

[原著]

急性骨髄性白血病細胞における *c-kit*/SCF 発現とその意義

趙 龍 桓

(1997年12月10日受付, 1998年2月24日受理)

要 旨

レセプター型チロシンキナーゼである *c-kit* とそのリガンドである stem cell factor (SCF) は初期造血において重要な役割を果たしていることが知られている。*c-kit* と SCF の共発現が autocrine 機序による腫瘍増殖に関与することがある種の腫瘍細胞において想定されているが、白血病細胞での報告は未だない。急性白血病 (AML) の細胞を対象に、*c-kit* と SCF による autocrine 機序を介した細胞増殖について検討した。AML 28症例の白血病細胞を材料に *c-kit* と SCF の specific primer を用いた RT-PCR 法により mRNA の発現を検討し、flow cytometry (FCM) により *c-kit* および SCF の細胞表面への発現を検討した。全例で *c-kit* mRNA の発現を認め、28症例中2例では *c-kit* と SCF の共発現を mRNA レベルと細胞表面蛋白レベルで確認した。共発現例の白血病細胞は低濃度の fetal calf serum (FCS) 添加で増殖し、SCF 中和抗体の添加で増殖が阻害された。また共発現を示した症例の培養細胞上清中に SCF が検出された。以上の結果より、AML の症例中には *c-kit* と SCF が共発現する例があり、autocrine 機序を介して白血病細胞の増殖に関与している可能性が示唆された。

Key words: *c-kit*, SCF, autocrine, RT-PCR, flow cytometry

略語一覧: SCF: stem cell factor

AML: acute myeloid leukemia

FAB: French-American-British classification

RT-PCR: reverse transcription-polymelase chain reaction

FCM: flow cytometry

I. 緒 言

白血病細胞は正常の造血細胞に比較して増殖能の亢進がみられるが、一般には正常造血と同様のサイトカインによる刺激や抑制を受けており、サイトカインに対する反応機構は正常の造血細胞に類似していると考えられる[1]。白血病細胞の旺盛な増殖能を説明する機序の一つとして、白血病細胞から産生されるサイトカインが白血病細胞自体の増殖を恒常的に刺激する、いわゆる autocrine の関与が想定されている。急性骨髄性白血

病 (AML) 細胞の大部分は interleukin-3 (IL-3), granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), granuloctye-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) 等に対するレセプターを発現し、これらのサイトカインに反応することが知られている[2-5]。また一部の急性骨髄性白血病細胞において前述したサイトカインの遺伝子発現がみられたとの報告があり[6-9]、これらは白血病細胞の増殖における autocrine 機序の存在を示唆する。

Stem cell factor (SCF) は248残基のアミノ

酸から成る膜結合型の glycoprotein で[10-13]構造は M-CSF に類似しており[14], cleavage を受け soluble form としても存在する[15,16]。構成的造血の初期に必須なサイトカインであり, 骨髓間質細胞表面に膜結合型として存在する SCF が造血幹細胞の増殖を支持していると考えられる[17]。SCF の受容体である *c-kit* レセプターは, 造血系では多能性幹細胞から lineage committed progenitor cell に至る比較的初期の段階に発現しており, 一部の例外を除いて分化が進むにつれて発現が低下する[18-20]。急性白血病細胞では *c-kit* 発現は細胞の分化段階及び系統を反映し, 急性骨髓性白血病細胞で高率に発現するとされている[21-23]。

近年 SCF と そのレセプターである *c-kit* が共に発現することが腫瘍細胞に一部みられるとの報告があり[24-27], autocrine loop を介した腫瘍細胞の増殖機構として注目される。肺癌特に small cell lung cancer でこの現象が多く報告されているが[28-30], SCF の造血系における役割を考えると, 先に述べた白血病細胞の自律的増殖との関係について検討することは意義があると思われる。

以上より, *c-kit* とそのリガンドである SCF の共発現を急性骨髓性白血病症例で検討し, 増殖との関連を明らかにすることを目的として本研究を行った。

II. 対象と方法

対象症例

当科及び関連施設で経験した急性骨髓性白血病 28 例で, FAB 分類による内訳を表 1 に示す。骨髓有核細胞中に占める白血病細胞の割合が 90% 以

表 1 対象症例

AML		28 例
FAB 分類	M0	2 例
	M1	3 例
	M2	11 例
	M3	3 例
	M4	6 例
	M5	2 例
	M7	1 例

上である症例を対象とした。

方 法

(1) *c-kit* および SCF mRNA の検出

診断確定時の骨髓穿刺により得られた骨髓細胞もしくは末梢血細胞から Ficoll 法[31]を用いて単核細胞を分離した。得られた単核細胞分画から acid-guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform (AGPC) 法にて total RNA を抽出し, 2.5 μ g の RNA を用い Superscript preamplification system (GIBCO 社製) にて reverse transcription (RT) を行い cDNA を合成した。プライマーは図 1-A に示す様に設定し, polymerase chain reaction (PCR) は denaturing 94°C, annealing 60°C, extension 72°C で行った。サイクル数の設定は PCR 産物とサイクル数が直線的関係にある 27 サイクルとした。PCR 産物を Tris-borate-EDTA buffer を用いアガロースゲル電気泳動後, ethidium bromide で染色し UV 下で band を観察した。内部コントロールとして glyceraldehyde

