

血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫において
新規に同定された疾患特異的遺伝子変異
G17V RHOA の機能解析

2014

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

榎 並 輝 和

筑 波 大 学

博士 (医学) 学位論文

血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫において
新規に同定された疾患特異的遺伝子変異
G17V RHOA の機能解析

2014

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

榎 並 輝 和

目次

第1章 序論	1
1.1 はじめに	1
1.2 背景	3
1.2.1 AITL における新規遺伝子変異 G17V <i>RHOA</i> の同定	3
1.2.2 Rho family GTPase について	9
1.3 本研究の目的	13
第2章 材料と方法	14
第3章 結果	22
3.1 G17V <i>RHOA</i> の活性化評価	22
3.2 G17V <i>RHOA</i> の野生型 <i>RHOA</i> に対する影響	25
3.3 G17V <i>RHOA</i> 以外の <i>RHOA</i> 変異体の機能解析	28
3.4 RhoGEF との結合能の評価	30
3.5 SRF-RE 転写活性に及ぼす影響	32
3.6 G17V <i>RHOA</i> の細胞骨格への影響	34
3.7 T 細胞株での G17V <i>RHOA</i> の影響	36

3.8 Jurkat 細胞及び 3T3 細胞での遺伝子発現への影響	39
第 4 章 考察	41
4.1 G17V RHOA のタンパク質構造からの考察	41
4.2 RHOA の腫瘍化への関与について	43
4.3 G17V RHOA と他の遺伝子変異との関係について	47
第 5 章 結語	51
第 6 章 謝辞	52
第 7 章 参考文献	53

第 1 章 序論

1.1 はじめに

血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫 (Angioimmunoblastic T-cell lymphoma : AITL) は、末梢性 T 細胞リンパ腫 (peripheral T-cell lymphoma : PTCL)の一亜型であり、高内皮細静脈と濾胞樹状細胞の増生を伴う多彩なリンパ球浸潤を呈し、リンパ節を侵す系統的疾患として特徴づけられている[1]。T 細胞リンパ腫の約 20%を占め、比較的高齢者に多く (年齢中央値 59~64 歳)、性差はほとんどない。臨床症状としては、全身リンパ節腫脹、脾腫、肝腫大、発疹、発熱、体重減少、多発性関節炎、胸腹水などを認め、診断時には進行病期であることが多い。典型例では、高 γ グロブリン血症、血清 LDH 上昇、赤血球沈降速度亢進がみられ、自己免疫疾患合併の頻度も高い[1, 2]。

AITL の腫瘍細胞はほとんどの症例で CD4 陽性であり、また近年の研究成果によって CD10、BCL6、CXCL13、PD-1 などの発現をしばしば認め、本腫瘍の正常対応細胞はリンパ濾胞 helper T 細胞 (follicular helper T cell : Tfh)であると認識されている[2, 3]。

また、末梢性 T 細胞リンパ腫、非特異群 (Peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified : PTCL-NOS)は、PTCL の約 30%を占め、他の疾患単位のいずれにも属さない PTCL と定義されている。この PTCL-NOS の中にも Tfh マーカ

一を発現し、形態学的にも AITL と同様の特徴を有する一群があることが知られている[4,5]。

これら AITL、PTCL-NOS の標準的治療は確立されておらず、非ホジキンリンパ腫で一般的に行われる CHOP 療法では予後不良である。造血幹細胞移植を含めた現在の治療方針でも、5 年生存率は約 30% と満足できる成績とは言えず、新規の治療薬の臨床応用が期待されている疾患群である[6]。

近年、*TET2*、*IDH2*、*DNMT3A* 遺伝子変異が AITL において高頻度に認められることが報告された[5, 7-9]。我々の研究グループは、これまで *TET2* 遺伝子を中心としたエピジェネティック分野に興味を持ち、研究を進めてきた。研究グループ内で解析している *TET2* ノックダウンマウスは、長期観察後に T 細胞性リンパ腫を発症しており、*TET2* が T 細胞性リンパ腫発症に関連していると推測される。しかし、*TET2* 変異は造血幹細胞に近い前駆細胞の段階で既に生じており、骨髄系腫瘍にも同様に認められることが報告されている[10-12]。このことは、T 細胞リンパ腫発症には *TET2* の機能抑制以外に、別の遺伝子要因が必要であることを示唆している。

そこで自分も参加している研究チームは、全エクソームシーケンス(Whole exome sequence : WES)[13]を用いて、AITL における新規遺伝子変異の検索を行うこととした。その結果、*RHOA* 遺伝子変異が高頻度に、そして疾患特異的に認

められることを明らかにした。

序論では、まず我々のチームが同定した AITL における *RHOA* 遺伝子変異について説明し、Rho family GTPase について概論していく。

1.2 背景

1.2.1 AITL における新規遺伝子変異 G17V *RHOA* の同定

我々のチームは、AITL における特異的な新規遺伝子変異を検出するために、AITL 3 例および PTCL-NOS 3 例の検体 (Table 1) を用いて WES を行った。

WES の結果、計 87 個のノンサイレント変異が同定された (Fig. 1)。内訳はミスセンス変異が 79、ナンセンス変異が 5、フレームシフト変異が 2、ノンフレームシフトの欠失が 1 であった。これらのうち、複数の検体で同定された変異遺伝子は *RHOA* のみであり、AITL 3 例、PTCL-NOS 1 例の 4 検体で確認された。

RHOA の変異部位は全て c.50G>T のミスセンス変異であり、この変異から生じるアミノ酸置換は p.G17V であった。いずれの検体でも、*RHOA* 付近のアレル不均衡は認めなかったことから (Fig. 2)、この G17V *RHOA* 変異はヘテロ変異であることが示唆された。

Sample ID	Age	Sex	Diagnosis	Disease Status	Stage	Germline Control	Status of DNA
PTCL1	53	F	AITL	diagnosis	stage4A	PB ^{*1}	original
PTCL2	84	M	AITL	diagnosis	stage2A	BM ^{*2}	original
PTCL3	75	F	PTCL-NOS	diagnosis	stage4B	BM	original
PTCL4	75	M	AITL	diagnosis	stage4B	BM	original
PTCL5	45	M	PTCL-NOS	diagnosis	stage3B	buccal mucosa	original
PTCL6	68	M	PTCL-NOS	diagnosis	stage2A	BM	original

^{*1} PB, peripheral blood cells

^{*2} BM, bone marrow cells

Table 1 WESで用いた患者検体

PTCL 6 例の患者検体情報を提示する。Germline のコントロールとしては、末梢血、骨髓細胞および口腔粘膜の DNA を用いた。

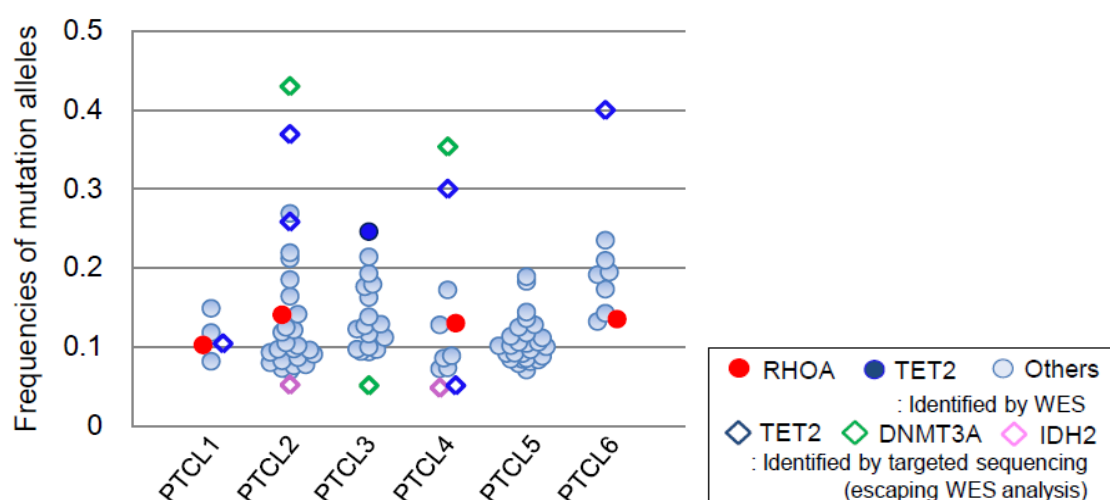


Fig. 1 WES より得られた体細胞変異の分布

AITL 3 例、PTCL-NOS 3 例の検体から得られた体細胞変異を、変異アレルの頻度に分けてプロットした。G17V *RHOA* 変異は赤、*TET2* 変異は青、それ以外の変異遺伝子は水色で示している。ターゲットシーケンスで新たに見つかった変異 (*TET2*: 青、*DNMT3A*: 緑、*IDH2*: 紫)に関しては、菱形で別に示した。

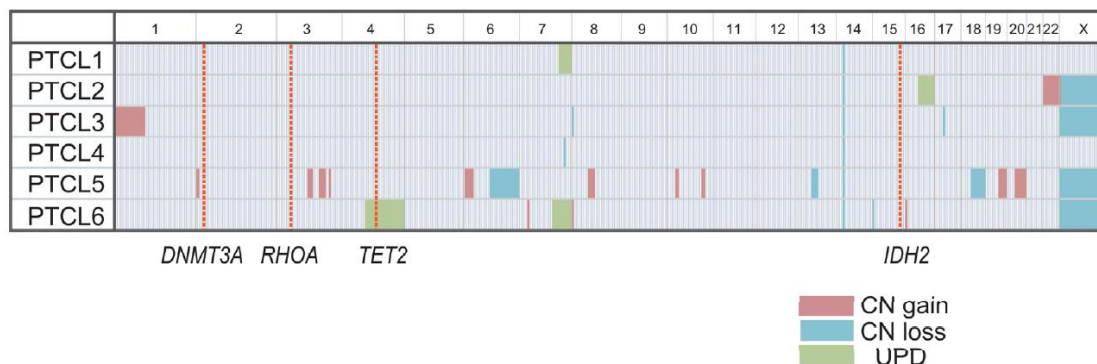


Fig. 2 SNPマイクロアレイによるコピー数変動、アレル不均衡の解析

WESで用いた検体のゲノムDNAを、250k GeneChip SNP genotyping microarray (Affymetrix) にて解析した。アレイデータはCopy Number Analyzer for GeneChips (CNAG) software[14]にてアレル特異的コピー数を解析した (<http://www.genome.umin.jp>)。RHOA付近のアレル不均衡は認めなかった。CN, copy number, UPD, uniparental disomy

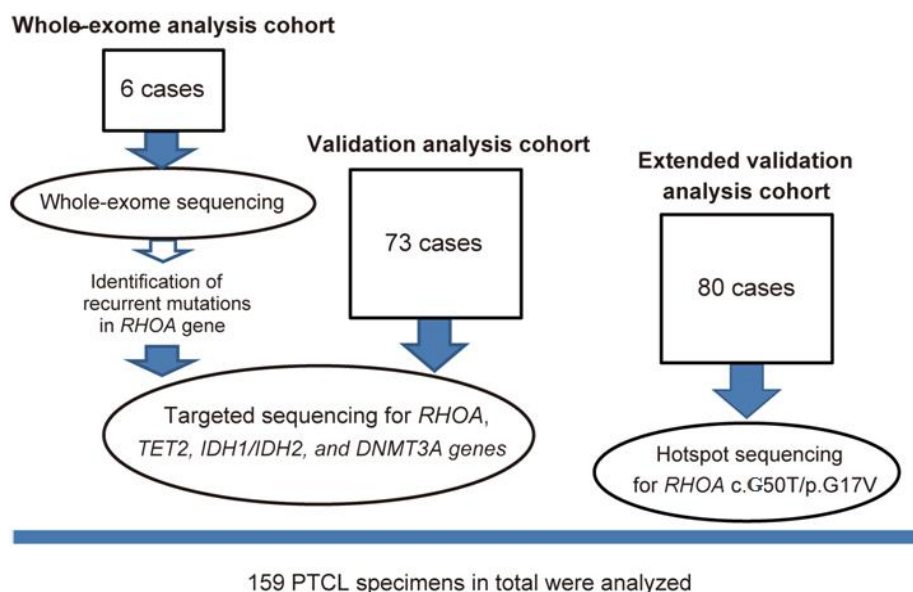


Fig. 3 シーケンス解析のストラテジー

WESにて新規RHOA変異を同定したため、RHOA遺伝子と、既報で変異の存在が知られているTET2、IDH1/2、DNMT3A遺伝子に関して、WESの6例と新たに73例を追加してターゲットシーケンスを行った。さらに、G17V RHOAのホットスポットに関しては、追加の80例でホットスポットシーケンスを行った。

我々のチームは、さらなる詳細な解析のため、*RHOA*遺伝子のターゲットシーケンスを、WESの6例を含んだ79例 (AITL 46例、PTCL-NOS 33例)に対して行った。さらに、G17V *RHOA*のホットスポットシーケンスを、追加で80例 (AITL 26例、PTCL 54例)に対して行った (Fig. 3)。

シーケンスの結果、*RHOA*変異は159例中の66例で認められ、その頻度はAITLで特に高かった (AITL : 51/72 (70.8%)、PTCL : 15/87 (17.2%))。このうち、64例はc.G50T/p.G17V変異であり、残りの2例はインフレーム変異のc.49_51del/p.G17delと、ミスセンス変異のc.482C>A/ p.161A>E であった (Fig. 4, Table 2)。

