慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	レチノイン酸によるトロンボポイエチン発現促進機構 : 分化誘導療法による血小板増多症例からの考察
Sub Title	
Author	金城, 謙太郎(Kinjo, Kentaro) 池田, 康夫(Ikeda, Yasuo)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2003
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.80, No.2 (2003. 6) ,p.T73- T83
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20030601-0073

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

慶應医学・80(2)：T73～T83，2003

学位論文

レチノイン酸によるトロンボポイエチン発現促進機構
－分化誘導療法による血小板増多症例からの考察－

慶應義塾大学医学部内科学教室
（指導：池田康夫教授）
金城（きんじょう）　謙太郎（けんたろう）

（平成14年9月30日受付）

Key Word： all-*trans* retinoic acid, thrombopoietin, thrombocytosis, acute promyelocytic leukemia, platelet

白血病の治療は複数の強力な抗癌剤により白血病細胞を完全に死滅させる“total cell kill”の概念に基づき，治癒を目指して行なわれている．殺細胞効果を有する抗癌剤は，腫瘍細胞のみならず正常細胞にも作用するために往々にして骨髄抑制による致命的な感染症や出血症状を惹起することが臨床的に大きな問題となっている．さらに抗癌剤により再発を繰り返す難治性の白血病の予後は極端に悪く，これら抗癌剤による治療の問題点を克服し，白血病の治療成績をより向上させるために新たな概念の治療法の開発が望まれている．このような背景の中で，1988年に上海のWang博士により提唱された急性前骨髄球性白血病（acute promyelocytic leukemia：APL）に対するビタミンA誘導体，オールトランス型レチノイン酸（all-*trans* retinoic acid：ATRA）を用いた分化誘導療法は，初発APL症例を高率に寛解導入したと報告され注目された[1]．さらなる追試により，ATRA療法はその有効性が全世界で確証され，現在では白血病細胞を成熟分化させることにより，最終的にアポトーシスを誘導し細胞を死滅させる分化誘導療法として確立され，APLの第一選択療法となった[2~4]．

約99%のAPL症例は，特異的な（15；17）転座を有し，その結果，15番染色体上に位置するPML（promyelocytic leukemia）遺伝子と，17番染色体上に位置するレチノイン酸受容体α（RARα）遺伝子が相互に転座し，PML/RARαキメラ遺伝子を形成する[5]．APLは白血病細胞の形態として，細胞質にアズール顆粒，アウエル小体を有することを特徴とし，発症時にほぼ全ての症例において播種性血管内凝固症候群（Disseminated Intravascular Coagulation；DIC）を合併する[2~4]．ATRAはAPL細胞の分化を誘導すると同時にDICをも改善させるために，APLにおける生命予後はATRAが導入されてから著しく改善した．しかしながら，症例を重ねるにつれて白血球増多を契機とし，肺水腫を伴い死に至るレチノイン酸症候群[6]，血小板増多症[7,8]などのATRAによる副作用が報告されるようになった．我々の教室では本邦でも早い時期からATRAを導入し，

本論文は，Kinjo K, Kizaki M, Takayama N, Michikawa N, Oda A, Okamoto S, Tahara T, Kato T, Miyazaki H, Ikeda Y：Serum thrombopoietin and erythropoietin levels in patients with acute promyelocytic leukaemia during all-*trans* retinoic acid treatment. Br J Haematol 105：382-387, 1999の一部を含む．

略号　APL　：急性前骨髄球性白血病（acute promyelocytic leukemia）
ATRA：オールトランス型レチノイン酸（all-*trans* retinoic acid）
TPO　：トロンボポイエチン（thrombopoietin）
c-Mpl　：トロンボポイエチン受容体
PML　：promyelocytic leukemia遺伝子
RARs　：レチノイン酸受容体（Retinoic acid receptors）
RXRs　：レチノイン酸X受容体（Retinoic acid X receptors）
RARE：レチノイン酸応答領域（Retinoic acid responsive elememt）
EPO　：エリスロポイエチン（erythropoietin）
EMSA：electrophoreic mobility shift assay

APLの治療を行なっているが，一部にATRAによる治療経過中に血小板の一過性増多を示す症例が存在することを明らかにしている[9]．しかしながら，ATRAによる血小板増多機構については今だ不明であり，本研究は，ATRA投与下における血小板増多機序の解明を試みた．

近年，血小板産生調節機構に関与するサイトカインとしてトロンボポイエチン（thrombopoietin：TPO）遺伝子がクローニングされ[10~15]，巨核球，及び血小板造血の主要因子であることが証明された．TPOは，主として肝臓，腎臓，骨髄，脾臓で産生され[16]，血中濃度は主に巨核球，血小板上に発現するc-Mpl（TPO受容体）による吸着により制御されている[17,18]．血小板減少を伴う動物モデル[19]，再生不良性貧血症例などにおいて骨髄間質細胞におけるTPOのmRNA発現増加を認めること[20]から，腎臓，肝臓とは異なる機構で発現制御がおこなわれると考えられている[16,20]．

ATRAはその標的遺伝子をレチノイン酸応答領域（Retinoic Acid Responsive Elememt：RARE）を介して転写活性を上昇させると報告されている[21]．ATRAのレセプターであるRARs（Retinoic Acid Receptors）とRXRs（Retinoic acid X receptors）がヘテロダイマーを形成し[21]，REREに結合した状態でATRAはリガンドとしてRARsに結合する[22]．ATRAがレセプターに結合すると転写抑制因子群であるコリプレッサー群が解離するに代わり，転写活性因子群であるコアクチベーター群がATRAレセプター複合体に結合し，標的遺伝子の転写を活性化する[23]．さらに，RAREの大多数が任意の5塩基を中間に挟んだ（A/G）G（G/T）TCAからなる6塩基配列の繰り返し配列（DR5）であることが報告されている[21]．しかしながら，現在までのところ血小板増加に関与するATRA標的遺伝子の報告はなく，本研究は臨床的にATRA療法中のAPL症例にみられる血小板増多機序として，ATRAが造血に関与する各種サイトカイン，特にTPO遺伝子発現増強に直接寄与することで，血小板増多をきたす可能性について検討した．

本研究においては，第一にAPL患者におけるATRA療法中の各種血清サイトカイン濃度を測定し，血小板増多と患者血清サイトイン濃度の相関を検討した[9]．さらに，骨髄間質細胞において，血小板の産生調節を司るサイトカインであるTPOの発現がATRA刺激により増強され得るのか否か，また，TPO遺伝子のプロモーター領域にRAREとして機能する配列が存在し，その領域を介したATRAによるTPO遺伝子の転写活性増強の有無につき検討を加えることで，ATRAが骨髄間質細胞において直接TPOの発現増強を介し，血小板数上昇を促進するかについても検討を加えた．