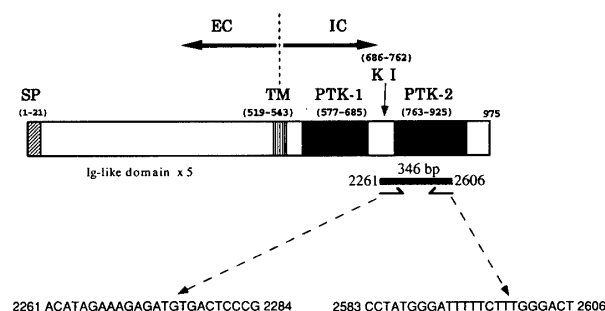


図 1-A *c-kit* の構造と primer の設定

PCR の primer は細胞内 kinase domain に設定した (346bp)。

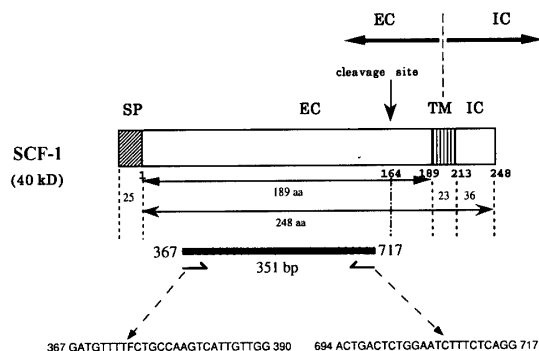


図 1-B SCF の構造と primer の設定

PCR の primer は図の如く細胞外領域に設定した (351bp)。

3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。

SCF についても同様に図 1-B のプライマーで RT-PCR を行い、PCR のサイクル数は基礎検討より 35 サイクルとした。

(2) 細胞表面抗原の検出

a) 細胞表面 *c-kit* の検出

細胞を phosphate buffered saline (PBS) 中に $1 \times 10^6 / \mu\text{l}$ の割合で浮遊させ細胞浮遊液を調整した。細胞浮遊液 $100 \mu\text{l}$ に抗ヒト Fc 抗体 (Pharmingen 社製) を添加した後、FITC 標識抗ヒト *c-kit* 抗体 (ニチレイ社製) $1 \mu\text{g}$ を添加し 15 分間氷上に静置し反応させた。遠沈沈澱画分を PBS で洗浄する操作を 2 回繰り返した後 $500 \mu\text{l}$ の PBS に再浮遊させ、FACScan (Becton Dickinson 社製) を用い解析用ソフトウェア Cell Quest (Becton Dickinson 社製) により解析を行った。

b) 細胞表面 SCF の検出

c-kit の場合と同様にして細胞浮遊液を得た後一次抗体に抗ヒト SCF 抗体 (マウス IgG, ニチレイ社製) を、二次抗体に phycoerythrin (PE) 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Immunotech 社製) を使用し、前述と同様に解析した。

(3) 細胞増殖能の検討

白血病細胞を 96 穴 microplate に 1×10^5 cells/well の割合で撒き、SCF を各濃度で添加し増殖への影響を検討した。

メディウムには 5% fetal calf serum (FCS, Boehringer Mannheim 社製) 添加 Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM, Life Technologies 社製) を使用した。*c-kit* と SCF を共に発現している症例と *c-kit* のみ発現している症例との間で増殖能の比較を行った。

(4) 細胞培養上清中 SCF 濃度の測定

c-kit と SCF を共発現している白血病細胞からの SCF 産生を証明する目的で、共発現例の細胞を 10% FCS 添加 IMDM 中で培養し、培養上清中の SCF 濃度を ELISA 法で測定した。測定には Quantikine Human SCF ELISA kit (R & D Systems 社製) を使用した。