G17V *RHOA*変異は、他の血液腫瘍 (骨髄腫瘍、成熟B細胞腫瘍、AITL・PTCL -NOS以外の成熟T細胞腫瘍)からは検出されず (Table 3)、少なくとも血液腫瘍においてはAITLとPTCL-NOSに特異的であると考えられた。さらに、PTCL-NOSにおいて、Tfhの特徴を持たない症例では*RHOA*変異が見られなかったことから、*RHOA*変異とTfhの特徴を有するPTCLとの相関が極めて強いと推測された (Table 3)。

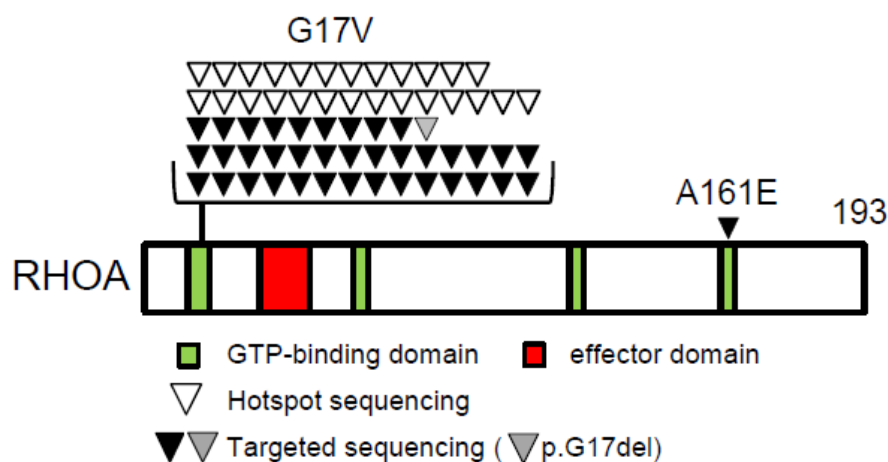


Fig. 4 *RHOA* 遺伝子変異の位置

159 例のシーケンスの結果から得られた *RHOA* 変異の位置を示す。黒三角はターゲットシーケンスで同定されたもの、白三角はホットスポットシーケンスで同定されたものである。1 検体でみられた G17del 変異は、灰色で示している。*RHOA* タンパク質において、GTP 結合ドメインは緑色、エフェクタードメインは赤色で示す。

Change of Transcript	Amino Acid Change	Type of Mutation	Number of Mutations
Targeted Sequencing (n = 79)			
c.G50T	p.G17V	Missense	37
c.C482A	p.A161E	Missense	1
c.49_51del	p.G17del	Nonframeshift del	1
Hotspot Sequencing (n = 80)			
c.G50T	p.G17V	Missense	27
Total (n = 159)			

Table 2 *RHOA* 遺伝子変異のまとめ

各シーケンス解析で見つかった *RHOA* 変異のまとめを示す。

ターゲットシーケンス 79 例中、G17V 変異が 37 例、A161E 変異が 1 例、G17del 変異が 1 例であった。ホットスポットシーケンスでは、80 例中 27 例に G17V 変異を認めた。

Disease	Number of mutated cases (%)
[T cell malignancies]	n=170
AITL ^{*1}	51/72 (70.8)
PTCL-NOS	15/87 (17.2)
with Tfh-like features	13/21 (61.9)
w/o Tfh-like features	0/38 (0)
ND ^{*2}	2/27 (7.4)
Other T cell malignancies	0/11 (0)
[B cell malignancies]	n=91
DLBCL	0/44 (0)
FL	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)

^{*1} G17del 1 例、A161E 1 例を含む

^{*2} Not determined

Table 3 他の血液腫瘍における G17V *RHOA* 変異

B 細胞腫瘍 91 例、骨髄性腫瘍 142 例には G17V *RHOA* 変異は認められなかった。

T 細胞リンパ腫 170 例のうち、G17V *RHOA* 変異を認めたのは AITL、および PTCL-NOS のみであった。このうち、Tfh-like features を持たない PTCL-NOS には変異が見られなかった。

※Tfh-like features：免疫組織学検査にて、以下の 4 項目のうち、2 項目以上当てはまるものを Tfh-like features と定義する。(1) 腫瘍細胞が CD10 陽性 (2) 腫瘍細胞が PD-1 陽性 (3) CD21 陽性の濾胞樹状細胞の増加 (4) EBER 陽性の B 細胞の存在

1.2.2 Rho family GTPases について

Rho family GTPasesはRas 類似の低分子量GTP結合タンパク質の一つであり、細胞骨格の主な制御因子として知られている。哺乳類では約20種類のメンバーが同定されているが、これらのうち、特にRHOA、Rac1、Cdc42についての研究が進んでいる[15]。

Rho family GTPaseの活性は、各メンバーに特異的に作用する3種類の因子によって主に制御されている (Fig. 5)。1つ目は、Rho guanine nucleotide exchange factor (RhoGEF)であり、不活性型Rhoに結合したGDPをGTPに置換することで活性型へと移行させる。多くのRhoGEFは、触媒活性を有するDbl homology (DH) ドメインと隣接するPleckstrin homology (PH) ドメインを持つ[16]。2つ目はRho GTPases-activating protein (RhoGAP)であり、Rhoの内在的なGTPase活性を亢進させることで、活性型Rhoに結合しているGTPをGDPに加水分解し、Rhoを不活性型へと移行させる[17]。3つ目のRho guanine nucleotide dissociation inhibitor (Rho GDI)は、不活性型RhoのC末端にあるイソプレニル基に結合してGDPの解離を抑制するとともに、細胞膜への移行を阻害している (Fig. 5) [18]。

Rhoは、不活性型のGDP結合Rhoと活性型のGTP結合Rhoとの間を往復し、細胞反応の分子スイッチとして働いている。活性型Rhoファミリーが下流のエフェクター分子に結合することによって、初めてその作用が発揮される[15]。

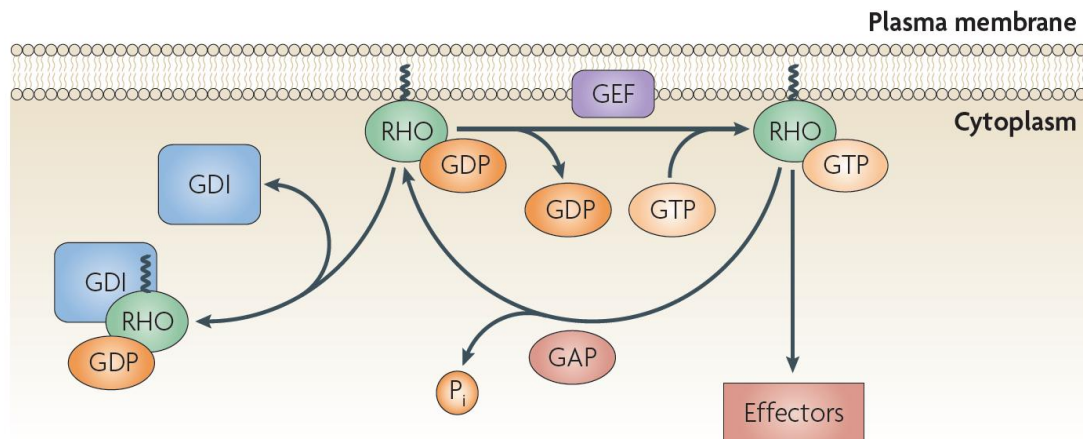


Fig. 5 分子スイッチとしての Rho Family GTPase (文献 19 より引用)

Rho は GTP と結合した活性型と、GDP と結合した不活性型の間を往復して、細胞内の分子スイッチとして機能している。Rho は RhoGEF によって GDP と解離し、細胞質内に豊富に存在する GTP と結合して活性型となる。反対に、RhoGAP により GTP から GDP へ加水分解を受け、不活性型となる。GDI は不活性型 Rho と結合することで、Rho の細胞膜への移動を阻害し、不活性型を維持している。

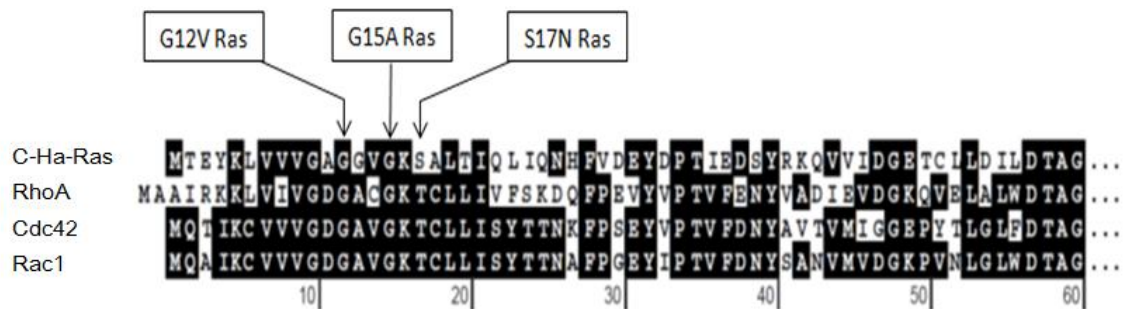


Fig. 6 N末端領域における、Rho family GTPasesのアミノ酸配列 (文献20より改変引用)

がん遺伝子であるc-Ha-Rasと、代表的なRho family GTPasesである、RHOA、Cdc42、Rac1のN末端領域のアミノ酸配列を示す。同一のアミノ酸配列は白抜きで示しているが、これら4つのGTPasesは非常に相同性の高い配列を有している。矢印は、c-Ha-Rasにおける活性型変異 (G12V Ras)、DN変異 (G15A Ras、S17N Ras)の位置を示している。

低分子量 GTP 結合タンパク質の細胞内での機能に関しては、以前より活性型変異体およびドミナントネガティブ (dominant negative: DN) 変異体を用いて研究がなされてきた。その代表的なメンバーが Ras である。活性型変異体として用いられる G12V Ras は、実際に悪性腫瘍検体から同定されたものであり、また、DN 変異体は、ランダムに突然変異を導入した変異体を用いた実験によって見出され、その中でも最も利用されている変異体は S17N Ras である[21]。Fig.6 に示したように、Ras と RHOA、Cdc42、Rac1 の N 末端領域のアミノ酸配列は極めて類似しており、同様の立体構造をとると考えられる。RHOA についても、Ras 変異体に対応する活性型変異体 (G14V RHOA)、DN 変異体 (T19N RHOA) が主に用いられ、様々な機能解析が行われてきた。

RHOA は、細胞骨格の制御において、アクチンストレスファイバーや細胞接着斑の形成に必須であることが知られているが[22]、その他にも細胞分裂、細胞周期、転写調節、細胞移動、細胞極性、細胞接着等、様々な細胞内プロセスに重要な役割を果たしていることが明らかとなった[23]。RHOA の主なエフェクタータンパク質としては mDia (mammalian homolog of Drosophila diaphanous) と ROCK (Rho-associated coiled-coil forming kinase) の 2 つが知られている。いずれもアクチン細胞骨格に対する作用が明らかにされており、mDia はアクチン重合を促進し、線維化アクチンを増生させる一方、ROCK はミオシンを活性化させア

クトミオシン収縮力の増強と、アクチン脱重合の抑制に働いている[24]。このように mDia と ROCK はストレスファイバーの形成に協調的に働いているが、互いに拮抗する作用があることも知られている。Rho を特異的に不活化するボツリヌス C3 酵素や ROCK inhibitor を用いた線維芽細胞の解析では、mDia は c-Src を介して Rac の活性化を誘導するのに対し、ROCK はこれを抑制する働きを有する[25]。この RHOA-ROCK 経路と RHOA-mDia-Src-Rac 経路の選択は、活性化 RHOA の割合に依存していることも、神経細胞の解析で明らかにされている[26]。RHOA 活性が高い場合には、ROCK、mDia 共に活性化されるが、ROCK により mDia 経路が抑制されるため、結果として ROCK 経路が優位となる。逆に RHOA 活性が低い場合には mDia が優先的に活性化され、mDia 経路が優位となる。つまり、RHOA の活性の程度によって表現系が変化することが推測されている。

悪性腫瘍においては、多くのがんで RHOA の発現上昇が認められ、また、がんの進行により発現が増加することが数多く報告されている[27]。発癌における RHOA の関与は、RHOA-ROCK 経路が Ras による細胞悪性化に必須であることが以前から知られていたが[28]、近年では、RHOA-mDia 経路が v-Src を細胞膜へ移行させることにより、v-Src による細胞悪性化と腫瘍形成を促進させることが明らかにされている[29]。以上のことから、RHOA シグナルを抑制することで、がんの進展も抑制されると一般的に認識されてきた。

1.3 本研究の目的

我々のチームが同定した AITL における新規遺伝子変異 **G17V RHOA** は、疾患特異的かつ高頻度に認められており、AITL 発症の直接の原因である可能性が高いと考えられる。そのため、**G17V RHOA** の機能解析によって、AITL の病態解明につながるだけでなく、この変異体や、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、新規治療薬の創薬への貢献も期待できる。そこで私は、この **G17V RHOA** の詳細な機能解析を行うことを目的に、本研究を開始した。

第2章 材料と方法

細胞株およびトランスフェクション

NIH3T3 細胞および HEK293T 細胞の培養には、低グルコースの Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma)にウシ胎仔血清 (FCS)を 10%、ペニシリン/ストレプトマイシン (PS)を 1%となるように添加したものをを用い、5%CO₂、37°Cのインキュベーター内で培養した。遺伝子導入は、リポフェクション試薬である FuGene6 (Roche)を用いて、添付のプロトコールに従って行った。

Jurkat 細胞は、RPMI-1640 Medium (Sigma)に 10% FCS と 1%PS を添加したものをを用い、5%CO₂、37°Cのインキュベーター内で培養した。

