

[原著] 白血病細胞における *c-kit* 遺伝子発現の
検討及び臨床応用

西村美樹

(1997年3月3日受付, 1997年4月11日受理)

要 旨

c-kit 遺伝子は初期造血に重要な役割を果たしているレセプター型チロシンキナーゼをコードしている。この *c-kit* 遺伝子の発現は骨髄細胞性、巨核芽球性白血病細胞から樹立した細胞株で検出され、それらの細胞の分化とともに減少した。*c-Kit* レセプター蛋白の発現は Flow cytometry を用いた解析で、遺伝子の発現と相関する結果が得られた。急性の造血器悪性疾患40例の細胞から RT-PCR を用いてその発現を検討したところ、未分化なタイプの白血病 (FAB の M1, M2) に強く検出され、リンパ球系の細胞からは検出されなかった。このように細胞における *c-kit* 遺伝子や、その蛋白の発現を検討することは、その細胞の分化段階、系統を決定するうえで有用であり、白血病の診断、予後の決定、治療法の選択等に重要な情報となることを推測させる。

Key words: *c-kit*, RT-PCR, Flow cytometry, 急性白血病, 細胞の分化段階, 系統

略語一覧: SCF: Stem cell factor.

AML: Acute myelogenous leukemia.

ALL: Acute lymphocytic leukemia.

CML: Chronic myelogeneous leukemia.

MDS: Myelodysplastic syndrome.

FAB: French-American-British.

RT-PCR: Reverse transcription-Polymelase chain reaction.

I. 緒 言

造血幹細胞は自己と同じ細胞をつくり出すという自己複製能を保持するとともに、すべての系列の血球に分化させる多分化能を併せもつ細胞として定義されている [1]。この造血幹細胞の増殖、分化の場として骨髄微小環境の必要性が示唆されてきたが、Dexter ら [2] の正常骨髄細胞の長期培養系の開発により in vitro で骨髄間質細胞層上

で長期に造血を維持させることが可能になり、骨髄間質細胞の重要性が明らかになった。この骨髄間質細胞との幹細胞の支持能の本態は幹細胞と骨髄間質細胞との接着と間質細胞から産生される Stem cell factor (SCF) をはじめとする様々なサイトカインであると考えられる [3]。遺伝的貧血マウスで *Sl* 遺伝子の欠損があり、造血支持細胞に異常があるとされてきた *Sl/Sl^h* マウスがあるが [4]、*Sl* 遺伝子の遺伝子産物がこの SCF で

ある。SCFの補充によりマウスの貧血が改善し、サルへ注射したところ骨髄で幹細胞の増殖がみられ、SCFの初期造血に関する重要性が判明した[5-6]。そのレセプターとして幹細胞に発現し、同じく初期造血に必須と考えられているものがc-Kitである[7-9]。

c-kit遺伝子は第4染色体長腕に位置しており、ネコ線維肉腫ウイルスから得られた癌遺伝子v-kitの細胞側遺伝子である。c-Kitはチロシンキナーゼ活性をもつレセプター型蛋白で、発現細胞は正常骨髄細胞中0.6~3.0%の未分化な細胞である[10-16]。その発現は幹細胞から、リンパ球系細胞へとコミットした段階で消失し、赤芽球系以外では分化とともに消失する[17]。

白血病ことに急性白血病では、正常な血球の分化と比較してみると、腫瘍細胞が正常造血の分化のある段階で成熟停止し、単クローン性に腫瘍性増殖をきたしている状態といえる。その腫瘍細胞の形質発現は由来している細胞の系統に合致し、また分化段階に対応すると考えられている。c-Kitは白血病細胞上にも発現しているという報告がみられている[18-20]。

以上のように、c-Kitの発現は分化の過程で変化し、更に細胞系統に特異的であることから、白血病の診断の指標、病態の把握等にたいする有用性が推測された。私はクローン化した細胞で分化とc-kitの発現を検討したうえで、白血病症例でmRNAの発現を定量し、更に細胞表面のc-Kit蛋白の発現を検出し、その相関について検討した。また、白血病の臨床的分類との相関、分類困難な症例における発現について検討し、診断、治療効果の予想についてc-kit検出の有用性を明らかにすることとした。

