

## Establishment of a human leukaemic cell line (CMK) with megakaryocytic characteristics from a Down's syndrome patient with acute megakaryoblastic leukaemia

TAKEYUKI SATO,<sup>1</sup> AKIRA FUSE,<sup>2</sup> MITSUOKI EGUCHI,<sup>3</sup> YASUhide HAYASHI,<sup>4</sup> RYUKICHI RYO,<sup>5</sup> MASASHI ADACHI,<sup>6</sup> YUJI KISHIMOTO,<sup>7</sup> MASANAO TERAMURA,<sup>8</sup> HIDEAKI MIZOGUCHI,<sup>8</sup> YUKICHI SHIMA,<sup>1</sup> ISAO KOMORI,<sup>1</sup> SHOUSUKE SUNAMI,<sup>1</sup> YURI OKIMOTO<sup>1</sup> AND HIRONORI NAKAJIMA<sup>1</sup> *Department of <sup>1</sup>Pediatrics and <sup>2</sup>Microbiology, School of Medicine, Chiba University, Chiba; <sup>3</sup>Department of Pediatrics, Dokkyo Medical School; <sup>4</sup>Division of Hematology, Saitama Children's Medical Center, Saitama; <sup>5</sup>Blood Transfusion Service, Kobe University Hospital, Kobe; <sup>6</sup>Department of Laboratory Medicine, Kobe University School of Medicine, Kobe; <sup>7</sup>First Department of Internal Medicine, Kansai Medical University, Osaka; <sup>8</sup>Division of Hematology, Department of Medicine, Tokyo Women's Medical College, Tokyo, Japan*

Received 17 August 1988; accepted for publication 24 January 1989

**Summary.** A new megakaryoblastic cell line (CMK), which also exhibits erythroid and myeloid markers, was established from a Down's syndrome patient suffering from acute megakaryoblastic leukaemia. The CMK cells were found to be positive in reactions with anti-platelet antibodies (anti-glycoproteins IIb/IIIa and Ib, and Plt-1). Platelet peroxidase (PPO) reactivity was found to be associated with the nuclear envelope and the endoplasmic reticulum but not with the Golgi apparatus. Some cells possessed cytoplasmic granules with the characteristics of  $\alpha$ -granules and demarcation membranes. Karyotyping revealed near-tetraploidy (modal chromosome number of 95; ranging 87-98) and a translocation der(17)t(11;17), also found in the original leukaemic cells, confirming that the cells were derived from the patient's

malignant blasts. The CMK cells were also found to be positive in reaction with anti-glycophorin A antibody, as well as with anti-myeloid antibodies (MY4, MY7 and MY9). Treatment of CMK cells with phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) greatly enhanced the reactivity with anti-platelet antibodies, increased the number of cells in which cytoplasm was dissociated into numerous segments and suppressed the reactivity with anti-glycophorin A. The proliferation of CMK cells was stimulated by interleukin-3 (IL-3) and granulocyte-macrophage colony stimulation factor (GM-CSF). This cell line should be a useful tool for analysing the basis of the afferent association between megakaryoblastic leukaemia and Down's syndrome, as well as for further study of megakaryocytic differentiation.

急性巨核芽球性白血病を患うダウン症候群患者から、赤血球系および骨髄系マーカーも示す新しい巨核芽球性細胞株 (CMK) が樹立されました。CMK 細胞は、抗血小板抗体 (抗糖タンパク質 IIb/IIIa および Ib、および Plt-1) との反応で陽性でした。血小板ペルオキシダーゼ (PPO) 反応は、核膜および小胞体と関連していましたが、ゴルジ体とは関連していませんでした。一部の細胞は、外顆粒および境界膜の特徴を持つ細胞質顆粒を有していました。核型分析により、近似四倍体 (染色体数 95: 範囲 87-98) および転座 der(17)t(11;17) が明らかになりました。これは元の白血病細胞にも見られました。細胞が患者由来のものであることを確認します。

**Acta Haematologica**

Editors-in-Chief: E.A. Beck, Lugano; H.R. Marti, Aarau

**Reprint**

Publisher: S. Karger AG, Basel  
Printed in Switzerland

Acta Haemat 1989;81:104-108

© 1989 S. Karger AG, Basel  
0001-5792/89/0812-0104 \$ 2.75/0

## Refractory Anemia Terminating in Acute Megakaryoblastic Leukemia (M7) (With 1 color plate)

Masashi Adachi<sup>a</sup>, Ryukichi Ryo<sup>a, b</sup>, Akinori Yoshida<sup>a</sup>, Nobuo Yamaguchi<sup>a</sup>, Yoichiro Izumi<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Department of Laboratory Medicine, Kobe University School of Medicine, Kobe; <sup>b</sup> Blood Transfusion Service, Kobe University Hospital, Kobe; <sup>c</sup> Kokura Memorial Hospital, Kita-Kyushu, Japan

**Key Words.** Marrow fibrosis · Megakaryoblastic leukemia · Refractory anemia

**Abstract.** A 72-year-old man with refractory anemia (RA) developed overt megakaryoblastic leukemia after the course of RA with excess of blasts. The blasts were positive for platelet peroxidase activity and had platelet glycoproteins (GPs) such as GPIIb/IIIa and GPIIIa. The bone marrow biopsy at terminal stage disclosed marked fibrosis. The nature of the megakaryoblasts was investigated. The blasts did not differentiate morphologically into mature megakaryocytes with TPA addition. In vitro colony assay showed the failure of colony-forming unit, megakaryocyte growth in peripheral blood. The pathogenesis of myelofibrosis in our patient is discussed.

72歳の男性が難治性貧血(RA)を患い、RAの経過中に芽球が増加した後、顕著な巨核芽球性白血病を発症した。芽球は血小板ペルオキシダーゼ活性に陽性であり、GPIIb/IIIaやGPIIIaなどの血小板糖タンパク質(GPs)を有していた。末期段階での骨髄生検では顕著な線維化が認められた。巨核芽球の性質が調査されたが、芽球はTPA添加によって形態的に成熟した巨核球に分化しなかった。インビトロコロニーアッセイでは、末梢血中のコロニー形成単位、巨核球の成長が失敗した。我々の患者における骨髄線維症の病因が議論されている。

[CANCER RESEARCH 49, 3805-3808, July 15, 1989]

## Elevation of Intracellular Calcium Ion by Prostaglandin E<sub>1</sub> and Its Inhibition by Protein Kinase C in a Human Megakaryocyte Leukemia Cell Line

Masashi Adachi,<sup>1</sup> Ryukichi Ryo, Akinori Yoshida, Keisuke Teshigawara, Nobuo Yamaguchi, Masahiko Hoshijima, Yoshimi Takai, and Takeyuki Sato

Departments of Laboratory Medicine [M. A., A. Y., K. T., N. Y.] and Biochemistry [M. H., Y. T.], Kobe University School of Medicine and Blood Transfusion Service, Kobe University Hospital [R. R.], Kobe 650; and Department of Pediatrics, Chiba University School of Medicine, Chiba 280 [T. S.], Japan

### ABSTRACT

In the present study, we examined the effect of prostaglandin E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>) on Ca<sup>2+</sup> mobilization in a human megakaryocyte (the progenitor of platelets) leukemia cell line, designated as CMK. PGE<sub>1</sub> caused a rapid and dose-dependent increase in the intracellular free calcium level ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) associated with the elevation of cyclic AMP. The PGE<sub>1</sub>-induced elevation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> was decreased by the prior addition of ethylene glycol bis(2-aminoethylether)tetraacetic acid to the medium by approximately 25% of the control. This result indicates that the PGE<sub>1</sub>-induced elevation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> is due to influx of Ca<sup>2+</sup> from the external medium and to mobilization of Ca<sup>2+</sup> from intracellular stores. Pretreatment of CMK cells with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), a stimulus for protein kinase C, further enhanced the PGE<sub>1</sub>-induced increase in the cellular cyclic AMP level. Inversely, pretreatment of CMK cells with TPA (10 nM), prior to the addition of PGE<sub>1</sub>, inhibited the PGE<sub>1</sub>-induced elevation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Dibutyl cyclic AMP and forskolin did not elevate [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> or affect the PGE<sub>1</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> mobilization. The inhibitory action of TPA in the PGE<sub>1</sub>-induced elevation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> was mimicked by other protein kinase C-activating agents, such as 1-oleoyl-2-acetylglucol and N-(6-phenylhexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide, and was selectively restored by protein kinase C inhibitors, such as 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine dihydrochloride and N-[2-(methylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide dihydrochloride. Thus, the inhibitory modulation of TPA on the PGE<sub>1</sub>-induced elevation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> is mediated through protein kinase C activation. PGE<sub>1</sub> had no induction effect of megakaryocytic phenotypic changes in CMK cells. The biological role of PGE<sub>1</sub>, which increased [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and cyclic AMP levels in the CMK cells, remains to be determined.

