ヒト白血病細胞 K562 の細胞分化における化学制御

小磯邦子,* 中島 修, 松村大輔, 藤本康之, 橋本祐一

東京大学分子細胞生物学研究所, 〒113-0032 東京都文京区弥生 1-1-1

Chemical Control of Cell Differentiation of Human Myeloleukemia K562 Cell Line

Yukiko KOISO,* Osamu NAKAJIMA, Daisuke MATSUMURA,
Yasuyuki FUJIMOTO, and Yuichi HASHIMOTO

*Institute of Molecular and Cellular Bioscience, The University of Tokyo,
Yayoi 1-1-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan*

(Received August 16, 1999)

Human myeloid leukemia K562 cells can be induced to differentiate to mature cells bidirectionally, i.e., hemin induces erythroid differentiation, while 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) induces differentiation to monocytes.

The differentiation-inducing activity of various hemin-related compounds suggested certain structural requirements for the activity: 1) the iron moiety of hemin is not essential, and 2) the propionic acid side chains of hemin play an important role in the differentiation and induction. In addition, we have examined the influence of some bioresponse-modifying factors on hemin/protoporphyrin IX-induced differentiation of K562 cell line. Retinoids and tubulin-disruptors, themselves did not induce differentiation, enhanced hemin/protoporphyrin IX-induced differentiation of K562 cells. We also examined the possible involvement of peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) in hemin/protoporphyrin IX-induced differentiation on K562 cell lines. The PBR specific ligands modified hemin-induced differentiation. These results suggest a requirement for retinoids (or retinoids-like cofactors) for hemin/protoporphyrin IX-induced differentiation of K562 cells and the involvement of PBR in erythroid differentiation of K562 cell line. Further we showed that TPA suppresses hemin-induced erythroid differentiation of K562 cells, while retinoids augment it. TPA is a potent inducer of heme oxygenase (HO), which catabolizes heme to biliverdin. An HO inhibitor, tin protoporphyrin (SnPP), suppresses TPA-induced K562 cell differentiation to monocytes. It was also found that cotreatment of K562 cells with SnPP and TPA induces erythroid differentiation of K562 cells, though SnPP alone or TPA alone does not induce erythroid differentiation, suggesting a role of HO in the directional switch of differentiation.

Key words—K562 cell line, cell differentiation, hemin

1. はじめに

K562 細胞は 1970 年, Luzzio らが慢性骨髄性白血病急性転化の患者胸水浸出細胞より, ヒト白血病由来としては初めて樹立した骨髄性白血病細胞株である.¹⁾ この K562 細胞は大型の未分化芽球で表面膜糖タンパク質構築は赤血球のそれと酷似しており, 赤血球特異的なシアロ糖タンパクやグリコホリン A を保持している. この細胞株はヒト由来の赤芽球分化モデルとして, マウス由来のフレンド白血病細胞とともに多くの研究がなされている. K562 細胞の薬物による分化は 1979 年に, Anderson らが酪酸による赤芽球系分化を最初に報告しており,²⁾ その後ヘムの中心鉄が 3 価となったヘミンや脂肪酸, 核酸及び核酸塩基誘導体 (5-fluorouracil, Ara-C など) 抗生物質 (Actinomycin D, Bleomycin など), ビタミン B₁₂ など様々な薬物による K562 細胞の赤芽球分化が報告されている.³⁾

一方, K562 細胞は多能性幹細胞的性質を有しており, TPA により単球/マクロファージ系あるいは巨核球系へ分化することも知られている.⁴⁾ K562 細胞の赤芽球系分化についてはヘミンを中心とした分化誘導剤によるヘモグロビン合成誘導の詳細な解析が進められている. ヘモグロビン誘導以外では K562 細胞のヘミン誘導分化においてヘムの生合成関連酵素である δ -アミノレブリン酸や, δ -アミノレブリン酸デヒドロゲナーゼの活性が上昇する一方で, ヘムの代謝酵素であるヘモオキシゲナーゼの活性が低下することが観察され, 細胞内のヘムの量を増やす方向に制御されていることなどがわかっている.⁵⁾

