

上皮性腫瘍細胞における *c-kit* 及び *kit* ligand の発現

豊田 実 日野田 裕治 今井 浩三

札幌医科大学内科学第1講座 (主任 谷内 昭 教授)

Expression of *c-kit* and *kit* Ligand in Human Epithelial Tumors

Minoru TOYOTA, Yuji HINODA and Kohzoh IMAI

Department of Internal Medicine (Section 1), Sapporo Medical College

(Chief : Prof. A. YACHI)

ABSTRACT *kit* ligand (KL), which was identified as the ligand for the tyrosine kinase receptor encoded by the proto-oncogene *c-kit*, has recently been shown to play an important role in proliferation of primitive hematopoietic progenitor cells. KL is found both on the cell surface and in solution, and alternative splicing has yielded two types of KL mRNAs. RT-PCR and Northern blot analysis were performed on human epithelial tumors to determine whether *c-kit* and KL were expressed there. The results are summarized as follows.

1. KL mRNA was expressed in a wide variety of tissues including the placenta, spleen, liver, lung, kidney, stomach, duodenum and colon. The ratio of the expression level of the two types of KL mRNAs was almost constant in all those tissues.

2. Four hepatocellular carcinoma cell lines and a hepatoblastoma cell line expressed detectable levels of KL, but did not express *c-kit*.

3. Among five colon carcinoma cell lines, Colo320DM and DLD-1 expressed both *c-kit* and KL. The expression of KIT protein was also confirmed by flow cytometry.

4. In Colo320DM, neither amplification nor rearrangement of *c-kit* gene was found.

(Received December 28, 1992 and accepted January 20, 1993)

Key words: *c-kit*, *kit* ligand, Human epithelial tumors

1 緒 言

受容体型チロシンキナーゼをコードする *c-kit* 遺伝子は、ネコ肉腫ウイルスである Hardy-Zuckerman 4-feline sarcoma virus (HZ4-FeSV) に由来する癌遺伝子 *v-kit*¹⁾ の cellular homologue として同定された²⁾。 *c-kit* は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞外領域、膜貫通領域及び 77 アミノ酸により二

分されたチロシンキナーゼ領域よりなる特徴的構造を有し、PDGF レセプター、M-CSF レセプターと高い相同性を示す。

一方、*c-kit* のリガンドは1990年クローニングされ、*kit* ligand (KL)^{3,4)}、mast cell growth factor (MGF)^{5,6,7)}、stem cell factor (SCF)^{8,9,10)} と命名された。 *c-kit* とそのリガンドの異常をきたすマウスが、貧血、色素の異常、不妊を示すことから、*c-kit* と KL は

Abbreviations

PDGF : platelet-derived growth factor
M-CSF : macrophage colony stimulating factor
RT-PCR : reverse transcriptase-polymerase chain reaction
mRNA : messenger RNA
cDNA : complementary DNA

kb : kilobase
PBS : phosphate-buffered saline
MDS : myelodysplastic syndrome
SDS : sodium dodecyl sulfate
HCC : hepatocellular carcinoma

造血幹細胞, メラノblast, 生殖細胞の増殖に重要な役割を果たしていると考えられている。ヒト悪性腫瘍においては造血器腫瘍^{11,12,13}, 肺小細胞癌¹⁴において *c-kit*, KL が腫瘍の増殖に関与することが知られている。

著者ら¹⁵は RT-PCR 法を用いて, ヒト KL において従来報告された mRNA (KL-H1) の他に, alternative splicing により第 6 exon を欠失する isoform (KL-H2) が存在することを明らかにしてきた。本研究では, ヒト正常組織及び各種腫瘍細胞株における 2 種類の KL mRNA の発現について検討し, さらにこれまで報告のない肝細胞癌および大腸癌における *c-kit* と KL の発現についても検討を加えたので報告する。

2 方 法

2.1 培養細胞株及び手術摘出組織

2.1.1 培養細胞株

大腸癌由来細胞株として, Colo320DM, DLD-1, SW1474, WiDr, CHC-Y1 を, 肝細胞癌由来細胞株として, HuH7, c-Hc-4, c-Hc-32, HLE を, 肝芽細胞腫由来細胞株として, HuH6 を, 神経芽細胞腫由来細胞株として NB39 を用いた。細胞は 10% 牛胎仔血清加 Dulbecco 変法 Eagle 培養液を用い, 37°C, 5% CO₂ インキュベーター内で培養した。

