させ、*Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウスあるいは *Trp53*<sup>+/-</sup> *VAV1-Tg* マウスを作製した。また、*VAV1* cDNA の挿入および *Trp53* アレルノックアウトの状態を確認するため、産まれたマウスの尻尾から抽出された DNA のジェノタイピングの結果を図 2D に示す。(図 2D)

8 週齢で、野生型・*VAV1-Tg*・*Trp53*<sup>-/-</sup>・*Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* のマウスから末梢血を採取し、それぞれのマウスの顆粒球・B 細胞・T 細胞の血球数と分画を評価した。*VAV1-Tg*・*Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* のマウスにおいて血液中の CD3 陽性 T 細胞が野生型マウスと比較して有意に増加していた。(図 2E)

次に 12 週齢の各マウスにおいて、脾臓および胸腺の細胞を回収しフローサイトメトリーで解析を行った。*Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウスでは脾臓の CD4 陽性 CD62L 陽性 CD44 陰性と定義されるナイーブ T 細胞の頻度が野生型マウスと比較して有意に減少し、一方で CD4 陽性 CD62L 陰性 CD44 陽性と定義されるメモリー T 細胞の頻度が野生型マウスと比較し有意に増加していた。また、programmed cell death 1 (PD-1) および inducible T-cell co-stimulator

(ICOS) を発現する CD4 陽性細胞も野生型マウスと比較して有意に増加していた。(図 3A) 胸腺においては、CD4・CD8 DN の分画における CD44 陰性 CD25 陽性で定義される DN3 の細胞数が、野生型または *Trp53*<sup>-/-</sup>マウスと比較して有意に増加していた。(図 3B) これらのデータは、*Trp53*<sup>-/-</sup>の状態のマウスにおいて *VAV1* 変異体の発現は、胸腺における DN3 段階での胸腺細胞の発達を部分的に損なうこと、および脾臓における CD4 陽性 T 細胞の分化に偏り

があることを示唆している。

また、V-Fus または野生型マウスから採取したナイーブ T 細胞の T 細胞受容体を刺激し、VAV1 のリン酸化をフローサイトメトリーで解析を行った。抗ヒト/マウスリン酸化 VAV1 抗体の標的部位が Tyr174 であるため、その部位が欠損している V-Del のマウスでは行わなかった。リン酸化 VAV1 の発現レベルは、T 細胞受容体刺激の有無にかかわらず、野生型マウス由来のナイーブ T 細胞よりも V-Fus マウス由来のナイーブ T 細胞の方が高かった。(図 4)

*Trp53<sup>-/-</sup> VAV1-Tg* マウスは *Trp53<sup>-/-</sup>* マウスよりも短い期間で腫瘍を発症し死亡した。( *Trp53<sup>-/-</sup> V-Del*, median 16.6 weeks; *Trp53<sup>-/-</sup> V-Fus*, median 18.6 weeks; vs *Trp53<sup>-/-</sup>*, median 33.7 weeks:  $p < 0.001$ ) 一方で、野生型・*VAV1-Tg* マウスは 60 週以上の全観察期間中生存していた。(図 5A) さらに *Trp53<sup>+/-</sup> VAV1-Tg*・*Trp53<sup>+/-</sup>* マウスは腫瘍発症を促進させるため、およそ 8 週齢の時点において、4 Gy の放射線照射を行った。照射された *Trp53<sup>+/-</sup> VAV1-Tg* マウスにおいても、照射された *Trp53<sup>+/-</sup>* マウスよりも短い期間で腫瘍を発症し死亡した。( *Trp53<sup>+/-</sup> V-Del*, median 22.6 weeks; *Trp53<sup>+/-</sup> V-Fus*, median 22.6 weeks; vs *Trp53<sup>+/-</sup>*, median 31.3 weeks:  $p < 0.001$ ) (図 5B)

肉眼的観察および CT スキャンにより、腫瘍を有する *Trp53<sup>-/-</sup> VAV1-Tg* マウスは顕著な胸腺腫大あるいは脾腫を示し、時にリンパ節腫脹および節外腫瘍を伴うことが明らかになった。一方で *Trp53<sup>-/-</sup>* マウスは胸腺腫大のみを認めていた。(図 5C・D) これらの腫瘍はフローサイトメトリーで解析され、CD3 陽性の腫瘍細胞であり、T 細胞の腫瘍であることが考えられた。T 細胞の胸腺で

の分化は、CD4 CD8 DN の状態から CD8 SP、CD4 CD8 DP の状態を経て CD4 あるいは CD8 SP の T 細胞に分化していく。その過程で、主に CD4 CD8 DP の T 細胞まで発現している CD24 を未分化、前駆 T 細胞の細胞表面抗原と定義、一方で CD4 CD8 DP の T 細胞ではほとんど発現が検出されず、CD4 あるいは CD8 SP の T 細胞に発現している細胞表面の membrane TCR $\beta$  (mTCR $\beta$ ) を成熟 T 細胞の細胞表面抗原と定義した。CD24 $\cdot$ mTCR $\beta$  によって、分化段階を解析され、主に胸腺腫大で発症していた腫瘍は CD24 が陽性であり、ヒトにおける未分化な T 細胞腫瘍 T-LBL、脾腫で発症していた腫瘍は CD24 陽性細胞をほとんど認めず、また mTCR $\beta$  が陽性であることから成熟 T 細胞腫瘍 Lym として定義した。放射線照射された *Trp53*<sup>+/-</sup> *VAV1-Tg*  $\cdot$  *Trp53*<sup>+/-</sup> マウスで発症した腫瘍は、T-LBL あるいは非造血器腫瘍であったが、*Trp53* 野生型対立遺伝子はこれらの腫瘍において欠失していた。(図 5E)

T-LBL で最も多く確認された免疫表現型は、*Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウスでは CD8 SP、*Trp53*<sup>-/-</sup> マウスでは CD4 CD8 両陽性 (DP) であり、CD8 SP の T-LBL 発症は有意に *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウスで高かった。(p = 0.004) さらに *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウスでは T-LBL だけでなく成熟 T 細胞性腫瘍である Lym が観察された一方で、*Trp53*<sup>-/-</sup> マウスでは T-LBL しか確認されなかった。(p < 0.05) (図 6A $\cdot$ B) T-LBL は主に胸腺、Lym は脾臓に腫瘍を認めていたが、T-LBL の腫瘍は胸腺外の肺 $\cdot$ 胸水 $\cdot$ 肝臓に浸潤していたもの (*Trp53*<sup>-/-</sup> V-Del, 87 % (13/15); *Trp53*<sup>-/-</sup> V-Fus, 57 % (8/14); *Trp53*<sup>-/-</sup>, 50 % (6/12))、Lym の腫瘍は全てのマウスで脾臓外に転移を認め、肺 $\cdot$ 胸腹水 $\cdot$ 肝臓 $\cdot$ 腎臓 $\cdot$ 骨髄など

に浸潤していたもの (*Trp53*<sup>-/-</sup> V-Del, 100 % (4/4); *Trp53*<sup>-/-</sup> V-Fus, 100 % (8/8)) を確認した。(図 6B) また、既報<sup>26</sup>にあるようにフローサイトメトリーによって分化段階を解析したところ、*Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウスの T-LBL は CD24 陽性 mTCR $\beta$  高発現を示した一方で、*Trp53*<sup>-/-</sup> マウスの T-LBL は CD24 陽性 mTCR $\beta$  低発現を示した。(図 7A) これらのデータは *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウスから得られた T-LBL の腫瘍サンプルが、*Trp53*<sup>-/-</sup> マウスから得られた腫瘍サンプルよりも分化していることを示唆している。

また、*Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウスの Lym の一部は CD4 SP であったが、主に CD4 CD8 DN であった。(図 7B) 全ての Lym の腫瘍細胞は、CD24 陰性 mTCR $\beta$  陽性の成熟 T 細胞の免疫表現型を示し、PD-1 陽性 ICOS 陽性の TFH 細胞様および CD62L 陰性 CD44 陽性のメモリー細胞様の表現型を示した。(図 7B・C) 解析を行うことのできた Lym は、少ない個体数ではあるが、CD8 陽性の Lym は 1 個体も認めなかった。

HE 染色では、T-LBL を発症したマウスから得られた胸腺が腫瘍細胞である幼若なリンパ球によって浸潤されており、皮髄境界が壊れていることを確認した。(図 8A) また、Lym を発症したマウスから得られた脾臓が腫瘍細胞である成熟リンパ球によって浸潤され、濾胞の拡大あるいは破壊が確認された。(図 8B) また、それぞれの標本は CD3、CD4、および CD8 の免疫組織化学染色で確認した。(図 9・10) 野生型マウスにおける内因性 VAV1 タンパク質の活性化あるいは、*Trp53*<sup>-/-</sup> V-Fus マウスにおける外因性 V-Fus 変異体の活性化の状態を確認するため、免疫組織化学染色によりリン酸化 VAV1 を評価した。

*Trp53*<sup>-/-</sup> V-Del マウスに関しては VAV1 のリン酸化部位 Tyr174 を欠いた変異体であり、抗体の標的抗原が欠損しているため評価は出来なかった。*Trp53*<sup>-/-</sup> V-Fus マウス由来の Lym サンプルのみでリン酸化 VAV1 を確認した。(図 10)

#### 4-2 *Trp53*<sup>-/-</sup> VAV1-Tg および *Trp53*<sup>-/-</sup> マウスの腫瘍細胞の細胞自律的な腫瘍増生能の確認

今回得られた腫瘍細胞の細胞自律的な増殖能を評価するために、*Trp53*<sup>-/-</sup> VAV1-Tg および *Trp53*<sup>-/-</sup> マウスから得られた T-LBL の胸腺腫瘍細胞、および *Trp53*<sup>-/-</sup> VAV1-Tg マウスから得られた Lym の脾臓腫瘍細胞を、2 Gy の放射線照射を行った免疫不全マウス BALBc/nude (ヌードマウス) に腹腔内注射で移植を行った。*Trp53*<sup>-/-</sup> VAV1-Tg マウスから得られた T-LBL を移植したレシピエントマウスは、*Trp53*<sup>-/-</sup> マウスから得られた T-LBL を移植したマウスよりも短い期間で腫瘍を発症し死亡した。(図 11A) さらに *Trp53*<sup>-/-</sup> VAV1-Tg マウスから得られた Lym を移植したレシピエントマウスも腫瘍を発症したが、腫瘍発症までの期間は T-LBL を移植したレシピエントマウスよりも長かった。また、Lym を移植したレシピエントマウスから得られた腫瘍細胞をヌードマウスに二次的に移植を行ったところ、一次的に移植をされたレシピエントマウスより短い期間で腫瘍を発症し死亡した (図 11B)

T-LBL または Lym を移植したレシピエントマウスは、いずれも肝脾腫・リンパ節腫脹および腹水を確認した。レシピエントマウスの脾臓を HE 染色で確

認したところ、濾胞の拡大あるいは破壊が確認された。(図 11C) 腫瘍細胞を移植したレシピエントマウスの脾臓およびリンパ節の細胞の大半は、C57BL/6 のドナー由来であることを示す MHC ハプロタイプ抗原 H-2K<sup>b</sup> を発現していた。(図 12A・B) フローサイトメトリーおよび免疫組織化学染色による解析で、レシピエントにおいて確認された腫瘍細胞の表面抗原の表現型はドナーの腫瘍細胞と類似していることを確認した。(図 12C)

#### 4-3 *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウスの腫瘍細胞の遺伝子発現プロファイル

次に腫瘍発生の分子機構を明らかにするために、以下のグループから抽出した RNA を用いて WTA を行った。:1) *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウス由来の T-LBL 胸腺全体 (90%以上が腫瘍細胞)、*n* = 4 (*Trp53*<sup>-/-</sup> V-Del, *n* = 2 ; *Trp53*<sup>-/-</sup> V-Fus, *n* = 2)、2) *Trp53*<sup>-/-</sup> マウス由来の T-LBL 胸腺全体 (90%以上が腫瘍細胞)、*n* = 2、3)野生型マウス由来の CD4 CD8 DP の胸腺細胞、*n* = 3、4) *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウス由来の Lym の脾臓における腫瘍分画 (CD4 SP あるいは CD4 CD8 DN)、*n* = 5 (*Trp53*<sup>-/-</sup> V-Del, *n* = 3 ; *Trp53*<sup>-/-</sup> V-Fus, *n* = 2)、および 5)野生型マウスの CD4 SP あるいは CD8 SP の脾臓細胞、*n* = 6 (CD4 SP, *n* = 3 ; CD8 SP, *n* = 3) Principle component analysis (PCA) および Unsupervised clustering では T-LBL、Lym それぞれで野生型、*Trp53*<sup>-/-</sup> マウス、*Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウスで明瞭な異なるクラスターを形成していた。(図 13) 次に、T-LBL において *Trp53*<sup>-/-</sup> マウスと比較した *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウスで高発現を認めている遺伝子リスト、および Lym において野生型マウスと



比較した *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウスで高発現を認めている遺伝子リストを作成し、両方のリストに共通して3倍以上発現している36個の遺伝子、2倍以上発現している176個の遺伝子を同定した。(図14A) その36個の遺伝子の中で *Myc* が *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウスで高発現であった。また、T-LBLにおいては定量PCRによる解析により *Myc* の発現を調べ、*Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウスから得られたT-LBLは *Trp53*<sup>-/-</sup> マウスから得られたT-LBLよりも *Myc* の発現量が有意に高いことを確認した(図14B) また、この共通して高発現している遺伝子リストを使用し Metascape 解析<sup>48</sup>を行ったところ、細胞周期に関連する経路が高発現していた。(図14C)

次に WTA のデータについて GSEA<sup>44,45</sup> を行った。MSigDB の Hallmark gene matrix analysis の結果、*Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウス由来の T-LBL は *Trp53*<sup>-/-</sup> マウス由来の T-LBL と比較し、G2M checkpoint・E2F target・PI3K/Akt/mTOR signaling を含む経路が有意に高発現であった。また、これら *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウス由来の T-LBL で有意に高発現となっていた遺伝子リストは、*Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウス由来の Lym においても有意に高発現となっていた。(図14D) また、MSigDB の C2: curated gene set を使用した解析では、*Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウス由来の T-LBL および Lym の両方において、対照群と比較して複数の *Myc* 関連の遺伝子セットが高発現であったことを確認した。(図15A)

さらに *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウス由来の Lym について WTA の発現データを用い、どのようなタイプのヒト T 細胞性腫瘍を模倣しているかを確認した。フ

ローサイトメトリーでの解析では、PD-1 と ICOS を発現していることを確認したが、WTA の発現データでは PDCD1 や BCL6・CXCR5 を含む TFH 細胞を特徴付ける遺伝子セットは高発現を示さなかった。一方で、当研究室の先行研究で既に報告している AITL を模倣した腫瘍を発症する *TET2*<sup>-/-</sup>/*RHOA* *G17V* マウス<sup>49</sup> は TFH 細胞を特徴付ける遺伝子セットが高発現を示した。

(図 15B) 他の遺伝子セットを調べていたところ、驚くべきことに *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウス由来の Lym は、TFH 細胞ではなく TH2 細胞を特徴付ける遺伝子セットが高発現を示していた。(図 15C) これらのデータから *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウス由来の Lym がヒト T 細胞性腫瘍の中で、PTCL-GATA3 を模倣していることを示唆している。また、フローサイトメトリーの解析により、Lym 腫瘍細胞が PTCL-GATA3 の指標である *Ccr4* の発現が確認された。(図 16A) また、*Gata3* タンパク質の発現は、免疫組織化学染色で確認された。

(図 16A・B) 特に、GSEA による解析において、*VAV1* と *Trp53* 両方の遺伝子に変異を認めているヒト PTCL-GATA3 検体で、*Trp53* のみに変異を認めている PTCL-GATA3 検体よりも高発現であった遺伝子が、*Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウス由来の腫瘍細胞では、*Trp53*<sup>-/-</sup> マウス由来の腫瘍細胞よりも高発現という傾向を示した。また、*Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウス由来の腫瘍細胞で、*Trp53*<sup>-/-</sup> マウス由来の腫瘍細胞よりも高発現であった遺伝子も、反対に *VAV1* と *Trp53* 両方の遺伝子に変異を認めているヒト PTCL-GATA3 検体では、*Trp53* のみに変異を認めている PTCL-GATA3 検体よりも高発現という傾向を示した。(図 16C)

#### 4-4 腫瘍未発症時点におけるマウスの T 細胞遺伝子プロファイル

次に、各マウスの腫瘍未発症時点におけるマウスの T 細胞の遺伝子プロファイルを調べた。生後 12 週齢の腫瘍未発症のマウス、1) *Trp53*<sup>-/-</sup> V-Fus マウス、2) *Trp53*<sup>-/-</sup> マウス、3) 野生型マウス、これらのマウスの全脾細胞から CD4 陽性ナイーブ T 細胞およびメモリー T 細胞を分取し、抽出した RNA を用いて WTA を行った。*Myc* 遺伝子発現のデータは、野生型マウスの CD4 陽性ナイーブ T 細胞よりも *Trp53*<sup>-/-</sup> V-Fus マウスの CD4 陽性ナイーブ T 細胞の方が有意に高く、また、*Trp53*<sup>-/-</sup> マウスの CD4 陽性メモリー T 細胞よりも *Trp53*<sup>-/-</sup> V-Fus マウスの CD4 陽性メモリー T 細胞の方が有意に高かった。(図 17A) また、*Trp53*<sup>-/-</sup> V-Fus マウスの CD4 陽性メモリー T 細胞では *Trp53*<sup>-/-</sup> マウスの CD4 陽性メモリー T 細胞よりも *Gata3* の遺伝子発現が有意に高かった。(図 17B) また、MSigDB の Hallmark 遺伝子セットを使用し GSEA 解析を行ったところ、*Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウス由来の Lym で高発現を認めていた G2M checkpoint および E2F target が、野生型マウス由来の CD4 陽性メモリー T 細胞と比較して *Trp53*<sup>-/-</sup> V-Fus マウスの CD4 陽性メモリー T 細胞でも高発現であったことを確認した。(図 17C・D) 腫瘍未発症時点のマウスでは、炎症関連の経路も高発現となっていたが、これらの経路は *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウス由来の腫瘍細胞では認めていなかった。したがって、*Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウスの CD4 陽性 T 細胞では、腫瘍未発症の時点でも、G2M checkpoint および E2F target などの細胞周期に関連する経路の高発現、および *Myc* や *Gata3* が高