Since PGE<sub>1</sub> has an inhibitory effect on the agonist-induced elevation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in platelets through cAMP accumulation, it is interesting to examine whether PGE<sub>1</sub> shows a similar effect in CMK cells. In this paper, we describe for the first time that PGE<sub>1</sub> is a potent activator of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in CMK cells.

Another line of study has shown that a phorbol ester such as TPA, a potent protein kinase C activator, inhibits the agonist-induced Ca<sup>2+</sup> mobilization in platelets (16-21). On the basis of this finding, it is hypothesized that protein kinase C activation may have a role in the termination of the agonist-induced signal transduction in platelets. To clarify the relationship between protein kinase C activation and the PGE<sub>1</sub>-modulated Ca<sup>2+</sup> mobilization in CMK cells, we have examined the effects of protein kinase C activators and inhibitors on the PGE<sub>1</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> mobilization in the cells. This paper also describes protein kinase C inhibition of the PGE<sub>1</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> mobilization in CMK cells.

### MATERIALS AND METHODS

**Chemicals.** Thrombin was a product of Mochida Pharmaceutical Co. (Tokyo, Japan). PGE<sub>1</sub> was donated by Ono Pharmaceutical Co. (Tokyo, Japan). TPA, dibutyl cyclic AMP, and forskolin were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). OAG was from Nakarai Chemicals (Kyoto, Japan). H7, H8, HA1004, and SC9 were from Seikagaku Kogyo Co. (Tokyo, Japan). Fura 2-AM was from Dojindo Laboratories (Kumamoto, Japan). The cAMP radioimmunoassay kit was from Amersham Japan Co. (Tokyo, Japan).

ヒト巨核球性白血病細胞株におけるプロスタグランジン E<sub>1</sub> による細胞内カルシウムイオンの上昇とプロテインキナーゼ C によるその阻害

本研究では、CMK と名付けたヒト巨核球（血小板の前駆細胞）白血病細胞株における Ca<sup>2+</sup> 動員に対するプロスタグランジン E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>) の効果を検討した。PGE<sub>1</sub> は、サイクリック AMP の上昇と関連して、細胞内遊離カルシウム濃度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) の急速かつ用量依存的な上昇を引き起こした。PGE<sub>1</sub> 誘導性の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の上昇は、培地にエチレンジトリオールビス (2-アミノエチルエーテル) テトラ酢酸を事前に添加することにより、対照の約 25% 減少した。この結果は、PGE<sub>1</sub> 誘導性の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の上昇が、外部培地からの Ca<sup>2+</sup> の流入および細胞内ストアからの Ca<sup>2+</sup> の動員によるものであることを示している。CMK 細胞をプロテインキナーゼ C の刺激物質である 12-O-テトラデカノイルホルボル-13-アセテート (TPA) で前処理すると、PGE<sub>1</sub> 誘導による細胞内サイクリック AMP 濃度の上昇がさらに促進された。逆に、PGE<sub>1</sub> 添加前に CMK 細胞を TPA (10 nM) で前処理すると、PGE<sub>1</sub> 誘導による [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇が抑制された。ジブチルサイクリック AMP およびフォスコリンは [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> を上昇させず、PGE<sub>1</sub> 誘導による Ca<sup>2+</sup> 動員にも影響を与えなかった。PGE<sub>1</sub> 誘導による [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇に対する TPA の阻害作用は、PGE<sub>1</sub> 誘導による [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇を阻害した。PGE<sub>1</sub> は、1-オレオイル-2-アセチルグリセロールや N-(6-フェニルヘキシル)-5-クロロ-1-ナフタレンスルホンアミドなどの他のタンパク質キナーゼ C 活性化剤によって模倣され、1-(5-イソキノリンスルホンイル)-2-メチルピペラジン二塩酸塩や N-[2-(メチルアミノ)エチル]-5-イソキノリンスルホンアミド二塩酸塩などのタンパク質キナーゼ C 阻害剤によって選択的に回復しました。このように、PGE<sub>1</sub> による [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の上昇に対する TPA の抑制調節は、タンパク質キナーゼ C の活性化を介しています。PGE<sub>1</sub> は CMK 細胞における巨核球表現型の変化を誘導しませんでした。CMK 細胞で [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> およびサイクリック AMP レベルを上昇させた PGE<sub>1</sub> の生物学的役割はまだ明らかにされていません。



## Platelet Factor 4 Gene Expression in a Human Megakaryocytic Leukemia Cell Line (CMK) and Its Differentiated Subclone (CMK11-5)

Masashi Adachi,<sup>1</sup> Ryukichi Ryo,<sup>1,2</sup> Takeyuki Sato,<sup>3</sup> and Nobuo Yamaguchi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Laboratory Medicine, Kobe University School of Medicine; <sup>2</sup>Blood Transfusion Service, Kobe University Hospital, Kobe; and <sup>3</sup>Department of Pediatrics, Chiba University School of Medicine, Chiba, Japan

(Received 26 November 1990; in revised form 25 March 1991; accepted 29 March 1991)

**Abstract.** The human cell line CMK spontaneously expresses megakaryocytic characteristics and can be induced to differentiate into mature megakaryocytes after exposure to 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA). In comparison with CMK, we have examined the characteristics of a subclone, designated as CMK11-5, that is morphologically larger than the parent clone CMK and contains multinucleated giant cells. All CMK11-5 cells were positive for platelet peroxidase (PPO) activity, and some contained abundant  $\alpha$ -granules and well-developed demarcation membranes. CMK cells had few demarcation membranes and  $\alpha$ -granules, and 10% of these cells were found not to possess PPO activity. Phenotypic analysis revealed the percentage of CMK11-5 cells for platelet glycoprotein (GP) IIb/IIIa (CD41a), and GPIIIa (CD61) was greater than that for CMK cells. On the basis of these findings, CMK11-5 cells were considered to be more differentiated than CMK cells. We further examined the expression of GPIIb and platelet factor 4 (PF4) mRNA by Northern blot hybridization using <sup>32</sup>P-labeled cDNA probes for GPIIb and PF4 in CMK and CMK11-5 cells. CMK cells exhibited mRNA for GPIIb, and its expression was augmented by TPA addition, but not PF4. In contrast, CMK11-5 cells were found to contain mRNA for GPIIb and PF4, and their mRNA levels were increased by the addition of TPA. The immunoreactive PF4 antigen was not detected in the TPA-treated CMK11-5 cells or in the culture medium of these cells. These results indicate that expression of mRNA for PF4 is a useful marker for the identification of mature megakaryocytes. Detection of mRNA for PF4 is a more sensitive method for characterization of megakaryocytic cells than that for the PF4 antigen.