2.1.2 手術摘出組織

手術後あるいは剖検時摘出された胎盤, 肝, 脾, 肺, 胃, 腎, 十二指腸, 大腸組織及び肝細胞癌組織は速やかに凍結して保存した後, total RNA, DNA の抽出に用いた。

2.2 RT-PCR 法

2.2.1 total RNA の抽出

2.1 で得た培養細胞株及び各種組織より, guanidium thiocyanate/CsCl 法¹⁶により total RNA を抽出した。

2.2.2 primer の作製

Fig. 1 に KL 遺伝子のドメイン構造を示す。Martin *et al*⁹ によって決定された cDNA 配列に基づき, 第 6 exon を間に介在するように KL の primer を作製した。sense primer としては, コドン 642 から 651 に相当する領域を, antisense primer としては, コドン 889 から 908 に相当する領域を用いた。

c-kit の primer は Yarden *et al*³ に従って, sense primer としてコドン 544 から 567 に相当する領域を, antisense primer としてコドン 814 から 837 に相当する領域を用いた。

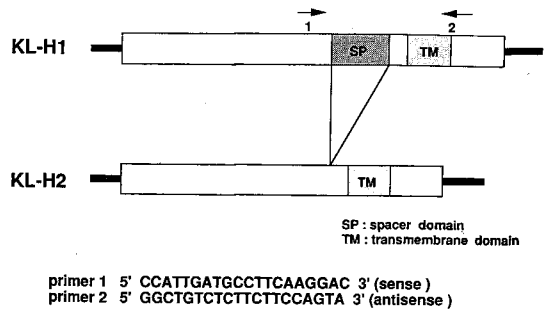


Fig. 1 Structure of alternatively spliced human *kit* ligand cDNAs.

Structure of KL-H1 is depicted based on the human KL cDNA previously described by Martin *et al*⁹. KL-H2 is a shorter KL cDNA that is missing an 84-nucleotide stretch (nucleotide numbers 704 to 787) compared to KL-H1. This region corresponds to exon 6, a proline/serine-rich variable spacer chain that contains the site for proteolytic release of the cytokine domain. Horizontal arrows indicate the hybridization sites of PCR primers.

β -actin についてはコドン 1560 から 1579 及びコドン 1906 から 1925 をそれぞれ, sense primer, antisense primer として用いた。

2.2.3 RT-PCR 法

2.2.1 で得た total RNA 1 μ g を鋳型とし, Kawasaki *et al*¹⁷ に従い, RT-PCR を行なった。reverse transcriptase を用いて 42°C で 15 分間反応させ cDNA を合成した。次に 2.2.2 で作製した primer と Taq polymerase を加え, 熱変性 95°C で 1 分, アニリング, 伸長反応 60°C, 1 分を 30 サイクル, DNA Thermal cycler (Perkin-Elmer-Cetus, USA) を使用して行なった。

2.3 Northern blot 法

2.2.1 より得られた total RNA 20 μ g/lane を Goldberg¹⁸ に従い, formaldehyde/agarose ゲルで電気泳動後, ニトロセルロース膜へトランスファーし, ランダムプライマー法¹⁹で ³²P を標識したプローブを用い, 42°C で 50% formamide, 5 \times SSPE (SSPE: 0.15 M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄·H₂O, 1 mM EDTA, pH 7.4), 5 \times Denhardt's solution (0.1% Ficoll 400, 0.1% bovine serum albumin, 0.1% polyvinylpyrrolidone), 0.1% SDS, 100 μ g 変性サケ精子 DNA を含む溶液中でハイブリダイゼーションを行なった。フィルターは, 2 \times SSC (SSC: 0.15 M NaCl, 15 mM sodium citrate, pH 7.0), 0.1% SDS 溶液中で室温 20 分間洗浄後, 同組成液中で 50°C, 20 分間洗浄した。

プローブは *c-kit* に関しては 2・2 で得られた約 800 bp の断片を、*c-myc* に関しては cDNA の EcoRI 断片、約 2・2 kb をそれぞれ用いた。また、内部標準として β -actin を用いた。

2・4 Southern blot 法²⁰⁾

2・4・1 DNA の抽出

2・1 より得られた細胞及び組織を 1%SDS, 0.2 mg/ml proteinaseK を含む溶液で 37°C, 16 時間反応後、phenol/chloroform 法にて抽出した。