(5) 抗 SCF 中和抗体によるブロッッキング

c-kit と SCF の共発現症例の白血病細胞を 10% FCS 添加 IMDM で培養し、ポリクローナル抗ヒ

ト SCF 中和抗体 (Genzyme 社製) を各濃度で添加した 24 時間後に MTT (microculture tetrazolium colorimetric) assay を行い細胞増殖を評価した。コントロール抗体には抗ヒト IgG 精製抗体 (ヒツジ IgG, Organon Teknika 社製) を用いた。

c-kit と SCF を共に発現した症例の臨床経過

症例 No.5 73 歳女性, AML (M1)。初診時 WBC $29400 / \mu\text{l}$ (blast 95%), LDH 7521 IU/l, 染色体分析で 46, XX。Japan adult leukemia study group (JALSG) AML92 protocol で寛解導入療法施行するも complete remission (CR) に至らず、発症後 1 ヶ月で播種性血管内凝固症候群、多臓器不全にて死亡。

症例 No.25 49 歳女性, AML (M4)。初診時 WBC $104000 / \mu\text{l}$, 染色体分析で 46, XX, inv (16) (p13q22) を認めた。JALSG AML92 protocol で寛解導入療法施行し CR 到達。以後治療に反応性みられるも短期間に再発を繰り返し、4th relapse で死亡された。

III. 結 果

(1) *c-kit* および SCF mRNA 発現

PCR 産物の電気泳動で得られた結果を図 2 に示す。*c-kit* mRNA の発現は 28 例全例で認められたのに対し、SCF mRNA の発現を認めたのは 28 例中骨髓由来の 5 例、末梢血由来の 3 例、計 8

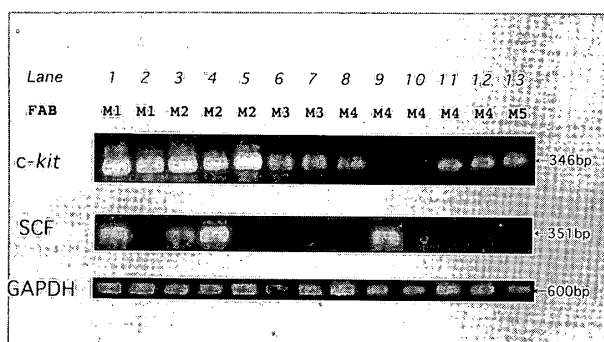


図 2 急性骨髄性白血病細胞における急性 *c-kit*/SCF mRNA の発現

PCR product の泳動結果を示す。図示した全例で *c-kit* mRNA の発現が認められたのに対し、SCF mRNA の発現を認めたのは 4 例のみであった (Lane 1, 3, 4, 9)。

例であった。

(2) 細胞表面抗原発現

c-kit のみ発現を認めた代表的な症例及び *c-kit* と SCF とともに発現を認めた症例の FCM をそれぞれ図 3-A, 図 3-B に示している。

SCF mRNA の発現を認めた 8 例全例で FCM による細胞表面 *c-kit* 蛋白の発現が証明された。

8 例のうち 2 例で細胞表面 SCF 蛋白の発現を認めた (表 2)。

(3) 細胞増殖能

c-kit と SCF の共発現症例の細胞に SCF を添加して培養した結果を図 4-A に示す。SCF は濃度依存性に共発現例の増殖を促進した。

次に共発現例と *c-kit* 単独発現例を SCF 無添加

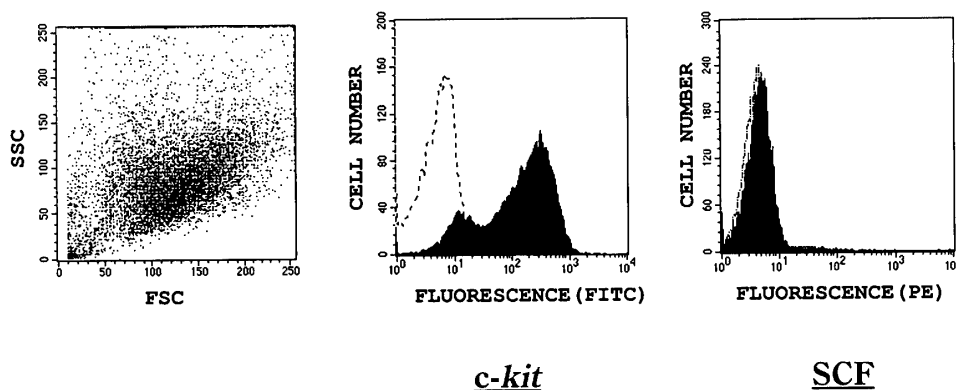


図 3-A FCM による細胞表面抗原の検討

c-kit 陽性, SCF 陰性例 (症例 No. 24 AML M4)