K562 細胞のヘミンによる赤芽球分化において特徴的な性質は, 分化の進行は細胞増殖に対してほとんど影響を与えず, さらにいったんヘミンにより分化した K562 細胞は培地中からヘミンを除くことに

より再び未分化な状態に戻る可逆性を示す。⁶⁾ この分化のタイプは特異なものであり、一般的な分化のタイプは TPA による単球/マクロファージ系分化に見られるように、分化が進むに従い増殖速度が低下して、最終的には増殖が停止し、いったん分化すれば分化誘導剤を除去しても分化した状態を維持し続ける不可逆性を示す。以上のような詳細な解析が

行われているにも関わらず、K562 細胞に対するヘミンによる赤芽球系誘導メカニズムに関しては明解な解答が得られていない。

筆者らは、ヘミン関連化合物の K562 細胞に対する分化誘導活性の構造活性相関を解析し、その知見を基に創製したリガンドをプローブとして分化に関わるポルフィリンの細胞内ターゲットの単離、同定

Table 1. K562 Cell Differentiation-Inducing Activity of Hemin-Related Compounds

		Inducing Activity	
		Opt. conc. (μM)	Max. B+ (%)
Hemin	Feric protoporphyrin IX chloride	25	80
Porphine		Inactive	
Bilirubin	1,3,6,7-Tetramathyl-4,5-dicarboxyethyl-2,8-divinyl-(b-13)-dihydrobilenone	Inactive	
Biliverdine	1,3,6,7-Tetramathyl-4,5-dicarboxyethyl-2,8-divinylbilenone	Inactive	
PP	Protoporphyrin IX	1	75
HP	Hematoporphyrin IX	10	85
MP	Mesoporphyrin IX	1	68
DP	Deuteroporphyrin IX	1	20
PDE	Protoporphyrin IX dimethyl ester	50	65
SnPP	Stannic protoporphyrin IX dichloride	Inactive	
ZnPP	Zinc protoporphyrin IX	Inactive	

Opt. conc. is the concentration at which the maximum percentage of benzidine-positive cells was observed. Max. B+ is the maximum percentage of benzidine-positive cells induced by each drug. The compounds which showed no differentiation-inducing activity at concentrations as high as 10–20 μM were judged as inactive.

を試みた。⁷⁾ ポルフィリンは細菌から動植物までのほとんどの生物が自ら生合成を行い、天然に偏在する色素として、また、酵素などの補欠分子として不可欠な生体成分である。ポルフィリンの中で特に動物では最も重要な研究対象となっているポルフィリン化合物としてヘムが挙げられる。動物におけるヘムの生合成はミトコンドリアと細胞質にわたって行われる。一方ヘムの代謝はヘムオキシゲナーゼによってビリベルディンと一酸化炭素と鉄イオンとなり、ビリベルディンはビリベルディンレダクターゼによって直ちにビリルビンに変換される。現在では様々な細胞内のプロセスにヘムが関わっており、特異的結合タンパクを介して転写、翻訳、細胞内輸送など様々なレベルでの細胞内プロセスをコントロールしていることが明らかになりつつある。

以上のように、K562 細胞の赤芽球系分化は、ポルフィリン系化合物の、細胞内における動向と相互に依存する様々なプロセスが多次元同時に関与するようである。そこで、転写や細胞増殖、ミトコンドリア機能に影響を与えるレチノイド、チューブリン重合阻害剤、及び末梢型ベンゾジアゼピンレセプターリガンドなどの生物応答調節剤が K562 細胞のポルフィリンによる赤芽球系分化に対してどのような影響を与えるか検討することで、赤芽球系分化に関わる細胞内プロセスを明らかにした。