抗体

ウェスタンブロット、および免疫染色に用いた抗体は以下の通りである。

マウス抗 RHOA 抗体 (Cytoskeleton)、マウス抗 β -actin 抗体 (Sigma)、マウス抗 DDDDK タグ抗体 (MBL)、マウス抗 Myc タグ抗体 (MBL)、マウス抗 GST タグ抗体 (MBL)、ウサギ抗 ECT2 抗体 (Millipore)、ヤギ抗マウス IgG/HRP 抗体 (Dako)、ヤギ抗ウサギ IgG/HRP 抗体 (Dako)、ヤギ抗マウス IgG-Alexa Fluor 647 抗体 (Invitrogen)。

変異導入および遺伝子導入ベクターの作製

健康人末梢血単核球由来の cDNA から PCR 法を用いて、ヒト *RHOA* の cDNA を増幅した。G14V、G17V、 G17del、 T19N、 A161E *RHOA* 変異は、PrimeStar mutagenesis Basal Kit (TaKaRa)を用いてプロトコールに従って作製した。そして、野生型 *RHOA*、および全ての変異型 *RHOA* に対し、N 末端に Flag タグ、及び c-Myc タグを挿入した cDNA を作製した。これら全ての cDNA は、発現ベクターである pEF-neo、レトロウイルスベクターである pGCDNsamIRESGFP[30]、または、テトラサイクリン誘導システムを持つレンチウイルスベクターである CS-TRE-PRE-Ubc-tTA-I2G7[31]へ挿入した。また、GFP 融合 ECT2 の cDNA から N 末端欠損型変異体 (414–882 残基)を PrimeStar mutagenesis Basal Kit を用いて作製した。野生型および G17V *RHOA* cDNA を pGEX-2tk vector (GE Healthcare) に挿入した。上記全てのプラスミドは、サンガー法にてシーケンスを行い、配列が正しいことを確認した。

レトロウイルスによる遺伝子導入

各々のレトロウイルスベクターを、VSVG 発現プラスミドとともに、HEK293gp パッケージング細胞へ共トランスフェクションした[32]。2 日間培養後、レトロウイルスが含まれた細胞上清を回収した。HEK293gp 細胞へ添加し、レトロウ

ウイルスを感染させて、高力価のレトロウイルスを産生させた。

野生型および変異型 **RHOA** を持続的に発現する細胞株を作製するため、**NIH3T3** 細胞に高力価レトロウイルスを感染させた。レトロウイルスベクターに搭載されている **GFP** を発現する感染細胞のみを、**FACSAria (BD Bioscience)**を用いて分離した。分離後の感染細胞の陽性率は **95%**以上であることを確認した。

RHOA 活性の評価

RHOA 活性の評価を **RHOA activation assay kit (Cytoskeleton)**を用いてプロトコール通りに行った[33]。グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (**GST**)を融合させた **Rhotekin** の **RHO** 結合ドメイン (**GST-RBD**)がグルタチオンセファロースビーズに固定されており、このビーズと細胞溶解液を **4°C**、**1 時間**で反応させた。キットに添付されている溶解バッファーで **2 回**、洗浄バッファーで **1 回**洗浄後、**Laemmli buffer** に溶解し、**95°C**、**5 分**煮沸した。**12% SDS-PAGE** ゲルに泳動し、抗 **RHOA** 抗体、抗 **Flag/Myc** タグ抗体を用いたウェスタンブロッティング法にて、活性型 **RHOA** を検出した。細胞溶解液も同様にウェスタンブロットを行い、**RHOA** の全タンパク質量も検出した。検出されたバンドはデンシトメーターにて定量化した。

GST 融合タンパク質を用いたタンパク質相互作用解析

GST を融合した野生型 RHOA と G17V RHOA を、以前報告されている方法を参考にして作製した[34]。野生型および変異型 RHOA が挿入されている pGEX-2tk vector を大腸菌 BL21 株 (TaKaRa) に形質転換し、GST 融合 RHOA を発現させた。大腸菌を lysis buffer (20 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, and 1 % Triton X, 1 mM dithiothreitol, and 1 mM phenyl -methylsulfonyl fluoride) に溶解させ、超音波にて破碎した。4°C、20,000×g で 15 分間遠心後、上清をグルタチオンセファロース 4B ビーズ (GE healthcare) と共に 4°C、45 分間反応させた。その後、lysis buffer にて 2 回洗浄した。

N 末端欠損 ECT2 を NIH3T3 細胞にトランスフェクションさせ、48 時間後に lysis buffer にて溶解した。この細胞溶解液と GST 融合 RHOA を 4°C、2 時間反応させた。その後ビーズを 3 回 lysis buffer で洗浄後、Laemmli buffer に溶解し、95°C 5 分間煮沸した。SDS-PAGE にてタンパク質を分離した後、抗 GST 抗体、抗 ECT2 抗体でタンパク質を検出した。

SRF-RE レポーター解析

血清応答因子応答配列 (Serum Response Factor-Response Element : SRF-RE) の活性を測定するため、pGL4.34 レポーターベクター (Promega) を用いてレポーター

アッセイを行った。SRF-RE は ternary complex factor (TCF) binding domain を欠いた serum response element の変異型であり、RHOA が活性化されることで引き起こされる SRF 依存、TCF 非依存パスウェイに反応するように設計されている[35]。24 穴プレートに NIH3T3 細胞を播種し、1 ウェル当たり pGL4.34 ベクター 40ng、 β -galactosidase cDNA 配列を含む pSR α ベクター 20ng、そして図に示した量の RHOA 発現プラスミドを細胞に共トランスフェクションさせた。48 時間培養後、細胞を溶解し、ルシフェラーゼ活性をルミノメーターにて測定した。同時に β -galactosidase 活性も測定し、標準化に用いた。

F-actin の免疫染色

カバーガラス上で NIH3T3 細胞に野生型および変異型 RHOA をトランスフェクションさせた。48 時間後、細胞を 4%パラホルムアルデヒドにて固定した (室温 15 分間)。浸透性を高めるために、0.5% Triton X-100 にて 10 分間反応させ、PBS で洗浄後、rhodamin phalloidin (100nM; Cytoskeleton)を反応させた。二重染色を行う際には、Triton X-100 で処理後、ブロッキングのために 3%ウシ血清アルブミン+0.1% Triton X-100 を室温で 1 時間反応させた。その後、抗 Myc タグ抗体で 1 時間反応させ、PBS で 3 回洗浄後、抗マウス IgG-Alexa Fluor 647 抗体と rhodamin phalloidin を共に反応させた。核は 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)

にて染色し、共焦点顕微鏡 (Leica)にて撮影した。

レンチウイルスによる遺伝子導入

各々のレンチウイルスベクターを、パッケージングベクターである psPAX2 とエンベローププラスミドである pMD2.G を HEK293T 細胞に共トランスフェクションさせ、レンチウイルスを産生した。Jurkat 細胞にこのウイルスを感染させ、FACS Aria を用いて GFP を発現する感染細胞を分離した。分離後の感染細胞の陽性率は 95%以上であることを確認した。

細胞増殖アッセイ

レンチウイルスを感染させた Jurkat 細胞を 96 穴プレートに播種し、Cell Counting Kit-8 (Dojindo)を用いて、プロトコール通りに一定時間後の 450 nm の吸光度を測定し、細胞数に換算した。

細胞周期解析

Jurkat 細胞の細胞周期解析を、5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)と 7-amino-actinomycin. D (7-AAD)の 2 重染色による BrdU Flow Kit (BD Pharmingen)を用いてプロトコール通りに行った。Jurkat 細胞を BrdU によりラベリングし (10 μ M

BrdU で 30 分間培養)、ホルムアルデヒドによる細胞固定、細胞膜浸透化を行った後、DNase 処理して BrdU エピトープを露出した。その後、APC 標識抗 BrdU 抗体と 7-AAD を反応させ、FACSCalibur (BD Biosciences)を用いてフローサイトメトリー分析を行い、FlowJo software (Tree Star)を用いて解析した。

Jurkat 細胞及び NIH3T3 細胞での mRNA シーケンス

ドキシサイクリンで RHOA 発現が誘導される Jurkat 細胞を作製し、ドキシサイクリン (2 μ g/ml)を添加して mock、野生型 RHOA、G17V RHOA を発現させた。2 日後にそれぞれの Jurkat 細胞を回収し、Total RNA を RNeasy mini kit (Qiagen)を用いて精製した。また、mock、野生型および G17V RHOA (pGCDNsamIRESGFP vector)を NIH3T3 細胞に一過性に過剰発現させ、48 時間培養後に FACS Aria を用いてトランスフェクションした細胞のみを分離し、同様に Total RNA を精製した。シーケンス用のライブラリーは TruSeq RNA Sample Preparation Kit v2 (Illumina)を用いて作製した。いずれもプロトコール通りに行った。ライブラリーの品質管理は Agilent 2200 TapeStation (Agilent)を用いた。ライブラリーを、Illumina Cluster Station を用いて Illumina フローセルへ結合した。シーケンシングは HiSeq2000 (Illumina)を用いてプロトコール通り行った。

RNA シーケンシングにて得られた配列は、genomon-fusion (<http://genomon>).

hgc.jp/rna/) パイプラインを用いてリファレンス配列にマッピングした。個々の遺伝子の発現は、遺伝子にマッピングされたリードを元に、FPKM (Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped fragments)値を算出した。Gene-Set Enrichment Analysis は GSEA ver. 2.0 を用いて解析した[36, 37]。Molecular Signatures Database に登録されている Motif Gene Set (c3.tft.version 4.0)を用いた (<http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb>)。

第3章 結果

3.1 G17V RHOA の活性化評価

RHOA 活性を評価するにあたり、活性型 RHOA (GTP-RHOA) を特異的に認識する Rho effector タンパク質の 1 つ、Rhotekin の Rho 結合領域 (Rho Binding Domain : RBD) を使用した[33]。GST タグを融合した Rhotekin-RBD を、グルタチオンアガロースビーズに結合させ、このビーズを用いて細胞溶解液から活性型 RHOA を特異的に分離し、ウェスタンブロットにて検出した (Fig. 7)。

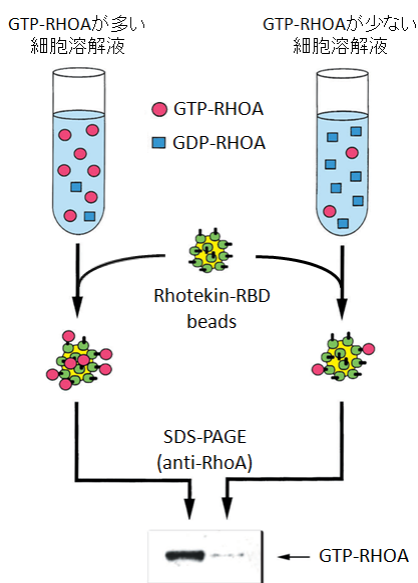


Fig. 7 Rhotekin-RBD pull-down assay の概略

グルタチオンアガロースビーズに結合させた GST 融合 Rhotekin-RBD を、細胞溶解液と反応させ、GTP-RHOA (活性型 RHOA) のみを分離する。その後ウェスタンブロット法にて GTP-RHOA を検出する。

まず、GTP との結合能を調べるため、GTP γ S を用いて pull-down assay を行った。GTP γ S は、加水分解されない GTP のアナログであり、RHOA は GTP γ S と安定的に結合する。これにより、RHOA と GTP との結合能を評価することが可能となる。NIH3T3 細胞に Flag タグを付けた野生型 RHOA (Flag-RHOA (WT)) および G17V RHOA (Flag-RHOA (G17V)) を過剰発現させ、その細胞溶解液を用いて pull-down assay を行った。内因性の野生型 RHOA および Flag-RHOA (WT) は活性型 RHOA のバンドを検出したが、Flag-RHOA (G17V) では検出できなかった (Fig. 8)。このことは、G17V RHOA は活性型を取ることができない、即ち GTP/GTP γ S との結合が障害されていることを意味しており、G17V RHOA は機能欠損型の変異体であることが示唆された。

実際に G17V 変異によって RHOA の立体構造がどのように変化するのか、G14V RHOA 変異体の立体構造をもとに構造推定した。野生型 RHOA では、G17 の O 元素と K118 の側鎖が、それぞれ水分子と疎水ポケットを介して、GDP/GTP のグアニン塩基と相互作用していると考えられる (Fig. 9a) [38, 39]。17 番目のグリシンがバリンに置き換わると、バリンの大きな側鎖 (イソプロピル基) により水分子が入り込める余地がなくなり、G17 を含むループ構造とともに K118 を含むループ構造が変化すると予想される (Fig. 9b-d)。以上のタンパク質立体構造推定からも、G17V RHOA では GDP/GTP との結合が阻害されていることが推測された。