発現であることが観察されたが、複数の発がんに関与する経路や、特に Myc に関連した経路の発現は、腫瘍発症したマウスでのみ観察された。

各マウスから採取した CD4 陽性ナイーブ T 細胞の分化の偏りを調べるために、マウス T 細胞増殖刺激用マイクロビーズを使用し CD4 陽性ナイーブ T 細胞をサイトカインや抗体を含まない Neutral condition と、TH2 細胞分化誘導で広く用いられているリコンビナントマウス IL-4 と抗マウス IFN- $\gamma$  抗体を含んだ TH2 condition 下でそれぞれ刺激し、その後の Gata3 タンパク質の発現を確認した。Neutral condition において、*Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウス由来の CD4 陽性ナイーブ T 細胞で他のマウスのものよりも Gata3 の発現は高く、また、*VAV1-Tg* マウスにおいても野生型または *Trp53*<sup>-/-</sup> マウス由来の CD4 陽性ナイーブ T 細胞よりも発現は高かった。一方で TH2 condition 下においては、Gata3 発現のレベルに明確な差は見られなかった。(図 18) これらのデータは VAV1 変異体が TH2 細胞の表現型へ傾倒して分化誘導しており、*Trp53* 遺伝子の欠失によってさらに増強されることを示唆している。

#### 4-5 VAV1 変異体を発現する腫瘍のクローン構造

T-LBL および Lym 腫瘍細胞のクローン構造を調べるために、17 匹のマウス、1) *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* T-LBL、*n* = 7、2) *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* Lym、*n* = 7、3) *Trp53*<sup>-/-</sup> T-LBL、*n* = 3、から採取した腫瘍細胞と正常コントロールとしての尻尾の DNA を抽出し、WES 解析を行った。得られたデータは、IGV により解析をし、国立がん研究センター研究所片岡圭亮先生より提供していただいたヒ

トにおける ATL・PTCL-NOS の患者サンプルで得られた Targeted Sequencing あるいは WES のデータと比較した。<sup>11,20</sup>111 個の一塩基多型、18 個の塩基配列の挿入欠失、3 個の終始変異を含む 132 個の体細胞変異を検出した。ヒトにおける ATL・PTCL-NOS の患者サンプルで得られた Targeted Sequencing と共通して 2 つの変異が同定された。*Notch1* 変異は *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg*、*Trp53*<sup>-/-</sup>マウスの腫瘍両方で認められ、*Ddx3x* 変異は *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウスの腫瘍のみで認めた。また、*Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウスの腫瘍は、ヒト ATL あるいは PTCL-NOS で認められた *Jak1* および *Tet2* 変異を認めた。(図 19A)

次に、WES データを用いて SCNAs を分析した。合計で 5 つの SCNAs を同定し、2 つの増幅 (14qE1 と 15qD1) と 3 つの欠失 (6qB1、14aC2、16qA1) を認めた。(図 19B) 特に、*Myc* locus を含む 15qD1 の SCNAs は、4 匹の *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウスの腫瘍のみ (7 匹中 1 匹の T-LBL、および 7 匹中 3 匹の Lym) で共通して認めた。そのうちの 2 個体の Lym で *Myc* locus を含む 15qD1 の 8 倍以上の増幅を示した。(図 19C) 実際、*Myc* タンパク質は *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウスの CD3 陽性 T-LBL および Lym 腫瘍細胞では高度に発現していたが、*Trp53*<sup>-/-</sup>マウスの T-LBL 腫瘍細胞ではほとんど発現していなかった。(図 20A) また、WES データを用いた MiXCR アルゴリズムの解析により、全ての腫瘍において TCR 遺伝子の少なくとも 1 つのクローン性遺伝子再構成が同定された。Lym 腫瘍細胞は全て TCR  $\alpha$  鎖のクローン性遺伝子再構成を有し、一部の T-LBL にも認められていた。(図 20B)

#### 4-6 ブロモドメイン阻害剤による *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* 腫瘍細胞を有するマウスの生存期間の延長

*Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウス由来の腫瘍細胞における *Myc* の高発現あるいは増幅の結果から、*Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウス由来の腫瘍細胞あるいは *Trp53*<sup>-/-</sup> マウス由来の腫瘍細胞を移植したヌードマウスから得られた腫瘍細胞を二次移植したヌードマウスを用いて、*Myc* の活性を抑制することが知られている JQ1 の *in vivo* での効果を調べた。JQ1 は代表的なブロモドメイン阻害剤であり、BET ファミリーのヒストンアセチル化リジンへの結合を阻害するため、MYC だけでなく多くの転写因子の発言に影響を及ぼすことが知られている。<sup>50</sup>*Myc* 自体の活性を単独で抑制するマウスに使用できる薬剤はなかったこともあり、直接 *Myc* の活性を抑制するわけではなく、かつ、他の経路を抑制してしまっており、*Myc* の活性が抑制されることで有効性があると判断することはできないが、JQ1 を使用することとした。二次移植を受けたマウス、1) *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウス由来の T-LBL、*n* = 7、2) *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウス由来の Lym、*n* = 20、3) *Trp53*<sup>-/-</sup> マウス由来の T-LBL、*n* = 10、移植後 7 日目から JQ1 を 3mg/kg 2 日に 1 回腹腔内注射を行い、死亡するまで観察を行った。(図 21A) JQ1 は *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウス由来の腫瘍細胞を移植したレシピエントマウスの全生存期間を延長した。(JQ1 で治療された *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウス由来の T-LBL を移植したレシピエントマウス、中央値 4.4 週；懸濁液のみのコントロールマウス、中央値 3.4 週、*p* = 0.001；JQ1 で治療された *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウス由来の Lym を移植

したレシピエントマウス、中央値 4.7 週；懸濁液のみのコントロールマウス、中央値 3.3 週、 $p < 0.001$ ) (図 21B および C) 一方で、*Trp53*<sup>-/-</sup>マウス由来の T-LBL を移植したレシピエントマウスの全生存期間は、懸濁液のみのコントロールマウスと同等であった。(JQ1 で治療された *Trp53*<sup>-/-</sup>マウス由来の T-LBL を移植したレシピエントマウス、中央値 3.9 週；懸濁液のみのコントロールマウス、中央値 3.9 週、 $p = 0.665$ ) (図 21D) 前述のように、この結果のみで Myc の活性を抑制したことが腫瘍潜伏期間を改善することに寄与したと判断することはできず、実際に ATAC シーケンス解析などで Myc のスーパーエンハンサー領域のアクセシビリティの違いや、他の領域に影響が見られているかなどを確認する必要があると思われ、今後の研究課題とする。

## 5. 考察

今回の研究により、VAV1 変異体の発現は *Trp53* 欠失の存在下で、T 細胞性腫瘍の発症を促進することを確認した。V-Fus と V-Del の 2 種類の VAV1 変異体は、同様の表現型、遺伝子プロファイル、およびゲノム異常を示し、類似した T 細胞性腫瘍発症に関与した。*Trp53* 欠失のみのマウスで認められた T 細胞性腫瘍は CD24 陽性 mTCR $\beta$  低発現の幼若な T-LBL であったが、VAV1 変異体を発現する T 細胞性腫瘍はより分化した免疫表現型である CD24 陽性 mTCR $\beta$  高発現の T-LBL および Lym であった。

ヒトにおける PTCL-NOS は分子的な機構に応じて、PTCL-TBX21 あるいは PTCL-GATA3 のサブグループのいずれかに属するものとして分類される。<sup>2</sup>PTCL-GATA3 は高い *MYC* 発現を特徴とし予後が悪く、<sup>2,51</sup>、しばしば高い頻度で *MYC* の増幅を伴う複雑なゲノム異常を示す。<sup>4</sup> 今回の研究により得られた Lym は、むしろヒトにおける PTCL-GATA3 に類似していることを報告した。Lym 腫瘍を発症したマウスにおける腫瘍細胞の遺伝子プロファイルに基づいて TH2 細胞の表現型を示していた。(図 15B・C) また、Lym 腫瘍細胞における *Myc* の高発現および *Myc* locus の増幅も確認された。(図 19B・C) マウスモデルとヒト PTCL-GATA3 の遺伝子プロファイルを比較したところ、両者に比較的共通する特徴があることが認められた。(図 16C)

*Trp53*<sup>-/-</sup> VAV1-*Tg* マウス由来の Lym 腫瘍細胞では *Gata3* と同様に *Ccr4* の発現が確認された。(16A・B) CCR4 は ATL の症例で強く発現されているこ



とが報告されており<sup>52,53</sup>、ケモカインである TARC/CCL17 や MDC/CCL22 などの受容体であり<sup>54-56</sup>、その抗 CCR4 抗体であるモガムリズマブは現在 ATL の標準的な治療薬の一つとして考えられている。<sup>57</sup> また、ヒト PTCL-GATA3 では CCR4 の発現レベルが GATA3 の発現レベルと正の相関を示すことが既に報告されている。<sup>3</sup> モガムリズマブは、腫瘍細胞上に CCR4 を発現する一部の PTCL に対して有効であると報告されている。<sup>58</sup> したがって、VAV1 変異体を発現する PTCL はモガムリズマブが治療の選択肢となり得るため、CCR4 発現について評価されるべきであると考察される。

今回の実験結果では、腫瘍を発症する前の *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウスで認められた胸腺および脾臓に偏りを認められていた。脾臓において、PD-1・ICOS を発現する TFH 細胞様、CD62L 陰性 CD44 陽性のメモリー細胞様の分画の割合が増加していた。(図 3A) また、T 細胞受容体刺激の有無にかかわらず V-Fus を発現する CD4 陽性ナイーブ T 細胞、および Lym 腫瘍細胞において、T 細胞受容体シグナルの指標であるリン酸化 VAV1 が観察された。(図 4・図 10) 今回使用した抗ヒトリン酸化 VAV1 抗体は、マウスリン酸化 VAV1 抗体にも反応性を示しており、内在性のマウスリン酸化 VAV1 に反応した可能性も考えられた。しかしながら、当研究室の先行研究で、細胞株においては機能獲得型の変異であることが明らかとされている V-Del・V-Fus 両方のマウスから、同様の腫瘍が発症しているにもかかわらず、抗リン酸化 VAV1 抗体の標的的部位である Y174 が欠損している V-Del には反応が見られず、V-Fus のみに反応したことを考慮すると、今回の研究で見られたリン酸化 VAV1 の結果はヒト

リン酸化 VAV1 に対しての結果であることが考えられる。このリン酸化 VAV1 の結果を考察すると、TH2 細胞へ傾倒する分化と、高い *Myc* 発現を伴う Lym の発症は、慢性的な T 細胞受容体シグナルの活性化に起因している可能性がある。T 細胞受容体シグナルは、*Myc* の発現を含む細胞周期関連分子の活性化を行い、成熟 T 細胞の増殖を促進することが報告されている<sup>59</sup>が、T 細胞における持続的な T 細胞受容体シグナルの活性化は、増殖シグナルの調節を緩和して成熟 T 細胞性腫瘍の発症をもたらすことが知られている。<sup>60</sup>さらに、突然入る T 細胞受容体シグナルではなく、慢性的に入る T 細胞受容体シグナルは、CD4 陽性ナイーブ T 細胞が、TH1 細胞ではなく *Gata3* を発現する TH2 細胞への分化を誘導することが知られている。<sup>61</sup>実際、今回の研究において、*Trp53*<sup>-/-</sup> V-Fus マウス由来の腫瘍発症前の CD4 陽性ナイーブ T 細胞およびメモリー T 細胞において、細胞周期に関連する遺伝子セット (G2M checkpoint と E2F target) の高発現と、T 細胞受容体シグナルの下流で発現すると知られている *Myc* と *Gata3*<sup>62,63</sup> の発現がわずかに上昇していることを観察した。(図 17) Lym の発症に伴って、*Myc* locus の増幅や他の発がんイベントが起きることによって、これらの細胞周期に関連する遺伝子や *Myc*・*Gata3* のより高い発現などが引き起こされていると考察される。

一方、*Trp53*<sup>-/-</sup> V-Fus マウス由来の T-LBL 腫瘍細胞ではリン酸化 VAV1 は観察されず、*Trp53*<sup>-/-</sup> VAV1-*Tg* マウス由来の T-LBL の腫瘍発症は T 細胞受容体シグナルの活性化によるものではない可能性が示唆された。(図 9) 腫瘍を発症する前の *Trp53*<sup>-/-</sup> VAV1-*Tg* マウスで認められた胸腺では、DN3 分画の割

合が増加していた。(図 3B) 実際には VAV1 欠損マウスにおいて、胸腺細胞の分化、特に DN3 分画が増加することは既に複数の研究室から報告されている。V-Fus の、VAV1 変異体は ICN1 の分解を促進するユビキチンリガーゼである Cbl-b タンパク質との相互作用に必要とされる C 末端 SH3 ドメイン<sup>26</sup>を欠いている。そのため、ICN1 の分解が出来ず過剰発現<sup>64,65</sup>となり、その影響による Notch シグナルの活性化、または Notch1 遺伝子の機能獲得<sup>64,66</sup>が T-LBL の発症につながることを報告されている。したがって、*Trp53*<sup>-/-</sup> V-Fus マウスにおける T-LBL の発症は Notch1 の活性化に起因している可能性があるが、これらのメカニズムは未だ明らかにされていない。また、*Trp53*<sup>-/-</sup> VAV1-*Tg* マウス由来の T-LBL で見られる Myc 経路の活性化亢進は、Notch1 シグナルの活性化に起因するものである可能性がある。<sup>67,68</sup> これらのことは、今回用いた VAV1 変異体の、未分化な段階の T 細胞においては VAV1 機能喪失、分化した段階の T 細胞では機能獲得型の作用を示していることが考察された。

BET ファミリータンパク質は、ヒストンのアセチル化リジンに結合し遺伝子活性化を起こすタンパク質であり、BET ファミリーの中に BRD4 が存在する。BRD4 は MYC を含む発癌に関与する遺伝子の転写を促進する。<sup>69,70</sup> この BET ファミリーを阻害することは、多くの転写因子の発現レベルに影響を与え、<sup>50,71</sup> 多くの固形腫瘍や血液悪性腫瘍のマウスモデルや細胞株に有効性を支持する報告がある。<sup>72,73</sup> JQ1 などの BET 阻害剤は、Myc などの転写因子活性が抑制されてはいるものの、背景にあるゲノム異常が根治されていないことによる、限定的で一時的な治療効果の影響から、臨床応用に進められていない薬剤

である。<sup>74,75</sup> 今回のモデルマウスにおける JQ1 の腫瘍潜伏期間への影響は、JQ1 の作用機序を考慮すると Myc の活性を抑制したことのみが要因ではない可能性は十分考えられるが、実際に JQ1 によってゲノム領域におけるプロモドメインの結合は阻害され Myc の活性が抑制されている報告もある。<sup>74</sup> そのため、今回のモデルマウスでは、Myc の発現や増幅に影響を来す VAV1 変異体の腫瘍に対して、一時的に Myc の活性を抑制することによって腫瘍潜伏期間が延長された可能性はあるが、VAV1 変異体自体に影響を及ぼさなかったことから根治に結びつかなかったということが考察される。

以上のことより、T 細胞に VAV1 変異体を発現するモデルマウスを作製し T 細胞性腫瘍における VAV1 変異体の発がん性の役割を評価することができた。VAV1 変異体が *MYC* や *CCR4* の遺伝子発現に影響を及ぼし、PTCL-GATA3 に類似した PTCL の発症に関与していることがわかった。臨床応用として、ATL や CCR4 陽性の再発・難治性 PTCL で使用できる抗 CCR4 抗体のモガムリズマブ、現在は未だ開発中であるが、MYC の活性を抑制する新規薬剤などが、今なお予後不良疾患である PTCL の新たな治療戦略として、選択される可能性を示唆した。

## 6. 結語

本研究では次のことが明らかになった。

1. 今回の研究により、*VAV1*変異の発現の有無によって、主に CD8 単独陽性の T-LBL を発症し、また、CD4 単独陽性あるいは CD4,CD8 両陰性の Lym 発症の確率や予後に影響を与えている可能性があることを確認した。
2. *VAV1* 変異体の発現を有する Lym 腫瘍細胞は、TH2 細胞の遺伝子プロファイルと類似しており、*Ccr4* や *Gata3* のタンパク発現や、*Myc* の遺伝子発現データなどからヒト PTCL-GATA3 を模倣した腫瘍細胞であることを確認した。腫瘍未発症の時点より、*Gata3* や *Myc* の発現が高く、慢性的な T 細胞受容体シグナルが入ることによる TH2 細胞への傾倒分化が誘導されていることが原因と考えられた。
3. *VAV1* 変異体を発現する PTCL は、抗 CCR4 抗体や MYC シグナル経路を阻害する薬剤が、一つの治療選択肢として考えられ、*Trp53<sup>-/-</sup> VAV1-Tg* マウスが予後不良な PTCL に対する新規治療薬を模索するための一つのツールとしてなり得る可能性を示唆した。

## 7. 謝辞

研究をご指導頂きました筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻血液内科研究室の千葉滋教授、坂田麻実子准教授に深謝致します。

また、本研究を進めるにあたり、ご助言・ご指導頂きました同研究室の皆様  
に厚く御礼申し上げます。

## 8. 参考文献

1. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375-2390.
2. Iqbal J, Wright G, Wang C, et al. Gene expression signatures delineate biological and prognostic subgroups in peripheral T-cell lymphoma. *Blood*. 2014;123(19):2915-2923.
3. Amador C, Greiner TC, Heavican TB, et al. Reproducing the molecular subclassification of peripheral T-cell lymphoma-NOS by immunohistochemistry. *Blood*. 2019;134(24):2159-2170.
4. Heavican TB, Bouska A, Yu J, et al. Genetic drivers of oncogenic pathways in molecular subgroups of peripheral T-cell lymphoma. *Blood*. 2019;133(15):1664-1676.
5. Quivoron C, Couronne L, Della Valle V, et al. TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. *Cancer Cell*. 2011;20(1):25-38.
6. Couronne L, Bastard C, Bernard OA. TET2 and DNMT3A mutations in human T-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2012;366(1):95-96.
7. Cairns RA, Iqbal J, Lemonnier F, et al. IDH2 mutations are frequent in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood*. 2012;119(8):1901-1903.
8. Sakata-Yanagimoto M, Enami T, Yoshida K, et al. Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat Genet*. 2014;46(2):171-175.
9. Palomero T, Couronne L, Khiabani H, et al. Recurrent mutations in epigenetic regulators, RHOA and FYN kinase in peripheral T cell lymphomas. *Nat Genet*. 2014;46(2):166-170.
10. Yoo HY, Sung MK, Lee SH, et al. A recurrent inactivating mutation in RHOA GTPase in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat Genet*. 2014;46(4):371-375.
11. Kataoka K, Nagata Y, Kitanaka A, et al. Integrated molecular analysis of adult T cell leukemia/lymphoma. *Nat Genet*. 2015;47(11):1304-1315.
12. Kataoka K, Shiraishi Y, Takeda Y, et al. Aberrant PD-L1 expression through 3'-UTR disruption in multiple cancers. *Nature*. 2016;534(7607):402-406.
13. Chiarle R, Simmons WJ, Cai H, et al. Stat3 is required for ALK-mediated lymphomagenesis and provides a possible therapeutic target. *Nat Med*. 2005;11(6):623-629.
14. Parrilla Castellar ER, Jaffe ES, Said JW, et al. ALK-negative anaplastic large cell lymphoma is a genetically heterogeneous disease with widely disparate clinical outcomes. *Blood*. 2014;124(9):1473-1480.
15. Streubel B, Vinatzer U, Willheim M, Raderer M, Chott A. Novel t(5;9)(q33;q22) fuses ITK to SYK in unspecified peripheral T-cell lymphoma. *Leukemia*. 2006;20(2):313-318.