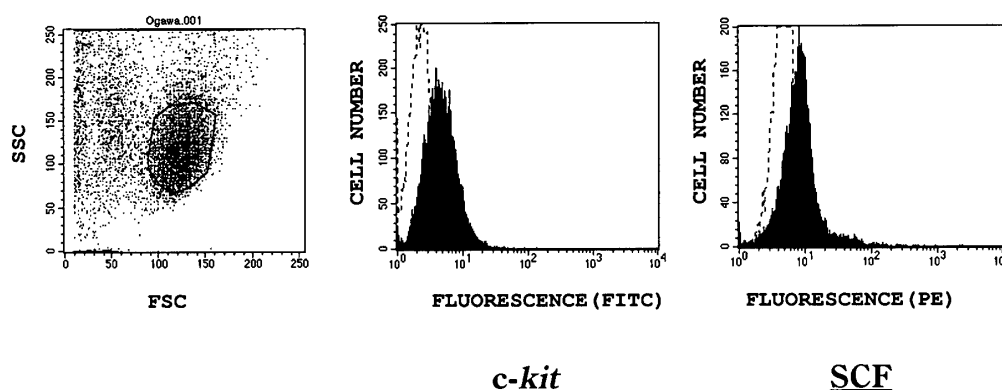


図 3-B *c-kit*/SCF とともに陽性の症例 (症例 No. 5 AML M1)

表 2 急性骨髄性白血病細胞における *c-kit*/SCF 発現

No.	pt's initial	FAB	source	<i>c-kit</i>		SCF	
				(mRNA)	(FCM)	(mRNA)	(FCM)
3	U.A.	M1	BM	P	P	P	N
5	O.M.	M1	PB	P	P	P	P
9	H.A.	M2	BM	P	P	P	N
11	Y.G.	M2	BM	P	ND	P	ND
13	S.A.	M2	BM	P	ND	P	ND
16	K.M.	M2	PB	P	NA	P	NA
25	K.H.	M4	PB	P	P	P	P
27	M.S.	M5	BM	P	P	P	N