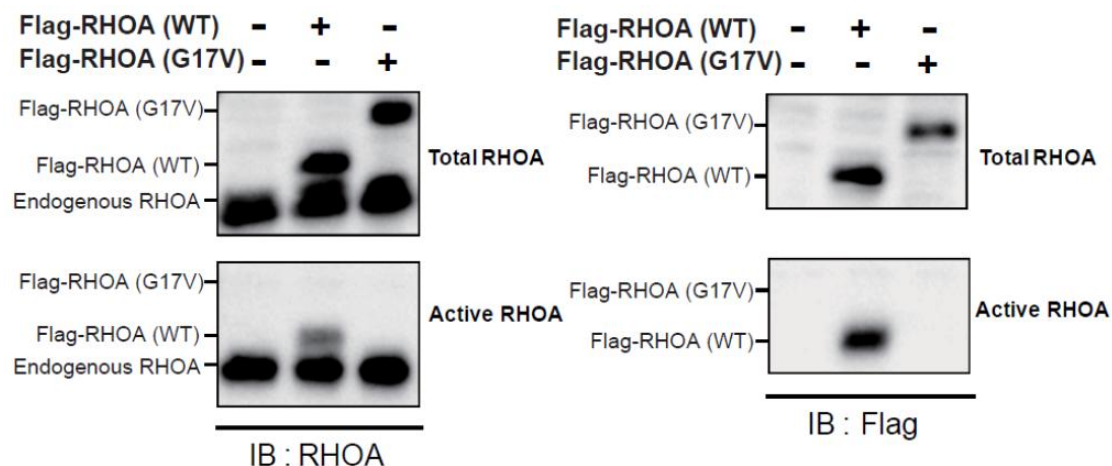


Fig. 8 G17V RHOA変異体のGTP/GTP γ S結合能の評価

Flag-RHOA (WT) (2 μ g/dish) 、またはFlag-RHOA (G17V) (10 μ g/dish)をNIH3T3にトランスフェクションし、2日後に細胞を溶解。細胞溶解液にGTP γ S (200 μ M)を室温で15分間反応させ、Rhotekin pull-down assayを行った。SDS-PAGE後、抗RHOA抗体 (左図)、抗Flagタグ抗体 (右図)にて検出した。上図は細胞溶解液中のRHOA (Total RHOA)、下図はPull-downしたサンプルのRHOA (Active RHOA ; GTP/GTP γ Sと結合しているRHOA)を示している。下図において、Flag-RHOA (G17V)のバンドが検出できないことから、GTP/GTP γ Sとの結合が阻害されていることが推測される。IB, immunoblot WT, wild-type

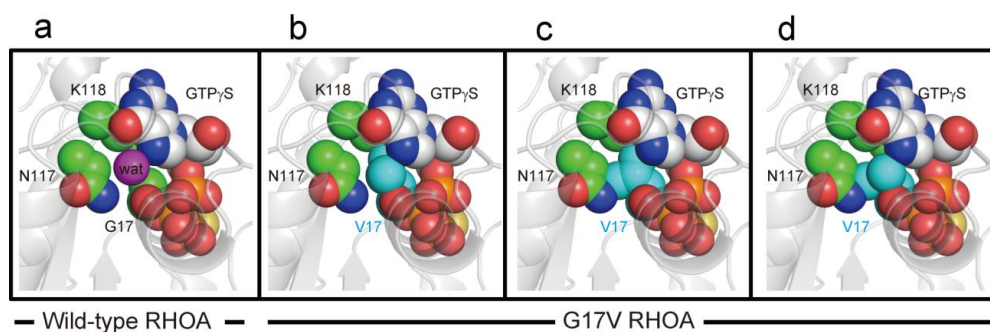


Fig. 9 G17V RHOAの推定立体構造

(東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻、瀧木埋先生による立体構造推定)

17番アミノ酸付近の野生型 RHOA および G17V RHOA の3つの推定される回転異性体に関して、GTP γ S が結合したときに予想される立体構造を示す。

水色 : V17 の炭素原子、緑色 : G17、N117、K118 の炭素原子、白色 : GTP γ S の炭素原子、赤色 : 酸素原子、青色 : 窒素原子、橙色 : リン原子、黄色 : 硫黄原子

3.2 G17V RHOA の野生型 RHOA に対する影響

次に、G17V RHOAが野生型RHOAの機能に影響を及ぼさないか、同様の pull-downアッセイを用いて評価した。NIH3T3細胞に、Flag-RHOA (WT)単独、またはFlag-RHOA (WT)とMyc-RHOA (G17V)を共トランスフェクションした。2日後に細胞を溶解し、GTP γ Sを添加せずにRhotekin pull-down assayを行い、活性型Flag-RHOA (WT)の量を解析した。SDS-PAGE後に、抗RHOA抗体、抗Flagタグ抗体で検出したところ、活性型Flag-RHOA (WT)は、G17V RHOAが存在することによって、明らかに量が減少していた (Fig. 10a)。また、デンスitomーターを用いて活性型Flag-RHOA(WT)の割合を測定したところ、統計学的にも有意な低下を認めた (Fig. 10b)。以上のことから、G17V RHOAは、それ自体が活性型を取ることができないだけでなく、野生型RHOAの活性を抑制する、DN効果を有することが明らかとなった。

また、このDN効果がG17V RHOAの容量依存的に変化するか、トランスフェクションするG17V RHOAの量を変えてRhotekin pull-down assayを行った。4回の実験の代表的なウェスタンブロットの結果と、デンスitomーターを用いて求めた各実験の活性型Flag-RHOA (WT)の割合を示す (Fig. 11)。共存するG17V RHOAの量が増えるに従い、活性型Flag-RHOA (WT)が減少する傾向がみられた。

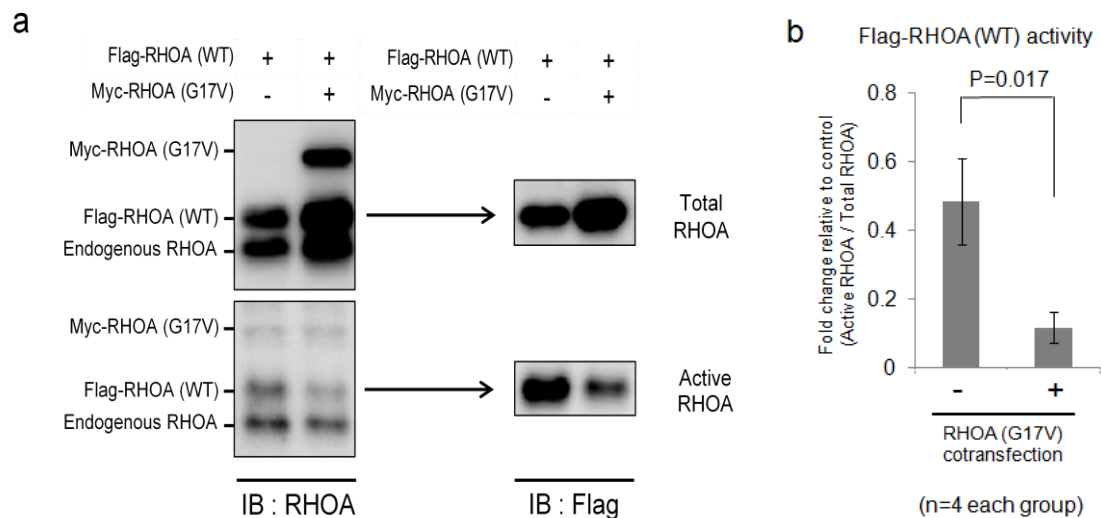
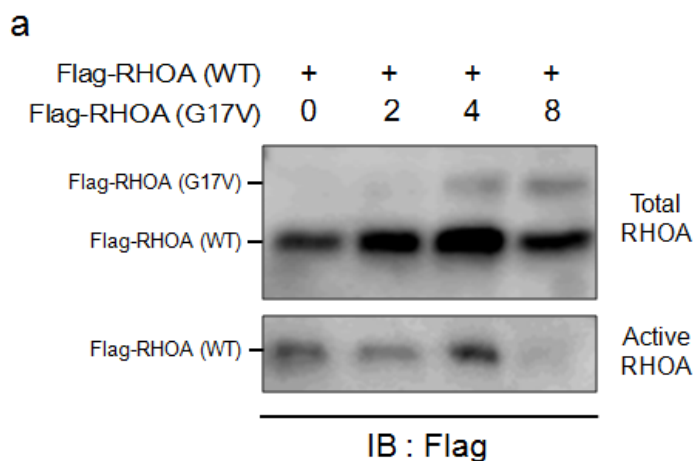


Fig. 10 G17V RHOAの野生型RHOAに対する影響

- a. NIH3T3細胞にFlag-RHOA (WT) (2 μ g/dish)単独、またはFlag-RHOA (WT) (2 μ g/dish)と Myc-RHOA (G17V) (8 μ g/dish)を共トランスフェクションさせ、2日後に細胞を溶解し、GTP γ Sを添加せずにRhotekin pull-down assayを行った。SDS-PAGE後、抗RHOA抗体 (左図)、抗Flagタグ抗体 (右図)にて検出した。
- b. Fig 10aのバンド濃度をデンスitomーターで測定し、Flag-RHOA (WT)のActive RHOA/Total RHOAを算出してGTP結合効率を算出した。4回の独立した実験の平均値を示す。誤差範囲は標準偏差を表し、Student's T testを用いて統計学的検定を行った。G17V RHOAが共在することにより、野生型RHOAのGTP結合能は有意に低下した。



b

Flag-RHOA(WT) activity

Experiment	Cotransfected G17V RHOA (μg/well)			
	0	2	4	8
#1	1	0.54	0.46	0.23
#2	1	0.30	0.32	0.24
#3	1	0.70	n/t*	0.40
#4	1	0.24	n/t	0.19
Average	1	0.44	0.39	0.26
SD	-	0.21	-	0.09

*n/t, not tested

Fig. 11 容量依存的なG17V RHOAのドミナントネガティブ効果

- a. NIH3T3にFlag-RHOA (WT) (2μg/dish)とともに、Flag-RHOA (G17V)を量を変えて (0, 2, 4, 8μg/dish)トランスフェクションし、Rhotekin pull-down assayを行った。4回の実験のうち、代表的な結果を示す。
- b. Fig. 11aの各レーンにおけるFlag-RHOA (WT) activityを算出し、Flag-RHOA (WT)のみをトランスフェクションしたサンプルとの比を表わす。共存するG17V RHOAの量が増えるに従い、野生型RHOAの活性が低下した。

3.3 G17V RHOA 以外の RHOA 変異体の機能解析

今回のシーケンス解析では、G17V RHOA 以外にも、G17del および A161E RHOA 変異が、それぞれ 1 例ずつ認められた。これらの変異体に関しても、G17V RHOA と同様の機能を有するのか、Rhotekin pull-down assay にて検証した。

GTP γ S を添加して GTP との結合能を解析したところ、いずれの変異体も、G17V RHOA と同様に活性型をとることができなかった (Fig. 12a)。また、各変異型 RHOA を Myc-RHOA (WT) と共トランスフェクションし、Myc-RHOA (WT) への影響を調べたところ、G17del RHOA、A161E RHOA とともに DN 効果を認めた (Fig. 12b)。以上のことから、AITL における RHOA 変異は、DN 効果によって野生型 RHOA を抑制することにより、AITL への発症に寄与していると推測された。

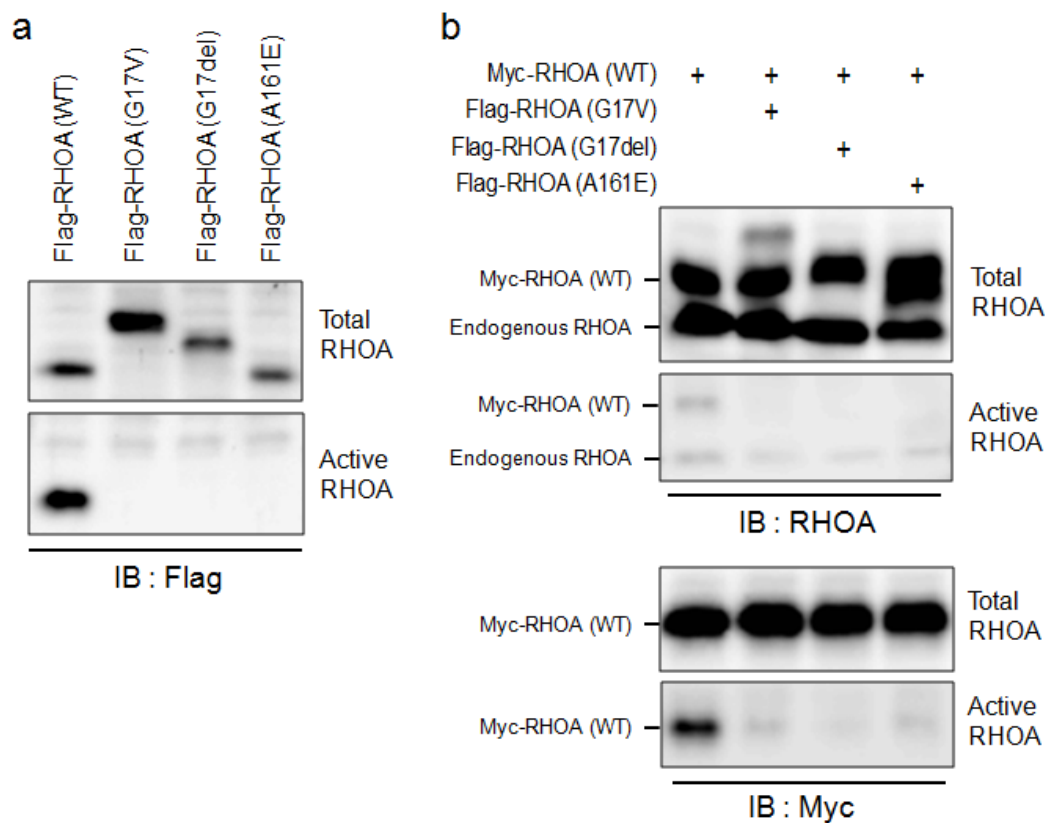


Fig. 12 G17del/A161E RHOA 変異体の機能解析

- a. Flag-RHOA (G17del)または Flag-RHOA (A161E)を NIH3T3 にトランスフェクションし、Fig. 8 と同様の方法で、GTP γ S との結合能を評価した。Flag-RHOA (WT)、Flag-RHOA (G17V) の結果も併せて示す。下図において、G17del、A161E RHOA のバンドが検出できないことから、G17V RHOA と同様に GTP/GTP γ S との結合が阻害されていると推測される。
- b. Myc-RHOA (WT)にFlag-RHOA (G17V)、(G17del)、(A161E)を共トランスフェクションし、Fig.10と同様の方法でRhotekin pull-down assayを行った。G17V、G17del、A161E RHOAの存在により、Myc-RHOA (WT)の活性が低下した。