16. Boddicker RL, Razidlo GL, Feldman AL. Genetic alterations affecting GTPases and T-cell receptor signaling in peripheral T-cell lymphomas. *Small GTPases*. 2019;10(1):33-39.
17. Vallois D, Dobay MP, Morin RD, et al. Activating mutations in genes related to TCR signaling in angioimmunoblastic and other follicular helper T-cell-derived lymphomas. *Blood*. 2016;128(11):1490-1502.
18. Fujisawa M, Sakata-Yanagimoto M, Nishizawa S, et al. Activation of RHOA-VAV1 signaling in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Leukemia*. 2018;32(3):694-702.
19. Boddicker RL, Razidlo GL, Dasari S, et al. Integrated mate-pair and RNA sequencing identifies novel, targetable gene fusions in peripheral T-cell lymphoma. *Blood*. 2016;128(9):1234-1245.
20. Watatani Y, Sato Y, Miyoshi H, et al. Molecular heterogeneity in peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified revealed by comprehensive genetic profiling. *Leukemia*. 2019;33(12):2867-2883.
21. Abate F, da Silva-Almeida AC, Zairis S, et al. Activating mutations and translocations in the guanine exchange factor VAV1 in peripheral T-cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(4):764-769.
22. Belver L, Ferrando A. The genetics and mechanisms of T cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(8):494-507.
23. Van Vlierberghe P, Ferrando A. The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest*. 2012;122(10):3398-3406.
24. Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, et al. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2012;481(7380):157-163.
25. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-2405.
26. Robles-Valero J, Lorenzo-Martin LF, Menacho-Marquez M, et al. A Paradoxical Tumor-Suppressor Role for the Rac1 Exchange Factor Vav1 in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell*. 2017;32(5):608-623 e609.
27. Bustelo XR. Vav proteins, adaptors and cell signaling. *Oncogene*. 2001;20(44):6372-6381.
28. Han J, Das B, Wei W, et al. Lck regulates Vav activation of members of the Rho family of GTPases. *Mol Cell Biol*. 1997;17(3):1346-1353.
29. Michel F, Grimaud L, Tuosto L, Acuto O. Fyn and ZAP-70 are required for Vav phosphorylation in T cells stimulated by antigen-presenting cells. *J Biol Chem*. 1998;273(48):31932-31938.
30. Huang J, Tilly D, Altman A, Sugie K, Grey HM. T-cell receptor antagonists induce Vav



- phosphorylation by selective activation of Fyn kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(20):10923-10929.
31. Kuhne MR, Ku G, Weiss A. A guanine nucleotide exchange factor-independent function of Vav1 in transcriptional activation. *J Biol Chem*. 2000;275(3):2185-2190.
  32. Costello PS, Walters AE, Mee PJ, et al. The Rho-family GTP exchange factor Vav is a critical transducer of T cell receptor signals to the calcium, ERK, and NF-kappaB pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(6):3035-3040.
  33. Saveliev A, Vanes L, Ksionda O, et al. Function of the nucleotide exchange activity of vav1 in T cell development and activation. *Sci Signal*. 2009;2(101):ra83.
  34. Lopez-Lago M, Lee H, Cruz C, Movilla N, Bustelo XR. Tyrosine phosphorylation mediates both activation and downmodulation of the biological activity of Vav. *Mol Cell Biol*. 2000;20(5):1678-1691.
  35. Yu B, Martins IR, Li P, et al. Structural and energetic mechanisms of cooperative autoinhibition and activation of Vav1. *Cell*. 2010;140(2):246-256.
  36. Barreira M, Fabbiano S, Couceiro JR, et al. The C-terminal SH3 domain contributes to the intramolecular inhibition of Vav family proteins. *Sci Signal*. 2014;7(321):ra35.
  37. Tarakhovsky A, Turner M, Schaal S, et al. Defective antigen receptor-mediated proliferation of B and T cells in the absence of Vav. *Nature*. 1995;374(6521):467-470.
  38. Zhang R, Alt FW, Davidson L, Orkin SH, Swat W. Defective signalling through the T- and B-cell antigen receptors in lymphoid cells lacking the vav proto-oncogene. *Nature*. 1995;374(6521):470-473.
  39. Fischer KD, Zmuldzinas A, Gardner S, Barbacid M, Bernstein A, Guidos C. Defective T-cell receptor signalling and positive selection of Vav-deficient CD4+ CD8+ thymocytes. *Nature*. 1995;374(6521):474-477.
  40. Fujikawa K, Miletic AV, Alt FW, et al. Vav1/2/3-null mice define an essential role for Vav family proteins in lymphocyte development and activation but a differential requirement in MAPK signaling in T and B cells. *J Exp Med*. 2003;198(10):1595-1608.
  41. Zhumabekov T, Corbella P, Tolaini M, Kioussis D. Improved version of a human CD2 minigene based vector for T cell-specific expression in transgenic mice. *J Immunol Methods*. 1995;185(1):133-140.
  42. Tsukada T, Tomooka Y, Takai S, et al. Enhanced proliferative potential in culture of cells from p53-deficient mice. *Oncogene*. 1993;8(12):3313-3322.
  43. Eino D, Tsukada Y, Naito H, et al. LPA4-Mediated Vascular Network Formation Increases the Efficacy of Anti-PD-1 Therapy against Brain Tumors. *Cancer Res*. 2018;78(23):6607-6620.
  44. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a

knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(43):15545-15550.

45. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, et al. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet*. 2003;34(3):267-273.
46. Wei G, Wei L, Zhu J, et al. Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells. *Immunity*. 2009;30(1):155-167.
47. Nurieva RI, Chung Y, Hwang D, et al. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity*. 2008;29(1):138-149.
48. Zhou Y, Zhou B, Pache L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat Commun*. 2019;10(1):1523.
49. Nguyen TB, Sakata-Yanagimoto M, Fujisawa M, et al. Dasatinib is an effective treatment for angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Cancer Res*. 2020.
50. Chapuy B, McKeown MR, Lin CY, et al. Discovery and characterization of super-enhancer-associated dependencies in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell*. 2013;24(6):777-790.
51. Manso R, Bellas C, Martin-Acosta P, et al. C-MYC is related to GATA3 expression and associated with poor prognosis in nodal peripheral T-cell lymphomas. *Haematologica*. 2016;101(8):e336-338.
52. Yoshie O, Fujisawa R, Nakayama T, et al. Frequent expression of CCR4 in adult T-cell leukemia and human T-cell leukemia virus type 1-transformed T cells. *Blood*. 2002;99(5):1505-1511.
53. Ishida T, Utsunomiya A, Iida S, et al. Clinical significance of CCR4 expression in adult T-cell leukemia/lymphoma: its close association with skin involvement and unfavorable outcome. *Clin Cancer Res*. 2003;9(10 Pt 1):3625-3634.
54. Imai T, Yoshida T, Baba M, Nishimura M, Kakizaki M, Yoshie O. Molecular cloning of a novel T cell-directed CC chemokine expressed in thymus by signal sequence trap using Epstein-Barr virus vector. *J Biol Chem*. 1996;271(35):21514-21521.
55. Imai T, Baba M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Yoshie O. The T cell-directed CC chemokine TARC is a highly specific biological ligand for CC chemokine receptor 4. *J Biol Chem*. 1997;272(23):15036-15042.
56. Horikawa T, Nakayama T, Hikita I, et al. IFN-gamma-inducible expression of thymus and activation-regulated chemokine/CCL17 and macrophage-derived chemokine/CCL22 in epidermal keratinocytes and their roles in atopic dermatitis. *Int Immunol*. 2002;14(7):767-773.

57. Ishida T, Jo T, Takemoto S, et al. Dose-intensified chemotherapy alone or in combination with mogamulizumab in newly diagnosed aggressive adult T-cell leukaemia-lymphoma: a randomized phase II study. *Br J Haematol.* 2015;169(5):672-682.
58. Ogura M, Ishida T, Hatake K, et al. Multicenter phase II study of mogamulizumab (KW-0761), a defucosylated anti-CC chemokine receptor 4 antibody, in patients with relapsed peripheral T-cell lymphoma and cutaneous T-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2014;32(11):1157-1163.
59. Preston GC, Sinclair LV, Kaskar A, et al. Single cell tuning of Myc expression by antigen receptor signal strength and interleukin-2 in T lymphocytes. *EMBO J.* 2015;34(15):2008-2024.
60. Wang X, Werneck MB, Wilson BG, et al. TCR-dependent transformation of mature memory phenotype T cells in mice. *J Clin Invest.* 2011;121(10):3834-3845.
61. Miller AT, Wilcox HM, Lai Z, Berg LJ. Signaling through Itk promotes T helper 2 differentiation via negative regulation of T-bet. *Immunity.* 2004;21(1):67-80.
62. Zhu JW, Field SJ, Gore L, et al. E2F1 and E2F2 determine thresholds for antigen-induced T-cell proliferation and suppress tumorigenesis. *Mol Cell Biol.* 2001;21(24):8547-8564.
63. Guy CS, Vignali KM, Temirov J, et al. Distinct TCR signaling pathways drive proliferation and cytokine production in T cells. *Nat Immunol.* 2013;14(3):262-270.
64. Weng AP, Ferrando AA, Lee W, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science.* 2004;306(5694):269-271.
65. O'Neil J, Grim J, Strack P, et al. FBW7 mutations in leukemic cells mediate NOTCH pathway activation and resistance to gamma-secretase inhibitors. *J Exp Med.* 2007;204(8):1813-1824.
66. Aster JC, Pear WS, Blacklow SC. Notch signaling in leukemia. *Annu Rev Pathol.* 2008;3:587-613.
67. Weng AP, Millholland JM, Yashiro-Ohtani Y, et al. c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes Dev.* 2006;20(15):2096-2109.
68. Palomero T, Lim WK, Odom DT, et al. NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(48):18261-18266.
69. Zeng L, Zhou MM. Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett.* 2002;513(1):124-128.
70. Perez-Salvia M, Esteller M. Bromodomain inhibitors and cancer therapy: From structures to applications. *Epigenetics.* 2017;12(5):323-339.
71. Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, et al. Selective inhibition of BET bromodomains.

*Nature*. 2010;468(7327):1067-1073.

72. Abedin SM, Boddy CS, Munshi HG. BET inhibitors in the treatment of hematologic malignancies: current insights and future prospects. *Onco Targets Ther*. 2016;9:5943-5953.

73. Delmore JE, Issa GC, Lemieux ME, et al. BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell*. 2011;146(6):904-917.

74. Handoko L, Kaczkowski B, Hon CC, et al. JQ1 affects BRD2-dependent and independent transcription regulation without disrupting H4-hyperacetylated chromatin states. *Epigenetics*. 2018;13(4):410-431.

75. Whitfield JR, Beaulieu ME, Soucek L. Strategies to Inhibit Myc and Their Clinical Applicability. *Front Cell Dev Biol*. 2017;5:10.

## 9. 図説名文

### 図 1 : VAV1 の構造と T 細胞における機能・VAV1 変異体の種類

- A. VAV1 の構造は、Calponin homology (CH) ドメイン、Acidic (Ac) ドメイン、Dbl homology (DH) ドメイン、Zinc finger (ZF) ドメイン、Src homology 3 (SH3) ドメイン、Src, homology 2 (SH2) ドメインからなる。VAV1 は T 細胞においてグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) として働く一方で、GEF 非依存性にアダプタータンパク質として機能し、NFAT や MAP キナーゼ経路といった T 細胞活性化・成熟に関与する。
- B. PTCL-NOS、AITL、ALCL、ATL で同定された点突然変異、欠失変異、融合変異をまとめる。●は欠失変異、▲は点突然変異を示す。

### 図 2 : マウスモデルの作製と観察

- A. 当研究室の先行研究におけるターゲットシーケンスによって同定された VAV1 の活性化に重要な Tyr174 を含む欠失変異 (p.165\_174del) V-Del と、融合遺伝子 *VAV1-STAP2* (V-Fus) を CD2 プロモーター下において発現させた遺伝子改変マウスを作製した。
- B. 腫瘍抑制因子をコードする *Trp53* を欠損させたマウス *Trp53* ノックアウトマウス (*Trp53*<sup>-/-</sup>) と交配させることにより、*VAV1* 変異の発現に加え、*Trp53*<sup>-/-</sup>・*Trp53*<sup>+/-</sup>の状態のマウスを作製した。*VAV1* 変異に加え *Trp53*<sup>-/-</sup>の状態のマウスは自然発症を、*Trp53*<sup>+/-</sup>の状態のマウスは自然発症に加え、出生後 7~12 週齢時点で 4Gy の放射線照射を行い観察する。
- C. ヒト PTCL-GATA3 における *VAV1* と *TP53* の変異の共存。変異間のペアワイズ相関は、Benjamini-Hochberg 補正 (q<0.1) を用いたペアワイズ Fisher's exact test を用いて評価した。
- D. 生後 4 週齢のマウスの尻尾から抽出された DNA 中の *VAV1* および *Trp53* 欠失の PCR の結果。左図は *VAV1* の PCR 結果で、左から VA ベクターにヒト野生型 *VAV1* が挿入されたプラスミド (PC)、*VAV1* 発現を有するマウスの尻尾から抽出された DNA、蒸留水 (NC)。右図は *Trp53* の PCR 結果で、左から *Trp53*<sup>-/-</sup>の PC、*Trp53*<sup>-/-</sup>のマウスの尻尾から抽出された DNA、*Trp53*<sup>+/-</sup>のマウスの尻尾から抽出された DNA、野生型のマウスの尻尾から抽出された DNA、蒸留水。これらの PCR は交配により産まれたマウス全てに施行された。各々 *n* = 2、KO, ノックアウト; WT, 野生型; PC,

ポジティブコントロール; NC, ネガティブコントロール

- E. 野生型・*VAV1-Tg*・*Trp53<sup>-/-</sup>*・*Trp53<sup>-/-</sup>* *VAV1-Tg* のマウスにおける白血球数・ヘモグロビン・血小板数と白血球における顆粒球・B細胞・T細胞の分画をフローサイトメトリーで解析し比較した。解析したマウス数は野生型 24 匹、*VAV1-Tg* 16 匹、*Trp53<sup>-/-</sup>* 6 匹、*Trp53<sup>-/-</sup>* *VAV1-Tg* 6 匹。統計解析は一元配置分散分析 one-way ANOVA を用い、多重比較には Bonferroni 法を用いて修正した。誤差範囲は標準偏差を表す。\*:  $p < 0.05$

**図 3** : 12 週齢マウスの脾臓・胸腺細胞分画の比較とフローサイトメトリーデータ

- A. 野生型・*VAV1-Tg*・*Trp53<sup>-/-</sup>*・*Trp53<sup>-/-</sup>* *VAV1-Tg* のマウスにおける脾臓の細胞分画をフローサイトメトリーで解析を行った。ナイーブ T 細胞、メモリー T 細胞、および CD4 陽性 PD-1 陽性 ICOS 陽性細胞の割合と代表的なフローサイトメトリーデータを示す。解析はそれぞれ独立した実験として行い、野生型 6 匹、*VAV1-Tg* 9 匹、*Trp53<sup>-/-</sup>* 10 匹、*Trp53<sup>-/-</sup>* *VAV1-Tg* 9 匹に行った。統計解析は一元配置分散分析 one-way ANOVA を用い、多重比較には Bonferroni 法を用いて修正した。誤差範囲は標準偏差を表す。\*:  $p < 0.05$
- B. 野生型・*VAV1-Tg*・*Trp53<sup>-/-</sup>*・*Trp53<sup>-/-</sup>* *VAV1-Tg* のマウスにおける胸腺の細胞分画をフローサイトメトリーで解析を行った。CD4 CD8 DN 細胞の成長段階における細胞分画の割合と代表的なフローサイトメトリーデータを示す。解析はそれぞれ独立した実験として行い、野生型 7 匹、*VAV1-Tg* 7 匹、*Trp53<sup>-/-</sup>* 7 匹、*Trp53<sup>-/-</sup>* *VAV1-Tg* 7 匹に行った。統計解析は一元配置分散分析 one-way ANOVA を用い、多重比較には Bonferroni 法を用いて修正した。誤差範囲は標準偏差を表す。\*:  $p < 0.05$

**図 4** : T 細胞受容体刺激によるリン酸化 VAV1 の発現

V-Fus マウスまたは野生型マウスの脾臓ナイーブ T 細胞を、T 細胞受容体刺激を行いリン酸化 VAV1 の発現をフローサイトメトリーで解析を行った。黒線は野生型、赤線は V-Fus の発現データを示す。点線は非刺激の状態、実線は刺激後の状態を示す。実験は独立して 3 回施行し、いずれも同様の結果であり、代表的な結果を示す。

図 5：腫瘍の潜伏期間と肉眼的・CT による所見 放射線照射による *Trp53* 野生型対立遺伝子の欠損

- A. 野生型・*VAV1-Tg*・*Trp53<sup>-/-</sup>*・*Trp53<sup>-/-</sup>* *VAV1-Tg* のマウスにおける生存曲線を示す。野生型 83 匹、V-Del 63 匹、V-Fus 23 匹、*Trp53<sup>-/-</sup>* 66 匹、*Trp53<sup>-/-</sup>* V-Del 24 匹、*Trp53<sup>-/-</sup>* V-Fus 22 匹。統計解析は Logrank 検定を用いて解析した。\* \*:  $p < 0.001$
- B. 放射線照射された野生型・*VAV1-Tg*・*Trp53<sup>+/-</sup>*・*Trp53<sup>+/-</sup>* *VAV1-Tg* のマウスにおける生存曲線を示す。野生型 46 匹、V-Del 26 匹、V-Fus 22 匹、*Trp53<sup>+/-</sup>* 49 匹、*Trp53<sup>+/-</sup>* V-Del 35 匹、*Trp53<sup>+/-</sup>* V-Fus 33 匹。統計解析は Logrank 検定を用いて解析した。\* \*:  $p < 0.001$
- C. 腫瘍の肉眼的所見を示す。(i) T-LBL を発症した *Trp53<sup>-/-</sup>* *VAV1-Tg* のマウスと同週齢の野生型マウスにおける胸腺。(ii) Lym を発症した *Trp53<sup>-/-</sup>* *VAV1-Tg* のマウスと同週齢の野生型マウスにおける脾臓。
- D. 腫瘍の CT スキャンによる所見を示す。T-LBL を発症した *Trp53<sup>-/-</sup>* *VAV1-Tg* のマウスと野生型マウスの胸部 CT、あるいは Lym を発症した *Trp53<sup>-/-</sup>* *VAV1-Tg* のマウスと野生型マウスの腹部 CT を示す。
- E. 放射線照射された *Trp53<sup>+/-</sup>* *VAV1-Tg* の T-LBL 腫瘍細胞から抽出したゲノム DNA に対する *Trp53* のゲノム PCR 解析。PC, ポジティブコントロール；NC, ネガティブコントロール