2・4・2 Southern blot 得られた DNA を各種制限酵素で消化し、1% agarose ゲルに電気泳動後、ニトロセルロースフィルターへトランスファーを行ない、2・3 と同じ条件でハイブリダイゼーション及びフィルターの洗浄を行なった。プローブには *v-kit* の SacI/SalI 断片約 700 bp を用いた。

2・5 フローサイトメトリー

Epics (Coulter Electronics, USA) を用いて、*c-kit* の蛋白レベルでの発現を検討した。大腸癌細胞株 Colo 320 DM, DLD-1, CHC-Y1 (5×10^5) に冷エタノール (-20°C) 3 ml を加え、4°C 60 分間固定した後 PBS で 2 回洗浄し、0.5% Tween 20, 0.5% BSA 加 PBS 250 μ l を加え、室温で 5 分間放置した。その後、抗 *c-kit* ポリクローナル抗体、K 963 (IBL, Japan) 10 μ g/ml を一次抗体として 4°C, 30 分間反応させ、PBS で 3 回洗浄後、1 ml の PBS に浮遊させて検索試料とした。抗体の細胞膜下抗原との反応は、横軸に蛍光強度、縦軸に細胞数として表現した。

3 成 績

3・1 RT-PCR 法を用いた 2 種類の KL mRNA の検出

Fig. 1 に示すように、KL 遺伝子の第 6 exon は 84 塩基対しかなく、通常の Northern blot 法では KL-H1 と KL-H2 mRNA を区別することはできない。KL mRNA の発現に加えて、KL-H1 と KL-H2 の発現レベルを比較する目的で KLcDNA の第 6 exon を介在するように primer を作製し、RT-PCR 法によってヒト正常組織及び各種腫瘍細胞株における検討を行なった。その結果、正常組織では胎盤、肝、脾、肺、腎臓、胃、十二指腸、大腸において KL mRNA の発現を認めた (Fig. 2)。また各種腫瘍細胞株については肝芽腫細胞株 HuH6、肝細胞癌細胞株 HuH7、c-Hc-4、c-Hc-32 及び HLE (Fig. 3)、大腸癌細胞株 Colo320DM, DLD-1, SW1474, CHC-Y1 及び WiDr において KL mRNA の発現を認めた (Fig. 4)。以上より KL はきわめて広い組織分布を示すと考えら

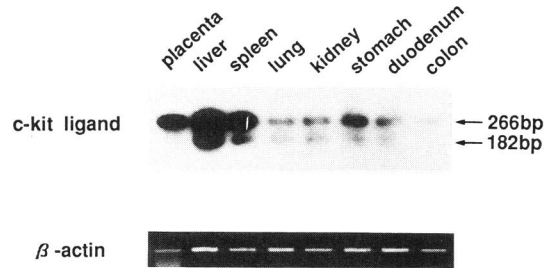


Fig. 2 Expression of two types of KL mRNAs in human tissues.

PCR was performed on first strand cDNA prepared from various human tissues. Five μ l of amplified product was electrophoresed on 2.5% agarose gel and subsequently transferred to a nylon filter. The filter was hybridized with the labeled KL specific probe. β -actin mRNA expressions detected by RT-PCR were also shown.

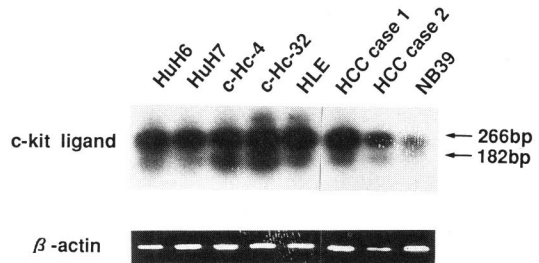


Fig. 3 Expression of two types of KL mRNAs in various human tumors.

RT-PCR was performed described as previously¹⁵⁾. The RNA samples were from hepatoblastoma cell line HuH-6, hepatocellular carcinoma cell line HuH7, c-Hc-4, c-Hc-32, HLE, primary hepatocellular carcinoma tissues, HCC1, HCC2, and neuroblastoma cell line NB39. β -actin mRNA expressions detected by RT-PCR were also shown.