方　法

1. 患者

1992年5月から1996年10月に，慶應義塾大学医学部内科学教室において，15番，17番の染色体転座及び，PML/RARα融合遺伝子の存在を確認し，形態的にFrench-American-British分類においてAPL[6]と診断され，同意を得た41症例のうち，血小板増多を示した5症例についてATRA投与中に経時的に採取した血清中の各種サイトカイン濃度を測定した．患者症例の詳細は第1表に記した．全ての患者はATRA 45 mg/m²/日内服により，完全寛解に至った．完全寛解の定義は，骨髄単核球中，芽球が5%未満，かつ，末梢血液検査において，白血球数$3\times10^9/l$未満，Hb 8g/dl以上，血小板数$100\times10^9/l$とした．白血球増多を認めた3症例（第1表，症例 1, 2, 3）はレチノイン酸症候群を予

第1表　ATRA療法を施行したAPL症例の一覧

Patient	Age (yr)	Sex	ATRA Dose (mg/d)	ATRA Duration (d)	Complete remission (d)	Chemo-therapy	Platelet transfusion	Platelet counts ($\times10^9/l$) Before treatment	Maximum	(d)
1	59	F	60	56	56	+	−	148	739	(46)
2	19	F	60	43	43	+	+	33	336	(30)
3	44	M	80	45	45	+	−	102	365	(38)
4	57	F	60	28	28	−	−	222	317	(29)
5	30	F	60	43	43	−	−	27	599	(32)

初発APL患者5名に対し，完全寛解に導入されるまでATRAを経口にて投与した．症例1, 2, 3に対しては白血球増加の為，化学療法を追加し，症例2に対しては血小板減少の為，血小板輸血を施行した．（Kinjo K et al：Br J Haematol 105：382-387, 1999のTable 1を許可を得て改変．）

防するためにダウノルビシン（DNR）40 mg/m² を 2 日間静注後，エノシタラビン（BHAC）200 mg/m² を 3 日間静注した．各種血清サイトカイン濃度の評価のため，患者肘静脈より採血し，測定まで－80 度にて血清を凍結保存した．

2. 血清各種サイトカイン濃度測定

血小板数調整機構に関与する可能性があるとされるインターロイキン 3（IL-3），IL-6，IL-11，顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF），顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF），幹細胞因子（SCF），エリスロポイエチン（EPO）を ELISA キット（R & D system 社，Mineapolis, Min. U.S.A.）により測定した．血清サイトカイン濃度は，3 回ずつ測定した平均値を算出し，測定方法はキット添付測定法説明文書に従った．患者血清 TPO 濃度の測定は Tahara らの報告[24]に沿いサンドイッチ ELISA 法にて測定した．血清 TPO 濃度も，前述のように，3 回測定した平均を測定値とした．

3. 統計学的解析

ATRA 療法中の APL 症例における各種サイトカイン血清濃度と血小板数の関係は，Friedman nonparametric test により解析した[25]．また，血清 TPO 濃度，血清 EPO 濃度と血小板数との相関関係につき，spearman rank correlation test により解析した．また，これらの解析には StatView 4.0 統計ソフトウエア（SAS Institute, Cary, NC, USA）software を用いた．

4. 細胞培養と試薬

SV40 largeT 抗原を導入して不死化した，正常ヒト骨髄間質細胞株 KM101 細胞[26]（千葉大学医学部，張ヶ谷博一博士より供与）及び，ヒト肝細胞腫細胞株 HepG2 細胞（JCRB Cell Bank，東京，日本）は，10％ウシ胎仔血清（Gibco-BRL, Rockville, MD, USA）と 100U/m ペニシリン，100 μg/m*l* ストレプトマイシン（Gibco-BRL）含むαMEM（Gibco-BRL）にて 37 度，5% CO_2 の条件下で培養した．付着した細胞を継代時，または細胞解析時にはリン酸緩衝液（phosphate buffered saline, PBS；Gibco-BRL）で 2 度洗浄した後，0.4％トリプシン（Gibco-BRL）を加え，培養，もしくは細胞解析に用いた．ATRA（Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA）はエタノールにて 10^{-2}M とし，－20 度にて保存し適宜培養液にて濃度調整した．

5. RT-PCR 法，及び定量 RT-PCR 法

KM101 細胞を 0.5％ウシ血清アルブミン（Gibco-BRL）と 100U/m*l* ペニシリン，100 μg/m*l* ストレプトマイシン（Gibco-BRL）含むαMEM（Gibco-BRL）にて 37 度，5%CO_2 の条件下で 8 時間培養後，10^{-6}M ATRA を添加し，継続的に 2，4，8 時間培養した．その後，細胞の全 RNA をアイソジェン RNA 抽出キット（日本ジーン，東京）を用いて精製し，1 μg の全 RNA より cDNA をスーパースクリプト II RNAse H 逆転写酵素（Gibco-BRL）を用いて合成した．定量 RT-PCR 法は Taqman PCR Core Reagent キット（Perkin Elmer Cetus, Emeryville, CA, USA）を用い添付説明文書に従い行なった．Taqman PCR 法による TPO の定量はプライマーとして sense 5'-TTC ACA GCA GAC TGA GCC AGT G-3' と antisense 5'-AGC TAA AGT CCA CAG CAG GCA-3' 並びに Taqman プローブとして 5'-AGA GGT TCA CCC TTT GCC TAC ACC TGT CCT-3' の 5' 終末に 6-carboxy fluorescein（FAM）を，3'終末に 6-carboxy-tetramethyl rhodamine（TAMRA）を標識して用いた．対照となるβ-actin の発現量は Taqman β-actin Control Reagents（Perkin Elmer Cetus）を使用した．また，増幅条件として 50 度 2 分，95 度 10 分後，95 度 15 秒のディネーチャー反応と 60 度 1 分のアニーリング兼エクステンション反応を 96-well thermal cycler 付属 ABI Prism 7700 sequence detector（Perkin Elmer Cetus）を用いて 40 サイクル施行した．測定値は Sequence Detector vo1.6 software（Perkin Elmer Cetus）を用いて添付説明文書に従って解析した．

6. Electrophoretic mobility shift assays（EMSA 法）と RARα蛋白合成法

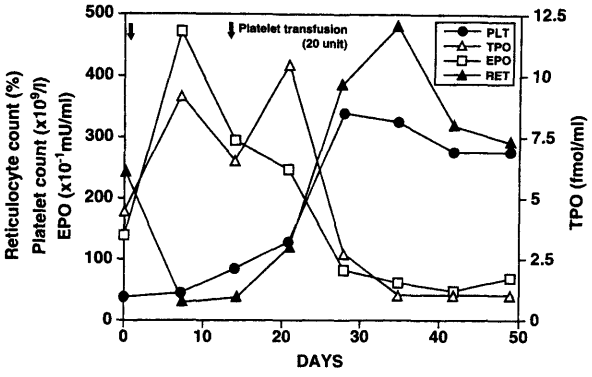
KM101 細胞を 10^{-6}M ATRA 存在下，非存在下の条件で 48 時間培養し，Dignam 変法[27]にて細胞蛋白の調整をした．EMSA 法に使用する 1 本鎖オリゴヌクレオチドを次のように合成した．TPO 遺伝子 5'側プロモーター領域に存在し，RARs 結合配列（A/G）G（G/T）TCA に相同性のある TPO-RARE 野生型オリゴヌクレオチド：5'-TGATG GGaTCA AGGTC AGGcCA GGA AG-3'，とその TPO-RARE の RARs 結合配列に 7 塩基変異を含む TPO-RARE 変異型オリゴヌクレオチド（mutant TPO-RARE）：5'-TGATG GacctA AGGTC AacctA GGAAG-3'の 1 本鎖オリゴヌクレオチドを合成し，100 度 3 分にてアニールし，T4 ポリヌクレオチドカイネースを用いて［γ-^{32}P］ATP にてラベルしプローブとした．その後，1 ng の放射線標識したプローブと 5