図 6：各マウスで確認された腫瘍のサブタイプと免疫表現型

- A. 各マウスにおいて確認された腫瘍のサブタイプを示す。*Trp53<sup>-/-</sup>* V-Del 21 匹、*Trp53<sup>-/-</sup>* V-Fus 23 匹、*Trp53<sup>-/-</sup>* 16 匹。青：T-LBL、赤：Lym、灰：非造血器腫瘍
- B. 各マウスから確認された T-LBL あるいは Lym の CD4 および CD8 の細胞表面抗原の表現型を示す。Extrathymic と表記されたものは T-LBL 腫瘍細胞を胸腺以外の臓器で認めたマウスの割合、Extrasplenic と表記されたものは Lym 腫瘍細胞を脾臓以外の臓器で認めたマウスの割合を示す。発症率の比較には Fisher の正確確率検定を用いて解析した。SP, single positive；DP, double positive；DN, double negative

図 7：各腫瘍の成熟度および Lym の PD-1/ICOS・CD62L/CD44 の発現の代表的なフローサイトメトリーのデータ

- A. 野生型の胸腺細胞、および *Trp53*<sup>-/-</sup>・*Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウスの T-LBL 腫瘍細胞の CD24 および mTCR $\beta$  の代表的なフローサイトメトリーデータを示す。解析はそれぞれ独立した実験として行い、野生型 14 匹、*Trp53*<sup>-/-</sup> 12 匹、*Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* 8 匹に行った。
- B. 野生型の脾臓細胞、および *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウスの Lym 腫瘍細胞の CD24 および mTCR $\beta$ 、PD-1 および ICOS の代表的なフローサイトメトリーデータを示す。解析はそれぞれ独立した実験として行い、野生型 7 匹、*Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* 8 匹に行った。
- C. 野生型の脾臓細胞、および *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウスの Lym 腫瘍細胞の CD62L および CD44 の代表的なフローサイトメトリーデータを示す。解析はそれぞれ独立した実験として行い、野生型 7 匹、*Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* 8 匹に行った。

図 8：各腫瘍の HE 染色標本

- A. 野生型の胸腺、および *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウスから採取した T-LBL の HE 染色標本を示す。染色はそれぞれのジェノタイプのマウスで 3 匹以上に対して行い、代表的な結果を示す。
- B. 野生型の脾臓、および *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウスから採取した Lym の HE 染色標本を示す。染色はそれぞれのジェノタイプのマウスで 3 匹以上に対して行い、代表的な結果を示す。低倍率は 4 倍、高倍率は 100 倍で撮影されたもの。スケールバーの長さは 20  $\mu$ m

図 9：T-LBL 腫瘍の免疫組織化学染色標本

野生型の胸腺、および *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウスから採取した T-LBL の CD3、CD4、CD8、pVAV1 の免疫組織化学染色標本を示す。染色はそれぞれのジェノタイプのマウスで 2 匹以上に対して行い、代表的な結果を示す。スケールバーの長さは 20  $\mu$ m。腫瘍の標本は右下に腫瘍細胞における陽性細胞の割合を示す。

図 10：Lym 腫瘍の免疫組織化学染色標本



野生型の脾臓、および *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウスから採取した Lym の CD3、CD4、CD8、pVAV1 の免疫組織化学染色標本を示す。染色はそれぞれのジェノタイプのマウスで 2 匹以上に対して行い、代表的な結果を示す。倍率は 40 倍で撮影されたもの。スケールバーの長さは 20  $\mu\text{m}$ 。腫瘍の標本は右下に腫瘍細胞における陽性細胞の割合を示す。

**図 11：各腫瘍を移植されたヌードマウスの腫瘍潜伏期間と HE 染色**

- A. *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* および *Trp53*<sup>-/-</sup> マウスから採取した T-LBL を腹腔内移植したヌードマウスの生存曲線を示す。*Trp53*<sup>-/-</sup> V-Del 13 匹、*Trp53*<sup>-/-</sup> V-Fus 26 匹 *Trp53*<sup>-/-</sup> 17 匹。統計解析は Logrank 検定を用いて解析した。\*:  $p < 0.05$
- B. *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウスから採取した Lym を腹腔内移植したヌードマウス、二次的に移植されたヌードマウスの生存曲線を示す。*Trp53*<sup>-/-</sup> V-Del 46 匹、*Trp53*<sup>-/-</sup> V-Fus 31 匹、2<sup>nd</sup> *Trp53*<sup>-/-</sup> V-Del 20 匹、2<sup>nd</sup> *Trp53*<sup>-/-</sup> V-Fus 40 匹。統計解析は Logrank 検定を用いて解析した。
- C. 移植をされていない免疫不全マウス BALBc/nude および *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウスから採取した T-LBL または Lym を移植した免疫不全マウス BALBc/nude から採取した脾臓の HE 染色標本を示す。染色はそれぞれのジェノタイプのマウスで 3 匹以上に対して行い、代表的な結果を示す。低倍率は 4 倍、高倍率は 100 倍で撮影されたもの。スケールバーの長さは 20  $\mu\text{m}$

**図 12：ドナー由来の細胞の同定とレシピエントマウスにおける脾臓の免疫組織化学染色標本**

- A. レシピエントマウスから得られた腫瘍細胞の表面抗原の表現型を決定するために、CD3、CD4 および CD8、ならびにレシピエント由来あるいはドナー由来の細胞を決定するため、MHC クラス I 分子である H-2K<sup>d</sup> および H-2K<sup>b</sup> についての代表的なフローサイトメトリーデータを示す。解析はそれぞれ独立した実験として行い、非移植群 3 匹、T-LBL 移植群 26 匹、Lym 移植群 20 匹に行った。

- B. T-LBL あるいは Lym を移植したレシピエントマウスのリンパ節および脾臓におけるドナー細胞の割合を示す。解析はそれぞれ独立した実験として行い、T-LBL 移植群 26 匹、Lym 移植群 20 匹に行った。
- C. *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウスから採取した T-LBL および Lym を移植したレシピエントマウスの脾臓の CD3、CD4、CD8 の免疫組織化学染色標本を示す。染色はそれぞれのジェノタイプのマウスで 2 匹以上に対して行い、代表的な結果を示す。スケールバーの長さは 20 μm。右下に腫瘍細胞における陽性細胞の割合を示す。

図 13：各種瘍の発現データを基にした PCA と Unsupervised clustering

- A. *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* および *Trp53*<sup>-/-</sup> マウスから採取した T-LBL の発現データを基にした PCA と野生型を含めた Unsupervised clustering を示す。野生型 3 匹、*Trp53*<sup>-/-</sup> 2 匹、*Trp53*<sup>-/-</sup> V-Del 2 匹、*Trp53*<sup>-/-</sup> V-Fus 2 匹に行った。
- B. *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウスから採取した Lym と野生型マウスの CD4 SP あるいは CD8 SP 脾臓細胞の発現データを基にした PCA と野生型を含めた Unsupervised clustering を示す。野生型 3 匹、*Trp53*<sup>-/-</sup> V-Del 3 匹、*Trp53*<sup>-/-</sup> V-Fus 2 匹

図 14：*Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウスの腫瘍細胞で共通して高発現であった遺伝子と発現データを基にした Metascape 解析と GSEA 解析

- A. *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウスから採取した T-LBL あるいは Lym の対照群と比較し、共通して 3 倍以上の発現を認めた遺伝子リストを示す。
- B. WTA のデータから得られた野生型 CD4 陽性脾臓細胞と、T-LBL および Lym の Myc 発現量と定量 PCR で解析された T-LBL の Myc 発現量を示す。統計解析は Student's t 検定を用いて解析を行った。誤差範囲は標準偏差を表す。
- C. *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウスから採取した T-LBL あるいは Lym の対照群と比較し、共通して(i)3 倍以上あるいは(ii)2 倍以上の発現を認めた遺伝子リストを使用した Metascape 解析結果を示す。
- D. MSigDB の Hallmark 遺伝子セットを使用し、(i) *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウス由来の T-LBL と *Trp53*<sup>-/-</sup> マウス由来の T-LBL を比較したものと、(ii)

*Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウス由来の Lym と野生型マウス由来の CD4 SP および CD8 SP の脾細胞を比較したものを示す。

図 15 : *Myc* 関連遺伝子の高発現と *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウス由来の Lym の TH2 フェノタイプ

- A. *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウス由来の Lym と野生型マウス由来の CD4 SP および CD8 SP の脾細胞を比較したものと T-LBL および Lym で共通して認めていた代表的な Enrichment plot を示す。赤線は *Myc* 関連遺伝子セットを示す。
- B. 野生型 CD4 SP または CD8 SP 脾細胞、*Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウス由来の Lym と *TET2*<sup>-/-</sup>/*RHOA G17V* マウス由来の AITL を模倣した腫瘍細胞の遺伝子プロファイルを示す。
- C. MSigDB 内の TH2 vs TH1 細胞および TFH vs TH2 細胞で高発現であった遺伝子リストを使用し野生型 CD4 SP 脾細胞と比較した *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウス由来の Lym の発現データの GSEA 解析データを示す。

図 16 : *Ccr4* と *Gata3* タンパク質の確認と *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウス由来の腫瘍細胞とヒト PTCL-GATA3 の発現データの比較

- A. *Ccr4* の細胞表面抗原のフローサイトメトリー解析データを示す。
- B. *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウス由来の Lym における脾臓の *Gata3* 免疫組織化学染色の結果を示す。染色はそれぞれのジェノタイプのマウスで 2 匹以上に対して行い、代表的な結果を示す。倍率は 40 倍で撮影されたもの。スケールバーの長さは 20  $\mu\text{m}$ 。右下に腫瘍細胞における陽性細胞の割合を示す。
- C. 左は *Trp53*<sup>-/-</sup> マウス由来の T-LBL と比較して *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウス由来の腫瘍細胞で高発現であった遺伝子リストを使用し、ヒト PTCL-GATA3 の *VAV1* と *Trp53* 遺伝子変異が共存しているサンプルと *Trp53* 遺伝子変異のみのサンプルで GSEA 解析を行ったデータ。右はヒト PTCL-GATA3 の *Trp53* 遺伝子変異のみのサンプルと比較して *VAV1* と *Trp53* 遺伝子変異が共存しているサンプルで高発現であった遺伝子リストを使用し、*Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウス由来の腫瘍細胞と *Trp53*<sup>-/-</sup> マウス由来の T-LBL で GSEA 解析を行ったデータを示す。

図 17 : CD4 陽性ナイーブ T 細胞あるいはメモリー T 細胞の *Myc*・*Gata3* 遺伝子の発現と GSEA 解析データ

- A. 野生型マウス、*Trp53*<sup>-/-</sup>マウス、*Trp53*<sup>-/-</sup> V-Fus マウスの CD4 陽性ナイーブ T 細胞およびメモリー T 細胞の *Myc* 遺伝子の発現レベルの比較を示す。
- B. 野生型マウス、*Trp53*<sup>-/-</sup>マウス、*Trp53*<sup>-/-</sup> V-Fus マウスの CD4 陽性ナイーブ T 細胞およびメモリー T 細胞の *Gata3* 遺伝子の発現レベルの比較を示す。

解析はそれぞれ独立した実験として行い、CD4 陽性ナイーブ T 細胞：野生型マウス、*n* = 3；*Trp53*<sup>-/-</sup>マウス、*n* = 3；*Trp53*<sup>-/-</sup> V-Fus マウス、*n* = 5、CD4 陽性メモリー T 細胞：野生型マウス、*n* = 2；*Trp53*<sup>-/-</sup>マウス、*n* = 4；*Trp53*<sup>-/-</sup> V-Fus マウス、*n* = 3 に行った。統計解析は一元配置分散分析 one-way ANOVA を用い、多重比較には Bonferroni 法を用いて修正した。誤差範囲は標準偏差を表す。\*：*p* < 0.05

- C. CD4 陽性ナイーブ T 細胞における Hallmark 遺伝子セットを使用した *Trp53*<sup>-/-</sup> V-Fus マウスと野生型、*Trp53*<sup>-/-</sup> V-Fus マウスと *Trp53*<sup>-/-</sup>マウスを比較した解析データを示す。
- D. CD4 陽性ナイーブ T 細胞における Hallmark 遺伝子セットを使用した *Trp53*<sup>-/-</sup> V-Fus マウスと野生型、*Trp53*<sup>-/-</sup> V-Fus マウスと *Trp53*<sup>-/-</sup>マウスを比較した解析データを示す。

# は CD4 陽性ナイーブ T 細胞およびメモリー T 細胞で共通して高発現を認めていた遺伝子セットを示す。

図 18 : T 細胞受容体刺激によるナイーブ T 細胞分化の偏り

CD4 陽性ナイーブ T 細胞の T 細胞受容体を、サイトカインおよび抗体を使用しない Neutral condition、リコンビナントマウス IL-4 と抗マウス IFN- $\gamma$  抗体を含んだ TH2 condition 下で刺激を行い、刺激を行ってから 8 日後に *Gata3* の発現をフローサイトメトリーで解析を行い比較したデータを示す。実験は独立して 3 回施行し、いずれも同様の結果であり、代表的な結果を示す。

図 19 : WES による体細胞変異と SCNAs

- A. *Trp53*<sup>-/-</sup>マウス、*Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウスの腫瘍細胞における体細胞変異と VAF を示す。ヒト ATL あるいは PTCL-NOS で使用された Targeted

sequencing データと共通して認められている変異を橙色、ヒト ATL ある  
いは PTCL-NOS で使用された WES データと共通して認められている変異  
を青色で示す。

- B. WES データを用いた GISTIC 2.0 アルゴリズムにより同定された SCNAs の  
結果を示す。増幅された領域は赤で、欠失した領域は青で示す。15qD1 の  
染色体部位には *Myc* locus が含まれている。
- C. 2 匹の *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウスの Lym で同定された *Myc* locus の 8 倍以  
上の増幅を示す。

**図 20** : 腫瘍細胞の *Myc* 免疫蛍光染色と同定された T 細胞受容体遺伝子のクロ  
ーン性遺伝子再構成

- A. 野生型マウスの胸腺および、*Trp53*<sup>-/-</sup>マウスと *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウスの  
T-LBL、また、野生型マウスと *Trp53*<sup>-/-</sup>マウスの脾臓および、*Trp53*<sup>-/-</sup>  
*VAV1-Tg* マウスの Lym を DAPI/CD3/cMyc でそれぞれ免疫蛍光染色を行  
ったものを示す。染色はそれぞれのジェノタイプのマウスで 3 匹以上に対  
して行い、代表的な結果を示す。倍率は 400 倍で撮影されたもの。スケ  
ールバーの長さは 10  $\mu$ m。腫瘍の標本は右下に腫瘍細胞における陽性細胞の  
割合を示す。
- B. WES データを用いた MiXCR アルゴリズムにより同定された T 細胞受容体  
遺伝子のクローン性遺伝子再構成の結果を示す。y 軸は特定の CDR3 配列  
を有する各 TCR 遺伝子再構成を示す。

**図 21** : JQ1 を使用した *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウス由来の腫瘍細胞に対する *in*  
*vivo* での有効性の確認

- A. 腫瘍細胞を二次移植されたレシピエントマウスに対する治療プロトコルを  
示す。*Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウス由来の T-LBL あるいは Lym、または  
*Trp53*<sup>-/-</sup>マウス由来の T-LBL を移植したレシピエントマウスに対し、JQ1  
を 3mg/kg で 7 日目から死亡するまで 2 日に 1 回腹腔内注射を行った。
- B-D. *Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウス由来の T-LBL (B) 、*Trp53*<sup>-/-</sup> *VAV1-Tg* マウス  
由来の Lym (C) 、および *Trp53*<sup>-/-</sup>マウス由来の T-LBL (D) を移植したレシ  
ピエントマウスの JQ1 投与群と懸濁液のみを投与したコントロール群の生存曲  
線を示す。統計解析は Logrank 検定を用いて解析した。

10. 表

(表 1) *VAV1* と *Trp53* 遺伝子におけるプライマー

Gene	Forward	Reverse
<i>VAV1</i>	GGCTGAGGCTGAACAGAACTG GTGG	CAGGCTCCTTGAAGGGGAACT GCAA
<i>Trp53</i>	GTTATGCATCCATACAGTACA	CAGGATATCTTCTGGAGGAAG

(表2) FACS で解析を行った細胞腫類と抗体の組み合わせ

細胞腫類	PE	FITC	APC	PE-Cy7	PerCP
Lineage	Gr-1/CD11b	B220	CD3e		7AAD
Tfh	PD-1	ICOS	CD8a	CD4	7AAD
ナイーブ T 細胞	CD3e	CD44	CD62L	CD4	7AAD
DN fraction	CD25	CD44	CD8a	CD4	7AAD
TCR $\beta$	TCR $\beta$	CD8a	CD24	CD4	7AAD
CCR4	CCR4	CD8a	CD3e	CD4	7AAD

Ly-6G/Ly-6C (Gr-1) Monoclonal Antibody, PE, Clone RB6-8C5, eBioscience/ CD11b Monoclonal Antibody, PE, Clone M1/70, eBioscience/ CD45R (B220) Monoclonal Antibody, FITC, Clone RA3-6B2/ CD3e Monoclonal Antibody, PE or APC, Clone 145-2C11, eBioscience/ CD279 (PD-1) Monoclonal Antibody, PE, Clone RMP1-30, eBioscience/ CD278 (ICOS) Monoclonal Antibody, FITC, Clone C398.4A, eBioscience/ CD8a Monoclonal Antibody, FITC or APC, Clone 53-6.7, eBioscience/ CD4 Monoclonal Antibody, PE-Cy7, Clone RM4-5, eBioscience/ CD44 Monoclonal Antibody, FITC, Clone IM7, eBioscience/ CD62L (L-Selectin) Monoclonal Antibody, APC, Clone MEL-14, eBioscience/ CD25 Monoclonal Antibody, PE, Clone PC61.5, eBioscience/ TCR beta Monoclonal Antibody, PE, Clone H57-597, eBioscience/ CD24 Monoclonal Antibody, APC, Clone M1/69, eBioscience/ PE anti-mouse CD194 (CCR4) Antibody, Clone 2G12, BioLegend/ 7-AAD Viability Staining Solution, eBioscience

(表 3) T 細胞受容体刺激実験で解析を行った細胞種類と抗体の組み合わせ

細胞種類	PE	Alexa Fluor 488	APC	PE-Cy7
phophoVAV1	CD8a	pVAV1	CD3e	CD4
GATA3	CD8a	GATA3	CD3e	CD4

CD8a Monoclonal Antibody, PE, Clone 53-6.7, eBioscience/ Anti-VAV1 (phospho Y174) antibody, Alexa Fluor 488, Clone EP510Y, abcam/ CD3e Monoclonal Antibody, APC, Clone 145-2C11, eBioscience/ CD4 Monoclonal Antibody, PE-Cy7, Clone RM4-5, eBioscience/ Gata-3 Monoclonal Antibody (TWAJ), Alexa Fluor 488, Clone TWAJ, eBioscience