ヒト細胞株 CMK は自発的に巨核球の特性を示し、12-*O*-テトラデカノイルホルボル-13-アセテート (TPA) への曝露により成熟巨核球への分化を誘導することができる。我々は CMK と比較するため、親クローン CMK よりも形態的に大きく、多核巨細胞を含むサブクローン (CMK11-5 と命名) の特性を調べた。CMK11-5 細胞は全て血小板ペルオキシダーゼ (PPO) 活性陽性であり、一部の細胞は豊富な  $\alpha$  顆粒とよく発達した分画膜を有していた。CMK 細胞は分画膜と  $\alpha$  顆粒が少なく、これらの細胞の 10% は PPO 活性を示さなかった。表現型解析の結果、CMK11-5 細胞では血小板糖タンパク質 (GP) IIb/IIIa (CD41a) および GPIIIa (CD61) の割合が CMK 細胞よりも高いことが明らかになった。これらの結果に基づき、CMK11-5 細胞は CMK 細胞よりも分化が進んでいると考えられる。さらに、CMK および CMK11-5 細胞における GPIIb および血小板因子 4 (PF4) mRNA の発現を、GPIIb および PF4 に対する <sup>32</sup>P 標識 cDNA プローブを用いたノーザンブロットハイブリダイゼーションにより調べた。CMK 細胞は GPIIb の mRNA を呈し、その発現は TPA 添加により増強されたが、PF4 では増強されなかった。対照的に、CMK11-5 細胞は GPIIb および PF4 の mRNA を含み、その mRNA レベルは TPA 添加により増加した。TPA 処理した CMK11-5 細胞およびその培養液中には、免疫反応性 PF4 抗原は検出されなかった。これらの結果は、PF4 mRNA の発現が成熟巨核球の同定に有用なマーカーであることを示唆している。PF4 mRNA の検出は、PF4 抗原の検出よりも巨核球細胞の特性評価においてより感度の高い方法である。



Reprinted from *CANCER*, Vol. 67, No. 4, February 15, 1991.  
Copyright © 1991, by the American Cancer Society, Inc. J. B. Lippincott Company.  
Printed in U.S.A.

## ***Platelet Factor 4 mRNA Expression in Cells From a Patient With Megakaryoblastic Crisis of Chronic Myelogenous Leukemia***

Ryukichi Ryo, MD,\* Masashi Adachi, MD,† Wataru Sugano, MD,†  
Mutsumi Yasunaga, MD,† Akinori Yoshida, MD,† Jiang Jikai, PhD,†  
Katsuyasu Saigo, MD,† Nobuo Yamaguchi, MD,† Hozuka Akita, MD,‡  
Mitsuhiro Yokoyama, MD,‡ Yoshiteru Konaka, MD,§  
and Mortimer Poncz, MD||

**A 61-year-old man with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia developed megakaryoblastic leukemia. In the blast phase, his blast cells showed undifferentiated megakaryoblastic characteristics with no  $\alpha$ -granules or demarcation membranes but with detectable platelet peroxidase (PPO) activity and surface glycoprotein (GP) IIb/IIIa. The patient has remained reasonably well for at least 12 months after blastic crisis, and 6-mercaptopurine alone has been effective in controlling leukocytosis and megakaryoblast proliferation. The expression of mRNA for platelet-specific proteins, such as GPIIb and platelet factor 4 (PF4), was studied in the patient's blast cells by the Northern blot analysis. Both GPIIb and PF4 mRNA were detected in the blast cells. Cytoplasmic maturation occurs later than the synthesis of the surface GP during megakaryocyte maturation. Therefore, PF4 mRNA expression should be a marker of mature megakaryoblasts. The PF4 mRNA expression in megakaryoblastic leukemia may indicate that a patient will have long survival and a good response to chemotherapy.**

***Cancer 67:960-964, 1991.***

フィラデルフィア染色体陽性慢性骨髄性白血病の61歳男性が、巨核芽球性白血病を発症した。急性転化期には、芽球細胞は $\alpha$ 顆粒や分画膜を欠く未分化巨核芽球性の特徴を示していたが、血小板ペルオキシダーゼ(PPO)活性および表面糖タンパク質(GP)IIb/IIIaが検出された。患者は急性転化後少なくとも12ヶ月間、比較的良好な状態を維持しており、6-メルカプトプリン単独投与により白血球増多および巨核芽球の増殖が抑制されている。患者の芽球細胞におけるGPIIbや血小板因子4(PF4)などの血小板特異的タンパク質のmRNA発現を、ノーザンブロット分析により調べた。芽球細胞ではGPIIbとPF4の両mRNAが検出された。巨核球の成熟過程において、細胞質成熟は表面GPの合成よりも遅れて起こる。したがって、PF4 mRNA発現は成熟巨核芽球のマーカーとなるはずである。巨核芽球性白血病におけるPF4 mRNA発現は、患者の長期生存と化学療法に対する良好な反応を示唆する可能性がある。

INTHEM 00121

## Ultrastructural analysis of platelet-like particles from a human megakaryocytic leukemia cell line (CMK11-5)

Takahiro Nagano<sup>a</sup>, Shigetoshi Ohga<sup>a</sup>, Yuji Kishimoto<sup>a</sup>, Takashi Kimura<sup>a</sup>, Kojiro Yasunaga<sup>a</sup>, Masashi Adachi<sup>b</sup>, Ryukichi Ryo<sup>c</sup> and Takeyuki Sato<sup>d</sup>

<sup>a</sup>First Department of Internal Medicine, Kansai Medical University, Osaka, Japan, <sup>b</sup>Department of Laboratory Medicine, Kobe University School of Medicine, Kobe, Japan, <sup>c</sup>Blood Transfusion Service, Kobe University Hospital, Kobe, Japan, and <sup>d</sup>Department of Pediatrics, School of Medicine, Chiba University, Chiba, Japan

(Received 27 August 1991, accepted 17 December 1991)

Ultrastructural observations were performed to further characterize the human megakaryocytic leukemia cell line, CMK, and its subclone, CMK11-5. We found that particles derived from CMK11-5 cells had cytoplasmic projections and no nucleus, and that some particles contained alpha granules. Incubation with ADP induced fibrinogen receptors on the surface of these particles. Furthermore, the particles had glycoprotein Ib antigen on their surfaces, and attached nonreversibly to rabbit aortic subendothelium, showing associated morphological changes similar to those observed in normal platelets. CMK and CMK11-5 are the first megakaryocytic cell lines that have been found to release particles that have some of the same functions as normal platelets. In particular, CMK11-5 seems to be a useful model for studying megakaryocyte function.

ヒト巨核球性白血病細胞株 CMK とそのサブクローン CMK 11-5 の超微細構造観察を行い、その特徴をさらに解明しました。CMK 11-5 細胞由来の粒子は細胞質突起を有し、核を持たず、一部の粒子には  $\alpha$  顆粒が含まれていることが分かりました。ADP とのインキュベーションにより、これらの粒子表面にフィブリノーゲン受容体が誘導されました。さらに、これらの粒子は表面に糖タンパク質 1b 抗原を有し、ウサギ大動脈内皮下層に不可逆的に付着し、正常血小板に見られるものと同様の形態変化を示しました。CMK と CMK 11-5 は、正常血小板と同様の機能を有する粒子を放出することが発見された初めての巨核球細胞株です。特に、CMK 11-5 は巨核球機能の研究に有用なモデルとなると考えられます。



## Induction of *smg p21/rap1A p21/krev-1 p21* gene expression during phorbol ester-induced differentiation of a human megakaryocytic leukemia cell line

Masashi Adachi<sup>1</sup>, Ryukichi Ryo<sup>2</sup>, Akinori Yoshida<sup>1</sup>, Wataru Sugano<sup>1</sup>, Mutsumi Yasunaga<sup>1</sup>, Katsuyasu Saigo<sup>1</sup>, Nobuo Yamaguchi<sup>1</sup>, Takeyuki Sato<sup>3</sup>, Kimihiko Sano<sup>4</sup>, Kozo Kaibuchi<sup>5</sup> & Yoshimi Takai<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of Laboratory Medicine, Kobe University School of Medicine, Kobe 650, Japan; <sup>2</sup>Blood Transfusion Service, Kobe University Hospital, Kobe 650, Japan; <sup>3</sup>Department of Pediatrics, Chiba University School of Medicine, Chiba 280, Japan; <sup>4</sup>Department of Pediatrics and <sup>5</sup>Department of Biochemistry, Kobe University School of Medicine, Kobe 650, Japan