3.4 RhoGEF との結合能の評価

Ras の DN 変異体は、RasGEF との親和性が極めて高いことにより、DN 効果を発揮すると考えられている[21]。そこで、G17V RHOA に関しても、同様に RhoGEF との親和性が亢進しているのか、RhoGEF の 1 つである ECT2 を用いて、RhoGEF binding assay を行って検証した。ECT2 は N 末端の BRCT ドメインにより、C 末端の DH/PH ドメインの機能が抑制されている[40]。そのため、RHOA との結合が可能である N 末端を欠損した活性型 ECT2 を作製し、NIH3T3 細胞に過剰発現させた。その細胞溶解液を、同量の GST タグを融合した野生型 RHOA または G17V RHOA で pull-down し、結合した N 末端欠損 ECT2 の量を比較した。その結果、野生型 RHOA に対し、G17V RHOA との結合量が明らかに増加していた (Fig.13)。以上より、G17V RHOA は RhoGEF との結合が亢進しており、それが野生型 RHOA への DN 効果の一因となっていると考えられた。

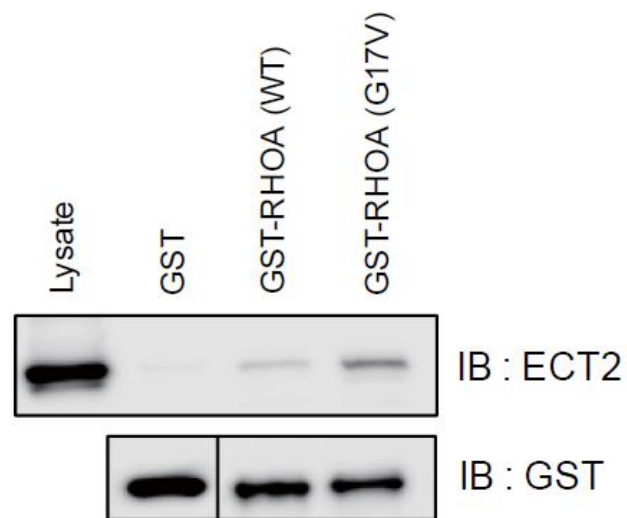


Fig. 13 ECT2との結合能の評価

NIH3T3にN末端欠損ECT2をトランスフェクションさせ、その細胞溶解液から、GST融合RHOA (WT)またはRHOA (G17V)を用いてECT2をpull-downし、SDS-PAGE後に抗ECT2抗体でブロットした。同時に抗GST抗体でもブロットし、GST融合タンパク質量も検出した。同じGST融合蛋白量で比較した場合、N末端欠損ECT2への結合能はG17V RHOAで増加していた。3回の独立の実験のうち、代表的な結果を示す。

3.5 SRF-RE 転写活性に及ぼす影響

G17V RHOA の生物学的な機能に及ぼす影響を調べるため、RHOA シグナルの活性を特異的に評価できる SRF-RE レポーターシステムを用いて検証した (SRF-RE レポーターについては、方法の項を参照)。

レポーターベクターとともに野生型 RHOA、変異型 RHOA を NIH3T3 細胞に共トランスフェクションさせ、ルシフェラーゼ活性を測定した。野生型 RHOA および活性型変異体 G14V RHOA を過剰発現させると、レポーター活性が上昇したのに対し、G17V RHOA および DN 変異体 T19N RHOA の過剰発現では活性の低下が見られた (Fig. 14a)。また、G17V RHOA の発現量を増やすと、容量依存的にレポーター活性が抑制された (Fig.14b)。さらに、野生型 RHOA と G17V RHOA を共に過剰発現させると、容量依存的な G17V RHOA の DN 効果が確認された (Fig. 14c)。

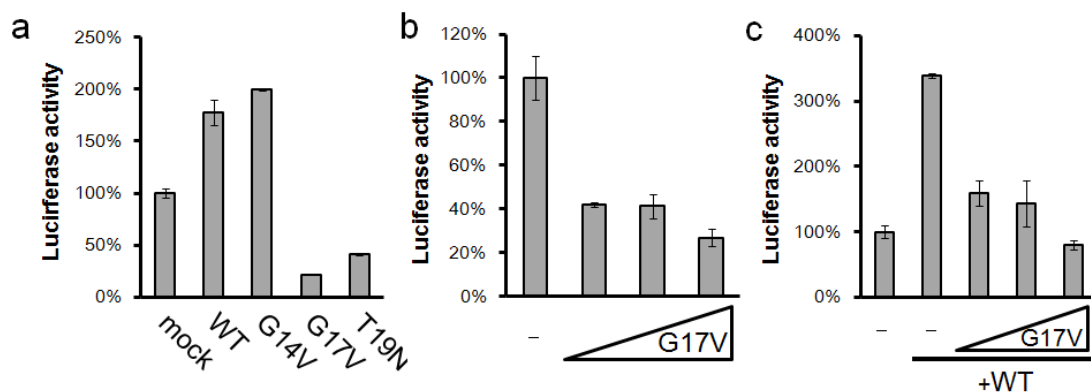


Fig. 14 G17V RHOA の転写因子活性への影響

G17V RHOA が SRF-RE 転写活性に及ぼす影響を、レポーターアッセイにて評価した。1 回の実験は 3 well ずつ行い、その平均値 \pm SD を示している。独立した 3 回の実験のうち、代表的な結果を示す。

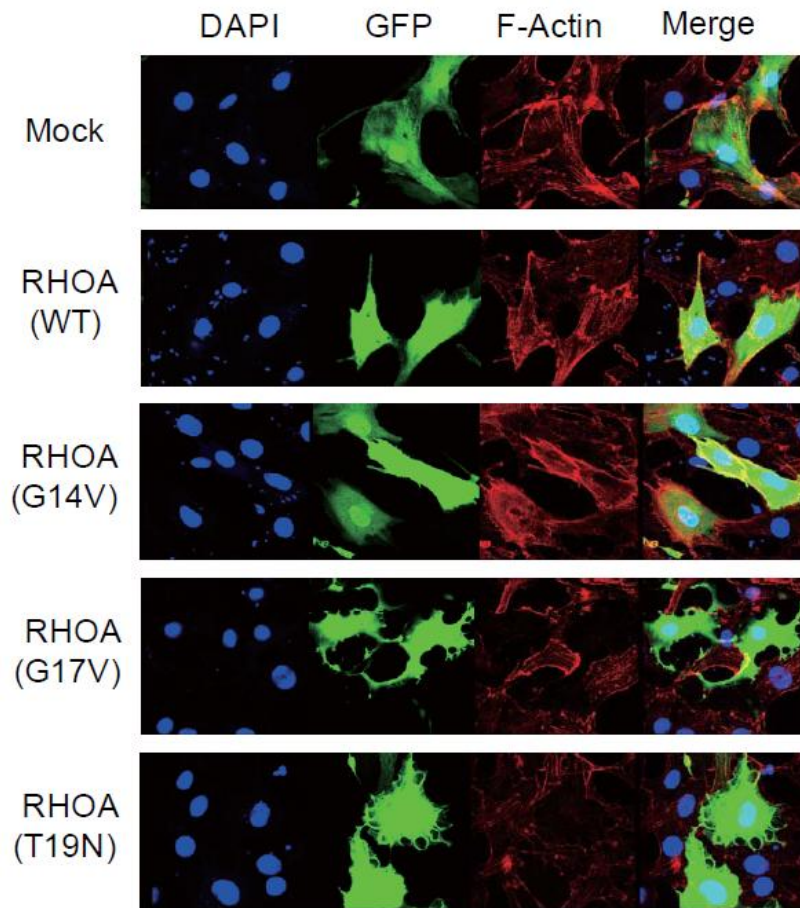
- NIH3T3 細胞に、野生型 RHOA、および変異型 RHOA (G14V、G17V、T19N) を過剰発現させ、SRF-RE レポーター活性を行った。野生型および活性型変異である G14V RHOA は活性が増加したのに対し、G17V および DN 変異である T19N RHOA は低下した。
- G17V RHOA による SRF-RE レポーター活性の低下は、用量依存的(G17V RHOA のベクター量は 16, 48, 144 ng/well)である。
- 野生型 RHOA により活性が増加した SRF-RE レポーター活性は、G17V RHOA によりその活性が抑制され、その効果は用量依存的(G17V RHOA のベクター量は 16, 48, 144 ng/well)である。

3.6 G17V RHOA の細胞骨格への影響

Rho family GTPases は細胞骨格において重要な役割を担っており、線維芽細胞にて RHOA が活性化されると、アクチンのストレスファイバー形成が見られる[22]。そこで、NIH3T3 細胞を用いて、変異 RHOA を過剰発現させることにより、ストレスファイバーの形成がどのように変化するか調べた。

野生型 RHOA、G14V RHOA を過剰発現した細胞では、ストレスファイバー形成が亢進したのに対し、G17V および T19N RHOA は、その形成を著明に抑制し、細胞形態の変形も観察された。また、恒常的に野生型 RHOA を発現している細胞株に G17V RHOA を過剰発現させると、F-actin 染色が抑制され、DN 効果が観察された (Fig. 15)。

a



b

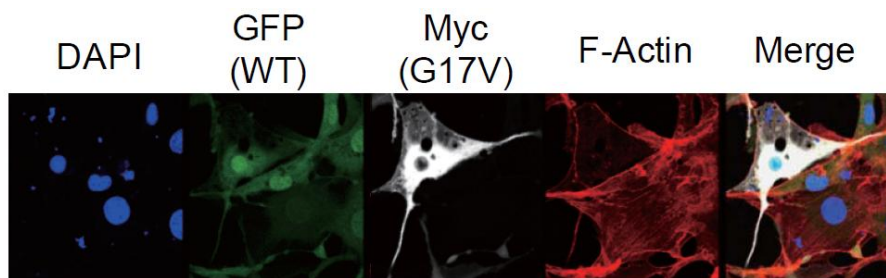


Fig. 15 G17V RHOA による細胞骨格への影響

- a. 野生型および変異型 RHOA を NIH3T3 にトランスフェクションし、phalloidine を用いて F-actin を染色した。Vector に搭載されている GFP をマーカーとしてトランスフェクションされた細胞を検出した。WT および G14V ではストレスファイバー形成が亢進したのに対し、G17V および T19N ではストレスファイバー形成や細胞の広がり が抑制された。
- b. レトロウイルスを用いて恒常的に野生型 RHOA を発現している細胞を作製し、この細胞に Myc タグを付加した G17V RHOA をトランスフェクションした。野生型 RHOA によるストレスファイバーの増加は、G17V の存在により抑制された。

3.7 T 細胞株での G17V RHOA の影響

次に、G17V RHOA が T 細胞においてどのような影響を与えるのか検証した。ドキシサイクリンにて RHOA の発現を誘導できる Jurkat 細胞を作製し、ドキシサイクリン投与の有無で、細胞増殖・細胞周期がどのように変化するのか解析した。その結果、野生型 RHOA を過剰発現させた Jurkat 細胞では細胞増殖が明らかに低下し (Fig. 16)、また細胞周期においても G1 期から S 期への移行が抑制されていたのに対し (Fig. 17)、G17V RHOA の過剰発現ではそれらの変化が見られなかった。

以上のことから、少なくとも過剰発現させた場合において、細胞周期が抑制されることにより生じる RHOA の細胞増殖抑制効果が、G17V RHOA では欠如していると推測された。

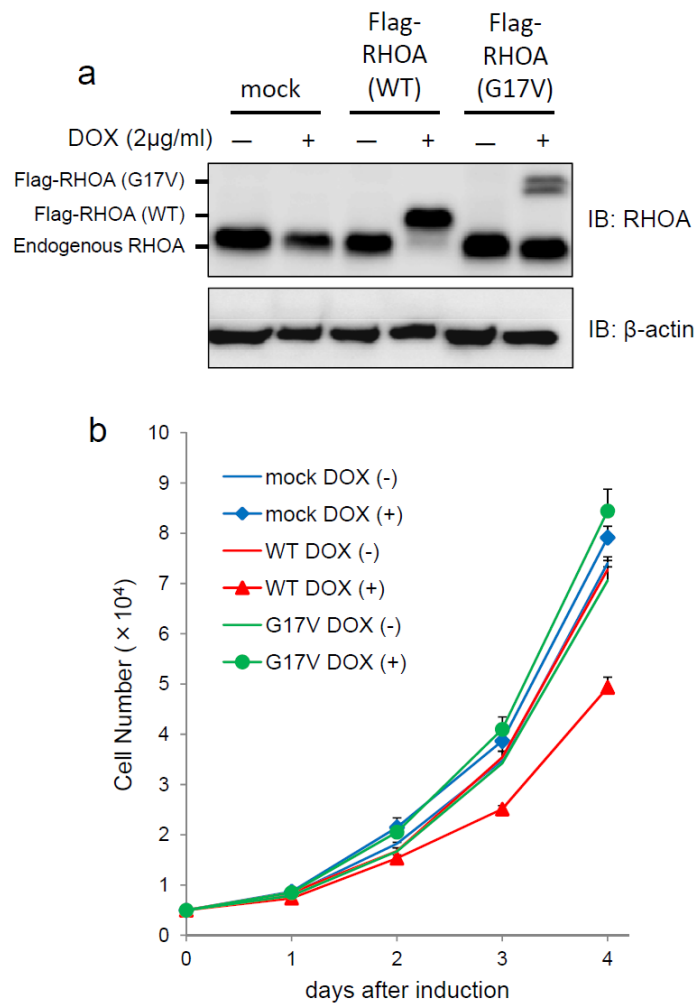


Fig. 16 T 細胞における G17V RHOA の影響

- a. Doxycycline で野生型 RHOA または G17V RHOA の発現が誘導される Jurkat 細胞を作製した。Doxycycline 投与 4 日後の細胞を溶解し、ウェスタンブロットにて発現を確認した。
- b. Fig 16a の Jurkat 細胞を用いて細胞増殖アッセイを行った。ドキシサイクリン投与後より 1 日毎に測定した。Cell counting kit-8 の試薬を投与し、2 時間後の吸光度 (450nm) から細胞数に換算した。1 回の実験は 4well ずつ行い、その平均値 \pm SD を示している。独立した 3 回の実験のうち、代表的な結果を示す。