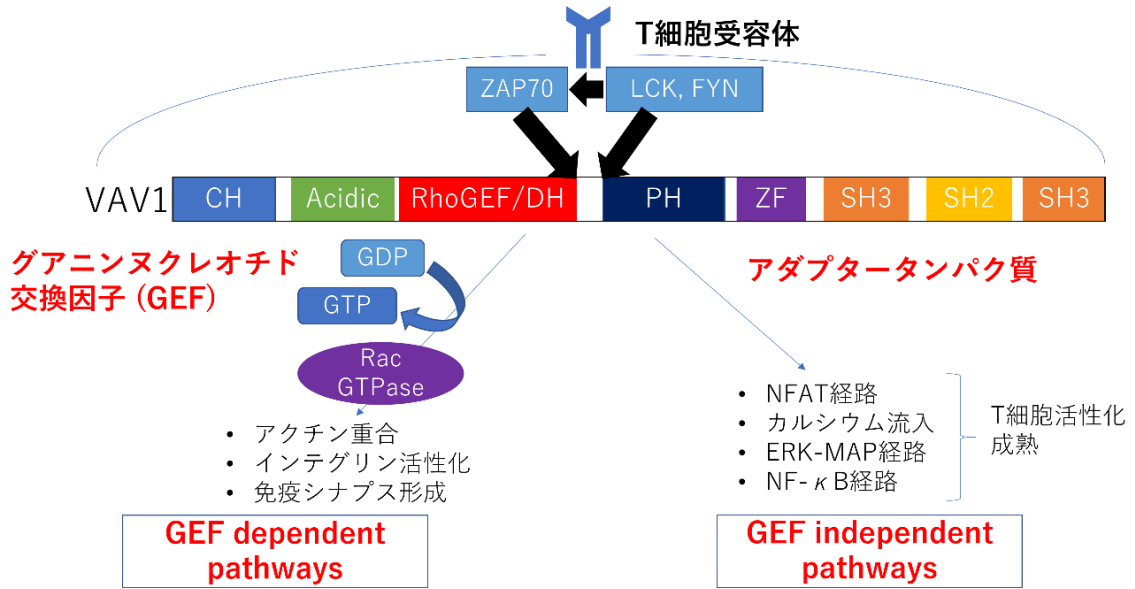


(表4) 1細胞あたりの VAV1 copy number 解析

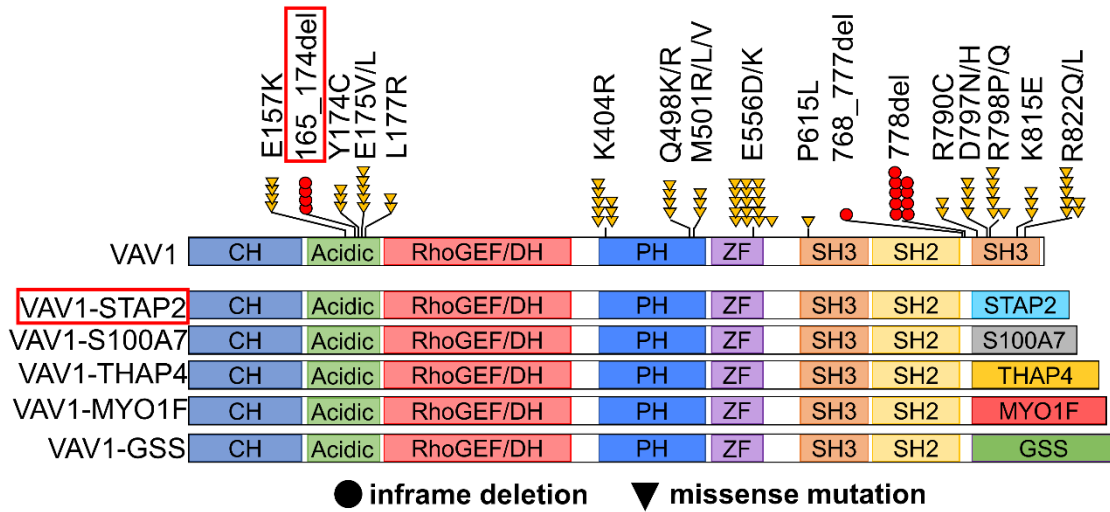
Line ID	Sample	VAV1 Copy/cell	Actin Quantity	VAV1/Actin copy number/cell	Average VAV1/Actin copy number/cell
VAV1-Del Low expression	LD1	4.2	9.191	1.0	1.0
	LD2	4.2	9.161	1.0	
	LD3	3.2	7.030	1.0	
VAV1-Del Middle expression	MD1	2.4	2.693	1.9	1.97
	MD2	2.2	2.512	1.9	
	MD3	4.3	4.339	2.1	
VAV1-Del High expression	HD1	16.1	11.846	2.9	3.03
	HD2	13.1	10.038	2.8	
	HD3	12.8	8.08	3.4	
VAV1-STAP2 Low expression	LST1	0.5	2.129	0.5	0.53
	LST2	0.6	2.379	0.5	
	LST3	0.8	3.062	0.6	
VAV1-STAP2 Middle expression	MST1	3.9	13.132	0.6	0.57
	MST2	4.6	15.986	0.6	
	MST3	0.6	2.964	0.5	
VAV-STAP2 High expression	HST1	4.7	7.535	1.3	1.37
	HST2	6.3	9.356	1.4	
	HST3	2.6	4.021	1.4	

図 1

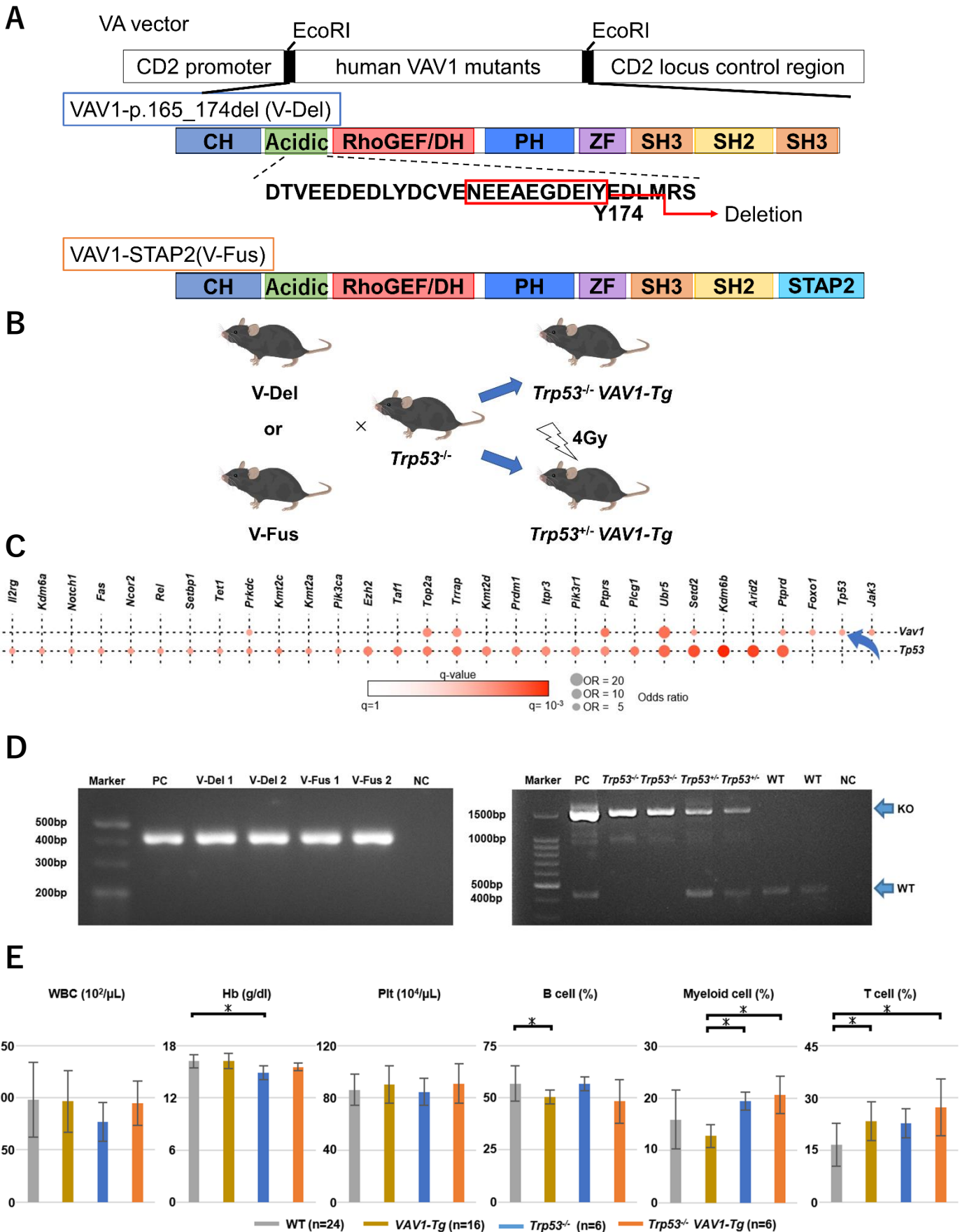
A



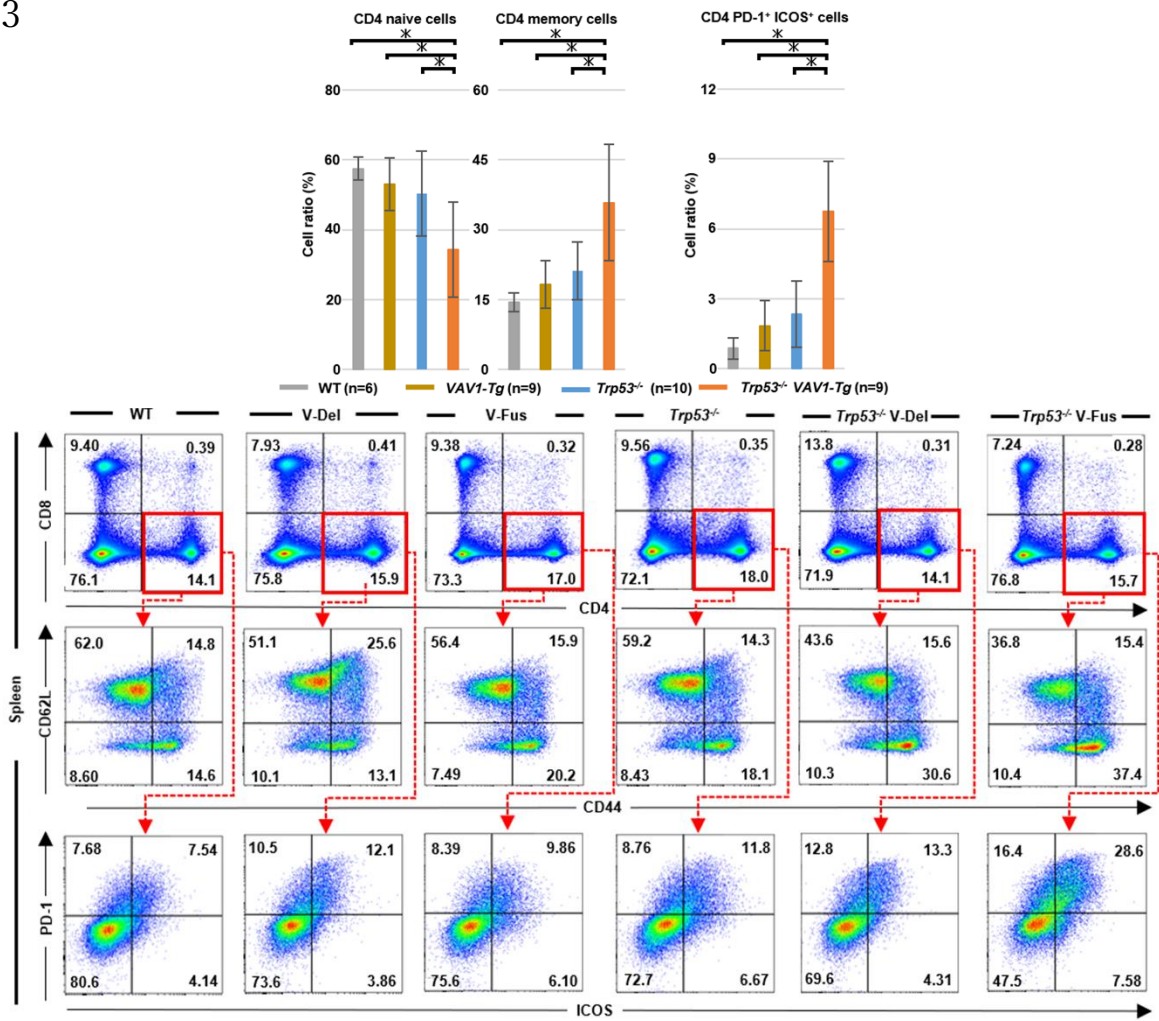
B



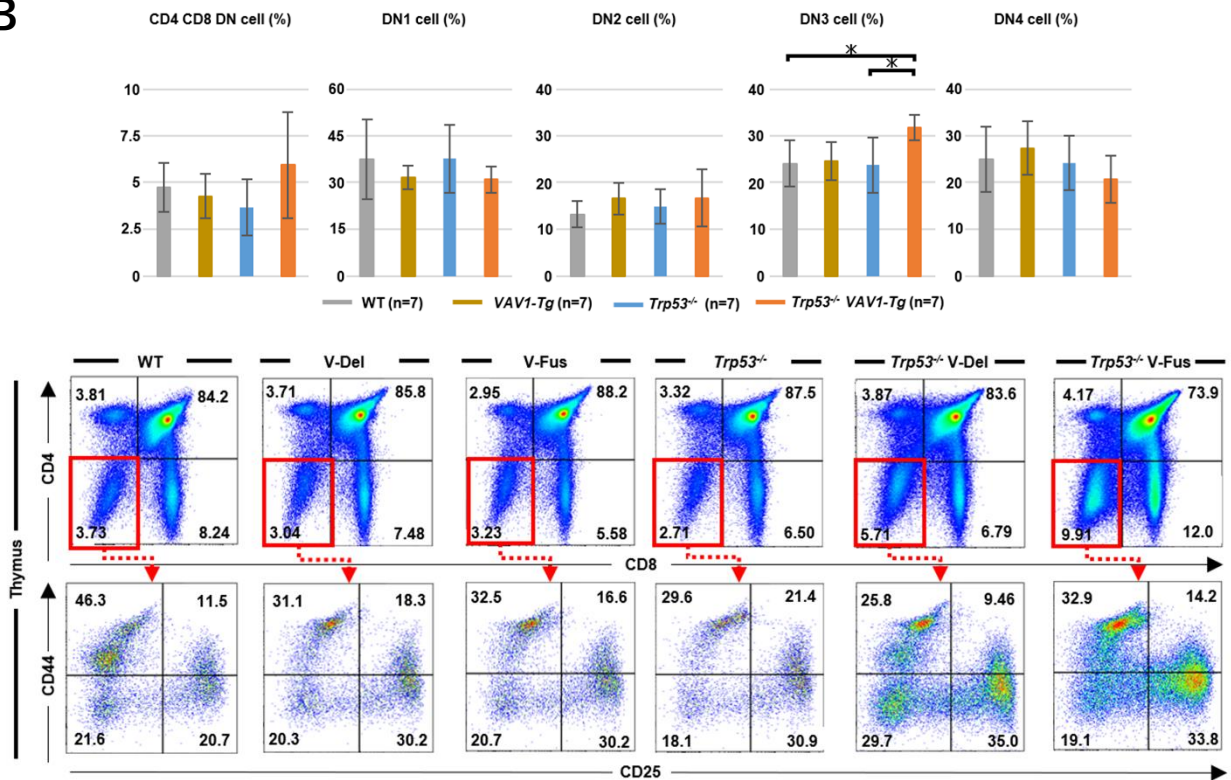
2



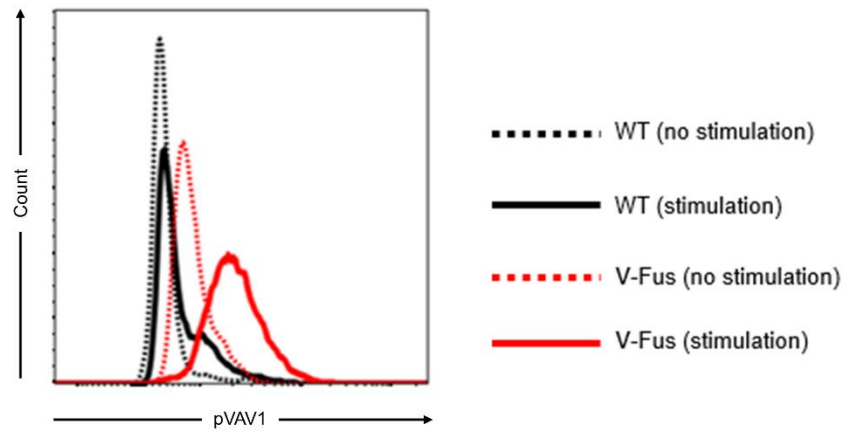
3  
A



B



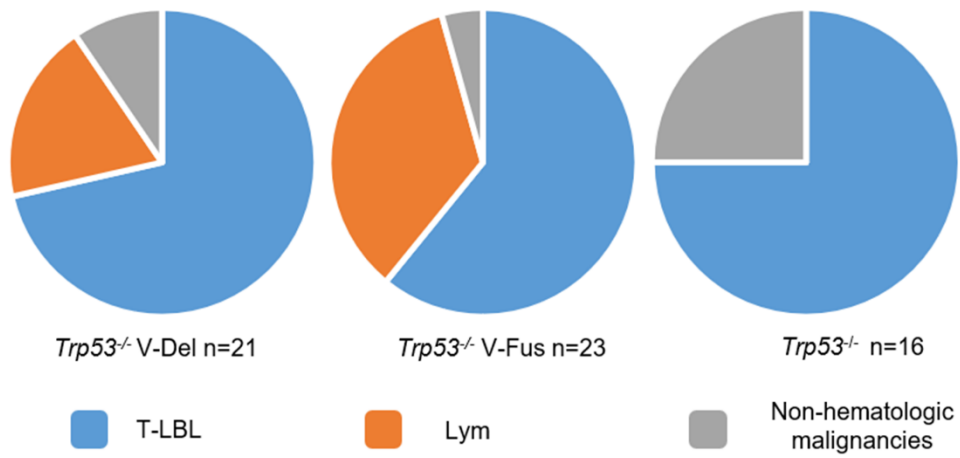
☒ 4





☒ 6

A



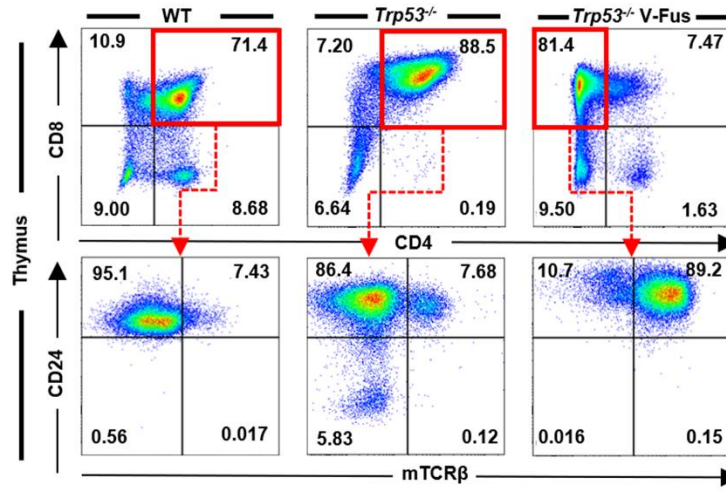
B

		Trp53 <sup>-/-</sup> V-Del	Trp53 <sup>-/-</sup> V-Fus	Trp53 <sup>-/-</sup>
T-LBL	CD8 SP T-LBL	73 % (11/15)	93 % (13/14)	25 % (3/12)
	DP T-LBL	27 % (4/15)	7 % (1/14)	75 % (9/12)
	Extrathymic	87 % (13/15)	57 % (8/14)	50 % (6/12)
Lym	CD4 SP Lym	50 % (2/4)	25 % (2/8)	-
	DN Lym	50 % (2/4)	75 % (6/8)	-
	Extrasplenic	100 % (4/4)	100 % (8/8)	-