本誌では、これまでの筆者らの K562 細胞の赤芽球系分化に関する研究成果について、(1) ポルフィリン系化合物の分化誘導に関わる構造活性相関、(2) その結果に基づいての結合タンパク探索の結果、(3) ポルフィリンに誘導される K562 細胞の赤芽球系分化を制御する諸因子、とりわけレチノイド、チューブリン重合阻害剤、末梢型ベンゾジアゼピンレセプターリガンドの影響の解析、(4) K562 細胞の分化の方向付けにおけるヘムオキシゲナーゼの役割を述べ、K562 細胞の分化の全体像を把握しようと試みる。

2. ヘミン関連化合物の K562 細胞に対する赤芽球系分化誘導活性の構造活性相関の解析

ヘミン関連化合物の K562 細胞に対する赤芽球系分化誘導活性について系統的に構造活性相関の知見を得るために 20 種以上のヘミン関連化合物の K562 細胞に対する赤芽球系分化誘導能を解析した。⁷⁾ 赤芽球系分化誘導活性は K562 細胞 (4×10^4 cells/ml) に薬物を処理して 4 日間培養後ベンゼジン染色を行い判定した。

その結果、中心鉄を別の金属イオンに置換したポルフィリンはいずれも実験条件下で不活性であったが、これまで無活性なものと考えられていた中心鉄を欠失させたプロトポルフィリン (PP) は、ヘミンより強い活性を持つことが判明した (Table 1)。⁸⁾ さらにヘミンのビニル側鎖を修飾したヘマトポルフィリン (HP)、メソポルフィリン (MP)、デューテロポ

Fig. 1. Structure and Differentiation-Inducing Activity on K562 Cell Line of Hemin

ルフィリン (DP) や PP の 2 つのプロピオン酸側鎖がエステル化されたプロトポルフィリンジメチルエステル (PDE) にも分化誘導能が観察された (Table 1)。⁷⁾ 構造活性相関に関する考察を Fig. 1 にまとめた。第 1 に PP が分化誘導活性を有するという知見からヘミンの鉄部分は活性に必ずしも必要ではないが、鉄以外の亜鉛又は錫イオンが配位したのものには活性がない。第 2 に、プロピオン酸側鎖が修飾され、かつ細胞内でプロピオン酸に変換され得ない化合物にはまったく活性が見られないことから、ヘミンのプロピオン酸側鎖は活性に必須であり、分化誘導において重要な働きをしていると考えられる。PDE がプロピオン酸側鎖が修飾されているにも関わらず活性を有しているのは細胞内において PDE のエステル基が容易に加水分解されているためと推定している。第 3 にビリベルディンのようにプロピオン酸などの側鎖がヘミンと同様に保持・配置していてもポルフィリン環が開裂した場合には活性を失うことから、ポルフィリン環は分化誘導能を持つために必須である。第 4 に PP 同様、HP, MP, DP が分化誘導剤として有効なことからヘミンのビニル基は分化誘導活性を失うことなく修飾が可能であると考えられる。以上の結果から、K562 細胞が分化誘導剤としてのポルフィリンの構造を厳密に認識しており、ポルフィリンによる非特異的な刺激のために生じる現象ではないということが考えられる。

これらの活性ポルフィリンはいずれも濃度依存的に赤芽球系分化誘導を行い、PP 及び MP はヘミンの 1/10 の至適濃度を持つ強力な分化誘導剤であり、HP はヘミンと同等の活性であった。活性ポルフィリンの細胞増殖に対する影響については概ねヘミンよりも強い阻害作用が観察された。また PP の分化誘導はヘミンのそれと同様に可逆的分化誘導であった。