μg の細胞抽出物を 20 mM Hepes（pH 7.9），0.5 mM EDTA，2 mM dithiothreitol，10% glycerol，50 mM KCl，1 μg poly dI：dC（Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden），非放射線標識プローブを含む 20 μl 溶液にて 25 分間室温で反応させ，ポリアクリルアミドゲル上に展開させた後，ろ紙上に移動し乾燥させた．反応後は X 線フィルムに感光させて解析した．

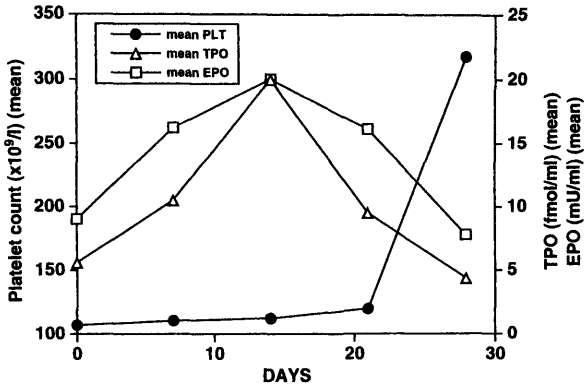
RARα 蛋白合成は，pSG5-hRARαプラスミド（京都大学ウイルス研究所，梅園和彦博士より供与）を RNA 合成の鋳型として，TNT Coupled Reticulocyte Lysate System（Promega）を用いて行なった．合成された蛋白は，抗 RARα 抗体を用いてウエスタンブロット法にて確認した．

7. 遺伝子導入とレポーターアッセイ法

ヒト TPO 遺伝子プロモーター領域を含むルシフェラーゼレポータープラスミドとして TPO 遺伝子の－1318 から＋100（転写開始地点を 0 とした．）までの 5'側プロモーター配列上に存在する TPO-RARE 配列を含み，その下流にルシフェラーゼ発現領域を持つ pLUC-TPO-RARE プラスミドを使用した（東京医科歯科大学，北嶋繁孝博士より供与[28]）．また，pLUC-TPO-RARE プラスミドの TPO-RARE 配列部位を QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit（Stratagene Inc., La Jolla, CA, USA）を用いて変異型 TPO-RARE 配列 TGATG GacctA AGGTC AacctA に変異させた mutant pLUC-TPO-RARE を作成した．レポータープラスミドである pLUC-mock，pLUC-TPO-RARE，pLUC-mutant-TPO-RARE は内在性レポーターアッセイコントロールプラスミドである hpRL-tk vector（Promega）と共に Effectene（QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA）を用いて KM101 細胞に遺伝子導入された．5×10^5 個の KM101 細胞を遺伝子導入前日に 6 穴プレートで培養し，遺伝子導入 24 時間後に 10^{-6}M ATRA にて，48 時間培養した．その後，細胞を dual luciferase assay system（Promega）を用いて細胞融解させ，Lumat luminometer（EG & G BERTHOLD, Stammwerk Wildbad）を用いてルシフェラーゼリポーター解析を施行した．



第 1 図　APL 患者（症例 2）における血小板数，網状赤血球数と血清 TPO，EPO 濃度の経時的変化．ATRA 療法を施行した APL 症例（症例 2）の血清 TPO，EPO 濃度，網状赤血球数（RET），血小板数（PLT）を示す．血清 TPO 濃度，血清 EPO 濃度は ELISA 法により経時的に測定した．（Kinjo K et al：Br J Haematol 105：382-387, 1999 の Fig. 1 の一部を許可を得て転載．）



第 2 図　ATRA 療法を施行した APL 全 5 症例における平均血小板数と血清 TPO，EPO 濃度の推移．ATRA 療法を施行した APL5 症例の血清 TPO と EPO 濃度を ELISA 法により測定した．患者は ATRA45mg/m² を連日投与され，完全寛解に導入された．測定値はそれぞれの平均を示し，標準偏差はいずれも平均の 10%以内であった．ATRA 投与後 16 日目以降の血清 TPO 値減少と血小板数増加は逆相関した．（Kinjo K et al：Br J Haematol 105：382-387, 1999 の Fig. 2 の一部を許可を得て転載．）

結　果

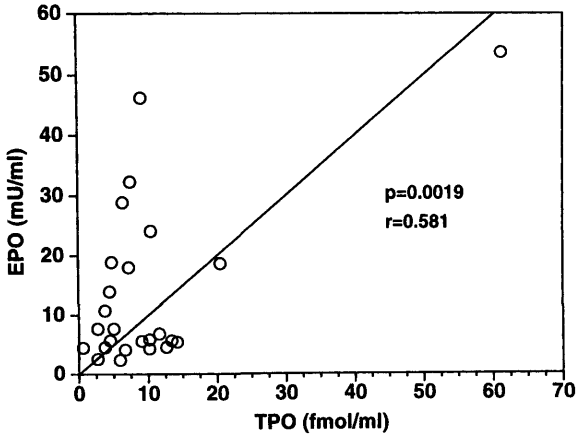
1. ATRA 療法による APL 症例の臨床経過と血小板増多

ATRA により加療した APL5 症例において血清中の TPO 濃度，サイトカイン濃度，末梢血中の血小板数，網状赤血球数を約 7 日間隔で測定した．全ての症例は ATRA 投与後平均 43 日目（28 日目から 56 日目）で完全寛解に導入され，3 症例（症例 1, 2, 3）は ATRA 症候群の予防として化学療法を追加された（第 1 表）．DIC は全ての症例で認められたが，ATRA 投与後 10 日以内に改善した．ATRA 投与前平均血小板数は $106.4\times10^9/l$（$27\text{-}222\times10^9/l$）で ATRA 投与後，徐々

に血小板数増加を認め，約 20 日目より急激な増加を認め，約 29～46 日目（平均 35 日目）で 471.2×10^9/l（317～739×10^9/l）と最高値に達した（第 1 図，第 2 図）．