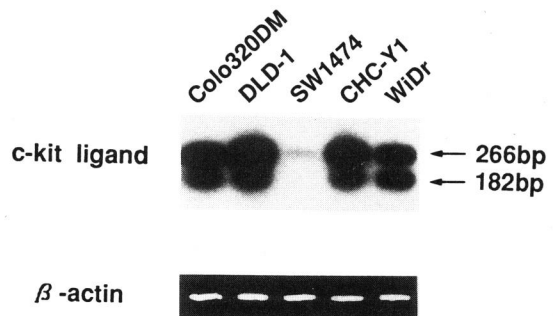


Fig. 4 Expression of two types of KL mRNAs in colon carcinoma cell lines.

Total RNAs from five colon carcinoma cell lines were analyzed by RT-PCR. β -actin mRNA expressions detected by RT-PCR were also shown.

れた。また、これまで検討した組織及び細胞株においては、KL-H1はKL-H2に比べて発現レベルはやや強いかほぼ同等の傾向を示した。

3.2 各種腫瘍細胞株における *c-kit* 遺伝子の発現

5種類の大腸癌細胞株において、*c-kit* 遺伝子の発現について Northern blot 法により検討したところ、Colo320DM, DLD-1において *c-kit* mRNA の発現を認め、SW1474, CHC-Y1, WiDr ではその発現を認めなかった (Fig. 5)。また、RT-PCR 法によっても同様の結果を得た。また未分化な細胞での発現が知られている *c-myc* 遺伝子についてもその発現を検討したが、5種類の大腸癌細胞株全てにおいて発現を認め、特に Colo320DM において非常に強い発現を認めた (Fig.

5)。一方、肝芽腫細胞株 HuH6, 肝細胞癌細胞株 HuH7, c-Hc-4, c-Hc-32, HLE においては RT-PCR 法にても *c-kit* mRNA を検出し得なかった。以上の結果を Table 1 に要約した。大腸癌細胞株では5株中2株で *c-kit* と KL を共に発現したのに対し、肝癌細胞株では KL のみ発現していた。

3.3 フローサイトメトリーによる KIT 抗原の検出

c-kit の蛋白レベルでの発現を検討する目的で、抗 *c-kit* 抗体 K963 を用いたフローサイトメトリーを行なった。Northern blot で *c-kit* mRNA を発現していた大腸癌細胞株 Colo320DM, DLD-1 において KIT 抗原の発現を認め、mRNA の発現を認めなかった CHC-Y1 では陰性であった (Fig. 6)。

3.4 *c-kit* 遺伝子の Southern blot 法による解析

c-kit を強く発現していた Colo320DM に関して、遺伝子構造の異常の有無を検討する目的で、チロシンキナーゼ領域をコードする約 700 bp の断片をプローブとして、制限酵素 EcoRI, PvuII, BamHI により DNA を消化し、Southern blot 法による解析を行なったとこ

Table 1 Expression of *c-kit* and KL genes in various human tumor cell lines^{a)}

Expression	HCC ^{b)}	colon	hematopoietic ^{c)}
<i>c-kit</i>	0/5	2/5	3/7
KL	5/5	5/5	7/8

^{a)} Expression of *c-kit* and KL genes was analysed by RT-PCR and Northern blot analysis.

^{b)} HCC cell lines include one hepatoblastoma cell line.

^{c)} Hematopoietic tumor cell lines studied include those of chronic myelocytic leukemia, monocytic leukemia, acute T-cell leukemia, adult T-cell leukemia, myeloma, Burkitt lymphoma, and histiocytic lymphoma.

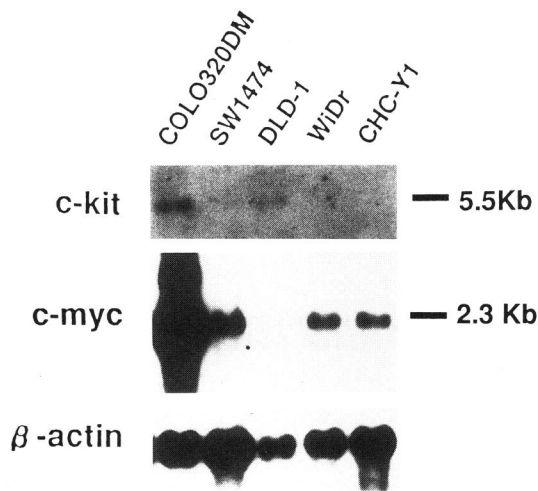


Fig. 5 Northern blot analysis of *c-kit* and *c-myc* mRNAs in colon carcinoma cell lines. Twenty μ g of total RNA per lane were loaded for each sample. Northern blot analysis was performed with the labeled *c-kit* and *c-myc* cDNA probes respectively. Expression of β -actin mRNA is shown in lower panel.