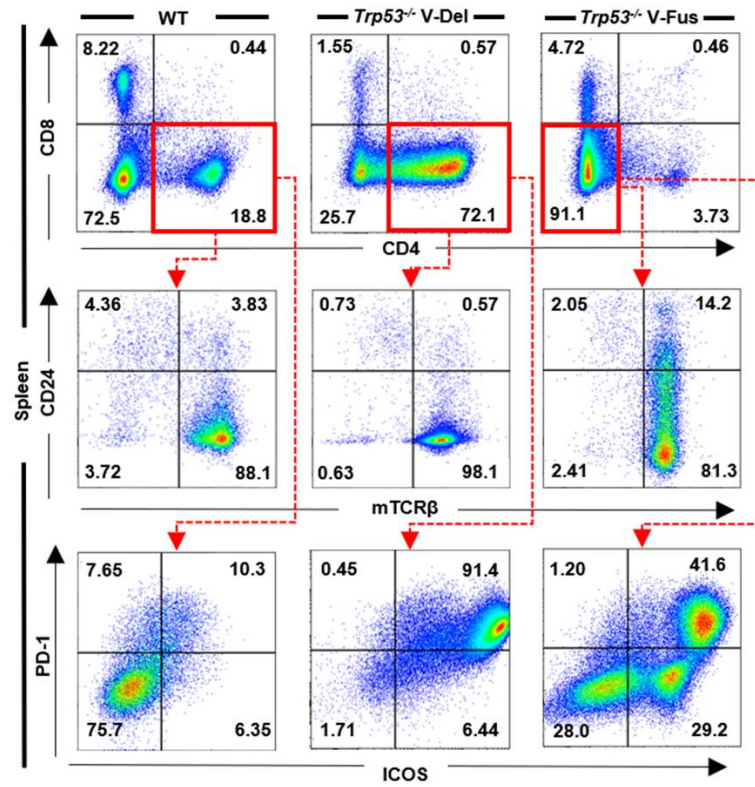
} p=0.004



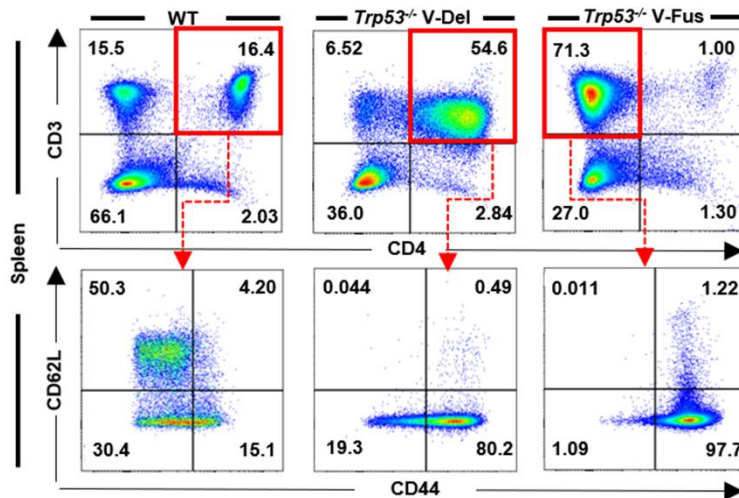
A



B



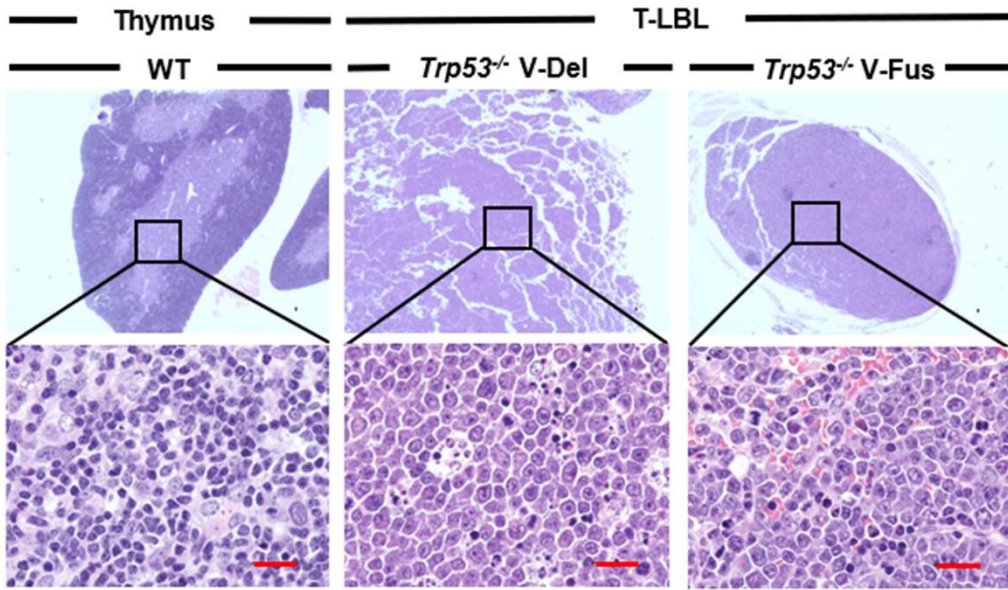
C





☒ 8

A



B

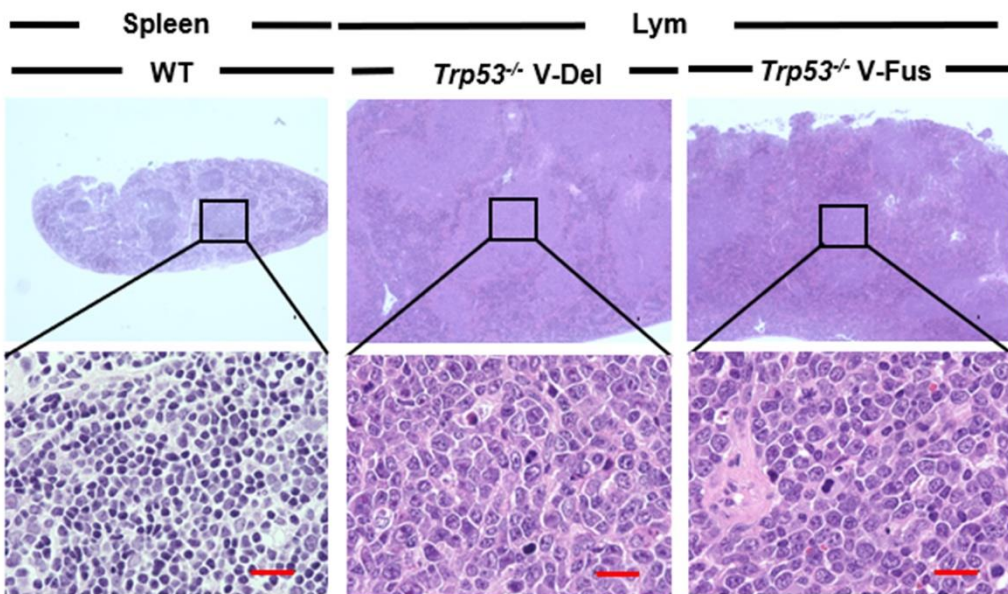


图 9

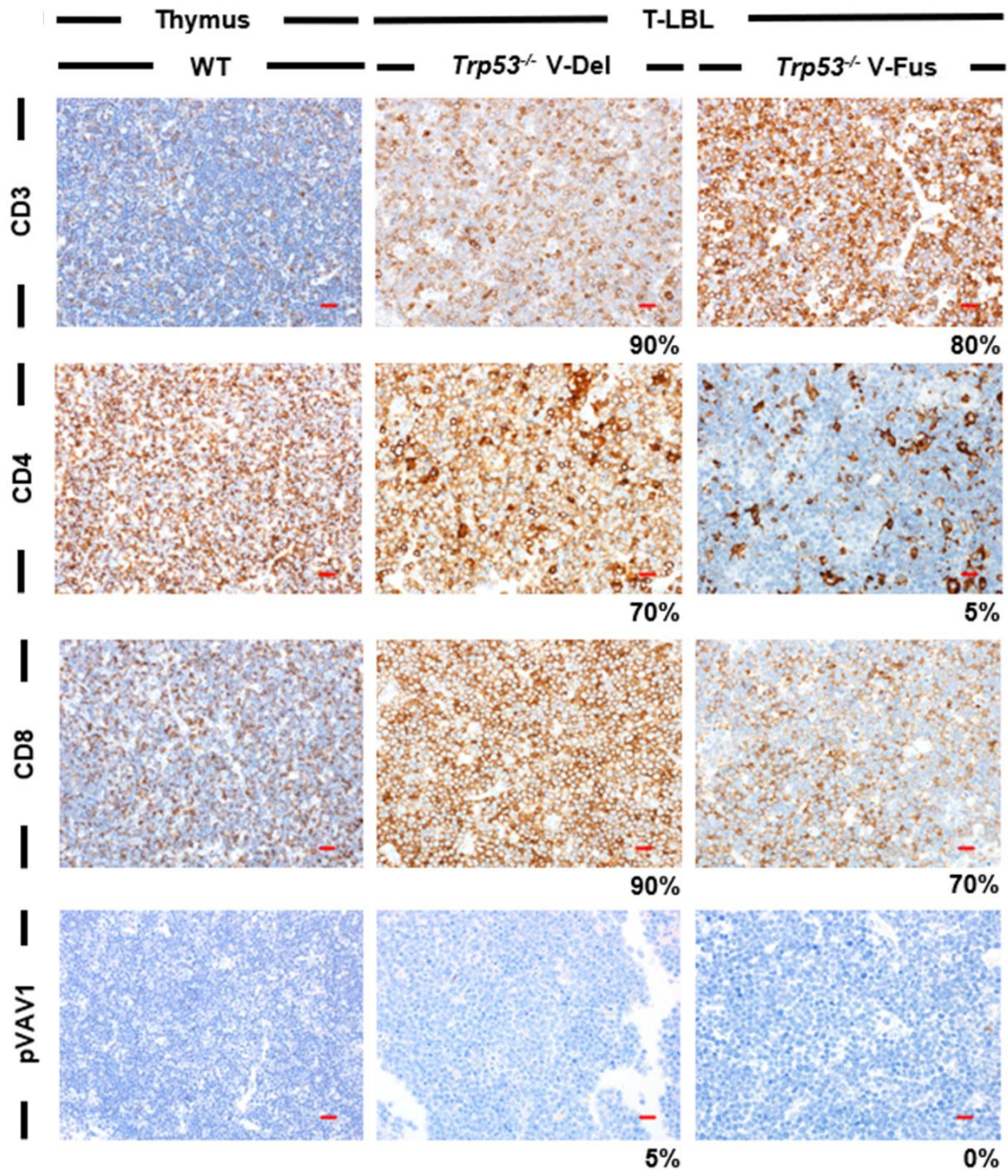
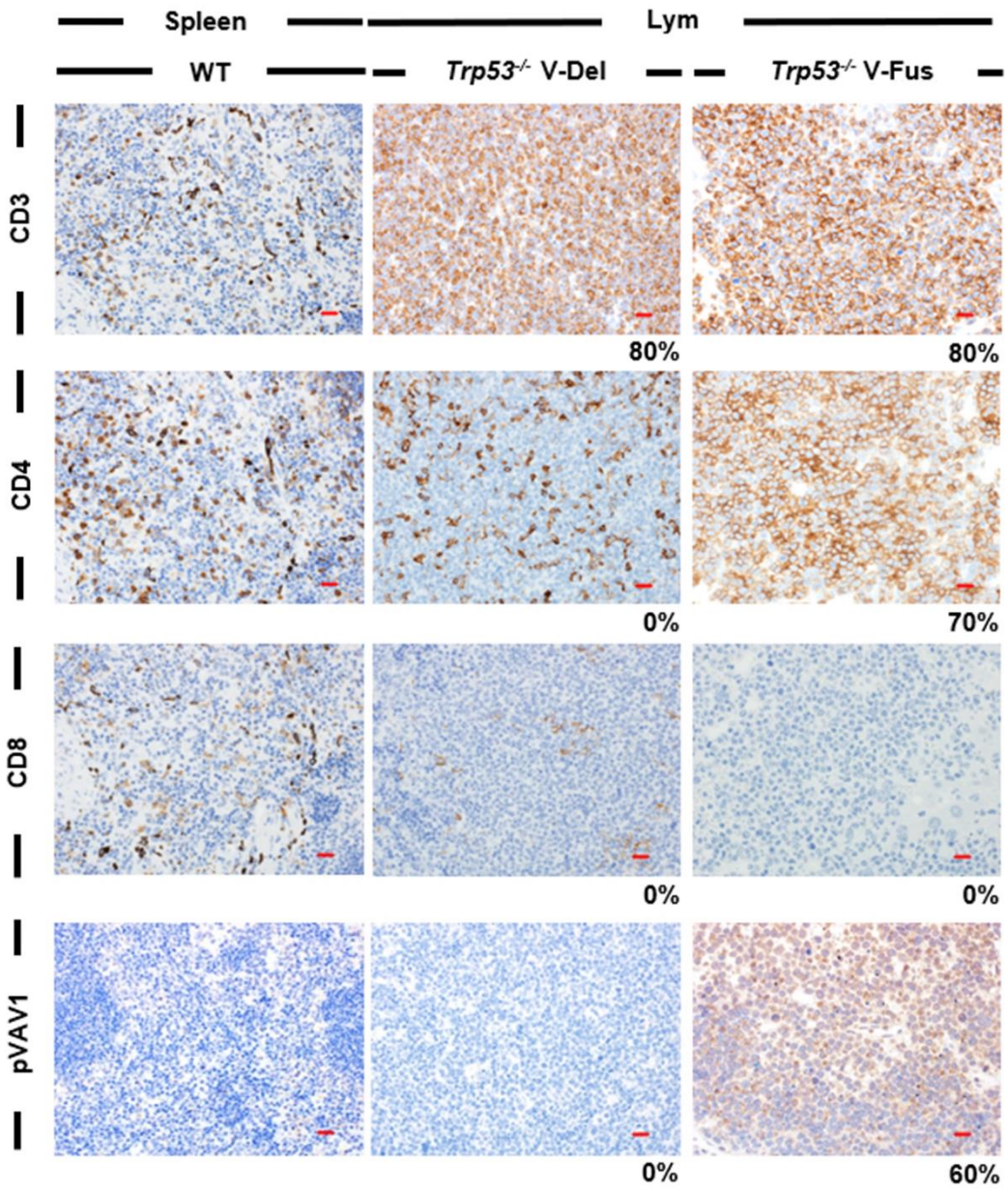
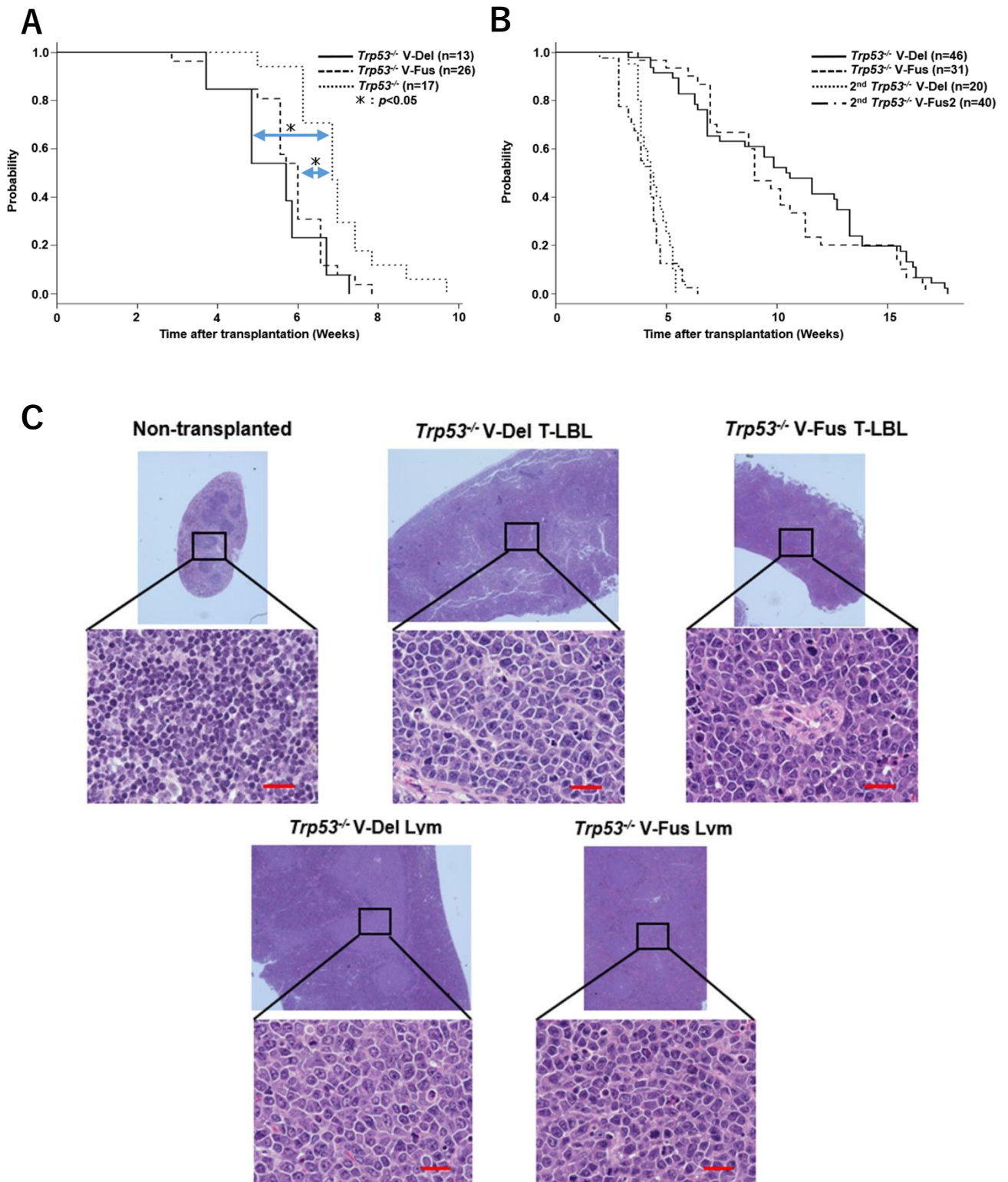