2. ATRA 療法中血清 TPO 濃度の推移

ATRA 治療中，血小板増多を認めた APL5 症例における，血清 TPO 濃度について検討を加えた．第 1 図，第 1 表に示すように No.2 の症例では ATRA 治療前の血小板数 33×10^9/l であったが，ATRA 投与後 30 日目には最大数 336×10^9/l に達した．ATRA 療法前における血清 TPO 濃度は 4.56 fmol/ml であったが，投与後 7 日目に 9.24 fmol/ml，14 日目の血小板輸血直後には一過性に減少を認め，21 日目には最大値 10.40fmol/ml に上昇した．その後 TPO 値は ATRA 投与前値より減少するに従い血小板数の上昇を認めた．また，全ての症例において，ATRA 療法中の血清 TPO 濃度と血小板数は同様の挙動を示した（図 2）．ATRA 投与前，平均血清 TPO 濃度は 5.47 fmol/ml（2.60～9.07 fmol/ml）で，ATRA 投与後約 16 日目をピークとして上昇し，平均血清 TPO 濃度は 20.92 fmol/ml まで上昇した．ピークを過ぎると平均血清 TPO 濃度は減少し，血小板数の増加とともに治療前値へと下降した．ピーク後の平均血清 TPO 濃度の減少と，血小板数増加は統計上有意差を認めた（$P<0.05$，第 2 図）．



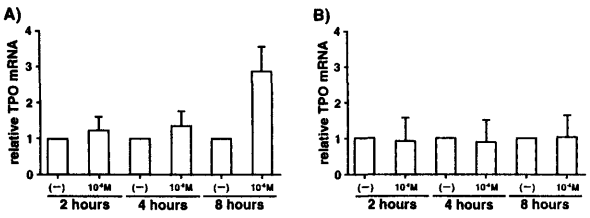
第 3 図　ATRA 療法中の APL5 症例の血清 TPO,EPO 濃度の関係．ATRA 療法中の APL 5 症例の血清 TPO，EPO 濃度の相関関係を示す．血清 TPO 濃度は血清 EPO 濃度と正の相関関係を示した（$r=0.581$，$P=0.0019$）．（Kinjo K et al：Br J Haematol 105：382-387，1999 の Fig. 3 の一部を許可を得て転載．）

3. 血清サイトカイン濃度と血小板数

ATRA 療法を受けた APL5 症例（第 1 表）について，血清 IL-3，IL-6，IL-11，G-CSF，GM-CSF，SCF，EPO 濃度を ELISA 法により測定した．血清 EPO 濃度は一過性に上昇し，ATRA 投与後平均 15.6 日目（10～20 日目）に平均最大値 24.54 mU/ml（2.41～53. mU/ml）に上昇した（第 1 図，第 2 図）．その後，血清 EPO 濃度は治療前値へと下降した．また，全 5 症例において，ピーク後の平均血清 EPO 濃度の減少と網赤血球数の増加，血小板数の増加は統計上有意差を認めた（$P=0.0399$，第 2 図）．さらに平均血清 TPO 濃度と平均血清 EPO 濃度の推移は類似しており（第 3 図），統計学的有意差（$r=-0.581$，$P=0.0019$）を認めた．また，全 5 症例において，血清 IL-3，IL-6，IL-11，G-CSF，GM-CSF，SCF 濃度の変化は認めず，ATRA 療法中の血小板上昇との関連は見出せなかった．

4. 骨髄間質細胞における ATRA による TPO の発現増強

ATRA 療法中の APL 症例において血清 TPO 濃度の上昇を認めたことから，ATRA による TPO 産生の直接増強の可能性について，ヒト骨髄間質細胞由来細胞株 KM101 細胞と，ヒト肝細胞由来細胞株 HepG2 細胞を用いて解析した．KM101 細胞，HepG2 細胞を ATRA で種々の時間（2, 4, 8 時間）刺激し，RT-PCR 法，定量的 PCR 法にて TPO mRNA 発現レベルを検討した．KM101 細胞において，時間，濃度依存性に TPO mRNA の発現増強を認めたが（第 4 図(A)），HepG2 細胞では有為な差異は認めなかった（第 4 図(B)）．KM101 細胞において，TPO mRNA レベルは ATRA 非刺激のコントロールと比較して，10^{-6}M ATRA 8 時

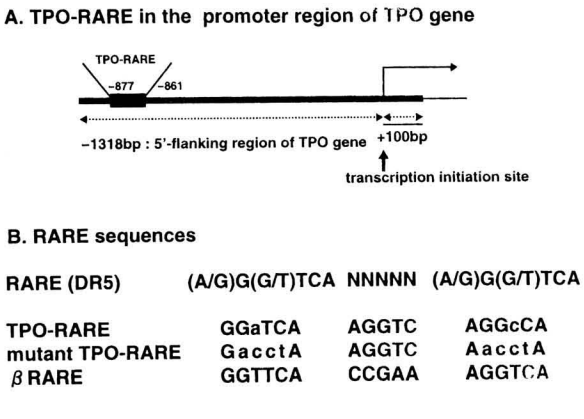


第 4 図　定量 RT-PCR 法による骨髄間質細胞株,KM101 細胞（A）と肝細胞腫細胞株,HepG2 細胞（B）における TPO mRNA レベルの発現解析．KM101 細胞（A）と HepG2 細胞（B）は 0.5%ウシ血清アルブミンを含む α MEM にて 8 時間培養後，10^{-6}M ATRA を添加，または非添加し，2, 4, 8 時間培養した．培養後，定量 RT-PCR 法（Taqman PCR 法）により，TPOmRNA 発現レベルを解析した．なお，コントロールとして β-actin mRNA を同様に測定し，TPO mRNA 測定値を補正した．

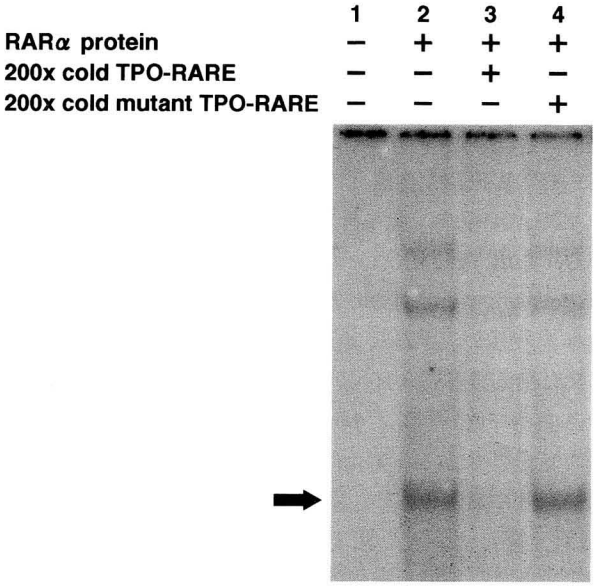
間刺激後に約3倍増加した（第4図(A)）．すなわち，ATRAにより骨髄間質細胞株KM101細胞におけるTPO遺伝子発現がmRNAレベルで増強されていることが確認された．