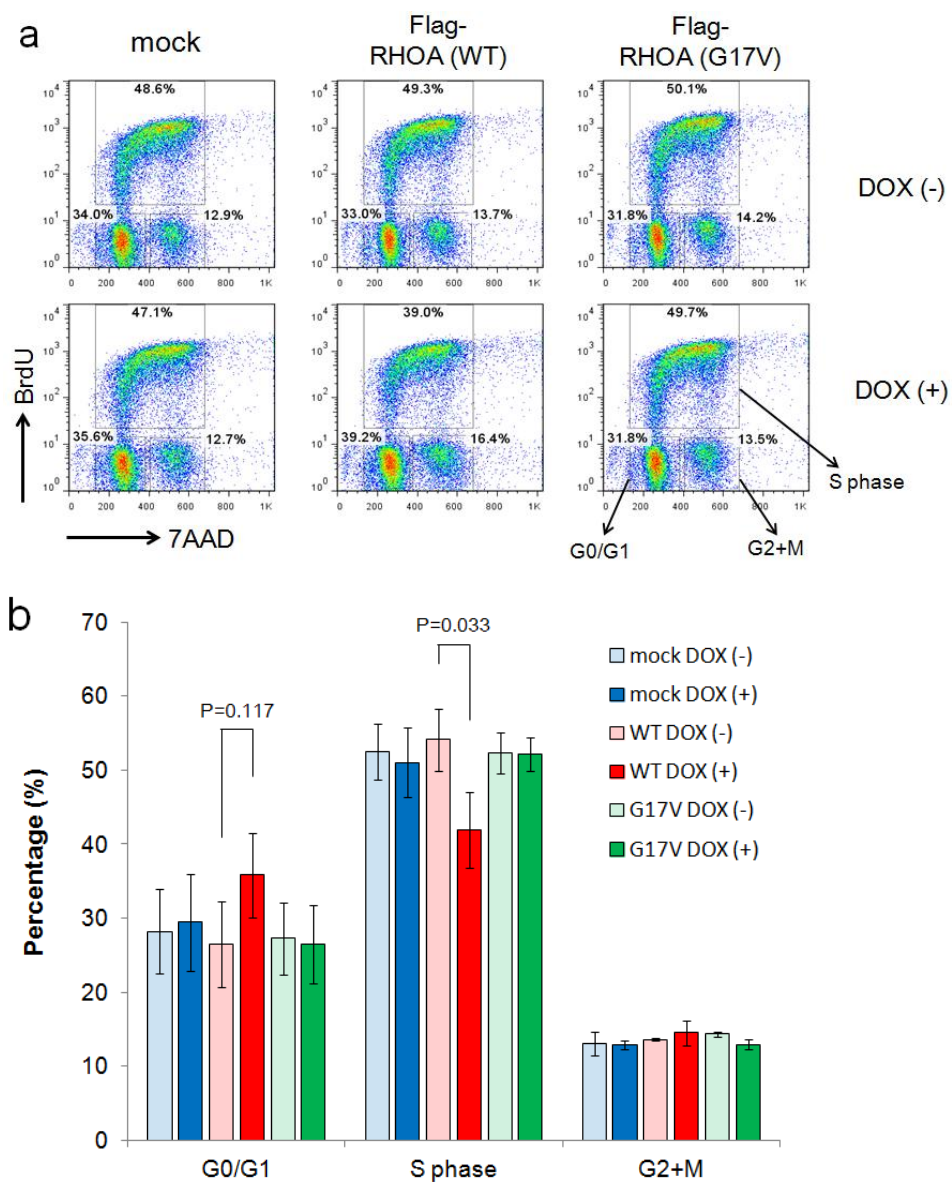


Fig. 17 Jurkat 細胞における細胞周期解析

a. ドキシサイクリンを投与後 3 日間培養した Jurkat 細胞を用いて、BrdU/7AAD 二重染色法による細胞周期解析を行った。独立した 3 回の実験のうち、代表的な結果を示す。

b. 3 回の実験における各周期での細胞割合の平均値±SD を示す。

3.8 Jurkat 細胞及び 3T3 細胞での遺伝子発現への影響

最後に、G17V RHOA による遺伝子発現への影響を評価するため、トランスクリプトーム解析を行った。Mock、野生型 RHOA、G17V RHOA をドキシサイクリンで発現誘導させた Jurkat 細胞、また、それらを一過性に過剰発現させた NIH3T3 細胞から RNA を抽出し、RNA シーケンスを行った。発現データに関して GSEA 解析を行ったところ、いずれの細胞においても、mock に対して野生型 RHOA で SRF pathway の発現が優位に上昇していた (Fig. 18)。SRF は RHOA 依存性に活性化されることが知られており [41]、また、この SRF pathway は、胸腺における T 細胞の分化に不可欠であることが報告されている[42, 43]。その一方、G17V RHOA 発現細胞では、SRF pathway の発現上昇が見られなかった。以上の結果も、G17V RHOA が機能欠損型変異であることを支持する所見と言える。

a) Jurkat cells

WT RHOA vs. mock

Name	NES	Nominal p-value	FDR q-value
V\$SRF_C	1.82	0.000	0.137

b) NIH3T3

WT RHOA vs. mock

Name	NES	Nominal p-value	FDR q-value
V\$SRF_Q4	2.27	0.000	0.000
V\$SRF_Q5_01	2.24	0.000	0.000
V\$SRF_Q1	2.16	0.000	0.000
CCAWWNAAGG_V\$SRF_Q4	2.14	0.000	0.000
TCANNTGAY_V\$SREBP1_01	2.13	0.000	0.000
V\$SRF_C	2.09	0.000	0.000
V\$NKX25_02	2.05	0.000	0.000
AAANWWTGC_UNKNOWN	2.04	0.000	0.001
V\$SOX5_01	2.04	0.000	0.001
V\$FOXO4_01	2.01	0.000	0.001

G17V RHOA vs. mock

Name	NES	Nominal p-value	FDR q-value
V\$FREAC4_01	2.04	0.000	0.013
V\$RP58_01	1.99	0.000	0.013
TGTYNNNNRGCARM_UNKNOWN	1.96	0.000	0.013
V\$MYOGNF1_01	1.92	0.000	0.018
V\$AP1_Q6_01	1.85	0.000	0.024
V\$STAT5B_01	1.82	0.000	0.031
V\$VDR_Q3	1.81	0.000	0.027
RGTTAMVNATT_V\$HNF1_01	1.80	0.002	0.029
V\$FXR_IR1_Q6	1.79	0.002	0.027
V\$TBP_01	1.78	0.000	0.026

mock vs. WT RHOA

Name	NES	Nominal p-value	FDR q-value
SGCGSSAAA_V\$E2F1DP2_01	-1.89	0.000	0.007
V\$E2F4DP1_01	-1.73	0.000	0.036
V\$E2F1_Q6	-1.69	0.000	0.037
V\$E2F4DP2_01	-1.68	0.000	0.030
V\$E2F1DP2_01	-1.67	0.000	0.028
V\$E2F1DP1_01	-1.66	0.000	0.026
V\$E2F_Q2	-1.64	0.000	0.026
V\$E2F_Q4_01	-1.60	0.000	0.037
V\$E2F_Q6	-1.56	0.000	0.049
V\$E2F_Q1	-1.54	0.016	0.054

mock vs. G17V RHOA

Name	NES	Nominal p-value	FDR q-value
V\$E2F_Q6_01	-2.65	0.000	0.000
V\$E2F_Q2	-2.62	0.000	0.000
V\$E2F_Q3	-2.61	0.000	0.000
V\$E2F1_Q6	-2.61	0.000	0.000
SGCGSSAAA_V\$E2F1DP2_01	-2.61	0.000	0.000
V\$E2F_Q6	-2.61	0.000	0.000
V\$E2F1DP1_01	-2.60	0.000	0.000
V\$E2F1_Q3	-2.59	0.000	0.000
V\$E2F1DP2_01	-2.59	0.000	0.000
V\$E2F4DP1_01	-2.59	0.000	0.000

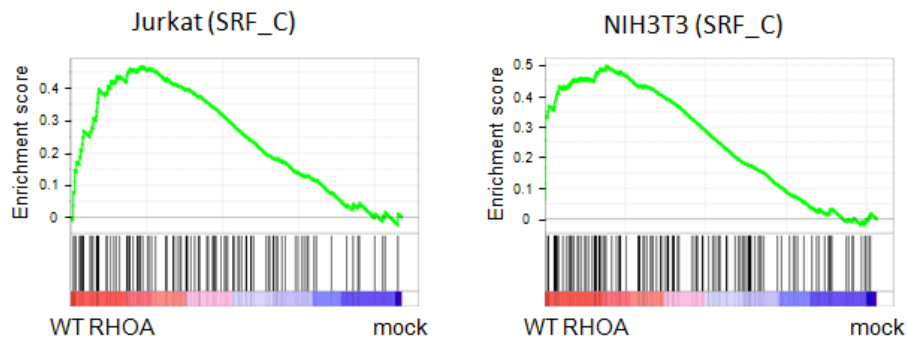


Fig. 18 野生型および G17V RHOA を過剰発現させた細胞における GSEA 解析

a, b. mock と比較し、WT または G17V RHOA を過剰発現した Jurkat 細胞(a)と NIH3T3 細胞 (b)において、優位に上昇、低下している遺伝子群を示す。

(FDR<0.25、normalized enrichment score (NES)の上位 10 セット)。

c. Jurkat 細胞、NIH3T3 細胞での SRF_C gene set の enrichment plot を示す

第 4 章 考察

4.1 G17V RHOA のタンパク質構造からの考察

本研究によって、G17V RHOA はそれ自体が活性型をとれないだけでなく、RhoGEF との結合が亢進していることが明らかとなり、その結果、野生型 RHOA に対してドミナントネガティブに作用することが推測された。

同じ RHOA の 17 番アミノ酸変異体である、G17A RHOA は、RHOA の DN 変異体の 1 つとして以前より知られているが、G17A RHOA は、そのアミノ酸配列の相同性から G15A Ras と同等の変異体として作製されたものである (Fig. 6)。

Ras の DN 変異体である G15A Ras と S17N Ras 変異体は、いずれも GTP との結合が阻害されている[44]。野生型 Ras が不活性型から活性型へ移行する反応では、GDP が解離して GTP が結合するまでの間に、一時的に nucleotide-free の状態となる[45]。Ras は nucleotide-free の状態において RasGEF と強固に結合するが、GDP/GTP が存在することでその親和性は低下する[46]。つまり、GTP と結合が阻害されている G15A Ras 及び S17N Ras が Ras GEF と結合した際に、nucleotide-free の状態が維持されてしまうために Ras GEF との解離が阻害されている。その結果、野生型 Ras と反応できる RasGEF が減少するためにドミナントネガティブに働くと考えられている。しかし、この 2 つの変異体には異なる点があり、S17N Ras は GDP との結合能は保たれていて、RasGEF との結合が可逆的である

のに対し、G15A Ras は GDP と結合できず、RasGEF と非可逆的に結合し、S17N Ras よりもその親和性が高い。そのため、G15A Ras の DN 効果は S17N Ras より優ると予想されるが、G15A Ras が細胞内で不安定であるため、DN 変異体としては S17N Ras が一般的に用いられている[21, 45]。

G17V RHOA と G17A RHOA の類似性について、立体構造から検討してみると、G17V RHOA と G17A RHOA は、それぞれグリシンが非極性側鎖アミノ酸であるバリンまたはアラニンに置換された、一塩基置換変異体である。17 番アミノ酸付近の立体構造を推定すると、いずれの変異体でも、17 番アミノ酸の側鎖 (イソプロピル基とメチル基)によって水分子が入り込む余地がなくなると考えられ、G17A RHOA も G17V RHOA と同様の理由で GDP/GTP との結合が阻害されると考えられる (Fig.9)。

本研究での結果、および G17A RHOA との立体構造の類似性は、G17V RHOA がドミナントネガティブに作用することを強く支持するものである。ただし、G15A Ras でも指摘されているのと同様に、本実験でも G17V RHOA の発現レベルは野生型 RHOA と比べて明らかに低く (Fig. 16a)、この変異体も細胞内では不安定であるという特徴がある。また、発現レベル以外にも、SDS-PAGE で分離した際に、野生型 RHOA よりも泳動距離が短いことが本研究で確認された (Fig. 8)。これはタグを取り除いた RHOA でも同様に観察されており、この理由の一