BM: bone marrow

P: positive

ND: not done

PB: peripheral blood

N: negative

NA: not assessable

の条件下で培養した際の細胞数の変化を図4-Bに示す。共発現例では細胞数が維持されるのに対し、*c-kit* 単独発現例では細胞数は経時的に減少した。

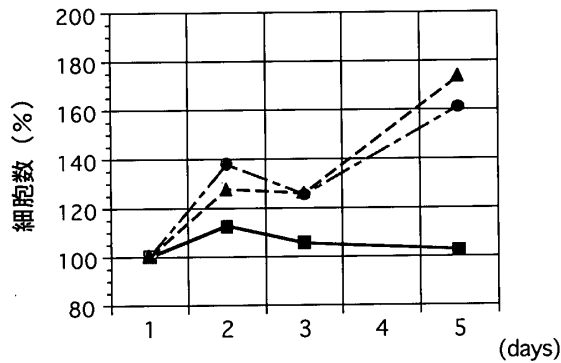


図4-A *c-kit*/SCF 共発現例の増殖と SCF 濃度

■: SCF (-), ●: SCF 1ng/μl,
▲: SCF 10ng/μl

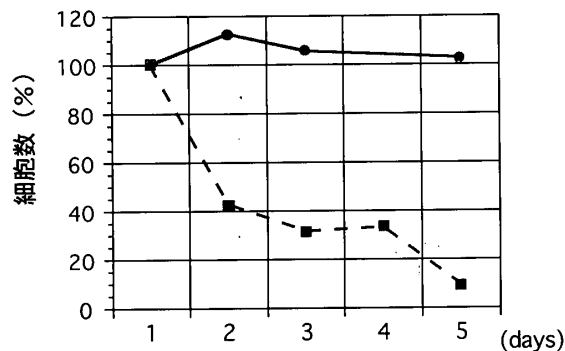


図4-B *c-kit*/SCF 共発現例と *c-kit* 単独発現例の比較

SCF 無添加の条件下で培養し経時的に生細胞数の比較を行った。

●: *c-kit*/SCF 共発現例, ■: *c-kit* 単独発現例

(4) 細胞培養上清中の SCF 濃度

c-kit と SCF の共発現症例の培養細胞上清中の SCF 濃度は、*c-kit* 単独発現例に比し有意な上昇を示した (図5)。

(5) 抗 SCF 中和抗体の増殖に及ぼす影響

図6に結果を示す。*c-kit* と SCF の共発現症例の細胞増殖は抗 SCF 中和抗体添加により濃度依存性に抑制された。

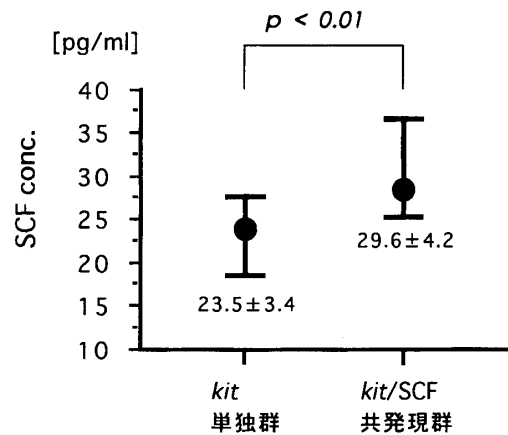


図5 白血病細胞培養上清中の soluble SCF 濃度

c-kit/SCF 共発現群の培養上清中では、*c-kit* 単独発現群に比して SCF 濃度の有意な上昇を認めた。

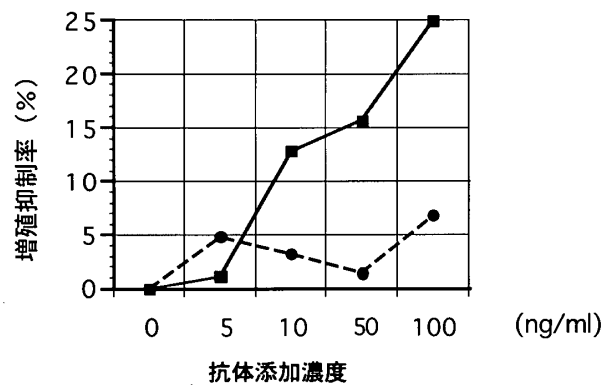


図6 抗 SCF 中和抗体添加による *c-kit*/SCF 共発現例の増殖抑制

■: 抗 SCF 中和抗体, ●: control 抗体

IV. 考 察

造血器悪性腫瘍細胞の増殖における autocrine や paracrine 機序の関与については、多発性骨髄腫細胞の IL-6 を介した増殖を始め現在まで多くの報告がなされている [32-35]。AML 細胞では G-CSF, GM-CSF, IL-3 を始めとする様々なサイトカインレセプターの発現が知られ、実際にこれらのサイトカインに対する反応性が *in vitro* で、一部では *in vivo* で確認されている [2-5]。更に一部の AML 細胞においては G-CSF, GM-CSF, IL-1, IL-3 等のサイトカイン遺伝子の発現がみられ、培養上清中にこれらのサイトカイン産生が認められたとの報告もみられる [6-9]。

In vitro における白血病細胞の増殖は一般に外来性造血因子に依存するが、AML 症例ではかなりの割合で造血因子非依存性の自律的増殖が認められる[36]。Loewenberg は自律的増殖を示す AML 症例は完全寛解率が低く、再発率も高いと報告した[37]。これは造血因子非依存性の増殖を示す白血病クローンが正常造血細胞に比較して有意に高い増殖能を持つことを示していると考えられ、autocrine 機序の関与が白血病の予後に関係している可能性を示すものである。

c-kit-SCF 系は初期造血において重要な役割を担っており、c-kit レセプターは正常造血系細胞においては多能性幹細胞から lineage committed progenitor cell の初期の段階に発現が認められる。他方、急性白血病細胞における c-kit の発現については本研究室の西村が検討しており[38]、c-kit レセプターは AML で全例に検出され、特に未分化なタイプ (FAB 分類 M1, M2) では強い発現がみられたのに対し、急性リンパ性白血病細胞からは検出されず、c-kit 発現の検討は細胞の分化段階、系統を決定するうえで有用であり診断、治療法の選択に重要な情報となり得としている。また、c-kit レセプターの恒常的活性化をもたらす c-kit 遺伝子の突然変異 (Val815→Asp) がマスト細胞性白血病株や骨髄異形成症候群の一部の症例で報告されており[39-42]、M-CSF レセプターの mutation と同様に造血器腫瘍の発症に関与している可能性を示唆したものとして注目される。

本研究は非造血器腫瘍において報告されている c-kit と SCF の共発現の有無を AML において検討し、細胞増殖への関与、臨床的特徴との関連を明らかにすることを目的として行った。RT-PCR 法による検討では、AML 28 例中 8 例で SCF mRNA の発現を認めた。このうち 5 例は骨髄由来の検体で、SCF の細胞表面蛋白としての発現を認めなかった。残る 3 例は末梢血由来の検体で、うち 2 例で FCM によって細胞表面の SCF 発現を検出した。

c-kit と SCF を共に発現している症例を中心に以下の検討を行った。共発現例の細胞は造血因子無添加の培養条件下で c-kit 単独発現例に比して細胞数が維持された。SCF 添加培養では濃度依

存性の増殖を認め、外来性 SCF に対する反応性を有することが示された。また培養上清中の SCF 濃度は共発現例で有意に上昇しており、抗 SCF 中和抗体の添加により共発現例の細胞増殖は濃度依存性に抑制された。以上の知見から、AML の一部症例では c-kit と SCF の共発現が認められ、autocrine 機序がこのような症例の白血病細胞増殖に関与している可能性が示された。