5. 合成RARα蛋白とTPO遺伝子プロモーター領域上の潜在的RARE配列との結合

すでに報告されたようにRARβ[29]やRARα遺伝子[30]に代表されるレチノイン酸応答遺伝子は，その遺伝子の5'側プロモーター領域にRARs, RXRsなどのレチノイン酸受容体が結合するREREが存在し，ATRA刺激により，応答遺伝子の発現増強を認める．そこで，TPO遺伝子の5'側プロモーター領域をデーターベースサーチ上，検索（MOTIF program, 京都大学化学研究所バイオインフォマティクスセンター）したところ，RARβの5'側プロモーター領域に存在するβRAREと2塩基相違する（英小文字）潜在的RARE（以下，TPO-RARE：5'-GGaTCA AGGTC AGGcCA-3'）を見い出した．このTPO-RAREは最も高頻度に存在するRARE（DR5）配列とは3塩基相違した（第5図）．そこでウサギ網状赤血球を利用した*in vitro*合成法で野生型RARαを合成し，ウエスタンブロット法にて蛋白の分子量を確認後，放射性同位元素でラベルした2本鎖TPO-RAREプローブとの結合をEMSA法にて解析した（第6図）．放射線標識したTPO-REREプローブと野生型RARα蛋白複合体の存在が確認され（第6図，レーン2．矢印），200倍量の非放射線標識TPO-RAREプローブ添加による競合の結果プローブ蛋白複合体が消失し（第6図,レーン3），200倍の非放射線標識mutant TPO-RAREプローブ（mutant TPO-RARE）添加では競合されず，プローブ蛋白複合体が変化しなかった（第6図，レーン4）．これらの結果より，*in vitro*において野生型RARα蛋白は特異的にTPO-REREと結合することが示唆された．



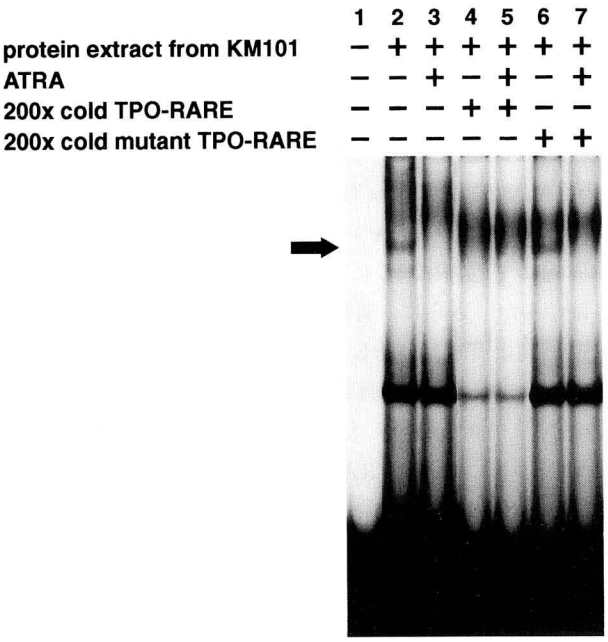
第5図　TPO遺伝子5'側プロモーター領域に存在するレチノイン酸応答領域（RARE）．(A) pLUC1318プラスミドはTPO遺伝子5'側プロモーター領域−1318塩基から転写開始領域＋100塩基を含み，TPO-RARE配列はTPO遺伝子5'側プロモーター領域の−877から−861に位置する．(B) 代表的なRARE（DR5），TPO-RARE，変異型TPO-RARE（mutant TPO-RARE），βREREの塩基配列．βREREは代表的なRARE（DR5）の一つで，RARα遺伝子の5'側プロモーター領域に存在する．TPO-REREの塩基配列において，英小文字は代表的なRARE（DR5）と相違する塩基を示す．



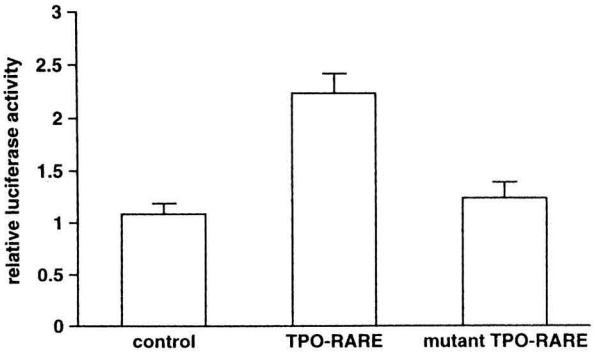
第6図　合成RARα蛋白とTPO-RAREプローブとの結合．RARα蛋白はウサギ網赤血球*in vitro*合成法により作成し，合成RARα蛋白と［γ-^{32}P］により放射線標識されたTPO-RAREプローブとの複合体を検出した（レーン2，矢印）．200倍の放射線非標識TPO-RAREを添付すると，競合し，蛋白複合体が消失した（レーン3）．200倍の放射線非標識変異型TPO-RAREを添付すると競合せず，蛋白複合体が検出された（レーン4，矢印）．

6. KM101細胞蛋白抽出物とTPO-RAREの結合，及びATRAによる結合変化

TPO-RAREとヒト骨髄間質細胞蛋白との結合を確認するため，KM101細胞の蛋白抽出物を使用してEMSA法を施行した（第7図）．放射線標識したTPO-RAREプローブと，KM101細胞の蛋白抽出物との複合体を確認した（第7図，レーン2, 6．矢印）．200倍の非放射線標識TPO-RAREプローブを添加すると競合によりプローブ蛋白複合体が消失し（第7図，レーン4, 5），200



第 7 図　KM101 細胞蛋白抽出物と TPO-RARE プローブ複合体との結合．KM101 細胞蛋白抽出物と放射線標識された TPO-RARE プローブとの蛋白プローブ複合体を EMSA 法により検出した（レーン 2，矢印）．200 倍の放射線非標識 TPO-RARE を添付すると，競合し，蛋白複合体が消失した（レーン 4）が，200 倍の放射線非標識変異型 TPO-RARE を添付すると，競合せず，蛋白複合体が検出された（レーン 6）．10^{-6}M ATRA 刺激では，蛋白複合体が消失した（レーン 3）．10^{-6}M ATRA 存在下での 200 倍の放射線非標識 TPO-RARE 添付（レーン 5），200 倍の放射性非標識変異型 TPO-RARE 添付（レーン 7）を図中に示す．



第 8 図　ATRA による TPO 遺伝子転写活性増強．レポーターベクターである pLUC vector, pLUC-TPO-RARE, pLUC-mutant-TPO-RARE をコントロールベクターである hpRL-TK vector と共に KM101 細胞に遺伝子導入し，10^{-6}M ATRA を 48 時間刺激した．その後，ルシフェラーゼレポーター解析法にて，ルシフェラーゼ活性を測定し，コントロールとして ATRA 非刺激時の値で補正後，ルシフェラーゼ活性の相対値をグラフに示した．

倍の非放射線標識 mutant TPO-RARE プローブ添加では競合されず，プローブ蛋白複合体に変化を認めなかった（第 7 図，レーン 6）．興味深いことに，10^{-6}M ATRA 刺激 48 時間培養後の KM101 細胞蛋白抽出物では放射線標識した TPO-RARE プローブと，蛋白抽出物の複合体が消失した（第 7 図，レーン 3, 5, 7）．これらの結果により TPO-RARE は KM101 細胞蛋白抽出物と結合し，ATRA 刺激によりその結合に変化が生じることが明らかにされた．