图 10

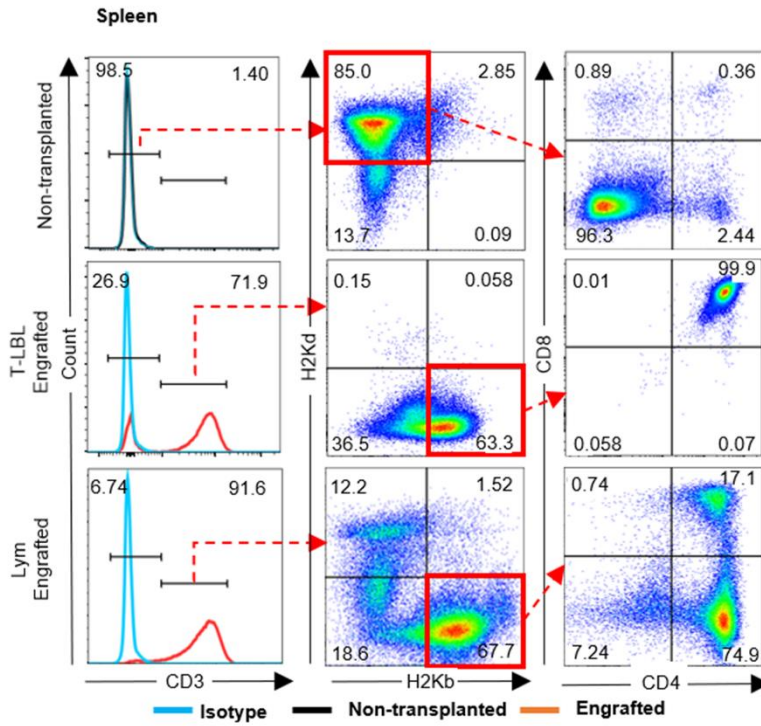


11

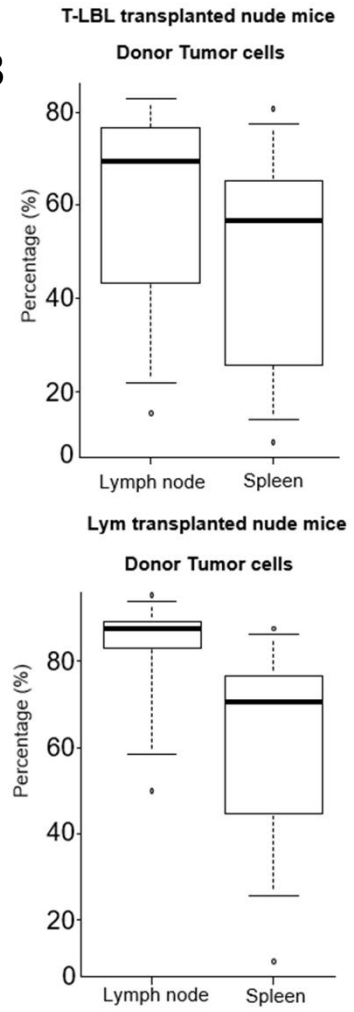




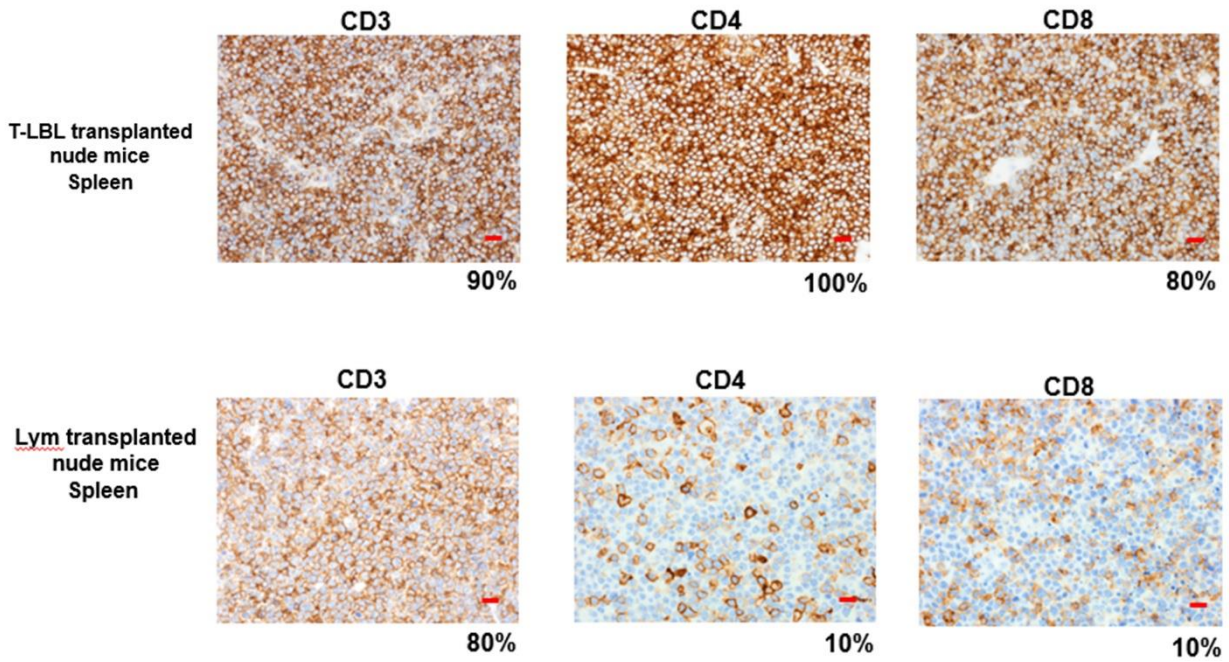
**A**

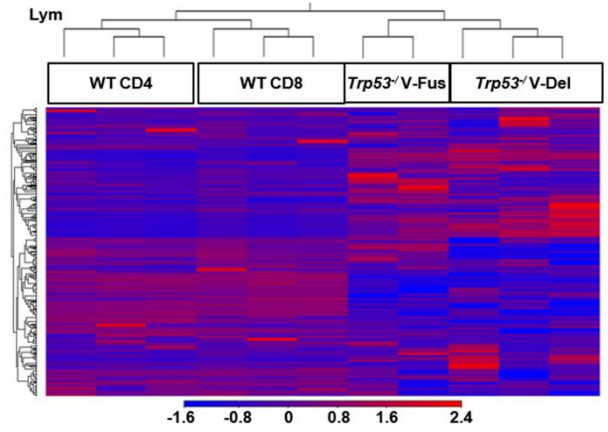
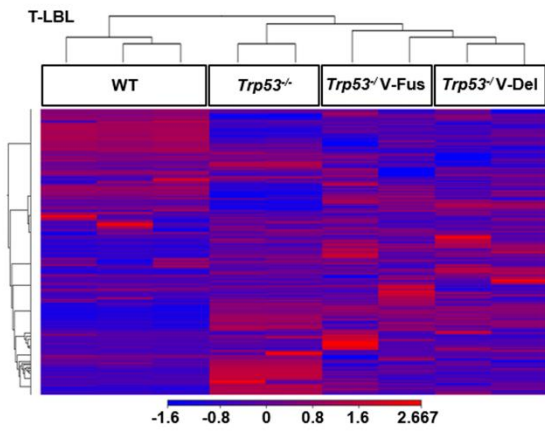
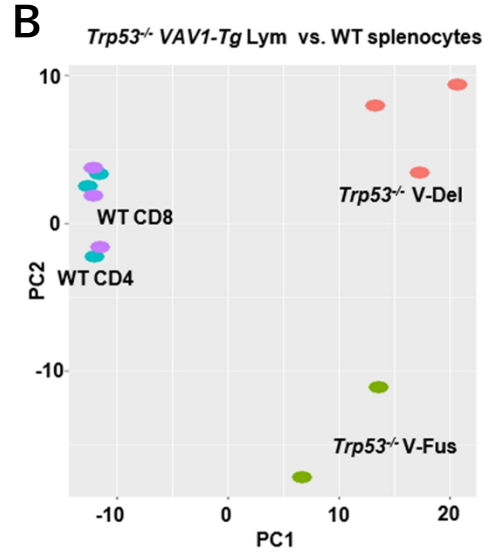
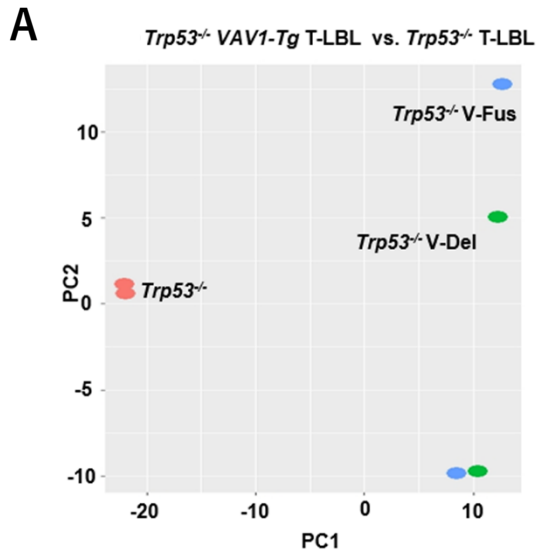