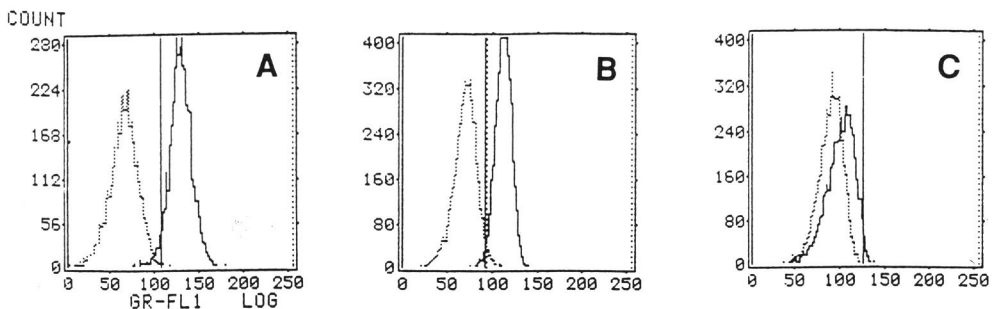


Fig. 6 Detection of KIT protein in colon carcinoma cell lines by flow cytometry analysis. The fluorescence intensity was shifted to the right by the addition of anti-*c-kit* antibody. A: Colo320DM, B: DLD-1, C: CHC-Y1

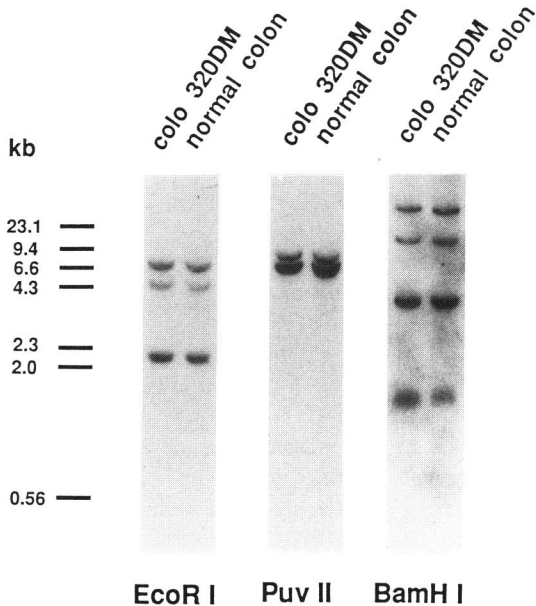


Fig. 7 Southern blot analysis of *c-kit* gene. Ten μ g of DNA from Colo320DM and a normal colon tissue was digested with restriction enzymes, EcoRI, PvuII and BamHI, electrophoresed in 1.0% agarose, blotted onto nitrocellulose filter and hybridized with the labeled *v-kit* probe (2.75-3.5 kb SacI/SalI fragment). The size marker, λ /Hind III fragment is indicated on the left side.

ろ, *c-kit* 遺伝子の増幅, 再構成等は認められなかった (Fig. 7). Control としては正常大腸より抽出した DNA を用いた.

4 考 察

1990年にKL遺伝子のクローニングがなされて以来, *c-kit*/KLの造血幹細胞の分化と増殖における役割について多くの研究がなされてきた. ヒト悪性腫瘍では造血器腫瘍^{11,12,13}, 肺小細胞癌¹⁴)において*c-kit*/KLの発現が知られている. 本研究ではこれまで報告のない肝細胞癌, 大腸癌など上皮性腫瘍における*c-kit*/KLの発現について検討した.

我々は¹⁵)これまでの研究においてKL mRNAには alternative splicingにより生ずる2種類のisoform (KL-H1, KL-H2)が存在し, KL-H2では第6 exonに相当する84塩基対が欠失していることを明らかにした. この第6 exonに相当する領域はプロリン, セリンに富む領域で膜結合型KLはこの部位でプロテアーゼによる分解を受け分泌型として放出されると考えられてい

る²¹). 本研究ではKL遺伝子の第6 exonが介在するようにprimerを作製し, RT-PCR法により2種類のKL mRNAの発現について検討した. その結果, KL-H1, KL-H2ともに広範な臓器での発現が認められ, 肝細胞癌, 大腸癌など上皮性腫瘍の細胞株においても発現が認められた.