7．ATRA 刺激による TPO-RARE を介した TPO 遺伝子転写活性化機構

ATRA 刺激による TPO-RARE を介した TPO 遺伝子転写活性化を評価するため，TPO-RARE を含む TPO 遺伝子プロモーター領域（−1318 から＋100 塩基まで）にルシフェラーゼ発現遺伝子を結合させたプラスミドである pLUC-TPO-RARE と，TPO-RARE 部位を変異型に改変した pLUC-mutant-TPO-RARE を作製した（第 5 図）．遺伝子導入効率の補正を行なうため，上記プラスミドと hpRL-TK ベクターを同時に KM101 細胞に遺伝子導入後，10^{-6}M ATRA により 48 時間刺激し，ルシフェラーゼ相対活性を解析した．pLUC-TPO-RARE を遺伝子導入した細胞では，ATRA 刺激により，約 2.2 倍のルシフェラーゼ活性上昇を認めた（第 8 図）．一方，pLUC-mutant-TPO-RARE の遺伝子導入した細胞では約 1.2 倍の活性上昇に留まった（第 8 図）．これらの結果により骨髄間質細胞において ATRA が TPO-RARE を介し TPO 遺伝子の転写活性を直接上昇させることが示唆された．

考　察

TPO は巨核球産生，血小板産生の主要なサイトカインとされ[10~15]，血清 TPO レベルは血小板または骨髄中の巨核球の特異的受容体である c-Mpl との結合により主に調整されている[17,18]．骨髄移植後症例[31]，血小板減少症例[32]，再生不良貧血症例[33]において骨髄間質細胞での TPO 発現が増強することが知られており，血小板数が骨髄における TPO 発現レベルを直接調節していると考えられているが，その機序は明らかであった．

最近，ATRA による APL の分化誘導療法中に一過

性に血小板増多を認めたAPL症例が報告されたが[7,8]，それら症例における血小板増多機構やTPOの関与については言及されておらずその機序は不明である．したがって，本研究においてはATRAによる新たなTPO産生調節機構の存在を明らかにするために，まず，ATRAによるAPLの分化誘導療法を施行した臨床例における血小板数等の末梢血の変動を検討し，さらに，ELISA法を用いて，主として血小板産生調節に係わるTPOを始めとした各種サイトカインの血清濃度を測定した[9]．ATRA治療の初期の10から20日後に血清TPO濃度の上昇が血小板数増加に先行して認められ，20日以降の血小板数の急上昇に伴い，TPO濃度が低下した．増加した血小板について，APL症例で，PML/RARα染色体が消失するのがATRA投与後平均31.2日目，PCR法でPML/RARαが消失するのがATRA投与後平均47.6日目であり，正常クローン由来の血小板が発現するのはそれら以降と考えられる[34]．また，興味深いことに，同時に血清EPO濃度の上昇，網状赤血球数増加は，血清TPO濃度や血小板数の変動に類似した時間的挙動を呈した．EPOはTPOと細胞内におけるシグナル伝達がクロスすることが知られ，巨核球前駆細胞の増殖，分化を促進させることが報告されている[35]．また，EPOとTPOが構造上類似していること[36]，ATRAによりEPO遺伝子の転写活性増強を認めたことより[37]，ATRAによりEPO発現増強が生じ，血小板増加に一部関与している可能性も考えられた．

ヒトにおけるTPOの発現は肝臓，腎臓にて恒常的であるが，血小板数減少時に骨髄間質細胞で高発現することが報告されている[16,20]，同時に本研究において，APL患者でATRA治療経過中に血小板数の増加に伴い血清TPO濃度の増加を認めたことより，ATRAが直接骨髄間質細胞に作用し，TPOの発現増強を介して血小板数増加をきたすと仮説を立て検証を行なった．ヒト骨髄間質細胞株KM101細胞とヒト肝細胞癌細胞株HepG2細胞を用い，定量RT-PCR法によりATRA投与前後でのTPO mRNA発現を比較したところ，骨髄間質細胞株でATRAによるTPO発現上昇が認められた．本研究ではKM101細胞，HepG2細胞を用いたが，それ以外の正常ヒト骨髄細胞，正常ヒト肝細胞についても更に詳細な検討を加えるべきと考えられる．また，ATRAによるTPOの発現増強機構をより明確にするため，TPO遺伝子の5'側プロモーター領域をデータベースにより検索したところ，5塩基を挟む直列6塩基配列，(A/G)G(G/T)TCA）から構成されるRARE（DR5）と3塩基異なり，かつ，RARβ遺伝子の5'プロモーター領域に存在するRARE（βRARE）と2塩基の差異をもつRARE（TPO-RARE：5'-GGaTCA AGGTC AGGcCA-3'）を見い出した[21,29]．近年，RA-binding protein II遺伝子や，ets-1遺伝子の5'側プロモーター領域にRAREと数塩基変異を認めるレチノン酸応答領域を介したATRAによる転写活性増強が報告されているが[38,39]，我々もATRAレセプターであるRARα蛋白が特異的にTPO-RAREに結合することをEMSA法により確認した．さらに，骨髄間質細胞株KM101細胞の蛋白抽出物とTPO-RAREが特異的に結合し，ATRAによりプローブ蛋白複合体の結合変化が生ずることをEMSA法により確認した．これらの結果から，骨髄間質細胞において，ATRAによりTPO-RAREに結合する細胞抽出物由来蛋白複合体の変化が明らかになった．一方，ATRAはRAREに結合するレセプター（RARs, RXRs）に定常状態で結合している転写抑制因子群（コリプレッサー）を遊離させ，転写活性因子群（コアクチベーター）を結合させることでATRA応答遺伝子の転写活性を上昇させると報告されている[23]．EMSA法にて，ATRA刺激によりβRAREプローブとATRA耐性APL細胞株蛋白抽出物との結合が変化せず，ATRA感受性APL細胞株において細胞蛋白プローブ複合体の結合変化が生じ，RARα遺伝子発現が増強されたとの報告と同様に[40]，本研究においても，ATRAによって，転写因子群を含めたプローブ蛋白複合体の結合変化が生じて，TPO-RAREを介するTPO遺伝子発現調節機構が存在すると予想されるが，この点に関しては今後詳細な検討を要すると考える．

最後に，骨髄間質細胞において，TPO遺伝子のプロモーター領域に存在するTPO-RAREの機能につき検討した．TPO-RAREを含む5'側プロモーター領域配列とルシフェラーゼ発現遺伝子を組み込んだベクターpLUC-TPO-RAREを，骨髄間質細胞株KM101細胞へ遺伝子導入し，ATRA刺激の有無でルシフェラーゼ活性を測定することで，骨髄間質細胞でのATRAによるTPO-RARE配列を介するTPO遺伝子転写活性を検討した．pLUC-TPO-RAREを導入したKM101細胞においてATRA刺激後，約2.2倍のルシフェラーゼ活性上昇を認めた．一方，TPO-RARE配列を変異させたmutant TPO-RAREを含むpLUC-mutant-TPO-RAREを導入した細胞ではルシフェラーゼ活性の上昇が約1.2倍に留まった．これらの結果からTPO-RAREを介したTPO遺伝子の発現が増強される機構の存在が証明された．