共発現例は 2 例とも治療抵抗性を示したが、共発現と臨床的特徴との関連については症例数が少ないため確定的なことを述べるのは難しい。染色体異常や初診時白血球数等、従来言われている AML の予後規定因子に加え、サイトカインに対する反応性やサイトカイン非依存性の自律的増殖も今後検討していく必要があると考える。

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齋藤康教授に深甚なる謝意を表します。また、直接の御指導を賜りました千葉大学医学部内科学第二講座西村美樹助手に感謝申し上げます。さらに、c-kit primer の供与、有益な御助言を賜り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。また、本研究を支えて頂いた千葉大学医学部内科学第二講座血液研究室並びに関連病院の諸先生方々に心より感謝申し上げます。

SUMMARY

Stem cell factor (SCF) is a pluripotent hematopoietic growth factor which is suggested to play an important role in early stage of constitutive hematopoiesis as the ligand of the c-kit proto-oncogene product. It is reported that some solid tumor cells such as small cell lung cancer, coexpress both c-kit and SCF, and the receptor/ligand system may have an autocrine function in such tumor cell growth. But little is known about the coexpression in hematological malignancies. We examined a panel of 28 acute myeloid leukemia (AML) specimens for coexpression of c-kit and SCF, using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method for mRNA expression, and flow

cytometry (FCM) for cell surface protein expression. *c-kit* mRNA was expressed in all cases tested, and in two cases, coexpression of *c-kit*/SCF was observed at mRNA and cell surface protein levels. These cells grew in spite of a low concentration of fetal calf serum, and the growth was blocked by addition of anti-SCF antibody. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) revealed elevation of soluble SCF levels in the supernatant of such cell culture. Thus, these data suggest that *c-kit*/SCF system may participate in autocrine stimulation of some AML cell growth.

文 献

- 1) Lowenberg B and Touw IP: Hematopoietic growth factors and their receptors in acute leukemia. *Blood* **81**: 281-92, 1993.
- 2) Miyauchi J, Kelleher CA, Yang Y-C, Wong GG, Clark SC, Minden MD, Minkin S and McCulloch EA: The effects of three recombinant growth factors, IL-3, GM-CSF, and G-CSF, on the blast cells of acute myeloblastic leukemia maintained short-term suspension culture. *Blood* **70**: 657-663, 1987.
- 3) Vellenga E, Ostapovicz D, O'Rourke B and Griffin JD: Effects of recombinant IL-3, GM-CSF and G-CSF on the proliferation of leukemic clonogenic cells in short-term and long-term cultures. *Leukemia* **1**: 584-589, 1987.
- 4) Delwel R, Salem M, Dorssers L, Wagemaker G, Clark S and Lowenberg B: Growth regulation of human acute myeloid leukemia: effects of five recombinant hematopoietic factors in serum-free culture system. *Blood* **72**: 1944-1949, 1988.
- 5) Pebusque MJ, Lopez M, Torres H, Carotti A, Guilbert L and Mannoni P: Growth response of human myeloid leukemia cells to colony stimulating factors. *Exp Hematol* **16**: 360-366, 1988.
- 6) Young DC and Griffin JD: Autocrine secretion of GM-CSF in acute myeloblastic leukemia. *Blood* **68**: 1178-81, 1986.
- 7) Rambaldi A, Wakamiya N, Vellenga E, Horiguchi J, Warren MK, Kufe D and Griffin JD: Expression of macrophage colony-stimulating factor and *c-fms* genes in human acute myeloblastic leukemia cells. *J Clin Invest* **81**: 1030-35, 1988.
- 8) Oster W, Cicco NA, Klein H, Hirano T, Kishimoto T, Lindemann A, Mertelsmann RH and Herrmann F: Participation of the cytokines interleukin 6, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin 1-beta secreted by acute myelogenous leukemia blasts in autocrine and paracrine leukemia growth control. *J Clin Invest* **84**: 451-7, 1989.
- 9) Kobayashi S, Teramura M, Sugiura I, Oshimi K and Mizoguchi H: Interleukin-11 acts as an autocrine growth factor for human megakaryoblastic cell lines. *Blood* **81**: 889-93, 1993.
- 10) Williams DE, Eisenman J, Baird A, Rauch C, Ness KV, March CJ, Park LS, Martin U, Mochizuki DY, Boswell HS, Burgess GS, Cosman D and Lyman SD: identification of a ligand for the *c-kit* proto-oncogene. *Cell* **63**: 167-174, 1990.
- 11) Flanagan JG and Leder P: The *kit* ligand: A cell surface molecule altered in steel mutant fibroblast. *Cell* **63**: 185-194, 1990.
- 12) 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**: 213-24, 1990.
- 13) 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**: 225-33, 1990.
- 14) Bazan JF: Genetic and structural homology of stem cell factor and macrophage colony-stimulating factor. *Cell* **65**: 9-10, 1991.
- 15) Anderson DM, Lyman SD, Baird A, Wignall JM, Eisenman J, Rauch C, March CJ, Boswell HS, Gimpel SD, Cosman D and Williams DE: Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble form. *Cell* **63**: 235-43, 1990.
- 16) Langley KE, Bennet LG, Wypych J, Yancik SA, Liu X-D, Westcott KR, Chang DG, Smith KA and Zsebo KM: Soluble stem cell factor in human serum. *Blood* **81**: 656-660, 1993.
- 17) Flanagan JG, Chan DC and Leder P: Transmembrane form of the *kit* ligand growth factor is determined by alternative splicing and is missing in the *Sld* mutant. *Cell* **64**: 1025-1035, 1991.
- 18) 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.
- 19) Ashman LK, Cambareri AC, To LB,