EGF, TGF- α , M-CSF等の増殖因子においても, KL同様一度膜結合型として細胞表面に発現した後, プロテアーゼにより分解を受け, 分泌型として放出されると考えられている³²). これら膜結合型増殖因子の役割については不明な点が多い. Flanagan *et al*²³)は膜結合型KLを発現させた細胞が, *c-kit*を発現しているmast cellと接着することから*c-kit*とKLが接着因子として働く可能性を示唆している. また, Arguello *et al*²⁴)はKLの膜結合部位に異常のある*Sl/Sl^d*マウスに*c-kit*を発現しているメラノーマ細胞を投与した際, 卵巣転移の頻度がcontrol群(100%)に比して6.6%と有意に低値を示したことから, *c-kit*/KLによる接着が腫瘍の転移に重要な役割を果たしていると報告している. 本研究で示したとおりKLの発現は非常に広い臓器にわたっており, 様々な組織での分化, 増殖に関与していることが示唆された.

本研究では, 一部の膵癌細胞株では*c-kit*/KLと共に発現していることを明らかにした. 膵癌においてはEGF, TGF- α ^{25,26}) amphiregulin²⁷), cript²⁷)など様々な増殖因子とその受容体が発現しており, 腫瘍の増殖に関与していると考えられている. 膵癌において*c-kit*/KLのautocrine loopが腫瘍の増殖に関与するか, 今後KLに対する膵癌細胞の反応性の検討や膵癌の臨床例において*c-kit*やKLの過剰発現が認められるか等についての検討が必要と思われる.

*c-kit*は造血幹細胞の中でもCD34陽性の非常に未分化な細胞に強く発現しており²⁸), 分化と共にその発現は低下する. 本研究では膵癌細胞株において, 分化の指標として未分化な細胞で強く発現し, 分化と共にその発現が低下することが知られている²⁹)*c-myc*との関係について検討した. その結果*c-kit*を強く発現しているColo320DMにおいて*c-myc*の強い発現が認められた. Colo320DMはACTHやPTH, serotoninなどを分泌しneuroendocrine由来の細胞株と考えられている^{30,31}). 同様にneuroendocrine由来である肺小細胞癌においても高率に*c-kit*を発現しており¹⁴), 上皮性腫瘍のどのようなpopulationに*c-kit*が発現するのか興味を持たれる.

また, 急性骨髄性白血病, 骨髄異形性症候群

(MDS)においては、*c-kit*の familyである*c-fms*遺伝子の点突然変異により、リガンドであるM-CSFに対する反応性の上昇やリガンド非依存性のチロシンキナーゼ活性の上昇が認められる³²⁾。ヒトの悪性腫瘍における*c-kit*遺伝子の異常に関してはこれまでのところ報告がないが、現在我々はその点についても検討中である。

最近 recombinant KL の大量生産が可能になり、先天性貧血や造血器異常の治療、末梢血幹細胞移植などの臨床応用へ向けて既に検討が進められている^{33,34,35)}。今後、各種増殖因子や化学療法剤との併用も考えられ、*c-kit*を発現している腫瘍細胞のKLに対する反応性についてさらに検討が必要と考えられる。

5 要 約

1) ヒト正常組織における2種類の、KL mRNAの発現につきRT-PCR法を用いて検討したところ、胎盤、脾、肝、肺、腎臓、胃、十二指腸及び大腸においてKL mRNAの発現を認めた。KL-H1、KL-H2の発現レベルはほぼ同等であった。

2) 肝細胞癌細胞株及び肝芽腫細胞株では、検討した5種類の細胞株全てにおいてKL mRNAの発現を認めたが、*c-kit*の発現は認めなかった。

3) 5種類の大腸癌細胞株について検討したところColo320DM、DLD-1において*c-kit*、KL両方の発現を認めた。また、フローサイトメトリーによりKIT蛋白の発現も確認された。

4) Colo320DMにおいては*c-kit*遺伝子の増幅、再構成は、認められなかった。

謝 辞

御指導、御校閲いただいた本学内科学第1講座谷内昭教授及び貴重な御意見をいただいた、同講座伊東文生博士に深謝致します。また細胞株をご供与下さったがん研究振興財団JCRB細胞バンク及び肝組織を御提供下さった北海道大学第1外科内野純一教授に深謝致します。本研究は文部省科学研究費補助金がん特別研究I(02151056 谷内)および重点領域研究(02262231 今井)の補助による。

文 献

1. Besmer P, Murphy JE, George PC, Qiu F, Bergold PJ, Lederman L, Synder HW Jr, Brodeur D, Zuckerman EE, Hardy WD. A new

acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene *v-kit* with the protein kinase gene family. *Nature* 1986, 320: 418-421.