II. 対象と方法

白血病細胞株の調整

白血病細胞株は骨髄性白血病細胞株としてU937, HL-60, CMK(いずれも千葉大学小児科学教室佐藤武幸博士より供与された。)を選択, リンパ性白血病株としてDaudi, Nalm6, BJAB(American Type Culture Collectionより購入した。)を用いた。分化誘導の検討にはこのなかで巨核芽

球性白血病株であるCMKを用いた。細胞は10%ウシ胎児血清(GIBCO社製)を含むRPMI(GIBCO社製)中で培養された。

対象症例

急性白血病, 及び慢性白血病の急性転化症例40例で, その内訳は急性骨髄性白血病26例, 急性リンパ性白血病10例, 形質細胞性白血病1例, 骨髄異形成症候群からの白血化1例, 分類不能2例。骨髄有核細胞中, 白血病細胞の占める割合は90%以上である症例を検討対象とした(表1)。

表1 患者背景

性別 (人)	男性	21
	女性	21
年齢 (才)		16-83
	中央値	32
疾患 (人)	AML	M0 1 M1 2 M2 10 M3 3 M4 6 M5 1
	ALL	L2 11
	CML(L-BC) ⁺	1
	CLL	1
	MDS→overt	M2 1 M4 2 M7 1
	PCL	1
	分類不能	1

AML; Acute myelogeneous leukemia
ALL; Acute lymphocytic leukemia
CML; Chronic myelogeneous leukemia
L-BC; Lymphid blast crisis
CLL; Chronic lymphocytic leukemia
MDS; Myelodysplastic syndrome
overt; overt leukemia
PCL; Plasma cell leukemia

CMK細胞の分化誘導

5x10⁵/mlのCMKを10%ウシ胎児血清(GIBCO社製)を含むRPMI(GIBCO社製)中にトロンボポエチン(キリン株式会社より供与された。)

を最終濃度10ng/mlで添加し、48時間培養。培養後の形態をライト-ギムザ染色で鏡検、また細胞表面抗原については、未分化な細胞に発現しているCD34（ファーミンジェン社製）、分化した血小板にも発現のみられるCD41a（ファーミンジェン社製）の抗体を用い flow cytometry にての解析を、FACScan（Becton Dickinson）を用いて行った。

c-kit mRNA の定量

細胞株及び診断確定時の骨髓穿刺によって得られた骨髓細胞を Ficoll 法[21]で分離し、得られた有核細胞から Acid-guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform (AGPC) 法にて total RNA を抽出、2.5 μ g の RNA を用いて Superscript preamplification system (GIBCO 社製) にて cDNA を合成。図1の如くプライマーを設定し、94°C, 55°C, 72°Cにて Polymerase chain reaction (PCR) 産物とサイクルが直線的な相関関係にある27サイクルで行った。Tris-borate-EDTA buffer 中アガロースゲルにて電気泳動を行い PCR 産物をエチジウムブロマイドで染色し、その濃度を画像処理ソフトウェアである NIH イメージを用いて測定した。同時に各検体から得られた RNA を GAPDH のプライマーを用いて Reverse Transcription (RT)-PCR を行い、その濃度が一定であることを NIH イメージにて確認し、これとの濃度の比を用いて *c-kit* の mRNA を半定量した。

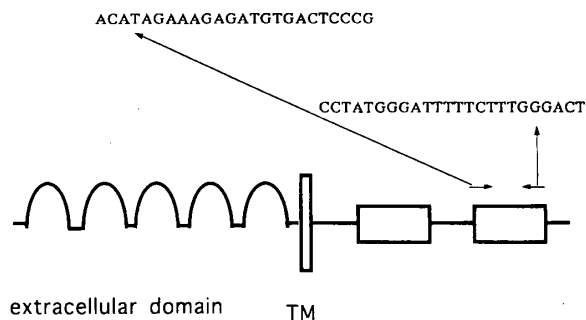


図1 *c-kit* の構造と primer の設定

細胞表面抗原の検討

Phosphate buffered saline (PBS) で細胞数を 1×10^6 /ml に調整した細胞浮遊液 100 μ l に抗ヒト Fc 抗体（ファーミンジェン社製）を添加しブ