3. 赤芽球系分化に関わるポルフィリン特異的結合タンパクの探索

前節の結果から、ポルフィリンによる K562 細胞の赤芽球系分化においてポルフィリンの構造を厳密に認識し得る機構として細胞内に存在し、ポルフィ

Fig. 2. Structure of Affinity Ligands

リン誘導分化に関わるレセプター様のポルフィリン特異的結合タンパク (PBP) の存在が示唆される。活性の明らかとなったポルフィリンの構造活性相関のデータをもとにアフィニティリガンドをデザインし、クロマトグラフィーにより PBP の探索を行った。方法として、結合が予想できるリガンド (ビニル基側からスペーサーを伸ばした誘導体: VL) あるいは結合しないと予想できるリガンド (プロピオン酸側鎖側からスペーサーを繋げた誘導体: PL) をデザイン・合成し (Fig. 2), それぞれを用いてアフィニティゲル (VG, PG) を作製し, 得られるタンパクを比較することで分化に関わる標的分子 PBP の探索を試みた。リード化合物としてはヘミンより活性が 10 倍以上高くかつ鉄錯体を形成していないために有機溶媒に比較的可溶で合成的にも取り扱いが容易なプロトポルフィリン (PP) を選択した。

調製した各ゲルに K562 細胞の全抽出液をバッチ法により吸着させ, ゲルに吸着するタンパクの結合特性を解析して, 特異的結合を示すポルフィリン特異的結合タンパク (PBP) の探索を行った。SDS-PAGE により解析した結果, VG のリガンドに対してのみ特異的吸着を示し, PG のリガンドには吸着を示さない 22KD のバンド (PBP22) が PBP の条件に合致することが判明し, これを PBP の候補と判断した。

VG を用いたカラムクロマトグラフィーを K562 細胞の全抽出液に対して行いアミノ酸配列分析に必要な PBP22 を調製した。アミノ酸配列分析は, SDS-PAGE にアプライして泳動後, PBP22 のバンドを切り出し, cDNA クローニングに十分な情報を得るためにペプチダーゼ処理より得られるペプチドフラグメントを HPLC で分取し, アミノ酸配列分析を行い内部配列を決定した。BLAST によるホモロジー検索を行った結果, PBP 22 は human biliverdin-IX beta reductase isozyme I あるいは human NADPH dehydrogenase であることが判明し

た。

4. K562 細胞のポルフィリン誘導分化に対するレチノイドの影響

レチノイドは細胞核に局在する特異的受容体, レチノイン酸レセプター (RAR) に結合することでその転写調節能を活性化し, 特異的な遺伝子発現の制御を行う。⁹⁾ レチノイドは一般的によく知られる分化誘導剤であり, 広範な細胞種に対して活性を示す。しかし, レチノイドは低濃度で, ヒト慢性骨髄性白血病細胞株 HL-60 の顆粒球系細胞への分化を誘導するが, K562 細胞に対して増殖阻害作用も分化誘導活性も示さない。

一方ヘミンは HL-60 細胞に無効であり, ヘミンによる K562 細胞の分化誘導とレチノイドによる HL-60 細胞の分化誘導では大きな違いが多々ある。その 1 つは, 前者が可逆的であり後者は不可逆的であることである。All-trans-retinoic acid に加え, 強力な合成レチノイドである Am80¹⁰⁾ や Ch55¹¹⁾ を用いて, ヘミンによる赤芽球系分化に対する影響を解析し, レチノイドと赤芽球系分化の関わりを明らかにしようと試みた。

その結果, これらのレチノイドとヘミンを同時に作用させるとヘミンにより誘起される K562 細胞分化がヘミン単独で作用させた場合に比べ著しく増強されることがわかった (Table 2),¹²⁾ 赤芽球系分化の指標としてベンチジン陽性率から分化促進作用を見るだけでなく, ヘモグロビンの量もベンチジン陽性率の結果と同様に Am80 同時処理により増加していることが判明した。また Am80 は PP, HP などの活性ポルフィリンによる分化に対してもヘミン誘起分化と同様に促進効果を示した。ヘミンにより誘導される K562 細胞の分化は可逆的で, ヘミン単独で誘起された分化細胞はヘミンを除去すると大部分が未分化な状態に戻ってしまう。¹³⁾ これに対して Am80 存在下でヘミンにより誘起された分化細胞は薬剤除去後再培養するとその 50% が分化状態を保持