つとして G17V RHOA では野生型とは異なる翻訳後修飾を受けている可能性がある。G17V RHOA に対する創薬という観点からも、タンパク質の特性を明らかにすることは重要であり、現在、翻訳後修飾に関して解析を行っているところである。

また、G17V RHOA が RhoGEF を介してドミナントネガティブに作用していることから、結合した GEF の種類によっては他の Rho Family タンパク質にも影響を及ぼしている可能性がある。今後は、T 細胞において G17V RHOA と結合している RhoGEF についても検索する予定である。

4.2 RHOA の腫瘍化への関与について

今回、AITL において DN 変異体 (G17V、G17del、A161E)が確認されたということは、RHOA ががんの進展を促進させるというこれまでの考えと相反するものであり、極めて重要な発見といえる。

これまで、多くの固形腫瘍においてがんの発症や進展に RHOA の発現上昇や活性化が関与していることが示されており[27]、肝細胞癌においては、RHOA 活性が高い程、再発が多く、予後不良であると報告されている[47, 48]。実際にマウスを用いた実験でも、RHOA を過剰発現させた癌細胞を腹腔内へ投与すると、

腹膜播種が増加したことから[49]、野生型 RHOA の発現増加のみでがんの進行は促進されると考えられる。

また、血液腫瘍においても RHOA の活性化が発症に寄与しているという報告もある。慢性骨髄性白血病でみられる Bcr-Abl 融合遺伝子は、Abl チロシンキナーゼの恒常的な活性化が主な病態であるが、Bcr に含まれる RhoGEF domain (DH-PH)によって RHOA も活性化されており、これが形質転換の一部に関与している[50]。また、Mixed Lineage Leukemia (MLL) gene との転座で生じる急性骨髄性白血病の中で、MLL-LARG (RhoGEF の 1 つ)、MLL-GRAF (RhoGAP の 1 つ) 融合遺伝子を有するものは、いずれも RHOA が恒常的に活性化し、白血病発症に関わっている[51-54]。

RHOA が Ras/v-SRC による細胞悪性化に重要な役割を果たしているという研究結果[28, 29]からも、一般的に腫瘍促進因子として働くと考えられているが、*in vitro* の系においては腫瘍抑制因子として作用するとする報告も散見される。Fas 経路によるアポトーシスを検証した *in vitro* の研究では、Fas ligand の発現は、RHOA 活性型変異体を導入すると増加するのに対し、RHOA DN 変異体では減少した[55]。また、アポトーシス自体も活性型変異体の導入では増強するのに対し、DN 変異体の導入および RHOA のエフェクターである ROCK の阻害剤 (Y27632) により抑制される、という報告もある[56, 57]。

さらに興味深いものとして、ボツリヌス菌 C3 トランスフェラーゼのトランスジェニックマウスを用いた研究がある。C3 トランスフェラーゼは Rho の 41 番目のアスパラギンを ADP-リボシル化することによりエフェクター結合ドメインをブロックし、RHOA/B/C の機能を阻害することが知られている[58]。T 細胞特異的な Lck プロモーター支配下に C3 トランスフェラーゼを発現させたトランスジェニックマウス (Lck-C3 マウス)では、胸腺前駆 T 細胞においてアポトーシスが亢進し、胸腺細胞、および末梢 T 細胞が減少する。しかし、ごく一部の細胞はアポトーシスから逃れ分化し、生後 4~8 ヶ月で胸腺リンパ芽球性リンパ腫を発症し、全例が死亡する[59]。これらの知見からは、少なくとも T 細胞においては、RHOA はがんを促進するのではなく、がん抑制遺伝子として働いている可能性が示唆される。

本研究での Jurkat 細胞を用いた増殖アッセイでは、野生型 RHOA を過剰発現させると増殖が低下しており、腫瘍抑制に働いていることが推測される。細胞周期の解析結果より、G1 期から S 期への移行が抑制されることが一因となっていると考えられる。以前から細胞周期の制御も RHOA の機能の一つとして知られており、ボツリヌス C3 酵素や DN 変異体を用いた研究からは、RHOA は G1 期から S 期への移行を促進させる働きがあると考えられていた[60, 61]。今回の結果はそれとは相反するものであるが、G14V RHOA または T19N RHOA 変異体

を導入した臍帯血由来造血幹細胞を用いた最近の研究では[62]、G14V RHOA 導入細胞では、G0 期の細胞が増加し、コロニー形成能が低下していたのに対し、T19N RHOA 導入細胞では、細胞周期に影響は見られず、コロニー形成能が亢進していた。これは細胞の種類によって RHOA の機能が変化することを示唆しており、成熟 T 細胞においては RHOA が腫瘍抑制的に働く可能性は十分にあると思われる。

ただし、これまでの報告や今回の研究から、AITL の発症を直接証明する結果は得られていない。*In vivo* でのマウスの報告では、Lck-C3 マウスで発症する T 細胞リンパ腫は CD4⁺CD8⁺double positive T cell から成り立っており、AITL が CD4⁺ single positive T cell であることとは異なっている。また、Lck よりも分化した胸腺細胞で発現する CD2 のプロモーター支配下に C3 トランスフェラーゼを発現させたトランスジェニックマウス (CD2- C3 マウス)では、Lck-C3 マウスとは異なる胸腺細胞の分化異常がみられ[63]、T 細胞リンパ腫発症は報告されていない。そして、今回の Jurkat 細胞を用いた実験では、G17V RHOA による細胞増殖は観察されなかった。

これまでの様々な報告から、RHOA の機能低下がどの細胞のどの段階で起こるかによって、表現型も変化することが推測される。T 細胞における RHOA の機能を詳細に解析した報告はないことから、今後 Conditional RHOA knockout

mice による *in vivo* での RHOA の機能解析が不可欠と考えられる。ただし、前述した通り G17V RHOA が RHOA 以外の Rho family タンパク質に対しても影響を及ぼしている可能性があるため、RHOA knockout とは表現系が異なる可能性は否定できない。そこで我々は、T 細胞で G17V RHOA を発現する CD2-G17V RHOA transgenic mice を現在作製しており、今後 *in vivo* での解析を行う予定である。

4.3 G17V RHOA と他の遺伝子変異との関連について

近年、AITL で報告されている TET2、IDH2、DNMT3A 遺伝子変異[5,7-9]と RHOA G17V との関連を調べるために、我々は 79 症例の PTCL において、これら 3 つの遺伝子に対してもターゲットシーケンスを行った (Fig. 19a)。

各々の遺伝子変異の関係をみると、明らかな相関が見られた (Fig. 19b)。RHOA 変異を有する症例には、全て TET2 変異が見られ、IDH2 変異を有する症例は、1 例を除いて全て RHOA 変異を有していた。また、ほとんどの症例において TET2 変異のアレル頻度は、RHOA、IDH2 のアレル頻度よりも高かった (Fig. 19c)。

また、皮膚に病変を認めた PTCL-NOS 患者 (RHOA 変異、DNMT3A 変異、2 つの TET2 変異を有する)の検体を詳細に解析したところ、DNMT3A 変異と 1 つの TET2 変異は、皮膚病変から分離した CD4⁺および CD8⁺細胞いずれにも変異を認めたが、RHOA 変異、および残りの TET2 変異は CD4 陽性細胞のみに検出

された (Fig. 20)。以上より、TET2 変異が RHOA 変異よりも未分化な細胞で生じていると考えられ、このことは、AITL 発症に RHOA G17V 変異だけではなく、TET2 の機能欠損変異も必須である可能性を示唆している。

TET2 ノックアウトマウスは骨髄球系腫瘍が発症することが近年報告されているが[7, 64-66]、当研究室で用いている TET2 ノックダウンマウスでは、長期観察後に Tfh の特徴を有する T 細胞リンパ腫を発症している (Muto, unpublished data)。このマウスでは、CD4⁺ T 細胞において、Tfh 分画が増加することが確認されており、これが Tfh 由来のリンパ腫発症要因の一つと考えられる。

また、別の機序として、TET2 等のエピジェネティック制御関連遺伝子の破綻によって、G17V RHOA の DN 効果が増強されている、という仮説も考えられる。本研究の Jurkat 細胞での増殖アッセイでは、G17V RHOA の発現を誘導しても細胞増殖に変化がみられなかった。その理由として、G17V RHOA がタンパク質として不安定であるため、一般的に用いられている T19N RHOA と比較して、DN 効果が減弱している可能性がある。今後は、TET2 機能欠損による DNA メチル化制御の破綻が、G17V RHOA の DN 効果とどのようにクロストークし、どのような機序で AITL が発症するのか、*in vitro* においては TET2 をノックダウンさせた細胞に G17V RHOA を過剰発現させる系を確立させ、また *in vivo* においては、TET2 knockout と G17V RHOA の double transgenic mice を作製し、それぞれの系

で詳細な解析を行いたいと考えている。

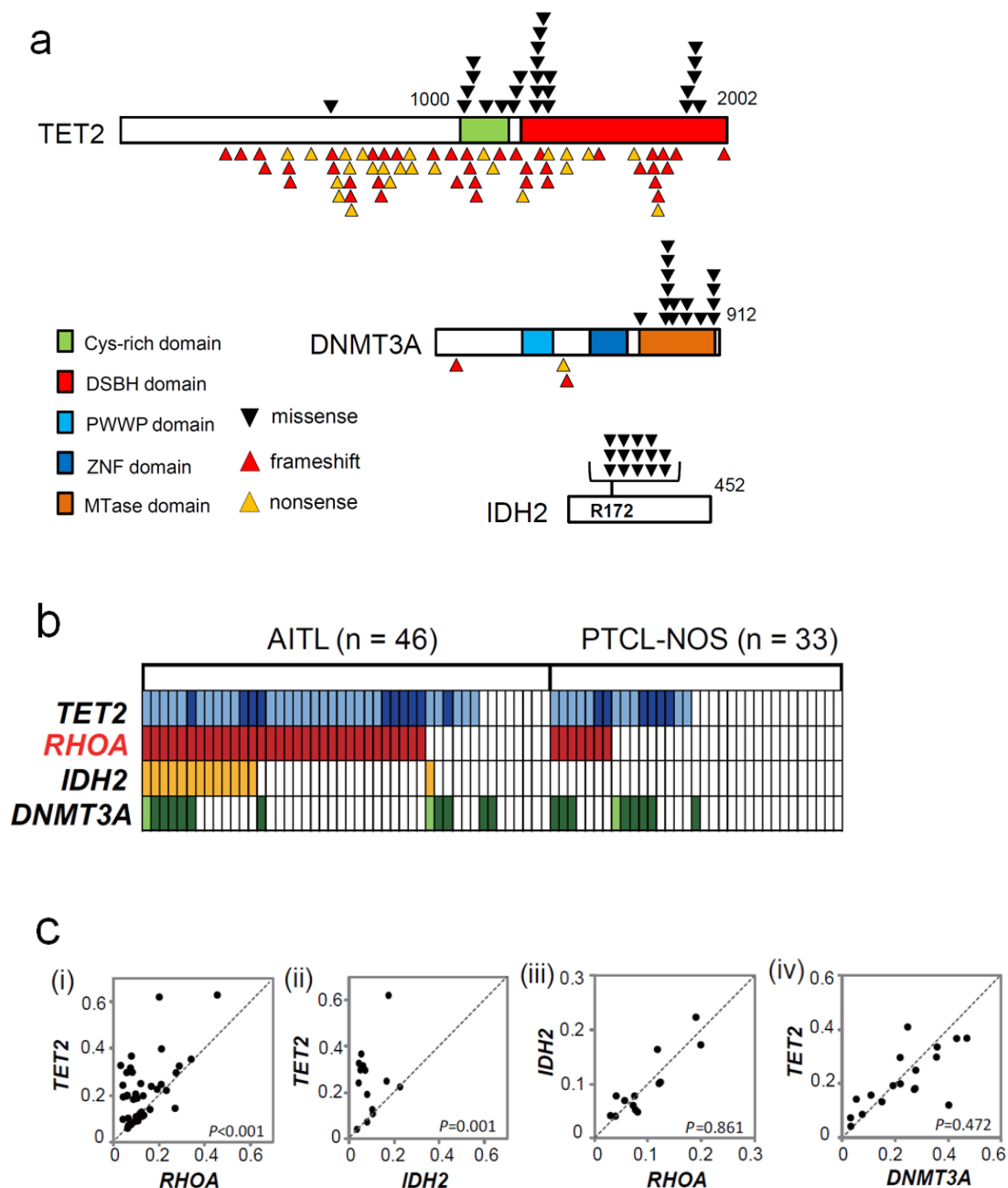


Fig. 19 PTCLにおける *RHOA*、*TET2*、*IDH2*、*DNMT3A* 遺伝子変異の関連性

a, *TET2*、*IDH2*、*DNMT3A* における遺伝子変異の位置を示す。

b. PTCL79 症例における、4 遺伝子変異の分布を示す。*TET2*、*DNMT3A* に関しては複数の変異を有する症例があり、それぞれ濃い青色、濃い緑色で示している。