本研究はATRAによる分化誘導療法を施行した

APL 症例において，血小板数増加と血清 TPO 濃度上昇が相関関係を有する事を初めて明らかにした．さらに，骨髄間質細胞において，TPO の 5'側プロモーター領域に存在する RARE を見出すとともに，ATRA による直接的な TPO 遺伝子の発現増強機序を立証した．

総　括

ATRA による分化誘導療法中の APL 症例における血小板増多と，血清サイトカイン濃度，特に血清 TPO 濃度との関係を ELISA 法により検討した．更に正常骨髄間質細胞株を用いて ATRA による直接的な TPO 遺伝子の転写活性の調節機構について検討した．

1. ATRA による分化誘導療法中の APL 症例の血小板増多につき，各種血清サイトカイン濃度を測定し，血小板数増加症例では ATRA の投与後に血清 TPO が上昇することを明らかにした．

2. 骨髄間質細胞株において ATRA 刺激による TPO の mRNA レベルでの発現上昇を明らかにした．また，肝細胞株では ATRA 刺激による TPO 発現の変化は認められなかった．

3. TPO 遺伝子の 5'側プロモーター領域に RARα が特異的に結合するレチノイン酸応答領域である TPO-RARE を新たに見い出し，骨髄間質細胞株抽出蛋白と TPO-RARE との結合が ATRA により変化することを明らかにした．

4. 骨髄間質細胞株においてレポーターアッセイ法により，TPO-RARE を介した ATRA による直接的な TPO 遺伝子の転写活性増強を明らかにした．

以上の実験結果より，臨床的に認められた ATRA による分化誘導療法における APL 症例の血小板増多は，骨髄間質細胞において ATRA による直接的な TPO 遺伝子の転写活性の増強，発現増強により，血清 TPO 濃度が上昇し，血小板増多を来した可能性が示唆された．本研究は，血小板増多及び，TPO 発現調節機構において ATRA が重要な役割を担う事を示唆するとともに，巨核球，血小板造血機能に新たな知見を付け加えるものと考えられた．

稿を終えるに当たり，本研究の機会を与えて頂き，また，御指導，御高閲を賜りました慶應義塾大学医学部内科学教室，池田康夫教授に深甚なる謝意を表します．また，本研究を直接御指導賜りました慶應義塾大学医学部内科学教室，木崎昌弘講師，宮川義隆博士，東京電力病院内科，内田秀夫先生に深謝します．また，検体提供，保存や，本研究遂行にあたり，御協力いただきました慶應義塾大学医学部内科血液研究室の諸兄に心より感謝いたします．

本研究の一部は，第 42 回米国血液学会，第 43 回米国血液学会，第 42 回日本臨床血液学会，第 30 会国際実験血液学会にて発表した．

文　献

1) Huang ME, Ye YC, Chen SR, Chai JR, Lu LX, Zhoa L, Gu HT, Wang ZY : Use of all-*trans* retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. Blood 72 : 567-572, 1988
2) Castaigne S, Chomienne C, Daniel MT, Ballarini P, Berger R, Fenaux P, Degos L : All-*trans* retinoic acid as a differentiation therapy for acute promyelocytic leukemia. I. Clinical results. Blood 76 : 1704-1709, 1990
3) Warrell RP Jr, Frankel SR, Miller WH Jr, Sheinberg DA, Itri LM, Hittelman WN, Vyas R, Andreeff M, Tafuri A, Jakubowski A, Gabrilove J, Gordon MS, Dmitrovsky E : Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin (all-*trans*-retinoic acid). N Engl J Med 324 : 1385-1393, 1991
4) Kanamaru A, Takemoto Y, Tanimoto M, Murakami H, Asou N, Kobayashi T, Kuriyama K, Ohmoto E, Sakamaki H, Tsubaki K, Hiraoka H, Yamada O, Oh H, Saito K, Matsuda S, Minato K, Ueda T, Ohno R : All-*trans* retinoic acid for the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. Blood 85 : 1202-1206, 1995
5) de The H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L, Dejean A : The t (15 ; 17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor α gene to a novel transcribed locus. Nature 347 : 558-561, 1991
6) Warrell RP Jr, de The H, Wang ZY, Degos L : Acute promyelocytic leukemia. N Engl J Med 329 : 177-189, 1993
7) Losada R, Espinosa E, Hernandez C, Dorticos E, Hernandez P : Thrombocytosis in patients with acute promyelocytic leukaemia during all-*trans* retinoic acid treatment. Br J Haematol 95 : 704-705, 1996
8) Kentos A, Le Moine F, Crenier L, Capel P, Meyer S, Muus P, Mandelli F, Feremans W : All-*trans* retinoic acid induced thrombocytosis in a patient with acute promyelocytic leukaemia. Br J Haematol 97 : 685, 1997
9) Kinjo K, Kizaki M, Takayama N, Michikawa N, Oda A, Okamoto, S, Tahara T, Kato T, Miyazaki H, Ikeda Y : Serum thrombopoietin and erythropoietin levels in patients with acute promyelocytic leukaemia during all-*trans* retinoic acid treatment. Br J Haematol 105 : 382-387, 1999

10) Bartley TD, Bogenberger J, Hunt P, Li Y-S, Lu HS, Martin F, Chang M-S, Samal B, Nichol JL, Swift S, Johnson MJ, Hsu R-Y, Parker VP, Suggs S, Skrine JD, Merewether LA, Clogston C, Hsu E, Hokom MM, Hornkohl A, Choi E, Pangelinan M, Sun Y, Mar V, McNinch J, Simonet L, Jacobsen F, Xie C, Shutter J, Chute H, Basu R, Selander L, Trollinger D, Sieu L, Padilla D, Trail G, Elliott G, Izumi R, Covey T, Crouse J, Gracia A, Xu W, Del Castillo J, Biron J, Cole S, Hu MC-T, Pacifici R, Ponting I, Saris C, Wen D, Yung YP, Lin H, Bosselman RA : Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. Cell 77 : 1117-1124, 1994

11) de Sauvage FL, Hass PE, Spencer SD, Malloy BE, Gurney AL, Spencer SA, Darbonne WC, Henzel WJ, Wong SC, Kuang W-J, Oles KJ, Hultgren B, Solberg LA, Jr, Goeddel DV, Eaton DL : Stimulation of megakaryopoiesis and throm-bopoiesis by the c-Mpl ligand. Nature 369 : 533-538, 1994

12) Lok S, Kaushansky K, Holly RD, Kuijper JL, Lofton-Day CE, Oort PJ, Grant FJ, Heipel MD, Burkhead SK, Kramer JM, Bell LA, Sprecher CA, Blumberg H, Johnson R, Prunkard D, Ching AFT, Mathews SL, Bailey MC, Forstrom JW, Buddle MM, Osborn SG, Evans SJ, Sheppard PO, Presnell SR, O'Hara PJ, Hagen FS, Roth GJ, Foster DC : Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production *in vivo*. Nature 369 : 565-568, 1994