5. チューブリン重合阻害剤

細胞周期と細胞分化との関係の重要性が近年分子レベルにおいても明らかになりつつある。チューブリン重合阻害剤はM期の紡錘体形成を阻害することで細胞周期をブロックすることが知られている。¹⁴⁾ 細胞周期を制御する薬物の中には細胞分化誘導を行うものもあり、¹⁵⁾ また分化誘導の際、細胞周期のパターンに影響を与える分化誘導剤も知られている。¹⁶⁾ 実際にHL-60細胞のレチノイン酸による分化がコルヒチンやビンブラスチンによって増強することが報告されている。¹⁷⁾

K562細胞のヘミンによる分化と細胞周期との関わりを知るためのプローブとして代表的な重合阻害剤であり、それぞれの結合部位が異なるコルヒチン、ビンブラスチン及びビリゾキシニンについてヘミン誘導分化に対する影響を検討した。

チューブリン重合阻害剤がK562細胞の細胞増殖阻害作用を示さない最大の濃度で1時間処理後薬物を除き、ヘミン2.5 μ Mを含む培地で2日間培養し、ベンチジン染色により分化誘導率を判定した。いずれのチューブリン重合阻害剤を処理した場合でも、無処理のものに比べてK562細胞の赤芽球系分化が2倍程度増強された (Table 3)。この事実から細胞周期やシグナル伝達に関与すると考えられている微小管あるいはチューブリンの細胞内動態が分化誘導剤

の活性発現に影響することが明らかとなった。¹⁷⁾

ヘミンによるK562細胞の分化誘導に対する、レチノイドやチューブリン重合阻害剤の作用の解明は、異なるタイプの薬物の併用による、より効果的な癌の分化誘導療法に向けての基礎研究となると考えている。

6. 末梢型ベンゾジアゼピンレセプターリガンドの赤芽球系分化に対する影響

末梢型ベンゾジアゼピンレセプター (PBR) はミトコンドリアに局在し、¹⁸⁾ 脂肪酸ステロイドなどの生成に関与していることが報告されているが、¹⁹⁾ 最近、ミトコンドリアでのヘム生成にも関与することが明らかになっている。²⁰⁾ ポルフィリンはPBRに特異的に結合し、PBRの生体内リガンドの可能性が示唆されており、²¹⁾ その結合特性とK562細胞に対する分化誘導能の間にかかなりの相関が確認される。そこでPBRのアゴニストであるジアゼパム及びアンタゴニストを用いてヘミンによるK562細胞の赤芽球系分化に対する影響を解析することで、赤芽球系分化と末梢型ベンゾジアゼピンレセプターの関連を検討した。

典型的なベンゾジアゼピン類であるジアゼパム (アゴニスト) とPBR特異的リガンドであるRo 5-4860 (アゴニスト)、²²⁾ PK 11195 (アンタゴニスト)²²⁾ を用いK562細胞増殖への影響、及びベンチ

Fig. 4. Increase of Hemin (2.5 μ M)-Induced K562 Cell Differentiation by Tubulin Disruptors

Fig. 5. Effect of PBR Ligands on K562 Cell Differentiation-Inducing Ability

Fig. 6. Effect of PBR Ligands on K562 Cell Differentiation Induced by Hemin, PP and Diazepam

ジン染色により赤芽球系分化を判定した。ジアゼパムは K562 細胞に対し、ポルフィリンに比べて弱いながら赤芽球系分化誘導活性を示したが、Ro 5-4860, PK 11195 は全く活性を示さなかった (Fig. 5)。各濃度の PBR リガンドとヘミン、プロトポルフィリン、ジアゼパムを同時処理して K562 細胞の赤芽球系分化に対する PBR リガンドの影響を解析すると、PK 11195 は 5 から 10 μM において若干分化を促進するが 20 μM 以上では分化阻害作用を示し、この分化阻害作用は、すべて活性ポルフィリン並びに