*smg p21A* and *-B* (*smg p21s*) are *ras p21*-like small GTP-binding proteins (G proteins) with the same putative effector domain as *ras p21s*. Both *smg p21A* mRNA and *smg p21B* mRNA were detected in CMK, a human megakaryocytic leukemia cell line, and their levels were markedly elevated by treatment with 12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA), which caused the differentiation of this cell line into more mature megakaryocytes. The *smg p21* protein molecules also increased during the TPA-induced differentiation of CMK cells. The mRNA level of glycoprotein IIb (GPIIb), a typical marker of the megakaryocytes, was increased by this treatment, but the time course of the increase in the *smg p21* mRNA levels was more rapid than that of the increase in the GPIIb mRNA level. Ha-*ras p21* mRNA was undetectable, but both Ki- and N-*ras p21* mRNAs were detected in CMK cells and their levels were also increased during TPA-induced differentiation of CMK cells, although to a lesser extent than those of *smg p21* mRNAs. Protein kinase C inhibitors inhibited the basal and TPA-induced *smg p21A* mRNA level, but cyclic AMP-elevating prostaglandin *E*<sub>1</sub> or Ca<sup>2+</sup>-mobilizing ionomycin did not inhibit them. Cycloheximide enhanced the basal and TPA-induced *smg p21A* mRNA levels. Actinomycin D blocked the TPA-induced *smg p21A* mRNA levels, but showed no detectable effect on the elevated *smg p21A* mRNA level which was induced by pretreatment with TPA. A dramatic increase in the *smg p21* mRNA levels was also observed in other leukemia cell lines during TPA-induced differentiation. These results suggest that TPA stimulated expression of the *smg p21A* gene, presumably through the action of protein kinase C at the transcriptional level rather than at the post-transcriptional level, in hematopoietic leukemia cells.

*smg p21A* および *smg p21B* (*smg p21s*) は、*ras p21* に類似した低分子 GTP 結合タンパク質 (G タンパク質) であり、*ras p21s* と同じ推定エフェクタードメインを有する。*smg p21A* mRNA および *smg p21B* mRNA はともにヒト巨核球性白血病細胞株 CMK において検出され、12-*O*-テトラデカノイル-ホルボル-13-アセテート (TPA) 処理によってそのレベルが著しく上昇した。この処理は、この細胞株をより成熟した巨核球へと分化させた。*smg p21* タンパク質分子も、TPA 誘導による CMK 細胞の分化に伴い増加した。この処理により、巨大核球の代表的なマーカーである糖タンパク質 IIb (GPIIb) の mRNA レベルが増加したが、*smg p21* mRNA レベルの増加の経過は GPIIb mRNA レベルの増加よりも速かった。Ha-*ras p21* mRNA は検出されなかったが、Ki-および N-*ras p21* mRNA は CMK 細胞で検出され、そのレベルも TPA 誘導による CMK 細胞の分化中に増加したが、*smg p21* mRNA ほどではなかった。タンパク質キナーゼ C 阻害剤は、基礎および TPA 誘導による *smg p21A* mRNA レベルを阻害したが、環状 AMP を上昇させるプロスタグランジン E<sub>1</sub> や Ca<sup>2+</sup> を動員するイオノマイシンはそれらを阻害しなかった。シクロヘキシミドは、基礎および TPA 誘導による *smg p21A* mRNA レベルを増強した。アクチノマイシン D は TPA 誘導性の *smg p21A* mRNA レベルの上昇を阻害したが、TPA 前処理によって誘導された *smg p21A* mRNA レベルの上昇には検出可能な効果を示さなかった。*smg p21* mRNA レベルの劇的な上昇は、TPA 誘導分化過程における他の白血病細胞株でも観察された。これらの結果は、TPA が造血性白血病細胞において、おそらく転写後レベルではなく転写レベルでのプロテインキナーゼ C の作用を介して、*smg p21A* 遺伝子の発現を刺激したことを示唆している。

## Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen gene of *lpr* mice

MASASHI ADACHI, RIE WATANABE-FUKUNAGA, AND SHIGEKAZU NAGATA\*

Osaka Bioscience Institute, 6-2-4 Furuedai, Suita-shi, Osaka 565, Japan

Communicated by Osamu Hayaishi, November 2, 1992

**ABSTRACT** The mouse *lpr* (lymphoproliferation) mutation carries a rearrangement in the chromosomal gene for the Fas antigen, which mediates apoptosis. Isolation and characterization of mouse Fas antigen chromosomal gene from wild-type and *lpr* mice indicated an insertion of an early transposable element (ETn) in intron 2 of the Fas antigen gene of *lpr* mice. Hybrid transcripts carrying the Fas antigen and ETn sequences were expressed in the thymus and liver of the mutant. This indicated that premature termination and aberrant splicing of the Fas antigen transcript caused by the insertion of the ETn in the intron are responsible for the lymphoproliferation and autoimmune phenotype of the mutant mouse. On the other hand, an insertion of the ETn into an intron of a mammalian expression vector dramatically but not completely reduced the expression efficiency. These findings suggest that *lpr* mice are able to express a very low level of the Fas antigen.

T-cell development occurs in the thymus where T cells reacting with autoantigen as T cells expressing nonfunctional

マウスの *lpr* (リンパ増殖) 変異は、アポトーシスを誘導する Fas 抗原の染色体遺伝子の再配列を伴う。野生型および *lpr* マウスからマウス Fas 抗原染色体遺伝子を単離し、その特徴を解析した結果、*lpr* マウスの Fas 抗原遺伝子のイントロン 2 に早期転座因子 (ETn) が挿入されていることが示された。Fas 抗原と ETn 配列を含むハイブリッド転写産物は、変異マウスの胸腺および肝臓で発現された。これは、イントロンへの ETn 挿入によって引き起こされる Fas 抗原転写産物の未熟終結および異常なスプライシングが、変異マウスのリンパ増殖および自己免疫表現型の原因であることを示す。一方、哺乳類発現ベクターのイントロンへの ETn の挿入は、発現効率を劇的に低下させたが、完全には低下しなかった。これらの知見は、*lpr* マウスが非常に低レベルの Fas 抗原を発現できることを示唆している。



## Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice

Jun Ogasawara<sup>\*†</sup>, Rie Watanabe-Fukunaga<sup>\*</sup>,  
Masashi Adachi<sup>\*</sup>, Akio Matsuzawa<sup>‡</sup>,  
Tsutomu Kasugai<sup>§</sup>, Yukihiro Kitamura<sup>§</sup>,  
Naoto Itoh<sup>\*</sup>, Takashi Suda<sup>\*</sup>  
& Shigekazu Nagata<sup>\*||</sup>

<sup>\*</sup> Osaka Bioscience Institute, 6-2-4 Furuedai, Suita,  
Osaka 565, Japan

<sup>†</sup> Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences,  
8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543, Japan

<sup>‡</sup> Laboratory Animal Research Center, Institute of Medical Science,  
University of Tokyo, Tokyo 108, Japan

<sup>§</sup> Department of Pathology, Osaka University Medical School,  
Yamada-oka, Suita, Osaka 565, Japan

|| To whom correspondence should be addressed.

DURING mammalian development, many cells are programmed to die<sup>1,2</sup> most mediated by apoptosis<sup>3</sup>. The Fas antigen<sup>4</sup> coded by the structural gene for mouse lymphoproliferation mutation (*lpr*)<sup>5,6</sup>, is a cell surface protein belonging to the tumour necrosis factor/nerve growth factor receptor family<sup>7,8</sup>, and mediates apoptosis<sup>7</sup>. The Fas antigen messenger RNA is expressed in the thymus, liver, heart, lung and ovary<sup>8</sup>. We prepared a monoclonal antibody against mouse Fas antigen, which immunoprecipitated the antigen (*M<sub>r</sub>* 45K) and had cytolytic activity against cell lines expressing mouse Fas antigen. We report here that staining of mouse thymocytes with the antibody indicated that thymocytes from the wild-type and *lpr*<sup>cr</sup> mice expressed the Fas antigen, whereas little expression of the Fas antigen was found in *lpr* mice. Intraperitoneal administration of the anti-Fas antibody into mice rapidly killed the wild-type mice but neither *lpr* nor *lpr*<sup>cr</sup> mice. Biochemical, histological

and electron microscope analyses indicated severe damage of the liver by apoptosis. These findings suggest that the Fas antigen is important in programmed cell death in the liver, and may be involved in fulminant hepatitis in some cases.