2. Yarden Y, Kuang W-J, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ, Chen E, Schlessinger J, Francke U, Ullrich A. Human proto-oncogene *c-kit*: a new cell surface receptor tyrosine kinase for unidentified ligand. *EMBO J* 1987, 6: 3341-3351.
3. Flanagan JG, Leder P. The kit ligand: A cell surface molecule altered in Steel mutant fibroblasts. *Cell* 1990, 63: 185-194.
4. Hung E, Nocha K, Beier DR, Chu, T-Y, Buck J, Lahm H-W, Wellner D, Leder P, Besmer P. The hematopoietic growth factor KL is encoded by the Sl locus and is the ligand for the *c-kit* receptor, the gene product of the W locus. *Cell* 1990, 63: 225-233.
5. Williams DE, Eisenman J, Baird A, Rauch C, Ness KV, March CJ, Park LS, Martin U, Mochizuki DY, Bosswell HS, Burgess GS, Cosman D, Lyman SD. Identification of a ligand for the *c-kit* proto-oncogene. *Cell* 1990, 63: 167-174.
6. Copeland NG, Gilbert DJ, Cho BC, Donovan PJ, Jenkins NA, Cosman D, Anderson D, Lyman SD, Williams DE. Mast cell Growth factor maps near the Steel locus on mouse chromosome 10 and is deleted in a number of Steel alleles. *Cell* 1990, 63: 175-183.
7. Anderson DM, Lyman SD, Baird A, Wignall JM, Eisenman J, Rauch C, March CJ, Boswell HS, Gimpel SD, Cosman D, Williams DE. Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. *Cell* 1990, 63: 235-243.
8. Zsebo KM, Wypych J, McNiece IK, Lu HS, Smith KA, Karkare SB, Sachder RK, Yuschenkoff VN, Birkett NC, Williams LR, Satyagal VN, Tung W, Bosselman RA, Mendiaz EA, Langley KE. Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from Buffalo rat liver-conditioned medium. *Cell* 1990, 63: 195-201.
9. Martin FH, Suggs SV, Langley KE, Lu SH, Ting J, Okino KH, Morris CF, McNiece IK, Jacobsen FW, Mendiaz EA, Birkett NC, Smith KA, Johnson MJ, Parker VP, Flores JC, Patel AC, Flisher EF, Erjavec Ho, Herreca CJ, Wypych J, Sachder RK, Pope JA, Leslie I,