ジアゼパムによる赤芽球系分化において観察された。ジアゼパムは 25 μM 以上においてヘミンによる赤芽球系分化を促進した。²³⁾ Ro 5-4864 は 25 μM 以下においてヘミン誘起分化に対して濃度依存的に分化促進作用を示したが、50 μM では顕著に分化を抑制した (Fig. 6)。現在までの知見では PBR の生理的役割は不明確ではあるが、PBR リガンドが K562 細胞の赤芽球系分化を修飾することから PBR が赤芽球系分化に関与していることが示唆された。

7. K562 細胞の TPA 誘起分化

K562 細胞はヘミンにより赤芽球系分化が誘導されるが、TPA により単球/マクロファージに分化することが知られており、実験条件下で TPA 0.5 nM で 20—30%、5 nM で 50—60% の分化率であった。TPA により単球系へ分化するのは、TPA の作用により K562 細胞より誘導されるヘムオキシゲナーゼによりヘムが分解されるために赤芽球系への分化が阻害されているためではないかと推測した。それを検証するために、K562 細胞の TPA 処理に際して、ヘムオキシゲナーゼの阻害剤であるスズプロトポルフィリン (SnPP) を共存させることによって単球/マクロファージ系への分化が押さえられると同時に赤芽球系への分化が促進されるという作業仮説を立てた。SnPP は K562 細胞に対して赤芽球系分化誘導活性を示さない。ヘミンあるいは SnPP のみを K562 細胞に作用させたときとそれら各濃度に TPA 0.5 nM を共存させたときの分化誘導率を比較した

Table 4. Effect of a HO Inhibitor, SnPP, on TPA (0.5 nM)-Induced Monocytic Differentiation of K562 Cells

Concentration of SnPP (μ M)	In the presence of TPA		In the absence of TPA	
	WG+cells (%)	BZD+cells (%)	WG+cells (%)	BZD+cells (%)
0	22	± 3	0	0
1	21	6	± 3	± 3
5	22	6	± 3	± 3
10	21	8	± 3	± 3
25	18	14	± 3	± 3
50	15	16	± 3	± 3

(Table 4). K562 細胞をヘミン又は SnPP と共に 1 時間培養し、培地交換することなく TPA 0.5 nM を添加し、4 日間培養した。赤芽球系分化はベンチジン染色により、単球/マクロファージ系分化はライト-ギムザ染色による形態変化の観察より判定した。単球/マクロファージ系への分化率はヘミン単独の場合でもヘミン/TPA 共存下でも変わりなく一定であった。また赤芽球系分化はヘミンの濃度依存的に上昇し、その至適濃度はヘミン単独では 25 μ M, TPA 0.5 nM との共存下では 5 μ M の時最大であったが、分化率に大きな差は見られない (Table 3)。一方 SnPP は、単独の場合は、赤芽球系への分化も単球/マクロファージ系への分化もほとんど認められなかったのに対して TPA との共存下においては、赤芽球系分化率 (ベンチジン陽性率) が濃度依存的に上昇し、25 μ M 共存下では 18% であった。一方、単球/マクロファージ系への分化 (ライト-ギムザ染色による形態観察) は減少して TPA 単独の時 22% であったのに対して、SnPP 25 μ M 共存下では 15% に減少した (Table 4)。²⁴⁾ これらの事実は先の仮説を裏付けており、SnPP によってヘムオキシゲナーゼ活性が抑制された結果、赤芽球系分化の促進と単球/マクロファージ系分化の減少を引き起こしていると解釈できる。

8. おわりに

ポルフィリンによる K562 細胞の赤芽球系分化について様々な角度から解析を行い、赤芽球系分化に関わる細胞内の全体的な機構の理解に多くの重要な知見を得ることが出来たと考えている。

K562 細胞に対する赤芽球系分化誘導能におけるポルフィリン系化合物の構造活性相関を解析することで、細胞はポルフィリンの構造を厳密に認識し、ポルフィリン環・プロピオン酸側鎖が活性発現に不可欠であることを明らかにした。この知見を基にポルフィリンによる分化誘導に関わる細胞内ターゲットの探索を試みている。