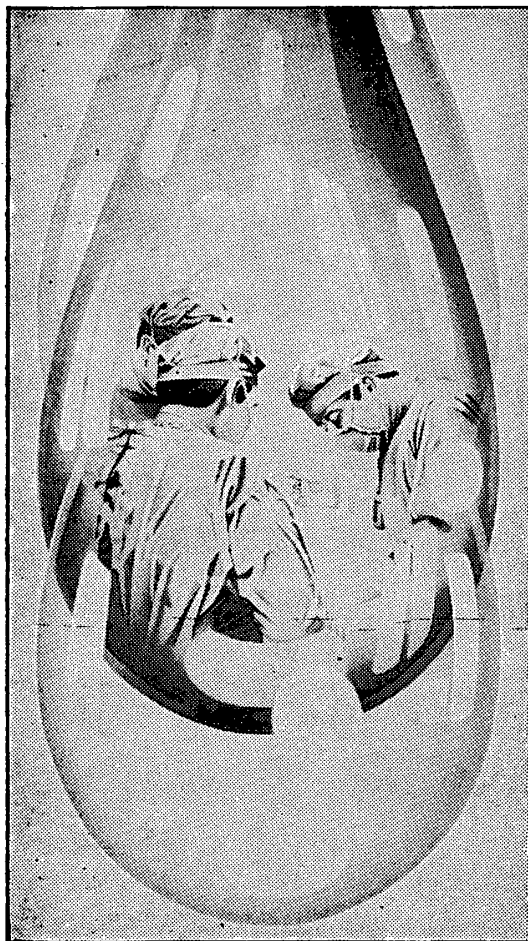
- Leminsky RJ and Juttner CA: Expression of the YB5.B8 antigen (*c-kit* proto-oncogene product) in normal human bone marrow. *Blood* **78**: 30-37, 1991.
- 20) Ratajczak MZ, Kuczynski WI, Sokol DL, Moore JS, Plecher CH and Gewirtz AM: Expression and physiologic significance of *Kit* ligand and stem cell tyrosine kinase-1 receptor ligand in normal human CD34+, *c-Kit*+ marrow cells. *Blood* **86**: 2161-2167, 1995.
 - 21) Broudy VC, Smith FO, Lin N, Zsebo KM, Egrie J and Bernstein ID: Blasts from patients with acute myelogenous leukemia express functional receptors for stem cell factor. *Blood* **80**: 60-67, 1992.
 - 22) Muroi K, Nakamura M, Amemiya Y, Suda and Miura Y: Expression of *c-kit* receptor (CD117) and CD34 in leukemic cells. *Leukemia and Lymphoma* **16**: 297-305, 1994.
 - 23) Noto RD, Pardo CL, Schiavone EM, Manzo C, Vacca C, Ferrara F and Vecchio LD: Stem cell factor receptor (*c-kit*, CD117) is expressed on blast cells from most immature types of acute myeloid malignancies but also a characteristic of a subset of acute promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol* **92**: 562-564, 1996.
 - 24) Tuner AM, Zsebo KM, Martin F, Jacobsen FW, Bennet LG and Broudy VC: Non-hematopoietic tumor cell lines express stem cell factor and display *c-kit* receptors. *Blood* **80**: 374-381, 1992.
 - 25) Cohen PS, Chan JP, Lipkuns kaya M, bieder JL, Seeger RC and The Children's Cancer Group: Expression of stem cell factor and *c-kit* in human neuroblastoma. *Blood* **84**: 3465-3472, 1994.
 - 26) Inoue M, Kyo S, Fujita M, Enomoto T and Kondoh G: Coexpression of the *c-kit* receptor and the stem cell factor in gynecological tumors. *Cancer Res* **54**: 3049-3053, 1994.
 - 27) DiPaola RS, Kuczynski WI, Onodera K, Ratajczak MZ, Hijiya N, Moore J and Gewirtz AM: Evidence for a functional kit receptor in melanoma, breast, and lung carcinoma cells. *Cancer Gene Ther* **4**: 176-182, 1997.
 - 28) Sekido Y, Obata Y, Ueda R, Hida T, Suyama M, Shimokata K, Ariyoshi Y and Takahashi T: Preferential expression of *c-kit* protooncogene transcripts in small cell lung cancer. *Cancer Res* **51**: 2416-2419, 1991.
 - 29) Hibi K, Takahashi T, Sekido Y, Ueda R, Hida T, Ariyoshi Y, Takagi H and Takahashi T: Coexpression of the stem cell factor and the *c-kit* genes in small cell lung cancer. *Oncogene* **6**: 2291-2296, 1991.
 - 30) Rygaard K, Nakamura T and Spang-Thomsen M: Expression of the proto-oncogenes *c-met* and *c-kit* and their ligands, hepatocyte growth factor and stem cell factor, in SCLC cell lines and xenografts. *Br J Cancer* **67**: 37-46, 1993.
 - 31) 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.
 - 32) Kawano M, Hirano T, Matsuda T, Taga T, Horii Y, Iwato K, Asaoku H, Tang B, Tanabe O and Tanaka H: Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature* **332**: 83-85, 1988.
 - 33) Kawano M, Kuramoto A, Hirano T and Kishimoto T: Cytokines as autocrine growth factors in malignancies. *Cancer Surv* **8**: 905-919, 1989.
 - 34) Kawano M, Tanaka H, Ishikawa H, Nobuyoshi M, Iwato K, Asaoku H, Tanabe O and Kuramoto A: Interleukin-1 accelerates autocrine growth of myeloma cells through interleukin-6 in human myeloma. *Blood* **73**: 2145-2148, 1989.
 - 35) Klein B, Zhang XG, Jourdan M, Content J, Houssiau F, Aarden L, Piechaczyk M and Bataille R: Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6. *Blood* **73**: 517-526, 1989.
 - 36) 岡村精一: 白血病における造血因子とそのレセプター. *医学のあゆみ* **171**: 825-828, 1994.
 - 37) Lowenberg B, van Putten WL, Touw IP, Delwel R and Santini V: Autonomous proliferation of leukemic cells in vitro as a determinant of prognosis in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* **328**: 614-619, 1993.
 - 38) 西村美樹: 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. *千葉医学* **73**: 263-270, 1997.
 - 39) Furitsu T, Tsujimura T, Tono T, Ikeda H, Kitayama H, Koshimizu U, Sugawara H, Butterfield JH, Ashman LK, Kanayama Y, Matsuzawa Y, Kitamura Y and Kanakura Y: Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene *c-kit* in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of *c-kit* product. *J Clin Invest* **92**: 1736-1744, 1993.
 - 40) Tsujimura T, Furitsu T, Morimoto M, Isozaki K, Nomura S, Matsuzawa Y, Kitamura Y and Kanakura Y: Ligand