哺乳類の発生過程において、多くの細胞が死滅するようにプログラムされており、そのほとんどがアポトーシスによって媒介されています<sup>3</sup>。マウスリンパ増殖変異体 (*lpr*) 5'6 の構造遺伝子によってコードされる Fas 抗原<sup>4</sup> は、腫瘍壊死因子/神経成長因子受容体ファミリー<sup>7,8</sup> に属する細胞表面タンパク質であり、アポトーシスを媒介します<sup>7</sup>。Fas 抗原メッセンジャーRNA は、胸腺、肝臓、心臓、肺、卵巣で発現しています<sup>8</sup>。我々は、マウス Fas 抗原に対するモノクローナル抗体を作製しました。この抗体は抗原 (*M<sub>r</sub>* 45K) を免疫沈降させ、マウス Fas 抗原を発現する細胞株に対して細胞溶解活性を示しました。本研究では、抗体を用いたマウス胸腺細胞の染色により、野生型および/*pr*"マウスの胸腺細胞は Fas 抗原を発現しているのに対し、/*pr*"マウスでは Fas 抗原の発現がほとんど見られないことが示されたことを報告する。マウスに抗 Fas 抗体を腹腔内投与すると、野生型マウスは急速に死滅したが、/*pr*"マウスや"*lpr*9"マウスは死滅しなかった。生化学、組織学、電子顕微鏡による分析では、アポトーシスによる肝臓の重篤な障害が示された。これらの知見は、Fas 抗原が肝臓のプログラム細胞死に重要であり、場合によっては劇症肝炎に関与している可能性があることを示唆している。

# Targeted mutation in the *Fas* gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver

Masashi Adachi<sup>1</sup>, Sachiko Suematsu<sup>2</sup>, Toru Kondo<sup>1</sup>, Jun Ogasawara<sup>1</sup>, Takashi Tanaka<sup>2</sup>, Nobuaki Yoshida<sup>2</sup> & Shigekazu Nagata<sup>1</sup>

*Fas*, a type I membrane protein that transduces an apoptotic signal, is expressed in lymphocytes as well as in various tissues such as the liver, lung and heart. The mouse lymphoproliferation (*lpr*) mutation is a leaky mutation in *Fas*. By means of gene targeting, we generated a mouse strain which is completely deficient in *Fas*. In addition to the massive production of lymphocytes, the *Fas*-null mice showed substantial liver hyperplasia, which was accompanied by the enlargement of nuclei in hepatocytes. The *Fas* system seems to play a role in the apoptotic process to maintain homeostasis of the liver as well as the peripheral lymphoid organs.

*Fas* は、アポトーシス信号を伝達する I 型膜タンパク質であり、リンパ球や肝臓、肺、心臓などの様々な組織に発現している。マウスのリンパ増殖 (*lpr*) 変異は *Fas* の漏れ変異である。遺伝子ターゲティングにより、*Fas* が完全に欠損したマウス株を作製した。リンパ球の大量産生に加えて、*Fas* 欠損マウスは肝臓の過形成を示し、これは肝細胞の核の拡大を伴っていた。*Fas* システムは、末梢リンパ器官だけでなく肝臓の恒常性を維持するためのアポトーシス過程に関与しているようである。



Proc. Natl. Acad. Sci. USA  
Vol. 93, pp. 2131-2136, March 1996  
Biochemistry

## Enhanced and accelerated lymphoproliferation in Fas-null mice

MASASHI ADACHI\*, SACHIKO SUEMATSU†, TAKASHI SUDA\*, DAISUKE WATANABE\*, HIDEHIRO FUKUYAMA\*, JUN OGASAWARA\*, TAKASHI TANAKA†, NOBUAKI YOSHIDA†, AND SHIGEKAZU NAGATA\*

\*Osaka Bioscience Institute, 6-2-4 Furuedai, Suita, Osaka 565, Japan; and †Research Institute, Osaka Medical Center for Maternal and Child Health, Izumi, Osaka 590-02, Japan

Communicated by Charles Weissmann, Universität Zürich, Zurich, Switzerland, November 22, 1995 (received for review June 26, 1995)

**ABSTRACT** Fas is a 45-kDa membrane protein that transduces an apoptotic signal. The mouse lymphoproliferation (*lpr*) mutation is a leaky mutation of Fas. In this study, we examined lymphocyte development in Fas-null mice generated by gene targeting. The Fas<sup>-/-</sup> mice progressively accumulated abnormal T cells (Thy1<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>, and CD8<sup>-</sup>) and developed lymphadenopathy and splenomegaly, which were much more accelerated and pronounced than those in *lpr* mice. In addition, the Fas-null mice showed lymphocytosis, accompanied by lymphocytic infiltration in the lungs and liver. The number of apparently normal B cells also increased, and large amounts of immunoglobulins, including anti-DNA antibodies, were produced. Thymic clonal deletion, assessed by deletion of T cells reactive to mouse endogenous superantigens, was apparently normal in the Fas<sup>-/-</sup> mice, whereas the peripheral clonal deletion of mature T cells against a bacterial superantigen was impaired. These results suggested that Fas plays a decisive role in peripheral clonal deletion but not in negative selection in the thymus.

Fas はアポトーシスシグナルを伝達する 45kDa の膜タンパク質です。マウスリンパ増殖 (*/pr*) 変異は Fas の漏出性変異です。本研究では、遺伝子ターゲティングによって作製した Fas-null マウスにおけるリンパ球発達について検討しました。Fas<sup>-/-</sup> マウスは、異常 T 細胞 (Thy1<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>, *ens*<sup>-</sup>) の蓄積が進行し、*/pr* マウスと比較してリンパ節腫脹および脾腫が著しく進行しました。さらに、Fas-null マウスはリンパ球増多症を示し、肺および肝臓へのリンパ球浸潤が見られました。また、一見正常な B 細胞数も増加し、抗 DNA 抗体を含む免疫グロブリンが大量に産生されました。マウス内因性スーパー抗原に反応する T 細胞の欠失によって評価した胸腺クローン欠失は、Fas<sup>-/-</sup> マウスでは明らかに正常であったが、細菌性スーパー抗原に対する成熟 T 細胞の末梢クローン欠失は阻害されていた。これらの結果は、Fas が末梢クローン欠失には決定的な役割を果たしているが、胸腺における負の選択には役割を果たしていないことを示唆している。

# Essential roles of the Fas ligand in the development of hepatitis

TORU KONDO<sup>1</sup>, TAKASHI SUDA<sup>1</sup>, HIDEHIRO FUKUYAMA<sup>1,2</sup>,  
MASASHI ADACHI<sup>1</sup> & SHIGEKAZU NAGATA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Osaka Bioscience Institute, 6-2-4 Furuedai, Suita, Osaka 565, Japan

<sup>2</sup>Department of Genetics, Osaka University Medical School, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan

M.A. present address: Department of Tumor Cell Biology, St. Jude Children's Research Hospital,  
Memphis, Tennessee 38101, USA

Correspondence should be addressed to S.N.

The Fas ligand (FasL) is expressed in activated T cells and induces apoptosis in Fas-bearing cells. A cytotoxic T lymphocyte (CTL) clone specific for hepatitis B surface antigen (HBsAg) causes an acute liver disease in HBsAg transgenic mice. Here we observed that the CTL clone killed hepatocytes expressing HBsAg in a Fas-dependent manner. Administration of the soluble form of Fas into HBsAg transgenic mice prevented the CTL-induced liver disease. In the second model, mice were primed with *Propionibacterium acnes*. A subsequent challenge with lipopolysaccharide (LPS) killed the mice by inducing liver injury. Neutralization of FasL rescued the mice from LPS-induced mortality, and Fas-null mice were resistant to LPS-induced mortality. These results suggest that FasL has an essential role in the development of hepatitis.