ロッキング後、1 μ g の精製 c-Kit 抗体（ニチレイ社製）を添加し15分間静置。遠沈、PBS で洗浄後 Phycoerythrin (PE) 標識二次抗体（イムノテック社製）を加え再び15分間静置、遠沈、PBS にて洗浄し500 μ l の PBS に再浮遊し、FACScan (Becton Dickinson 社製) を使用し解析用ソフトウェア Cell Quest (Becton Dickinson 社製) にて解析した。CMK 細胞の分化の指標となる CD34, CD41a 抗体についても同様に解析した。

白血病症例における検討

症例1) 75歳男性、臨床診断では分類不能。

初診時 WBC17000、骨髓中核小体の明らかな顆粒を持たない N/C 比の大きな大型の幼若な細胞がほぼ100%を占める。ミエロペルオキシダーゼ染色陰性、細胞表面抗原では CD34陽性。(図2A)

症例2) 20歳女性、臨床診断 M0または L2

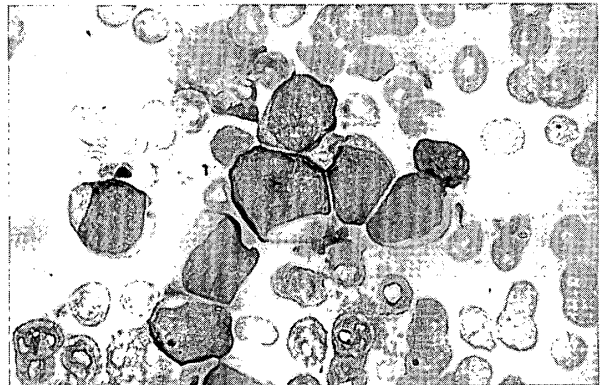


図2A 症例1の骨髓所見

顆粒のない N/C 比の大きい核小体を持つ細胞である。ライト-ギムザ染色。倍率 400倍。

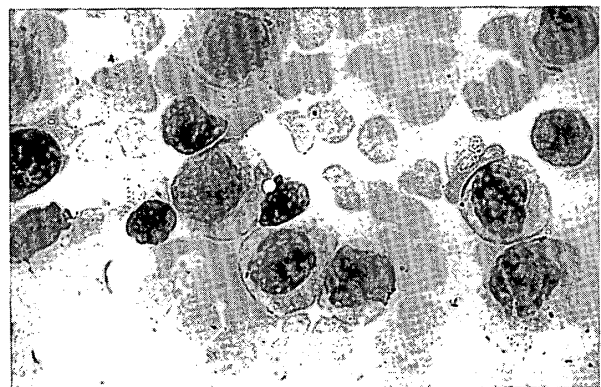


図2B 症例2の骨髓所見

胞体が大きく顆粒のない、核小体を持つ細胞である。ライト-ギムザ染色。倍率 400倍。

疑い。診断時 WBC3300, 骨髓中, 核小体の明らかな顆粒を持たない胞体の大きい大型の幼若な細胞が90%以上を占める。ミエロペルオキシダーゼ陰性, 細胞表面抗原では CD34陽性 (図 2B)。

III. 結 果

CMK の分化

TPO 添加により, 形態学的に細胞の小型化, 核小体の消失等がみられ (図 3A), 細胞表面抗原の検討でも CD34の発現減少, CD41aの発現増加を認め明らかに分化していることを確認した (図 3B)。また, TPO 添加により分化した CMK では c-Kit の発現は低下していた (図 3C)。