- Wen D, Lin C-H, Cupples RL, Zsebo KM. Primary structure and functional expression of rat and human stem cell factor DNAs. *Cell* 1990, 63: 203-211.
10. Zsebo KM, Williams DA, Geissler EN, Broudy VC, Martin FH, Atkins HL, Hsu R-Y, Blrkett NC, Okino KH, Mordoch DC, Jacobsen FW, Langley KE, Smith KA, Takeishi T, Cattanauch BM, Galli SJ, Suggs SV. Stem cell factor is encoded at *Sl* locus of the mouse and is the ligand for the *c-kit* tyrosine kinase receptor. *Cell* 1990, 63: 213-224.
 11. Wang C, Curtis JE, Geissler EN, McCulloch EA, Minden MD. The expression of the proto-oncogene *c-kit* in the blast cells of acute myeloblastic leukemia. *Leukemia* 1989, 10: 699-702.
 12. Ikeda H, Kanakura Y, Takami T, Kuriu A, Kitayama H, Ishikawa J, Kanayama Y, Yonezawa T, Tarui S, Griffin JD. Expression and functional role of the proto-oncogene *c-kit* in acute myeloblastic leukemia. *Blood* 1991, 73: 2962-2968.
 13. Broudy VC, Smith FO, Lin N, Zsebo KM, Egrie J, Bernstein ID. Blasts from patients with acute myelogenous leukemia express functional receptors for stem cell factor. *Blood* 1992, 80: 60-67.
 14. Hibi K, Takahashi T, Sekido Y, Ueda R, Hida T, Ariyoshi Y, Takagi H, Takahashi T. Coexpression of the stem cell factor and the *c-kit* gene in small-cell lung cancer. *Oncogene* 1991, 6: 2291-2296.
 15. Toyota M, Hinoda Y, Itoh F, Imai K, Yachi A. Expression of two types of *kit* ligand in human tumor cells. *Int J Hematol* 1992, 55: 301-304.
 16. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979, 18: 5294-5299.
 17. Kawasaki ES. Amplification of RNA. *PCR Protocols*. Academic Press, 1990, 21-27.
 18. Goldberg DA. Isolation and partial characterization of *Drosophila* alcohol dehydrogenase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980, 77: 5794-5798.
 19. Feinber AP, Vogerstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 1983, 132: 6-13.
 20. Toyota M, Hinoda Y, Nakano T, Imai K, Yachi A. A new restriction fragment length polymorphism of the human alpha-fetoprotein gene in Japanese individuals: detection of loss of heterozygosity in human hepatocellular carcinoma. *Tumor Biol* 1992, 13: 133-137.
 21. Bazen JF. Genetic and structural homology of stem cell factor and macrophage colony-stimulating factor, *Cell* 1991, 65: 9-10.
 22. Massague J. A model for membrane-anchored growth factors. *J Biol Chem* 1990, 265: 21393-21396.
 23. Flanagan JG, Chan DC, Leder P. Transmembrane form of the *kit* ligand growth factor is determined by alternative splicing and is missing in the *Sl* mutant. *Cell* 1991, 64: 1025-1035.
 24. Arguello F, Furlanetto RW, Baggs RB, Graves BT, Harwell SE, Choen HJ, Frantz CN. Incidence and distribution of experimental metastasis in mutant mice with defective organ micro-environments (Genotypes *Sl/Sl* and *W/W*). *Cancer Res* 1992, 52: 2304-2309.
 25. Coffey Jr RJ, Goustin AS, Soderquist AM, Shipley GD, Wolfshohl J, Carpenter G, Moses HL. Transforming growth factor α and β expression in human colon cancer cell lines: implications for an autocrine model. *Cancer Res* 1987, 47: 4590-4594.
 26. Anzano MA, Rieman D, Prichett W, Bowen-Pope DF, Greig R. Growth factor production by human colon cancer cell lines. *Cancer Res* 1989, 49: 2898-2904.
 27. Ciardiello F, Kim N, Saeki T, Dono R, Persico MG, Plowman GD, Garrigues J, Radke S, Todaro GE, Salomon DS. Differential expression of epidermal growth factor-related proteins in human colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88: 7792-7796.
 28. Buhring H-J, Ullrich A, Schaudt K, Muller CA, Busch FW. The product of the proto-oncogene *c-kit* ($P145^{c-kit}$) is a human bone marrow surface antigen of hematopoietic precursor cells which is expressed on a subset of acute non-lymphoblastic leukemic cells. *Leukemia* 1991, 5: 854-860.
 29. Collins SJ. The HL60 promyelocytic leukemia cell lines: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood* 1987, 70: 1233-1244.
 30. Quinn LA, Moore GE, Mogan RT, Woods LK. Cell lines from human colon carcinoma with unusual cell products, double minutes, and homogeneously staining regions. *Cancer Res* 1979,

- 39: 4919-4924.
31. Collins JF, Herman P, Schuch C, Bagby GC Jr. c-myc antisense oligonucleotides inhibit colony-forming capacity of Colo320 colonic carcinoma cells. *J Clin Inv* 1990, 89: 1523-1527.
32. Ridge SA, Worwood M, David O, Jacobs A, Padua RA. FMS mutations in myelodysplastic, leukemic, and normal subjects. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 87: 1377-1380.
33. Abkowitz JL, Sabo KM, Nakamoto B, Blau CA, Martin FH, Zsebo KM, Papayannopoulou T. Diamond-Blackfan anemia: *in vitro* response of erythroid progenitors to the ligand for *c-kit*. *Blood* 1991, 78: 2198-2202.
34. Miles SA, Lee K, Hutlin L, Zsebo KM, Mitsuyasu RT. Potential use of human stem cell factors as adjunctive therapy for human immunodeficiency virus-related cytopenias. *Blood* 1991, 78: 3200-3208.
35. Bagnara GP, Strippoli P, Bonsi L, Brizzi MF, Avanzi GC, Timeus F, Ramenngi U, Piaggio G, Tong J, Podesta M, Paolucci G, Gabutti V, Bacigalupo A. Effect of stem cell factor on colony growth from acquired and constitutional (Fanconi) aplastic anemia. *Blood* 1992, 80: 382-387.

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学内科学第1講座 豊田 実