Fas リガンド (FasL) は活性化 T 細胞で発現し、Fas 保有細胞のアポトーシスを誘導する。B 型肝炎表面抗原 (HBsAg) に特異的な細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) クローンは、HBsAg トランスジェニックマウスで急性肝疾患を引き起こす。本研究では、CTL クローンが Fas 依存的に HBsAg を発現している肝細胞を死滅させることを観察した。HBsAg トランスジェニックマウスに可溶性 Fas を投与すると、CTL 誘導性肝疾患を予防できた。2 つ目のモデルでは、マウスをプロピオニバクテリウム・アクネスで感作した。続いてリポ多糖類 (LPS) を投与すると、肝障害が誘導され、マウスは死亡した。FasL を中和すると、マウスは LPS 誘導性死亡から回復し、Fas-null マウスは LPS 誘導性死亡に抵抗性を示した。これらの結果は、FasL が肝炎の発症に重要な役割を果たすことを示唆している。



## Features of Macrophage Differentiation Induced by p19<sup>INK4d</sup>, a Specific Inhibitor of Cyclin D-Dependent Kinases

By Masashi Adachi, Martine F. Roussel, Karin Havenith, and Charles J. Sherr

The mitogen-dependent induction of cyclin D-dependent kinase activity is required for cells to enter the DNA synthetic (S) phase of their division cycle. Immature 32Dcl3 myeloid cells (32D) proliferating in the presence of interleukin-3 (IL-3) normally express cyclins D2 and D3, which assemble into binary holoenzyme complexes with their catalytic subunits, CDK4 and CDK6. When 32D cells are switched to medium containing granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) instead of IL-3, D-type cyclins are degraded and, in the absence of their associated kinase activity, the cells arrest in the first gap phase (G<sub>1</sub>) of the cell cycle and differentiate to neutrophils. We derived 32D cells in which the expression of p19<sup>INK4d</sup>, a specific polypeptide inhibitor of CDK4 and CDK6, is regulated by the heavy metal-inducible sheep metallothionein promoter. Induction of p19<sup>INK4d</sup> in response to zinc prolonged cell survival in the absence of growth factor treatment. When maintained in medium containing both IL-3 and

zinc, these cells lost cyclin D-dependent kinase activity, underwent G<sub>1</sub> phase arrest, and acquired certain morphologic, antigenic, and functional properties of mononuclear phagocytes. Cells induced to express p19<sup>INK4d</sup> did not synthesize receptors for macrophage colony-stimulating factor (M-CSF/CSF-1) and reverted to an immature myeloid phenotype when shifted back into medium containing IL-3 alone. These cells exhibited accelerated differentiation to neutrophils in response to G-CSF but also gave rise to macrophage-like cells when maintained in medium containing both G-CSF and zinc. Therefore, the acquisition of macrophage properties in response to zinc treatment neither depended upon IL-3 nor upon G<sub>1</sub> phase arrest per se and instead reflects some ability of p19<sup>INK4d</sup>, and presumably cyclin D-dependent kinases, to affect myeloid differentiation.

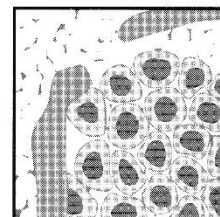
© 1997 by The American Society of Hematology.

細胞が分裂周期の DNA 合成期 (S 期) に入るには、マイトジェン依存性のサイクリン D 依存性キナーゼ活性誘導が必要である。インターロイキン-3 (IL-3) 存在下で増殖する未熟な 32Dcl3 骨髄細胞 (32D) は通常、サイクリン D2 および D3 を発現し、これらは触媒サブユニットである CDK4 および CDK6 と二元ホロ酵素複合体を形成する。32D 細胞を IL-3 の代わりに顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) を含む培地に切り替えると、D 型サイクリンは分解され、関連するキナーゼ活性が欠如しているため、細胞周期の最初のギャップ期 (G<sub>1</sub> 期) で停止し、好中球へ分化する。CDK4 および CDK6 の特異的ポリペプチド阻害剤である p19<sup>INK4d</sup> の発現が、重金属誘導性ヒツジメタロチオネインプロモーターによって制御される 32D 細胞を作製した。亜鉛に反応した p19<sup>INK4d</sup> の誘導は、成長因子処理なしでも細胞生存期間を延長させた。IL-3 と亜鉛の両方を含む培地で培養すると、これらの細胞はサイクリン D 依存性キナーゼ活性を失い、G 期停止を起こし、単核食細胞の形態学的、抗原性および機能的特性を獲得した。p19<sup>INK4d</sup> の発現が誘導された細胞は、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF / CSF-1) の受容体を合成せず、IL-3 のみを含む培地に戻すと未熟な骨髄細胞表現型に戻った。これらの細胞は G-CSF に反応して好中球への分化が促進されたが、G-CSF と亜鉛の両方を含む培地で維持するとマクロファージ様細胞にも分化した。したがって、亜鉛処理に反応してマクロファージ様特性を獲得する過程は、IL-3 や G<sub>1</sub> 期停止そのものに依存するのではなく、むしろ p19<sup>INK4d</sup>、そしておそらくサイクリン D 依存性キナーゼが骨髄細胞分化に影響を与える能力を反映していると考えられる。

Experimental Hematology 25:1077-1083 (1997)  
© 1997 International Society for Experimental Hematology

Experimental  
Hematology

# Induction of apoptosis in megakaryocytic leukemia cell lines by MX2, a morpholino anthracycline



Tatsuya Katsurada, Masashi Adachi, Hirofumi Kido, Munehiro Date, Yuji Kishimoto, Yoshitaka Yamanaka, Takashi Kimura, Shirou Fukuhara

First Department of Internal Medicine, Kansai Medical University, Osaka 570, Japan

Offprint requests to: Tatsuya Katsurada, First Department of Internal Medicine, Kansai Medical University, 10-15 Fumizono-cho, Moriguchi, Osaka 570, Japan

(Received 1 April 1996; revised 5 November 1996; accepted 10 December 1996)

## Abstract

Leukemia with megakaryocytic involvement has a poor prognosis. MX2 is a new morpholino anthracycline that is effective against various leukemic cell lines. This study examined the antitumor activity of MX2 against human megakaryocytic cell lines, including CMK, CMK11-5, MEG-01, and UT-7, and investigated the role of apoptosis in the cytotoxicity of this drug. To quantify the extent of apoptosis induced by MX2, we used the in situ terminal deoxynucleotide transferase assay and the histone-associated DNA fragmentation assay. The cytotoxic effect of MX2 on CMK cells was reduced by various inhibitors of apoptosis. To our knowledge, this is the first report showing that apoptosis is involved in the killing of megakaryocytic cell lines by an antileukemic agent. We suggest that MX2 may be useful for the treatment of megakaryocytic leukemia.

巨核球系白血病は予後不良です。MX2 は、様々な白血病細胞株に有効な新規モルフォリノアントラサイクリンです。本研究では、CMK、CMK11-5、MEG-01、UT-7 を含むヒト巨核球細胞株に対する MX2 の抗腫瘍活性を検討し、この薬剤の細胞毒性におけるアポトーシスの役割について検討しました。MX2 によって誘導されるアポトーシスの程度を定量化するために、in situ 末端デオキシヌクレオチド転移酵素アッセイとヒストン関連 DNA 断片化アッセイを使用しました。CMK 細胞に対する MX2 の細胞毒性効果は、様々なアポトーシス阻害剤によって減少しました。我々の知る限り、これは抗白血病剤による巨核球細胞株の殺傷にアポトーシスが関与していることを示す初の報告です。MX2 は巨核球性白血病の治療に有効である可能性があるとし唆しています。

# Downregulation of Fas ligand by shedding

MASATO TANAKA<sup>1,2</sup>, TOSHIMITSU ITAI<sup>1</sup>, MASASHI ADACHI<sup>1</sup> & SHIGEKAZU NAGATA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics, Osaka University Medical School, 2-2 Yamada-oka, Suita, Osaka 565, Japan

<sup>2</sup>Osaka Bioscience Institute, 6-2-4 Furuedai, Suita, Osaka 565, Japan

Correspondence should be addressed to S.N.