白血病細胞株における c-kit mRNA 発現の検討

骨髄性白血病系由来の HL-60, U-937, CMK

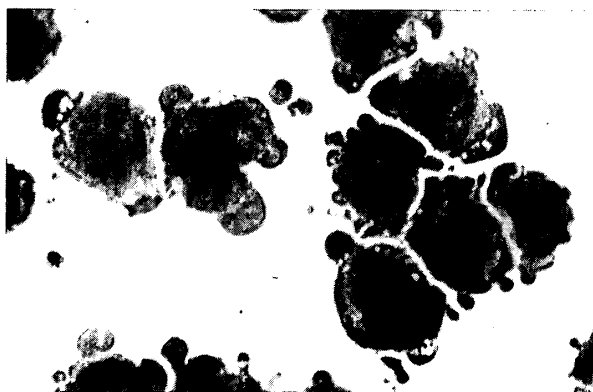


図 3A-1 TPO を添加していない CMK 細胞
大型で核小体を持つ幼若な細胞である。

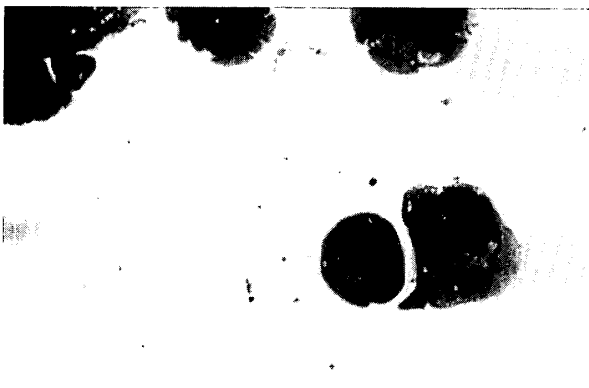


図 3A-2 TPO 添加によって分化した CMK 細胞
核小体はわずかにみられるものの小型化し成熟の過程にある細胞である。

では c-kit の発現がみられ, リンパ性白血病由来の Daudi, Nalm6, P30では発現は認められなかった (図 4)。

白血病症例における c-kit mRNA の発現

AML 症例では全例に c-kit mRNA が検出され

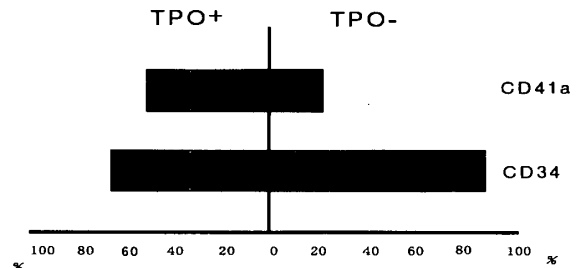


図 3B TPO 添加した CMK 細胞と非添加の CMK 細胞の細胞表面抗原の変化

TPO 添加によって CMK 細胞の分化の最終段階である血小板にも発現している CD41a の発現が増加している。

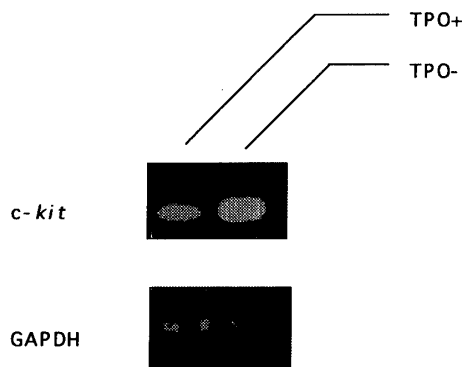


図 3C TPO 添加による CMK 細胞の c-kit mRNA 発現の変化

TPO 添加により c-kit の発現は低下している。

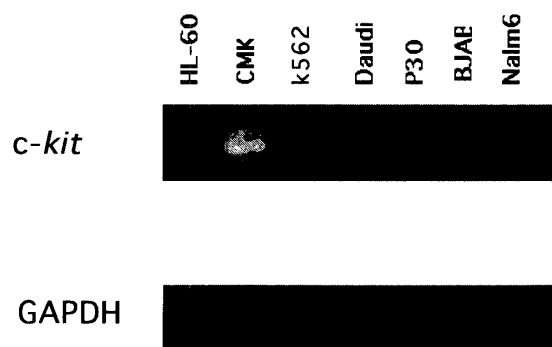


図 4 白血病細胞株での c-kit mRNA の発現

AML の細胞株には c-kit の発現がみられるが Lymphoid malignancies の細胞株には発現がみられない。

たが、未分化の M1, M2では強発現をし、やや分化の進んだ段階と考えられる M3では発現量が少なかった。FAB 分類[22]では M2に分類される症例で、表面抗原等の検索で M4との鑑別の困難であった症例ではむしろ発現は低下していた(図5)。ALL 症例, CML のリンパ球性急性転化症例, 形質細胞性白血病症例では、細胞表面抗原の結果では骨髄球系の表面抗原の認められた症例もあったが、*c-kit* mRNA は検出できなかった(図6)。