本研究においてはポルフィリンのターゲットの探索の他に、細胞内の様々な相に作用する薬物の影響を解析することでポルフィリンによる赤芽球系分化に関わる諸相を明らかにした。

レチノイド類、チューブリン重合阻害剤について

はポルフィリンによる赤芽球系分化を促進する結果が得られた。TPA とポルフィリンによる分化誘導の間には共通の過程が含まれることも示唆された。また、K562 細胞の多能性分化能について、その分化の方向付けにおいて、ヘムオキシゲナーゼが少なくとも部分的には関与していることなど、これらの知見は、白血病の分化誘導療法や多剤併用治療の開発への基礎を与えるものと考えられる。

REFERENCES

- 1) Lozzio C. B., Lozzio B. B., *Blood*, **45**, 321-334 (1975).
- 2) Andersson L. C., Jokinen M., Garmberg C. G., *Nature* (London), **280**, 464-465 (1979).
- 3) Hashimoto Y., "Clinical Oncology," Vol. 1, ed. by Ariyoshi H., Saijo N., Sasaki Y., Fukuoka M., Watanabe T., Japanese Society of Medical Oncology (Tokyo), 1999 pp. 202-218.
- 4) Tetters A. T., Massaro F., Mulder A., Schreuder-van Gelder R., von dem Borne A. E., *Leuk. Res.*, **8**, 197-206 (1984).
- 5) Hoffman R., Ibrahim N., Murnane M. J., Diamond B. G., Forget A., Levere R. D., *Blood*, **56**, 567-570 (1980).
- 6) Dean A., Erard F., Schneider A. B., Schneider A. N., *Science*, **212**, 459-461 (1981).
- 7) Nakajima O., Hashimoto Y., Iwasaki S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **198**, 720-727 (1994).
- 8) Sassa S., *Semin. Hematol.*, **25**, 312-320 (1988).
- 9) "Retinoids," ed. by Hashimoto Y., Shudo K., Kodansha-Scientific (Tokyo) (1992).
- 10) Kagechika H., Kawachi E., Hashimoto Y., Shudo K., *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 4209-4212 (1984).
- 11) Shudo K., Kagechika H., Kawachi E., Hashimoto Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 404-407 (1985).
- 12) Nakajima O., Hashimoto Y., Iwasaki S., *FEBS Lett.*, **330**, 81-84 (1993).
- 13) Nakajima O., Sugishita Y., Hashimoto Y.,

- Iwasaki S., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 742-744 (1994).
- 14) Iwasaki S., *Med. Res. Rev.*, **13**, 183-198 (1993).
- 15) Rowley P. T., Ohlsson-Wilhelm B. M., Farley B. A., Labella S., *Exp. Hematol.*, **9**, 32-37 (1981).
- 16) Gambari R., Marks P. A., Rifkind R. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 4511-4515 (1979).
- 17) Leung M. F., Sartorelli A. C., *Leuk. Res.*, **16**, 929-935 (1992).
- 18) Anholt R. R., Pederson P. L., De Souza E. B., Snyder S. H., *J. Biol. Chem.*, **261**, 576-583 (1986).
- 19) Parola A. L., Yamamura H. I., Laird H., III., *Life Sci.*, **52**, 1329-1342 (1993).
- 20) Taketani S., Kohno H., Furukawa T., Tokunaga R., *J. Biochem.*, **117**, 875-880 (1995).
- 21) Verma A., Nye J. S., Snyder S. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 2256-2260 (1987).
- 22) Le Fur G., Vaucher N., Perrier M. L., Flamier A., Benavides J., Renault C., Dubroeuq M., Gueremy C., Uzan A., *Life Sci.*, **33**, 449-457 (1983).
- 23) Nakajima O., Hashimoto Y., Iwasaki S., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 903-906 (1995); *idem*, *Cell. Mol. Biol.*, **43**, 115-134 (1997).
- 24) Koiso Y., Fujimoto Y., Matsumura D., Nakajima O., Hashimoto Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 439-440 (1999).