Apoptosis-inducing Fas ligand (FasL) is a type II membrane protein, predominantly expressed in the activated T cells. FasL is cleaved by a putative metalloproteinase to produce a soluble form. Here, we blocked the shedding of human FasL by deleting its cleavage site. Although human Jurkat cells and mouse primary hepatocytes that express a low level of Fas were resistant to the soluble form of FasL, they were efficiently killed by membrane-bound FasL. Furthermore, soluble FasL inhibited cytotoxicity of the membrane-bound FasL. These results indicate that the membrane-bound form of FasL is the functional form and suggest that shedding of FasL is to prevent the killing of the healthy bystander cells by cytotoxic T cells.

アポトーシス誘導 Fas リガンド (FasL) は、活性化 T 細胞で主に発現する II 型膜タンパク質です。FasL は推定メタロプロテアーゼによって切断され、可溶性型となります。本研究では、切断部位を欠損させることでヒト FasL の分離を阻害しました。Fas 発現レベルが低いヒト Jurkat 細胞およびマウス初代培養肝細胞は可溶性型の FasL に対して抵抗性を示しましたが、膜結合型 FasL によって効率的に死滅しました。さらに、可溶性 FasL は膜結合型 FasL の細胞毒性を阻害しました。これらの結果は、膜結合型の FasL が機能的な型であることを示しており、FasL の分離は細胞傷害性 T 細胞による健康



# Transgenic Expression of Fas in T Cells Blocks Lymphoproliferation But Not Autoimmune Disease in MRL-*lpr* Mice<sup>1</sup>

Hidehiro Fukuyama,<sup>\*†</sup> Masashi Adachi,<sup>\*‡</sup> Sachiko Suematsu,<sup>2‡</sup> Keiko Miwa,<sup>\*</sup> Takashi Suda,<sup>\*</sup> Nobuaki Yoshida,<sup>‡</sup> and Shigekazu Nagata<sup>3\*†</sup>

Fas is a member of the TNF receptor family. Binding of Fas ligand to Fas induces apoptosis in Fas-bearing cells. Fas is expressed in various cells, including thymocytes, peripheral T cells, and activated B cells. The mouse *lpr* mutation is a loss of function mutation of Fas. MRL-*lpr/lpr* mice develop lymphadenopathy and splenomegaly, and produce multiple autoantibodies, which results in autoimmune disease. In this report, we describe the establishment of a line of Fas transgenic MRL-*lpr* mice in which mouse Fas cDNA was expressed using the T cell-specific murine *lck* promoter. The transgenic mice expressed functional Fas in thymocytes and peripheral T cells, but not in B cells. The transgenic mice did not accumulate abnormal T cells (Thy-1<sup>+</sup> B220<sup>+</sup>), but still accumulated B cells (Thy-1<sup>-</sup> B220<sup>+</sup>); they produced a large quantity of Igs (IgG1 and IgG2a), including anti-DNA Abs, and developed glomerulonephritis. These results suggest that autoreactive or activated B cells must be killed through Fas expressed in the B cells by the Fas ligand expressed in activated T cells. *The Journal of Immunology*, 1998, 160: 3805-3811.

Fas は TNF 受容体ファミリーのメンバーです。Fas リガンドが Fas に結合すると、Fas 保有細胞のアポトーシスが誘導されます。Fas は、胸腺細胞、末梢 T 細胞、活性化 B 細胞など、さまざまな細胞で発現しています。マウスの *lpr* 変異は、Fas の機能喪失変異です。MRL-*lpr/lpr* マウスはリンパ節腫脹と脾腫を発症し、自己抗体を多数産生して自己免疫疾患を引き起こします。本報告では、T 細胞特異的マウス *lck* プロモーターを使用してマウス Fas cDNA を発現した Fas トランスジェニック MRL-*lpr* マウスの系統の樹立について説明します。このトランスジェニック マウスは胸腺細胞と末梢 T 細胞で機能的 Fas を発現しましたが、B 細胞では発現していませんでした。このトランスジェニック マウスは異常な T 細胞 (Thy-1 + B220+) を蓄積しませんが、B 細胞 (Thy-1- B220+) は蓄積しました。大量の IgG (IgG1 および IgG2a) (抗 DNA 抗体を含む) を産生し、糸球体腎炎を発症した。これらの結果は、自己反応性または活性化 B 細胞は、活性化 T 細胞に発現する Fas リガンドによって、B 細胞に発現する Fas を介して殺傷される必要があることを示唆している。



## Structure and promoter analysis of murine *CAD* and *ICAD* genes

Kohki Kawane<sup>1,2</sup>, Hidehiro Fukuyama<sup>1,2</sup>, Masashi Adachi<sup>1,2</sup>,  
 Hideki Sakahira<sup>1,2</sup>, Neal G. Copeland<sup>3</sup>, Debra J. Gilbert<sup>3</sup>,  
 Nancy A. Jenkin<sup>3</sup> and Shigekazu Nagata<sup>\*,1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Genetics, Osaka University Medical School, Osaka, Japan

<sup>2</sup> Core Research for Evolutional Science and Technology, Japan Science and Technology Corporation, 2-2 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

<sup>3</sup> Mammalian Genetics Laboratory, ABL-Basic Research Program, National Cancer Institute-Frederick Cancer Research and Development Center, Frederick, Maryland 21702, USA

\* corresponding author: Shigekazu Nagata, Ph.D., Department of Genetics, Osaka University Medical School B-3, 2-2 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan.

tel: 81-6-6879-3310; fax: 81-6-6879-3319;

e-mail: nagata@genetic.med.osaka-u.ac.jp

Received: 20.4.99; revised: 16.5.99; accepted: 2.6.99

Edited by Y. Kuchino

### Abstract

Caspase-activated DNase (*CAD*) degrades chromosomal DNA during apoptosis, whereas *ICAD* (inhibitor of *CAD*) inhibits the *CAD*'s DNase by binding to it. Here, we describe the assignment of murine *CAD* and *ICAD* genes to the distal part of murine chromosome 4. Molecular cloning and structural analysis indicated that *CAD* and *ICAD* genes are comprised of 7 and 6 exons, respectively. Two different *ICAD* mRNAs coding for two forms of *ICAD* proteins (*ICAD-S* and *ICAD-L*) were found to be produced by alternative splicing of intron 5. The *CAD* and *ICAD* mRNAs were detected ubiquitously in various murine tissues. Analyses of the promoter activity with a series of deletion mutants of their 5' flanking regions indicated that a 190-bp 5' flanking region of the *CAD* gene was sufficient to promote the transcription. Whereas, a 120-bp flanking region of *ICAD* gene was required to promote its transcription. These regions do not show similarity between *CAD* and *ICAD* genes, suggesting that expression of *CAD* and *ICAD* genes is regulated by different mechanisms.