c-kit



AML MPD
M1 M1 M2 M2 M2 M3 M3 M4 M4 M4 M4 M5

GAPDH



図5 白血病症例における *c-kit* mRNA の発現
M1, M2の未分化なものに *c-kit* の発現が強く、分化が進んでいると考えられる M3では低い。

c-kit



UN UN ALL PCL CMLinBC CLL
L2 L2 L2 L2 L2 L2 L2

GAPDH



図6 白血病症例における *c-kit* mRNA の発現
リンパ球性の白血病では発現がみられない。UN (分類不能) 例2例のうち *c-kit* を発現している症例が症例1であり、発現していないものが症例2である。

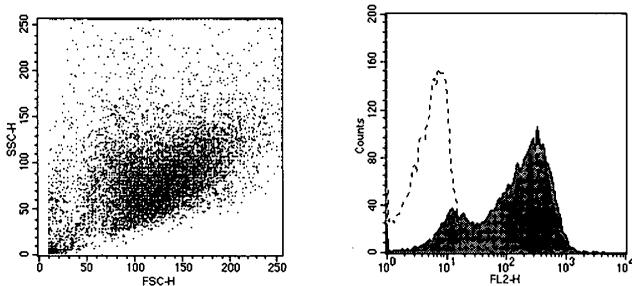


図7 *c-kit* mRNA を発現している症例の細胞表面 *c-kit* 蛋白の検出

表2 *c-kit* mRNA を発現している症例

No	FAB分類	表面抗原	<i>c-kit</i> /GAPDH	<i>c-kit</i> receptor
1	M1	M1 or M5a	1.57	
2	M1		1.30	
3	M2		1.83	
4	M2		1.50	(++)
5	M2		1.30	
6	M2	M4	0.52	
7	M2		0.99	
8	M2		0.96	
9	M2		0.52	
10	M2		1.52	
11	M2		1.54	
12	M2		0.52	(+)
13	M2(MDS)		2.11	
14	M3		0.99	(+)
15	M3		0.99	
16	M3		0.99	
17	M4	M2	1.40	(++)
18	M4	M1	2.17	
19	M4		0.44	(+-)
20	M4		0.66	(+-)
21	M4		0.96	
22	M4		0.92	
23	M4(MDS)		1.30	(++)
24	M4(MDS)		1.32	(++)
25	M5		1.58	
26	M7(MDS)		0.52	
27	分類不能		1.10	