**B**

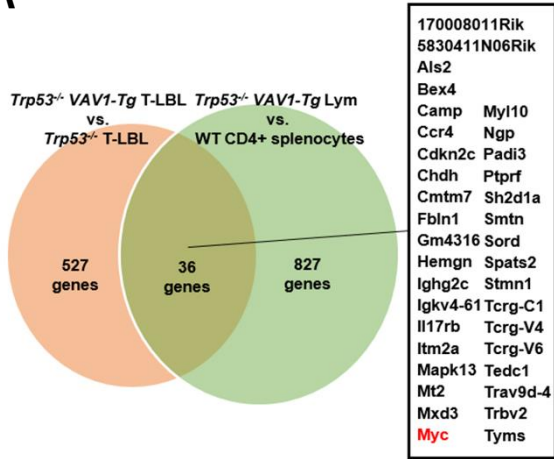


**C**

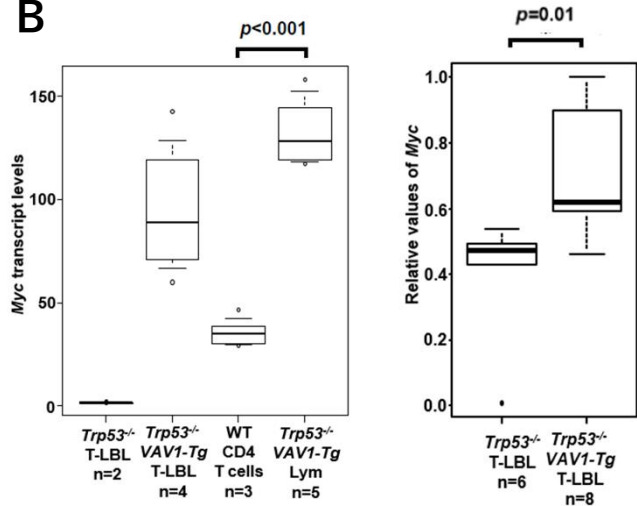




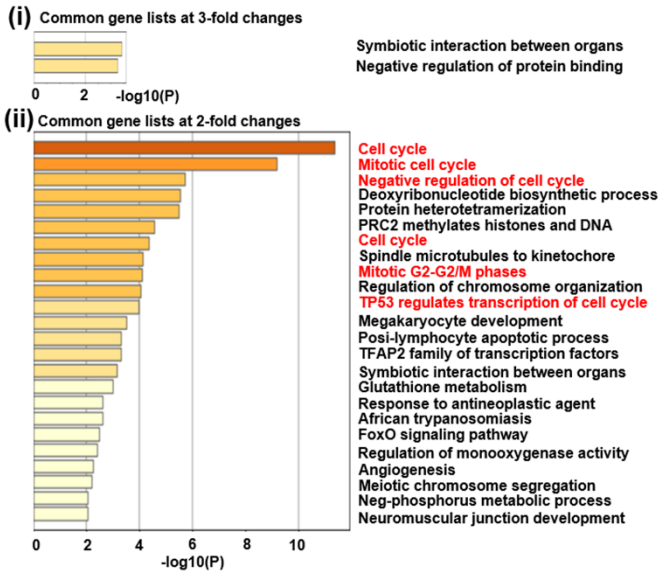
**A**



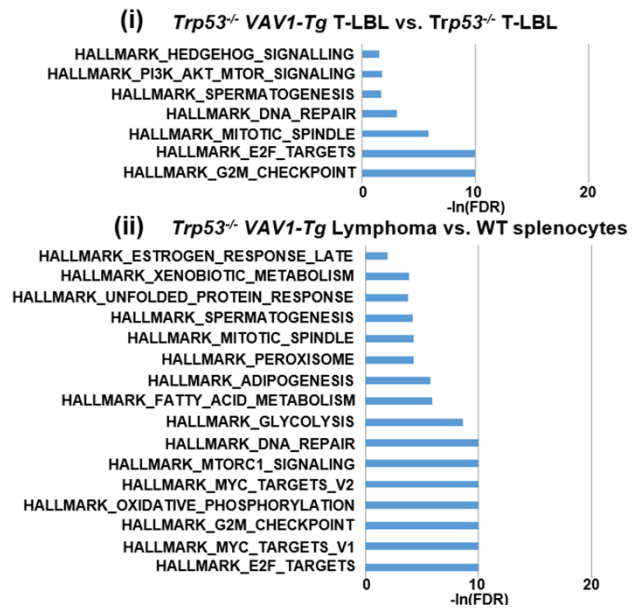
**B**



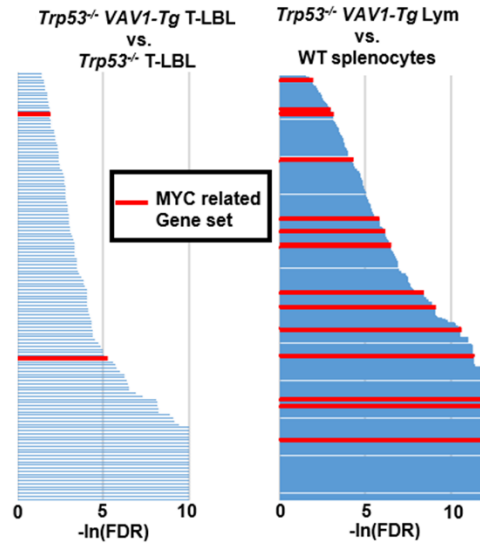
**C**



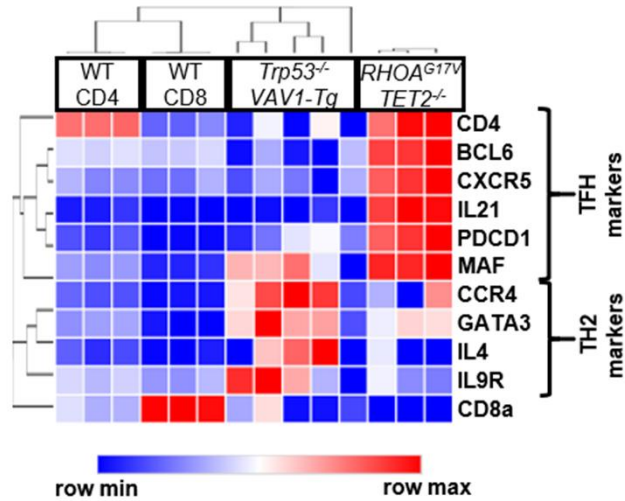
**D**



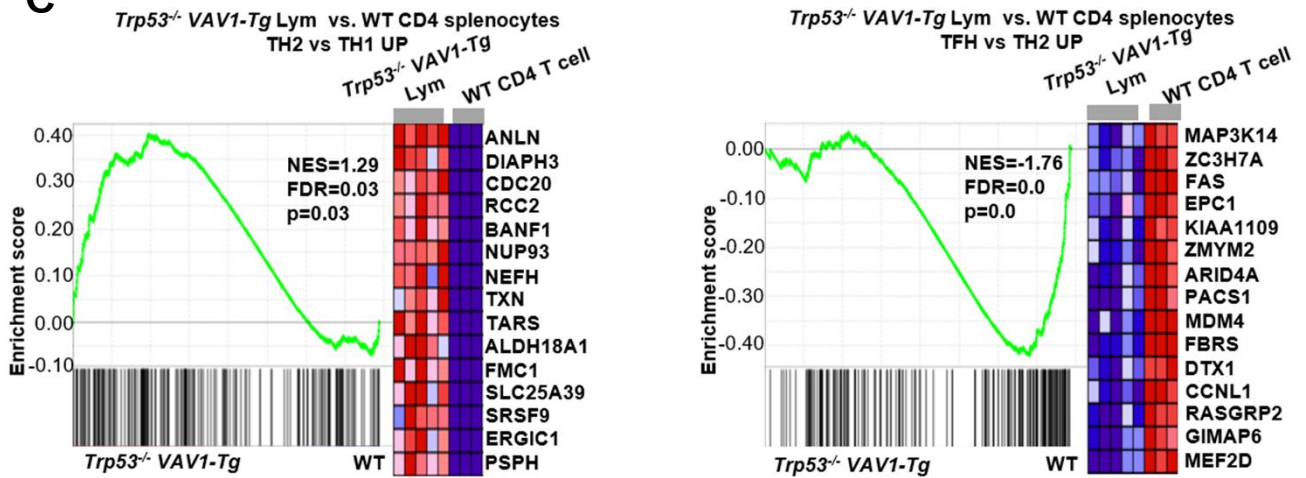
A



B

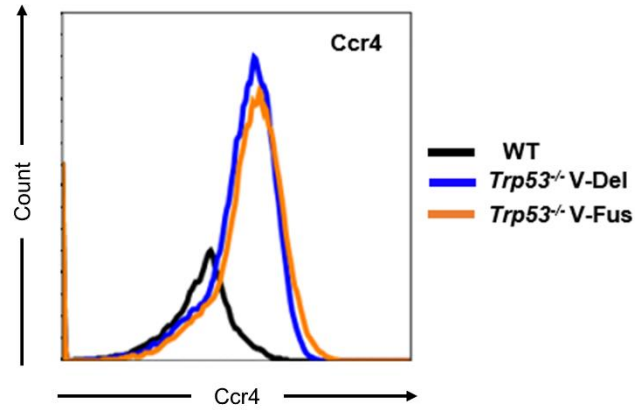


C

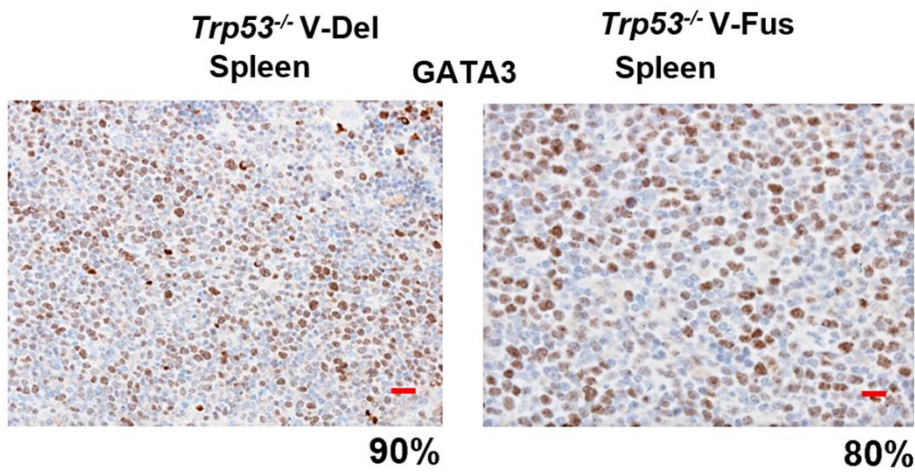




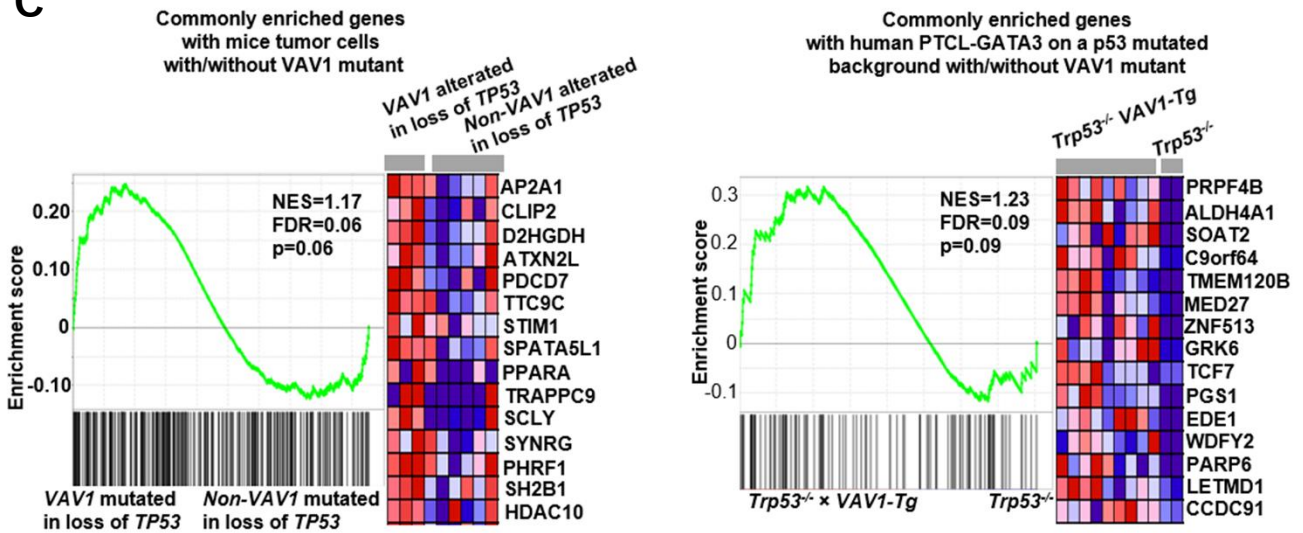
A



B



C



☒ 17

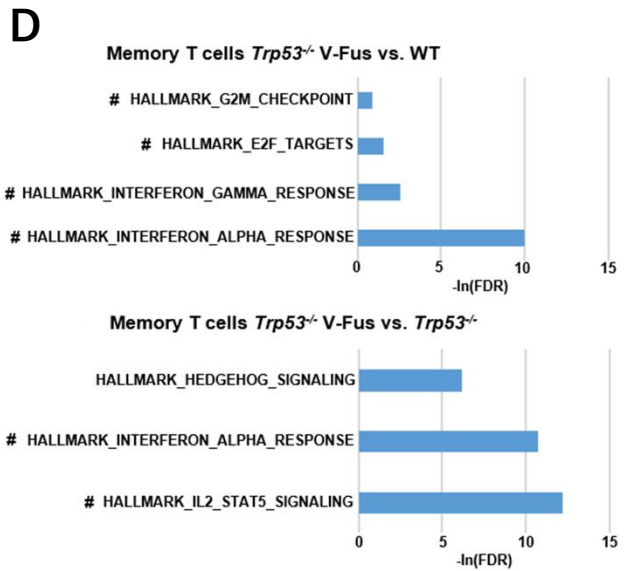
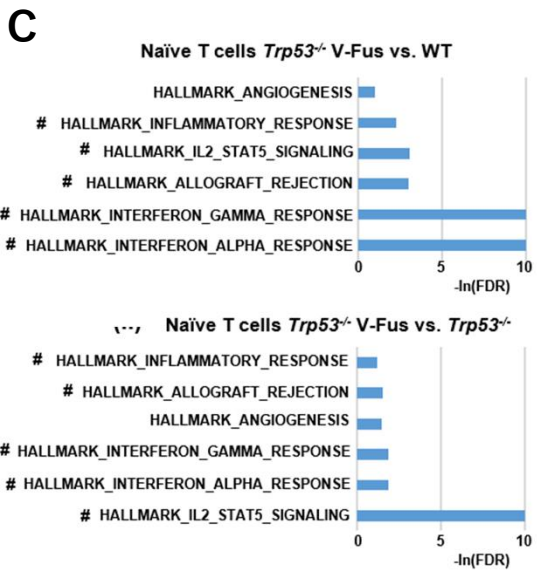
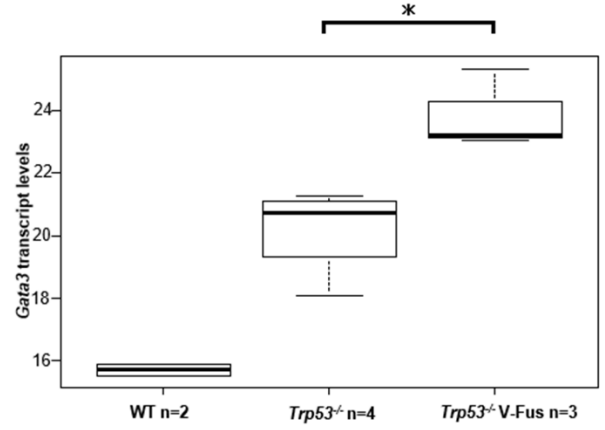
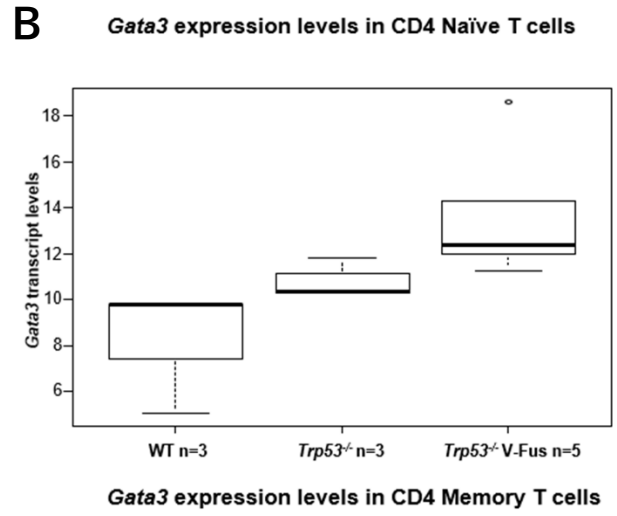
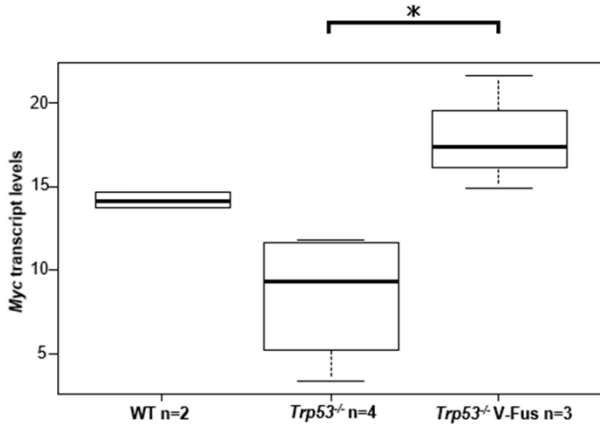
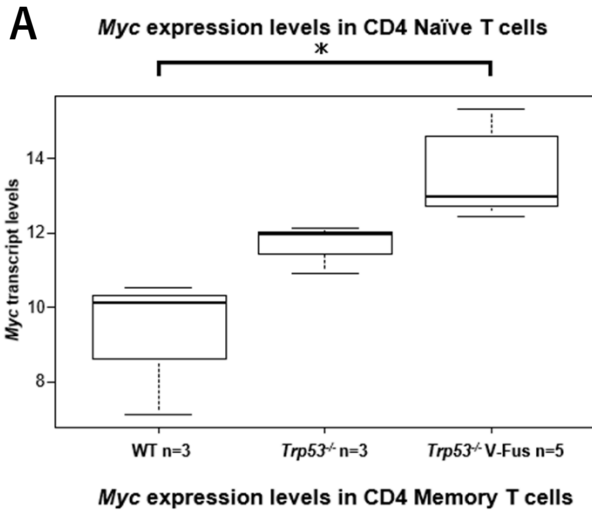
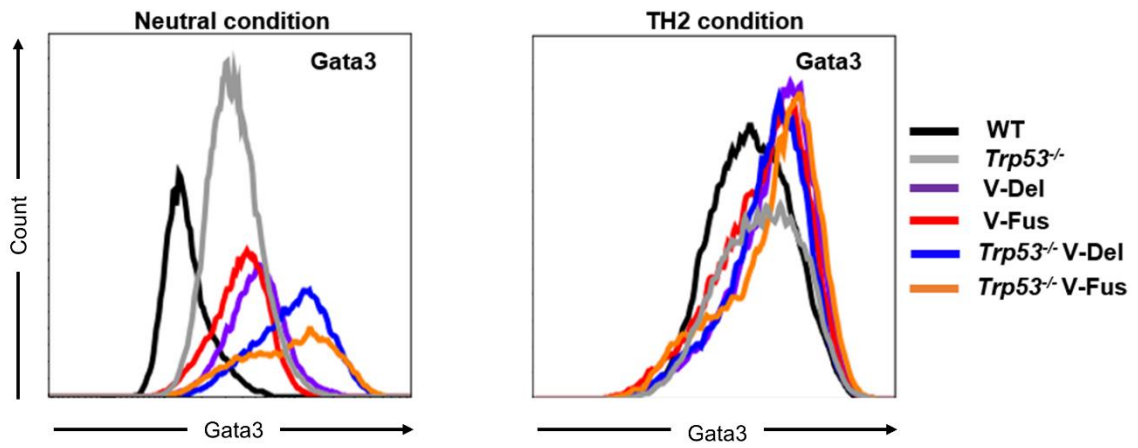
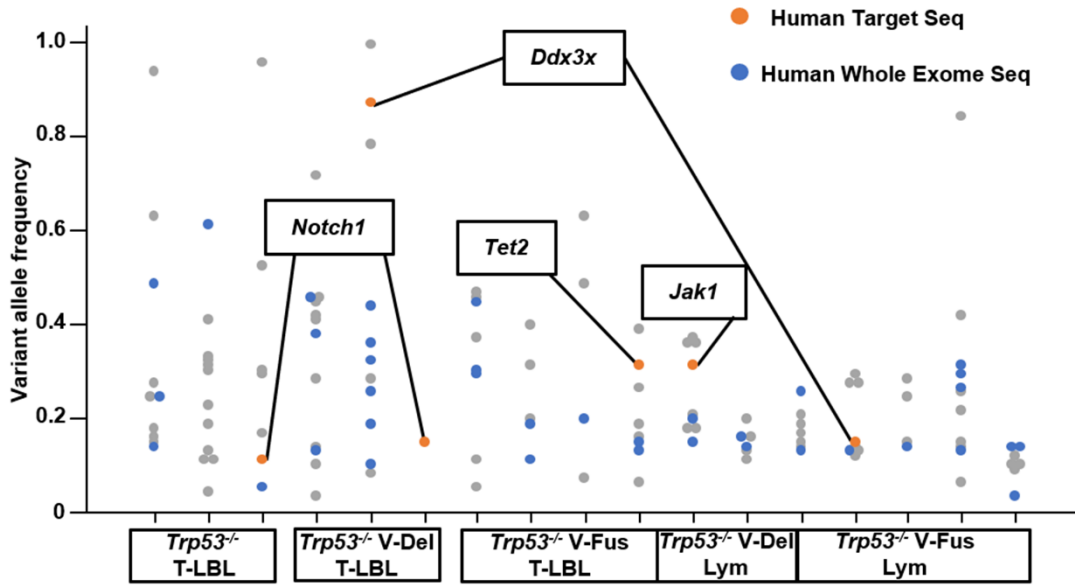


図 18

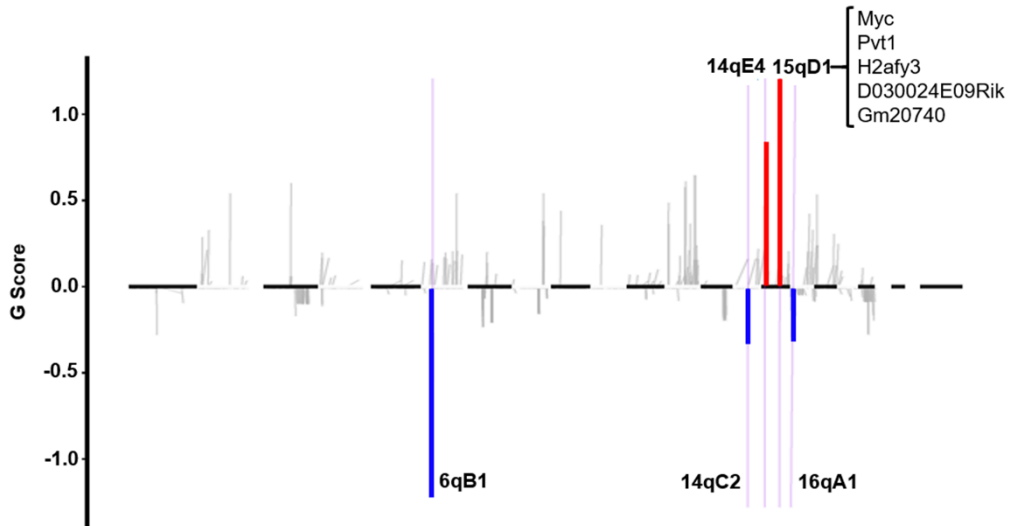


19

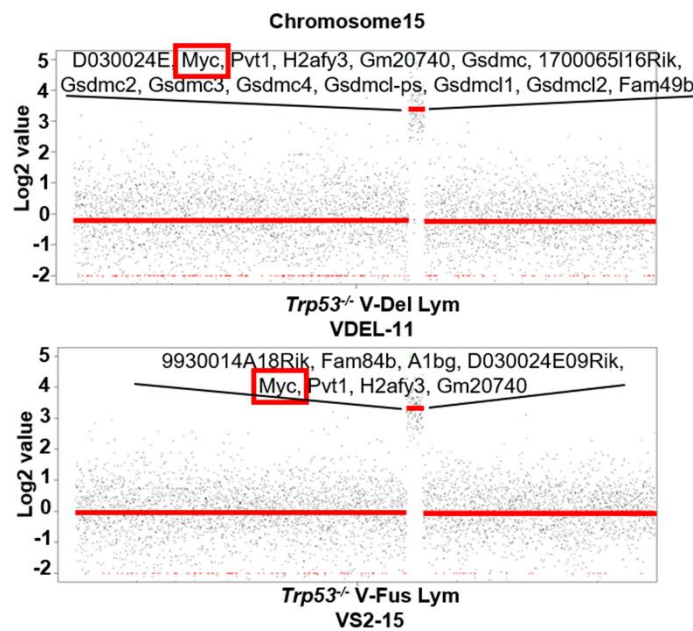
**A**



**B**

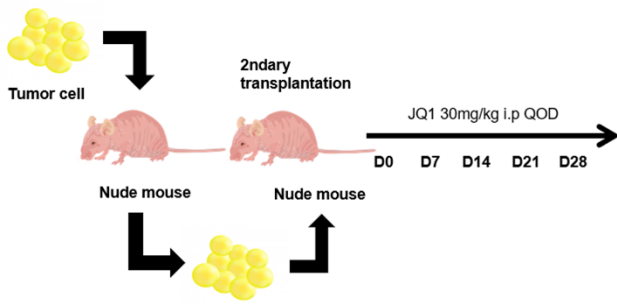


**C**

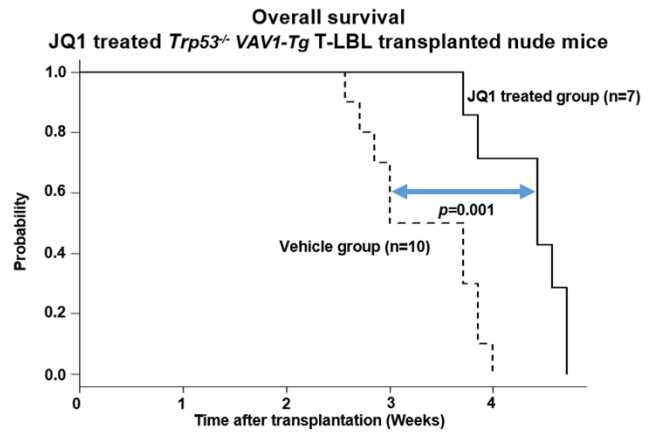




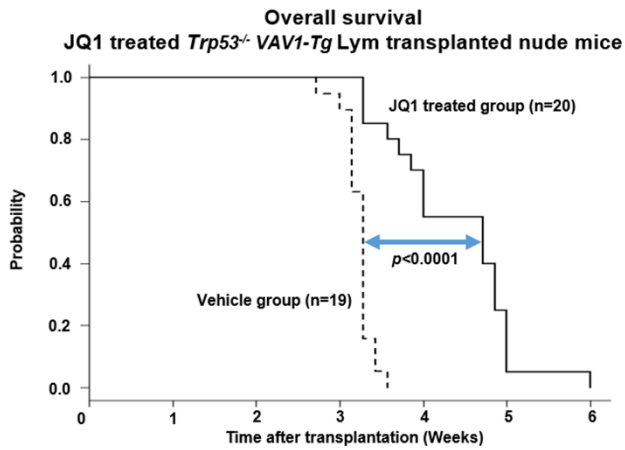
A



B



C



D