カスパーゼ活性化デオキシリボヌクレアーゼ (*CAD*) はアポトーシスの際に染色体 DNA を分解するが、*ICAD* (*CAD* 阻害剤) は *CAD* のデオキシリボヌクレアーゼに結合してそれを阻害する。ここでは、マウス *CAD* 遺伝子と */CAD* 遺伝子がマウス第 4 染色体の遠位部に割り当てられたことを述べる。分子クローニングと構造解析から、*CAD* 遺伝子と */CAD* 遺伝子はそれぞれ 7 つのエクソンと 6 つのエクソンから構成されることが示された。2 種類の *ICAD* タンパク質 (*ICAD-S* と *ICAD-L*) をコードする 2 つの異なる */CAD* mRNA が、イントロン 5 の選択的スプライシングによって生成されることがわかった。*CAD* および */CAD* mRNA は、さまざまなマウス組織で普遍的に検出された。5' 隣接領域の一連の欠失変異体を用いたプロモーター活性の解析から、*CAD* 遺伝子の 190 bp の 5' 隣接領域が転写を促進するのに十分であることが示された。一方、*/CAD* 遺伝子の転写を促進するには、その 120bp の隣接領域が必要であった。これらの領域は *CAD* 遺伝子と */CAD* 遺伝子間で類似性を示さないことから、*CAD* 遺伝子と */CAD* 遺伝子の発現は異なるメカニズムによって制御されていると考えられる。

# Disruption of the *ARF* transcriptional activator *DMP1* facilitates cell immortalization, Ras transformation, and tumorigenesis

Kazushi Inoue,<sup>1</sup> Renren Wen,<sup>2</sup> Jerold E. Reh,<sup>3</sup> Masashi Adachi,<sup>1,5</sup> John L. Cleveland,<sup>2</sup> Martine F. Roussel,<sup>1</sup> and Charles J. Sherr<sup>1,4,6</sup>

Departments of <sup>1</sup>Tumor Cell Biology, <sup>2</sup>Biochemistry, <sup>3</sup>Pathology, and <sup>4</sup>Howard Hughes Medical Institute, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee 38105 USA

The *DMP1* transcription factor induces the *ARF* tumor suppressor gene in mouse fibroblasts, leading to cell cycle arrest in a p53-dependent manner. We disrupted sequences encoding the DNA-binding domain of *DMP1* in mouse embryonic stem cells and derived animals lacking the functional protein. *DMP1*-null animals are small at birth, and males develop more slowly than their wild-type littermates. Some adult animals exhibit seizures and/or obstructive uropathy, each of unknown cause. The growth of explanted *DMP1*-null mouse embryo fibroblasts (MEFs) is progressively retarded as cells are passaged in culture on defined transfer protocols; but, unlike the behavior of normal cells, p19<sup>ARF</sup>, Mdm2, and p53 levels remain relatively low and *DMP1*-null MEFs do not senesce. Whereas the establishment of cell lines from MEFs is usually always accompanied by either p53 or *ARF* loss of function, continuously passaged *DMP1*-null cells readily give rise to established 3T3 and 3T9 cell lines that retain wild-type *ARF* and functional p53 genes. Early-passage *DMP1*-null cells, like MEFs from either *ARF*-null or p53-null mice, can be morphologically transformed by oncogenic Ha-Ras (Val-12) alone. Splenic lymphocytes harvested from both *DMP1*-null and *ARF*-null mice exhibit enhanced proliferative responses in long-term cultures when stimulated to divide with antibody to CD3 and interleukin-2. Although only 1 of 40 *DMP1*-null animals spontaneously developed a tumor in the first year of life, neonatal treatment with dimethylbenzanthracene or ionizing radiation induced tumors of various histologic types that were not observed in similarly treated *DMP1*<sup>+/+</sup> animals. Karyotypic analyses of MEFs and lymphomas from *DMP1*-null animals revealed pseudodiploid chromosome numbers, consistent with the retention of wild-type p53. Together, these data suggest that *ARF* function is compromised, but not eliminated, in animals lacking functional *DMP1*.

*DMP1* 転写因子はマウス線維芽細胞において *ARF* 腫瘍抑制遺伝子を誘導し、p53 依存的に細胞周期停止を引き起こす。我々は、マウス胚性幹細胞および機能タンパク質を欠損する派生動物において、*DMP1* の DNA 結合ドメインをコードする配列を破壊した。*DMP1* 欠損動物は出生時に小型で、雄は野生型の同腹仔よりも発育が遅い。成体動物の中には、原因不明の発作および/または閉塞性尿路疾患を呈する個体もいる。*DMP1* 欠損マウス胚線維芽細胞 (MEF) を体外培養すると、規定の移植プロトコルに従って継代培養するにつれて増殖が徐々に遅くなるが、正常細胞とは異なり、p19<sup>ARF</sup>、Mdm2、および p53 レベルは比較的低いままであり、*DMP1* 欠損 MEF は老化しない。MEF からの細胞株の樹立は通常、p53 または *ARF* のいずれかの機能喪失を伴うが、*DMP1* ノル細胞を継代培養すると、野生型 *ARF* および機能的な p53 遺伝子を保持する 3T3 および 3T9 細胞株が容易に樹立される。継代培養初期の *DMP1* ノル細胞は、*ARF* ノルマウスまたは p53 ノルマウス由来の MEF と同様に、発癌性 Ha-Ras (Val-12) 単独によって形態学的に変化し得る。*DMP1* ノルマウスおよび *ARF* ノルマウスから採取した脾臓リンパ球は、CD3 抗体およびインターロイキン-2 による分裂刺激を受けた場合、長期培養において増殖反応の増強を示す。*DMP1* 遺伝子を欠損した動物 40 頭中、生後 1 年目に自然発生的に腫瘍を発症したのはわずか 1 頭であったが、ジメチルベンゼントラセンまたは電離放射線による新生児期治療は、同様の治療を受けた *DMP1*<sup>+/+</sup> 動物では観察されなかった様々な組織学的型の腫瘍を誘発した。*DMP1* 遺伝子を欠損した動物由来の MEF およびリンパ腫の核型解析では、野生型 p53 の保持と一致する擬似二倍体染色体数が明らかになった。これらのデータを総合すると、機能的な *DMP1* を欠損した動物では、*ARF* の機能は損なわれるものの、消失するわけではないことが示唆される。



## Requirement of Fas expression in B cells for tolerance induction

Hidehiro Fukuyama<sup>1,2</sup>, Masashi Adachi<sup>1</sup>, Sachiko Suematsu<sup>3</sup>, Keiko Miwa<sup>1,2</sup>, Takashi Suda<sup>4</sup>, Nobuaki Yoshida<sup>5</sup> and Shigekazu Nagata<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Genetics, Osaka University Medical School, Osaka, Japan

<sup>2</sup> Core Research for Evolutional Science and Technology, JST, Osaka, Japan

<sup>3</sup> Department of Molecular Immunology, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Fukuoka, Japan

<sup>4</sup> Center for the Development of Molecular Target Drugs, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa, Japan

<sup>5</sup> Laboratory of Gene Expression and Regulation, Center for Experimental Medicine, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

Fas is a death receptor that belongs to the tumor necrosis factor receptor family and is expressed in various cell types, in particular, in lymphoid cells. A loss-of-function mutation in the Fas gene (*lpr* mutation) causes lymphadenopathy and splenomegaly, and accelerates autoimmune diseases in some strains of mice such as MRL. In this report, Fas cDNA driven by murine *lck* distal promoter was used to establish transgenic MRL-*lpr* mouse lines. The transgenic mice expressed functional Fas in mature T cells and B cells. The lymphadenopathy and splenomegaly caused by accumulation of abnormal T cells in the *lpr* mice were rescued in the transgenic mice. The number of B cells in the periphery as well as the serum IgG level were significantly reduced, and the autoimmune symptoms and mortality were ameliorated. These results indicate that both mature B cells and T cells must undergo Fas-mediated apoptosis to prevent the development of autoimmune diseases.

Fas は腫瘍壊死因子受容体ファミリーに属する細胞死受容体であり、様々な細胞種、特にリンパ系細胞に発現している。Fas 遺伝子の機能喪失変異 (*lpr* 変異) は、MRL などの一部のマウスにおいてリンパ節腫脹および脾腫を引き起こし、自己免疫疾患の進行を加速させる。本研究では、マウス/*ck* 遠位プロモーター駆動型 Fas cDNA を用いて、MRL-*lpr* トランスジェニックマウスを樹立した。このトランスジェニックマウスは、成熟 T 細胞および B 細胞において機能的な Fas を発現した。*lpr* マウスにおいて異常 T 細胞の蓄積によって引き起こされたリンパ節腫脹および脾腫は、このトランスジェニックマウスでは改善された。末梢 B 細胞数および血清 IgG 値は有意に減少し、自己免疫症状および死亡率が改善された。これらの結果は、自己免疫疾患の発症を予防するには、成熟 B 細胞および T 細胞の両方が Fas を介したアポトーシスを受ける必要があることを示している。