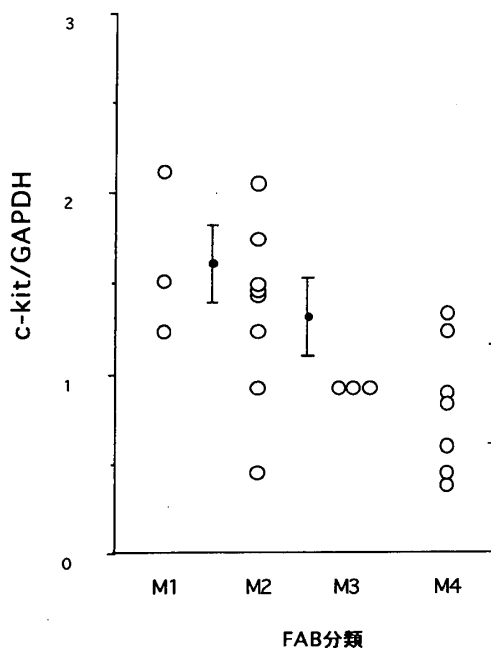


図8 *c-kit* mRNA の発現と FAB分類

細胞表面 c-Kit 蛋白の発現

10例中2例は *c-kit* mRNA の発現がない症例では細胞表面 c-Kit 蛋白の発現もみられなかった(データ提示せず)。*c-kit* mRNA が発現している8例では細胞表面に c-Kit 蛋白が検出され、その代表例を図7に示した。発現の強度もほぼ mRNA の発現強度と相関した(表2, 図8)。

白血病症例の臨床経過

症例1) *c-kit* mRNA が強発現していたことより急性骨髄球性白血病と診断。behenoyl Ara-C, 6mercaptopyrine, daunorubicin 併用の AML の寛解導入療法にて寛解導入が達成された。

症例2) *c-kit* mRNA の発現, 細胞表面 c-Kit 蛋白の発現ともにみられず, 急性リンパ球性白血病のプロトコールに従って predonisolone, vincristin, cyclophosphamide, L-asparaginase 等にて治療を行い, 完全寛解となった。

IV. 考 察

近年, 急性白血病の治療成績は向上し, 治癒する症例も増加してきている。その背景には様々な要因があげられるが, なかでも診断, 治療法の進歩があげられる。従来から行われている急性白血病の診断に不可欠な FAB 分類も形態学的な面からのみならず細胞表面抗原を指標にしながら適宜改訂を行っている。治療では Total cell kill を目標とする化学療法のみならず, 分化誘導療法[23]も行われている現状を考えると, 白血病細胞の系統, 分化段階をふまえた診断が重要視されてきていることを示している。

幹細胞に発現し, 臨床的に現在最も汎用されている細胞表面抗原は CD34 である[24]。しかし, *c-kit* はより未分化な細胞に発現し, しかもリンパ球系にコミットされた段階でその発現は認められなくなるため, 分化の程度及びその系統についてより正確な情報が得られると考えられる。しかしこれまでの白血病症例での検討では FAB 分類との相関がないという報告もあり[25-26], 未分化な白血病に発現が強いという結果もある[27-28]。以上のことから *c-kit* の検出の有用性について一定の結果は得られていないといわざるを得ない。

このような報告による結果の相違は行われた症例, 細胞の特異性等も原因と考えられ, より多くの症例での検討が求められる。今回の検討では *c-kit* の発現は mRNA レベルと, 細胞表面蛋白と定量性をもって分化段階, 系統の指標になる結果を得た。

また *c-kit* 遺伝子がオンコジーンである *v-kit* の細胞側遺伝子であるという事実を考えるとそれ自体の腫瘍原性も考えられる。しかし *c-kit* の発現量と予後との間に相関はないとの報告[29]もあり, 今回検討した症例はほぼ同一のプロトコールで治療されているが, 寛解導入率と *c-kit* 発現量の間に関連はなかった。また, 造血器腫瘍化に関係あると報告のあった Val815→Asp815 の点突然変異[30-31]はこれらの症例では認められなかった(データ未提示)。これについては今後の検討が求められる。

c-kit は造血細胞の分化段階, 系統を示す鋭敏な指標であるといえる。白血病の治療戦略をたてるうえで重要な指標となることが明らかとなった。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導を賜りました恩師, 千葉大学医学部内科学第二講座斎藤康教授に深甚なる感謝を申し上げます。また, 終始御指導を賜りました千葉大学医学部内科学第二講座, 血液研究室王伯銘助手, *c-kit* のプライマー等供与下さいました耳鼻咽喉科学講座永田博史講師, 多大な技術的協力を頂きました山岸美雪氏, 岩井良恵氏に感謝申し上げます。更にこのような研究の機会を得ることができましたことに第二内科特に血液研究室, 関連病院の諸先生方々に感謝申し上げます。