c. 2 つの遺伝子変異を同時に有する検体を用いて、各変異アレルの頻度を比較した。統計学的な検定には、Wilcoxon の順位和検定を用いた。

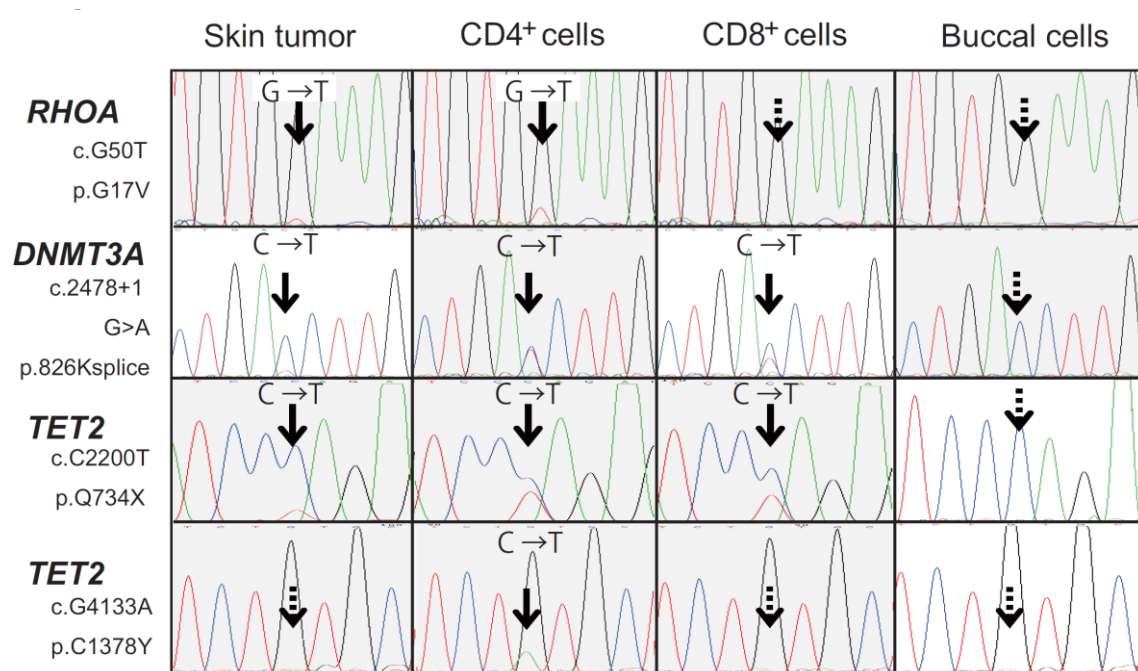


Fig. 20 皮膚に病変を認める PTCL-NOS 患者の遺伝子変異解析

Skin tumor 全体、および Skin tumor から分離した CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞、口腔粘膜細胞から DNA を抽出し、それぞれの遺伝子変異部位のサンガーシーケンスを行った。

第5章 結語

本研究によって、AITLにおいて高頻度に認められる G17V RHOA は、野生型 RHOA に対してドミナントネガティブに作用することが明らかとなった。

これまで、多くの悪性腫瘍で RHOA の発現、活性の上昇が報告されてきたが、本研究の結果は、T 細胞においては RHOA 機能低下が腫瘍発生に関与する可能性を示唆するものであり、重要な発見であると言える。今後、この変異体を用いたさらなる解析により、AITL の発症機構の解明、および特異的な治療法開発に大きく貢献できると期待される。

第 6 章 謝辞

レンチウイルスベクターCS-TRE-PRE-Ubc-tTA-I2G7 は京都大学大学院医学研究科腫瘍生物学講座、眞田昌先生より提供を受けた。ECT2 cDNA は大分大学医学部薬理学教室、石崎敏理先生より提供を受けた。ここに心より感謝の意を表する。

次世代シーケンスによる患者検体の解析を、京都大学大学院医学研究科腫瘍生物学講座、小川誠司先生、吉田健一先生に行っていただいた。ここに心より感謝の意を表する。

RHOA タンパク質の立体構造を、東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻、濡木理先生に構造推定をしていただいた。ここに感謝の意を表する。

本研究を遂行するにあたっては、主として筑波大学大学院人間総合科学研究科、千葉滋教授、坂田 (柳元)麻実子准教授の御指導のもとで行われた。研究計画から、実験手技、データ解析、論文作成に至るまで、懇切な御指導いただき、ここに心より感謝の意を表する。

研究にあたり、数々の御助言を頂きました筑波大学血液内科研究室の諸学兄に深く感謝の意を表する。

第7章 参考文献

- 1 Swerdlow, S. H., Campo, E., Harris, N. L., *et al.* *WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues*. 4th ed. Lyon, France. IARC Press, 306-311 (2008).
- 2 de Leval, L., Gisselbrecht, C. & Gaulard, P. Advances in the understanding and management of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* **148**, 673-689 (2010).
- 3 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).
- 4 Rodriguez-Pinilla, S. M. *et al.* Peripheral T-cell lymphoma with follicular T-cell markers. *Am. J. Surg. Pathol.* **32**, 1787-1799 (2008).
- 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 Dunleavy, K., Wilson, W. H. & Jaffe, E. S. Angioimmunoblastic T cell lymphoma: pathobiological insights and clinical implications. *Curr. Opin. Hematol.* **14**, 348-353 (2006).
- 7 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).
- 8 Couronne, L., Bastard, C. & Bernard, O. A. TET2 and DNMT3A mutations in human T-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **366**, 95-96 (2012).
- 9 Cairns, R. A. *et al.* IDH2 mutations are frequent in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood* **119**, 1901-1903 (2012).
- 10 Delhommeau, F. *et al.* Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N. Engl. J. Med.* **360**, 2289-2301 (2009).
- 11 Mardis, E. R. *et al.* Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N. Engl. J. Med.* **361**, 1058-1066 (2009).
- 12 Ley, T. J. *et al.* DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **363**, 2424-2433 (2010).
- 13 Yoshida, K. *et al.* Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* **478**, 64-69 (2011).

- 14 Nannya, Y. *et al.* A robust algorithm for copy number detection using high-density oligonucleotide single nucleotide polymorphism genotyping arrays. *Cancer Res.* **65**, 6071-6079 (2005).
- 15 Etienne-Manneville, S. & Hall, A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-635 (2002).
- 16 García-Mata, R. & Burridge, K. Catching a GEF by its tail. *Trends Cell Biol.* **17**, 36-43 (2007).
- 17 Tcherkezian, J. & Lamarche-Vane, N. Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. *Biol. Cell* **99**, 67-86 (2007).
- 18 Garcia-Mata, R., Boulter, E. & Burridge, K. The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 493-504 (2011).
- 19 Tybulewicz, V. L. & Henderson, R. B. Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 630-644 (2009).
- 20 Västrik, I. *et al.* Sema3A-induced growth-cone collapse is mediated by Rac1 amino acids 17-32. *Curr. Biol.* **9**, 991-998 (1999).
- 21 Feig, L. A. Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases. *Nat. Cell Biol.* **1**, E25-27 (1999).
- 22 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**, 389-99 (1992)
- 23 Thumkeo, D., Watanabe, S. & Narumiya, S. Physiological Roles of Rho and Rho effectors in mammals. *Eur. J. Cell Biol.* 2013 Oct 8. [Epub ahead of print]
- 24 Watanabe, N. *et al.* Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat. Cell Biol.* **1**, 136-143 (1999)
- 25 Tsuji, T. *et al.* ROCK and mDia1 antagonize in Rho-dependent Rac activation in Swiss 3T3 fibroblasts. *J. Cell Biol.* **157**, 819-206 (2002)
- 26 Arakawa, Y. *et al.* Control of axon elongation via an SDF-1alpha/Rho/mDia pathway in cultured cerebellar granule neurons. *J. Cell Biol.* **161**, 381-391 (2003)
- 27 Karlsson, R. *et al.* Rho GTPase function in tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1796**, 91-98 (2009).
- 28 Qui, R. G. *et al.* A role for Rho in Ras transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 11781-11785 (1995)
- 29 Tanji, M. *et al.* mDia1 Targets v-Src to Cell Periphery and Facilitates Cell Transformation, Tumorigenesis, and Invasion. *Mol. Cell Biol.* **30**, 4604-4615. (2010)

- 30 Sugihara, E. *et al.* Enhanced expression of MYCN leads to centrosome hyperamplification after DNA damage in neuroblastoma cells. *Oncogene* **23**, 1005-1009 (2004).
- 31 Yamaguchi, T. *et al.* Development of an all-in-one inducible lentiviral vector for gene specific analysis of reprogramming. *PLoS One* **7**, e41007 (2012)
- 32 Ory, D. S., Neugeboren, B. A. & Mulligan, R. C. A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 11400-11406 (1996).
- 33 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).
- 34 Guilluy, C. Dubash, A. D. & Garcia-Mata, R. Analysis of RhoA and Rho GEF activity in whole cells and the cell nucleus. *Nat. Protoc.* **6**, 2050-2060 (2011).
- 35 Cheng, Z. *et al.* Luciferase Reporter Assay System for Deciphering GPCR Pathways. *Curr. Chem. Genomics* **4**, 84-91 (2010).
- 36 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).
- 37 Mootha, V. K. *et al.* PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat. Genet.* **34**, 267-273 (2003).
- 38 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).
- 39 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).
- 40 Saito, S. *et al.* Deregulation and mislocalization of the cytokinesis regulator ECT2 activate the Rho signaling pathways leading to malignant transformation. *J. Biol. Chem.* **279**, 7169-7179 (2004).
- 41 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).
- 42 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).
- 43 Fleige, A. *et al.* Serum response factor contributes selectively to lymphocyte development. *J. Biol. Chem.* **282**, 24320-24328 (2007).

- 44 Chen, S. Y. *et al.* Ras-15A protein shares highly similar dominant-negative biological properties with Ras-17N and forms a stable, guanine-nucleotide resistant complex with CDC25 exchange factor. *Oncogene* **9**, 2691-2698 (1994)
- 45 Cherfils, J. & Chardin, P. GEFs: structural basis for their activation of small GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 306-311 (1999)
- 46 Lai, C. C. *et al.* Influence of guanine nucleotides on complex formation between Ras and CDC25 proteins. *Mol. Cell Biol.* **13**, 1345-1352 (1993)
- 47 Fukui, K. *et al.* Expression and prognostic role of RhoA GTPases in hepatocellular carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **132**, 627-633 (2006).
- 48 Li, X. R. *et al.* Overexpression of RhoA is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Eur. J. Surg. Oncol.* **32**, 1130-1134 (2006).
- 49 Horiuchi, A. *et al.* Overexpression of RhoA enhances peritoneal dissemination: RhoA suppression with Lovastatin may be useful for ovarian cancer. *Cancer Sci.* **99**, 2532-2239 (2008).
- 50 Sahay, S. *et al.* The RhoGEF domain of p210 Bcr-Abl activates RhoA and is required for transformation. *Oncogene* **27**, 2064–2071 (2008).
- 51 Kourlas, P. J. *et al.* Identification of a gene at 11q23 encoding a guanine nucleotide exchange factor: evidence for its fusion with MLL in acute myeloid leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 2145-2150 (2000).
- 52 Reuther, G. W. *et al.* Leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor, a Dbl family protein found mutated in leukemia, causes transformation by activation of RhoA. *J. Biol. Chem.* **276**, 27145-27150 (2001).
- 53 Borkhardt, A. *et al.* The human GRAF gene is fused to MLL in a unique t(5; 11)(q31; q23) and both alleles are disrupted in three cases of myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia with a deletion 5q. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 9168-9173 (2000).
- 54 Bojesen, S. E. *et al.* Characterisation of the GRAF gene promoter and its methylation in patients with acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome. *Br. J. Cancer* **94**, 323-332 (2006).
- 55 Blais, L., Desgagné, A. & LeLorier, J. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors and the risk of cancer: a nested case-control study. *Arch. Intern. Med.* **160**, 2363-2368 (2000).
- 56 Hébert, M. *et al.* Rho-ROCK-dependent ezrin-radixin-moesin phosphorylation regulates Fas-mediated apoptosis in Jurkat cells. *J. Immunol.* **181**, 5963-5973 (2008).

- 57 Subauste, M. C. *et al.* Rho family proteins modulate rapid apoptosis induced by cytotoxic T lymphocytes and Fas. *J. Biol. Chem.* **275**, 9725-9733 (2000).
- 58 Narumiya, S., Sekine, A, and Fujiwara, M. Substrate for botulinum ADP-ribosyltransferase, Gb, has an amino acid sequence homologous to a putative rho gene product. *J. Biol. Chem.* **263**, 17255-17257 (1998)
- 59 Cleverley, S. C. *et al.* A. Loss of Rho function in the thymus is accompanied by the development of thymic lymphoma. *Oncogene* **19**, 13-20 (2000).
- 60 Yamamoto, M. *et al.* ADP-ribosylation of the rhoA gene product by botulinum C3 exoenzyme causes Swiss 3T3 cells to accumulate in the G1 phase of the cell cycle. *Oncogene* **8**, 1449-1455 (1993)
- 61 Ghosh, P. M. *et al.* Role of RhoA activation in the growth and morphology of a murine prostate tumor cell line. *Oncogene* **18**, 4120-4130 (1999)
- 62 Jaganathan, B. G. *et al.* Active RHOA favors retention of human hematopoietic stem/progenitor cells in their niche. *J. Biomed. Sci.* **20**, 66 (2013)
- 63 Cleverley, S., Henning, S. & Cantrell, D. Inhibition of Rho at different stages of thymocyte development gives different perspectives on Rho function. *Curr. Biol.* **9**, 657-660 (1999).
- 64 Ko, M. *et al.* Ten-eleven-translocation 2 (TET2) negatively regulates homeostasis and differentiation of hematopoietic stem cells in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 14566–14571 (2011)
- 65 Li, Z. *et al.* Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies. *Blood* **118**, 4509–4518 (2011).
- 66 Moran-Crusio, K. *et al.* Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell* **20**, 11–24 (2011).