independent activation of *c-kit* receptor tyrosine kinase in a murine mastocytoma cell line P-815 generated by a point mutation. *Blood* 83: 2619-2626, 1994.

- 41) Kitayama H, Kanakura Y, Furitsu T, Tsujimura T, Oritani K, Ikeda H, Sugahara H, Mitsui H, Kanayama Y, Kitamura Y and Matsuzawa Y: Constitutively activating mutations of *c-kit* receptor tyrosine kinase confer factor-independent growth and tumorigenicity of factor-independent hematopoie-

tic cell lines. *Blood* 85: 790-798, 1995.

- 42) 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 of patient who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proc Natl Acad Sci* 92: 10560-10564, 1995.



手術時の血圧管理に

速効性 確実性 調節性 安全性

にすぐれた

ニトログリセリン注射液

（毒指）

ミリスロール[®]注 新発売

（特 性）

1. 速やかに血圧を低下させる。
2. 血圧の調節が容易である。
3. 過剰な血圧低下がおこらない。
4. 安全性にすぐれている。
5. 虚血性心疾患患者の血圧調節に有用である。
6. 安定な水溶液の注射剤である。

（効能・効果）

- 手術時の低血圧維持
- 手術時の異常高血圧の救急処置

（包 装）

2ml: 10, 50アンプル

10ml: 10, 50アンプル

詳細: 添付文書参照、または弊社医薬情報担当者面談。

（健保適用）

日本化薬株式会社

東京都千代田区富士見一丁目11番2号（東京富士見ビル）
TEL. 03(237)5111(代)