SUMMARY

The *c-kit* proto-oncogene encode a receptor tyrosine kinase that is considered to play an important role in hematopoiesis, especially at early stage. The expression of proto-oncogene *c-kit* was detected in human cell lines derived from leukemic cells of myeloid and megakaryocytic lineages and decreased depending on cell

differentiation. The amount for c-Kit receptor protein on cells was analyzed by flow cytometry, and correlated with the level of its gene expression estimated by RT-PCR. The expression on the cells of patients with immature phenotype of acute myelogenous leukemia (FAB M1 and M2) was high and was not detected on cells of lymphoid malignancies. Thus, the detection of *c-kit* gene or protein on leukemic cells was useful for determination of the stage of differentiation and the lineages of cells and for diagnosis of leukemia, estimate of its prognosis, and the selection for treatment.

文 献

- 1) 三浦恭定: 血液病学 第二版 文光堂. 2-8, 1995.
- 2) Dexter TM, Allen TD and Lajtha LG: Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol* **91**: 335-344, 1977.
- 3) Torok-Storb B: Cellular interactions. *Blood* **72**: 373-385, 1988.
- 4) Bernstein A, Forrester L, Reith AD, Dubreuil P and Rottapel R: The murine *W*/*c-kit* and *Steel* loci and the control of hematopoiesis. *Semin Hematol* **28**: 138-142, 1991.
- 5) Zsebo KM, Williams DA, Geissler EN, Broudy VC, Martin FH, Atkins HL, Hsu RY, Birkett NC, Okino KH and Murdock DC: Stem cell factor is encoded at the *Sl* locus of the mouse and is the ligand for the *c-kit* tyrosine kinase receptor. *Cell* **63**: 213-224, 1990.
- 6) Witte ON: *Steel* locus defines new multipotent growth factor. *Cell* **63**: 5-6, 1990.
- 7) Huang E, Nocka K, Beier DR, Chu TY, Buck J, Lahm HW, Wellner D, Leder P and Besmer P: The hematopoietic growth factor *KL* is encoded by the *Sl* locus and is the ligand of the *c-kit* receptor, the gene product of the *W* locus. *Cell* **63**: 225-233, 1990.
- 8) Kodama H, Nose M, Yamaguchi Y, Tsunoda J, Suda T and Nishikawa S: In vitro proliferation of primitive hemopoietic stem cells supported by stromal cells: evidence for the presence of a mechanism(s) other than that involving *c-kit* receptor and its ligand. *J Exp Med* **76**: 351-361, 1992.
- 9) Williams DE, Eisenman J, Baird A, Rauch C, Van Ness K, March CJ, Park LS, Martin U, Mochizuki DY and Boswell HS: Identification of a ligand for the *c-kit* proto-oncogene. *Cell* **63**: 167-174, 1990.
- 10) Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ, Chen E, Schlessinger J, Francke U and Ullrich A: Human proto-oncogene *c-kit*: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO* **6**: 3341-3351, 1987.
- 11) Qiu FH, Ray P, Brown K, Barker PE, Jhanwar S, Ruddle FH and Besmer P: Primary structure of *c-kit*: relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family-oncogenic activation of *v-kit* involves deletion of extracellular domain and C terminus. *EMBO* **7**: 1003-1011, 1988.
- 12) Geissler EN, Ryan MA and Housman DE: The dominant-white spotting (*W*) locus of the mouse encodes the *c-kit* proto-oncogene. *Cell* **55**: 185-192, 1988.
- 13) Chabot B, Stephenson DA, Chapman VM, Besmer P and Bernstein A: The proto-oncogene *c-kit* encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse *W* locus. *Nature* **335**: 88-89, 1988.
- 14) Ullrich A and Schlessinger J: Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**: 203-212, 1990.
- 15) Okada S, Nakauchi H, Nagayoshi K, Nishikawa S, Nishikawa S, Miura Y and Suda T: Enrichment and characterization of murine hematopoietic stem cells that express *c-kit* molecule. *Blood* **78**: 1706-1712, 1991.
- 16) Ogawa M, Matsuzaki Y, Nishikawa S, Hayashi S, Kunisada T, Sudo T, Kina T, Nakauchi H and Nishikawa S: Expression and function of *c-kit* in hemopoietic progenitor cells. *J Exp Med* **174**: 63-71, 1991.
- 17) Okada S, Nakauchi H, Nagayoshi K, Nishikawa S, Miura Y and Suda T: In vivo and in vitro stem cell function of *c-kit*- and *Sca-1*-positive murine hematopoietic cells. *Blood* **80**: 3044-3050, 1992.
- 18) Ikeda H, Kanakura Y, Tamaki T, Kuriu A, Kitayama H, Ishikawa J, Kanayama Y, Yonezawa T, Tarui S and Griffin JD: Expression and functional role of the proto-oncogene *c-kit* in acute myeloblastic leukemia cells. *Blood* **78**: 2962-2968, 1991.
- 19) Wang C, Koistinen P, Yang GS, Williams DE, Lyman SD, Minden MD and McCulloch EA: Mast cell growth factor, a ligand for the receptor encoded by *c-kit*, affects the growth in culture of the blast cells of acute myeloblastic leukemia. *Leukemia* **5**: 493-499, 1991.
- 20) Wang C, Curtis JE, Geissler EN, McCulloch EA and Minden MD: The expression of the proto-oncogene *c-kit* in the blast cells of acute myeloblastic leukemia. *Leukemia* **3**:

- 699-702, 1989.
- 21) Bain B and Pshyk K: Enhanced reactivity in mixed leukocyte cultures after separation of mononuclear cell on Ficoll-Hypaque. *Transplant Proc* 4: 163-164, 1972.
 - 22) Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C: Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO) *Br J Haematol* 78: 325-9, 1991.
 - 23) Ohno R, Naoe T, Hirano M, Kobayashi M, Hirai H, Tubaki K and Oh H: Treatment of myelodysplastic syndromes with all-trans retinoic acid. Leukemia Study Group of the Ministry of Health and Welfare. *Blood* 81: 1152-1154, 1993.
 - 24) Oxley S and Sackstein R: Detection of an L-secreting ligand on a hematopoietic progenitor cell line. *Blood* 84: 3299-3306, 1994.
 - 25) Valverde LR, Matutes E, Farahat N, Heffernan A, Owusu-Ankomah K, Morilla R and Catovsky D: C-kit receptor (CD117) expression in acute leukemia. *Ann Hematol* 72: 11-15, 1996.
 - 26) Cole SR, Aylett GW, Harvey NL, Cambareri AC and Ashman LK: Increased expression of c-Kit or its ligand Steel Factor is not a common feature of adult acute myeloid leukaemia. *Leukemia* 10: 288-296, 1996.
 - 27) Di Noto R, Lo Pardo C, Schiavone EM, Manzo C, Vacca C, Ferrara F and Del Vecchio L: Stem cell factor receptor (c-kit, CD117) is expressed on blast cells from most immature types of acute myeloid malignancies but is also a characteristic of a subset of acute promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol* 92: 562-564, 1996.
 - 28) Reuss-Borst MA, Buhning HJ, Schmidt H and Muller CA: AML: immunophenotypic heterogeneity and prognostic significance of c-kit expression. *Leukemia* 8: 258-263, 1994.
 - 29) Kanakura Y, Furitsu T, Tsujimura T, Butterfield JH, Ashman LK, Ikeda H, Kitayama H, Kanayama Y, Matsuzawa Y and Kitamura Y: Activating mutations of the c-kit proto-oncogene in a human mast cell leukaemia cell line. *Leukemia* 8: 18-22, 1994.
 - 30) Nagata H, Worobec AS, Oh CK, Chowdhury BA, Tannenbaum S, Suzuki Y and Metcalfe DD: Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells. *Proc NAS* 92: 10560-10564, 1995.
-