13) Kaushansky K, Lok S, Holly RD, Broudy VC, Lin N, Bailey MC, Forstrom JW, Buddle MM, Oort PJ, Hagen FS, Roth GJ, Papayannopoulou T, Foster DC : Prom otion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. Nature 369 : 568-571, 1994

14) Wendling F, Maraskovsky E, Debili N, Florindo C, Teepe M, Titeux M, Methia N, Breton-Gorius J, Cosman D, Vainchenker W : cMpl ligand is a humoral regulator of megakaryocytopoiesis. Nature 369 : 571-574, 1994

15) Kato T, Ogami K, Shimada Y, Iwamatsu A, Sohma Y, Akahori H, Horie K, Kokubo , Kudo Y, Maeda E : Purification and characterization of thrombopoietin. J Biochem (Tokyo) 118 : 229-236, 1995

16) Sungaran R, Markovic B, Chong BH : Localization and regulation of thrombopoietin mRNA expression in human kidney, liver, bone marrow, and spleen using in situ hybridization. Blood 89 : 101-107, 1997

17) Stoffel R, Wiestner A, Skoda RC : Thrombopoietin in thrombocytopenic mice : evidence against regulation at the mRNA level and for a direct regulatory role of platelets. Blood 87 : 567-573, 1996

18) Kuter DJ Rosenberg, RD : The reciprocal relationship of thrombopoietin (c-Mpl ligand) to changes in the platelet mass during busulfan-induced thrombocytopenia in the rabbit. Blood 85 : 2720-2730, 1995

19) McCarty JM, Sprugel KH, Fox NE, Sabath DE, Kaushansky K. Murine thrombopoietin mRNA levels are modulated by platelet count. Blood 86 : 3668-3675, 1995

20) Hirayama Y, Sakamaki S, Matsunaga T, Kuga T, Kuroda H, Kusakabe T, Sasaki K, Fujikawa K, Kato J, Kogawa K, Koyama R, Niitsu Y : Concentrations of thrombopoietin in bone marrow in normal subjects and in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura, aplastic anemia, and essential thrombocythemia correlate with its mRNA expression of bone marrow stromal cells. Blood 92 : 46-52, 1998

21) Umesono K, Murakami KK, Thompson CC, Evans RM : Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. Cell 65 : 1255-1266, 1991

22) Mader S, Leroy P, Chen JY, Chambon P : Multiple parameters control the selectivity of nuclear receptors for their response elements. Selectivity and promiscuity in response element recognition by retinoic acid receptors and retinoid X receptors. J Biol Chem 268 : 591-600, 1993

23) Lin RJ, Nagy L, Inoue S, Shao W, Miller WH Jr, Evans RM. Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. Nature 391 : 811-814, 1998

24) Tahara T, Usuki K, Sato H, Ohashi H, Morita H, Tsumura H, Matsumoto A, Miyazaki H, Urabe A, Kato T. A sensitive sandwich ELISA for measuring thrombopoietin inhuman serum : serum thrombopoietin levels in healthy volunteers and in patients with haematological disorders. Br J Haematol 93 : 783-788, 1996

25) Glantz SA : Primer of Biostatistics, 3rd Ed, McGraw-Hill, New York, p. 353-365, 1992

26) Harigaya K. Handa H : Generation of functional clonal cell lines from human bone marrow stroma. Proc Natl Acad Sci USA 82 : 3477-3480, 1985

27) Dignam JP, Lebowitz RM, Roeder RG : Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. Nucleic Acids Res 11 : 1475-1489, 1983

28) Kamura T, Handa H, Hamasaki N, Kitajima S : Characterization of the human thrombopoietin gene promoter. A possible role of an Ets transcription factor, E4TF1/GABP. J Biol Chem 272 : 11361-11368, 1997

29) de The H, Vivanco-Ruizm MM, Tiollais P, Stunnenberg H& Dejean A : Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor beta gene. Nature 343 : 177-180, 1990

30) Leroy P, Nakshatri H, Chambon P : Mouse retinoic acid receptor alpha 2 isoform is transcribed from a promoter that contains a retinoic acid response element. Proc Natl Acad Sci USA 88 : 10138-10142,

1991
31) Ishida A, Miyakawa Y, Tanosaki R, Wakui M, Ueno H, Watanabe R, Awaya N, Tahara T, Kato T, Miyazaki H, Oda A, Kizaki M, Okamoto S, Ikeda Y. Circulating endogenous thrombopoietin, interleukin-3, interleukin-6 and interleukin-11 levels in patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation. Int J Hematol 65 : 61-69, 1996
32) Kimura F, Nakamura Y, Sato K, Wakimoto N, Kato T, Tahara T, Yanada M, Nagata N, Motoyoshi K : Cyclic change of cytokines in a patient with cyclic thrombocytopenia. Br J Haematol 94, 171-174, 1996
33) Schrezenmeier H, Griesshammer M, Hornkohl A, Nichol JL, Heimpel H, Kubanek B, Raghavachar A : Thrombo-poietin serum levels in patients with aplastic anaemia : correlation with platelet count and persistent elevation in remission. Br J Haematol 100 : 571-576, 1998
34) Nakajima H, Kizaki M, Takayama N, Kawai Y, Watanabe K, Okamoto S, Ikeda Y : Proposals for the objective indices for evaluating the differentiation of leukemic cells by all-*trans* retinoic acid in the patients with acute promyelocytic leukemia. Jpn J Clin Hematol 37 : 208-213, 1996
35) Ishibashi T, Koziol JA, Burstein SA : Human recombinant erythropoietin promotes differentiation of murine megakaryocytes *in vitro*. J Clin Invest 79 : 286-289, 1987
36) Kaushansky K : Thrombopoietin : the primary regulator of platelet production. Blood 86 : 419-431, 1995
37) Kambe T, Tada-Kambe J, Kuge Y, Yamaguchi-Iwai Y, Nagao M, Sasaki R : Retinoic acid stimulates erythropoietin gene transcription in embryonal carcinoma cells through the direct repeat of a steroid/thyroid hormone receptor response element half-site in the hypoxia-response enhancer. Blood 96 : 3265-3271, 2000
38) Astrom A, Pettersson U, Chambon P, Voorhees JJ : Retinoic acid induction of human cellular retinoic acid-binding protein-II gene transcription is mediated by retinoic acid receptor-retinoid X receptor heterodimers bound to one far upstream retinoic acid-responsive element with 5-base pair spacing. J Biol Chem 269 : 22334-22349, 1994
39) So EN, Crowe DL : Characterization of a retinoic acid responsive element in the human ets-1 promoter. IUBMB Life 50 : 365-370, 2000
40) Shao W, Benedetti L, Lamph WW, Nervi C, Miller WH Jr : A retinoid-resistant acute promyelocytic leukemia subclone expresses a dominant negative PML-RAR alpha mutation. Blood 89 : 4282-9, 1997