7. *c-kit* レセプターを介したヒト白血病細胞の増殖と分化

金 倉 護

大阪大学医学部 第2内科

Role of the Proto-oncogene *c-kit* Product in Proliferation and Differentiation of Human Leukemia Cells

Yuzuru KANAKURA

The Second Department of Internal Medicine, Osaka University Medical School, Osaka

Summary

The *c-kit* proto-oncogene encodes a receptor tyrosine kinase that is considered to play important roles in hematopoiesis. The proto-oncogene *c-kit* product was expressed on various types of human cell lines derived from leukemic cells of erythroid, megakaryocytic and mast cell lineages. Also, the *c-kit* product was detectable in blast cells in most cases of acute myeloblastic leukemia (AML). Tyrosine phosphorylation and activation of the *c-kit* product was induced by treatment with a ligand for *c-kit*, stem cell factor (SCF), resulting in proliferation of some human leukemia cell lines, such as M07E, and blast cells in most cases of AML. In addition, SCF appeared to have an activity in inducing differentiation of human leukemia cells. In some cases, further, the *c-kit* product was activated even before the stimulation with SCF, and the *c-kit* activation was found to be due to point mutations of *c-kit* gene in a human leukemia cell line. These results suggest that *c-kit* proto-oncogene may be involved in excessive proliferation and aberrant differentiation of human leukemia cells, and possibly in leukemogenesis.

緒 言

プロトオンコジーン *c-kit* は、ネコ肉腫ウイルス (Hardy-Zuckerman 4-feline sarcoma virus) に由来する癌遺伝子 *v-kit* の cellular homologue であり、145~165 キロダルトンのチロシンキナーゼレセプターをコードしている¹⁾。*c-kit* 遺伝子産物 (*c-kit* 受容体) は、造血幹細胞やマスト細胞表面に発現されている。一方、*c-kit* 受容体のリガンド [stem cell factor (SCF)] は線維芽細胞などのストローマ細胞表面に発現されているが、この膜結合型以外にもプロテアーゼで切られることにより微量ではあるが可溶性因子としても存在することが知られている¹⁾。

SCF は、*c-kit* 受容体を発現している造血幹細胞やマスト細胞に作用し、血球の増殖・分化にきわめて重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、ヒト白血病細胞の増殖・分化における *c-kit* 受容体の役割については、十分には解明されていない。本稿では、ヒト白血病細胞における、*c-kit* の発現、機能ならびに活性化についての成績を提示し、白血病細胞の異常増殖あるいは白血化における *c-kit* の意義について

考察する。

実験材料、方法および実験成績

1) 白血病細胞における *c-kit* の発現

ヒト白血病細胞株ならびに急性骨髄性白血病 (AML) 細胞における *c-kit* mRNA の発現については Northern blot 法にて検討した²⁾。また、*c-kit* 遺伝子産物については抗 *c-kit* 血清を用いた immunoblot 法、及びヒト *c-kit* 受容体の細胞外ドメインを認識する抗 *c-kit* モノクローナル抗体 (YB5, B8) を用いた flow cytometry にて検討した^{2,3)}。Table 1 に示すように、ヒト白血病細胞株では、赤白血病細胞株 (HEL, LAMA, TF-1)、巨核球性白血病細胞株 (M07E, MEG-01) やマスト細胞白血病細胞株 (HMC-1) に *c-kit* の発現が認められる。しかし、骨髄性白血病細胞株 (HL-60, KG-1, THP-1, U937) やリンパ性白血病細胞株 (Daudi, Raji, MOLT4, CEM) ではほとんど *c-kit* の発現が認められなかった。

一方、骨髄性白血病細胞株では *c-kit* がほとんど発現されていなかったのとは対照的に、ほとんどの急性骨髄性白血病 (AML) 症例では *c-kit* の発現が認めら

Table 1 Expression of *c-kit* and proliferative response to SCF in human leukemia cell lines and AML cells

Types of cells	Expression of <i>c-kit</i> ^a	Proliferative response to ligand for <i>c-kit</i> ^b
Cell lines		
Myeloid		
HL-60	—	—
KG-1	—	—
THP-1	—	—
U-937	—	—
Erythroid		
HEL	+	±
LAMA	+	—
TF-1	+	+
K-562	—	—
Erythroid/Basophil		
KU812F	+	+
Megakaryocytic		
M07E	+	+
MEG-01	+	—
Mast cell		
HMC-1	+	—
Lymphoid		
Dauji	—	—
Raji	—	—
MOLT4	—	—
CEM	—	—
AML (FAB)		
M0	1/1 ^c	1/1 ^d
M1	5/5	3/4
M2	6/6	4/5
M3	2/2	NT ^e
M4	5/6	2/4
M5	4/7	1/2
M6	1/1	NT
M7	2/2	2/2
M/L ^f	0/1	NT
Total	26/31 (84%)	13/18 (72%)

^a Expression of *c-kit* was examined by means of Northern blot, immunoblot, and flow cytometry analyses.

^b Proliferative response to SCF was evaluated by MTT colorimetric assay, ³H-thymidine incorporation, or cell enumeration.

^c No. of *c-kit*-positive cases/No. of total cases tested.

^d No. of cases that proliferative in response to SCF/No. of *c-kit*-positive cases tested.

^e Not tested.

^f Biphenotype of myeloid and lymphoid lineage.

れる。Northern blot 法, immunoblot 法あるいは flow cytometry 等の解析の結果を Table 1 に示すが, 症例により発現強度にかなりの差が存在したが, AML 症例 31 例中 26 例 (84%) に *c-kit* の発現が認められた。また, ほとんどの症例で Northern 法での *c-kit* mRNA のシグナル強度と, immunoblot 法あるいは flow cytometry での *c-kit* タンパクの発現強度はおおよそ相関した。*c-kit* の発現はいずれの病型 (FAB 分類) にも認められたが, その発現頻度, 発現強度に有意の差は認められなかった²⁾。また初発の AML と MDS の経過を経て発症した AML との間にも *c-kit* の発現に差異は認められず, *c-kit* の発現と病態とは相関がなかった。ただし, M4 や M5 などのより分化した表現型を有する症例の一部, および白血病細胞が骨髓系とでリンパ系の両系の性質を有した症例では *c-kit* は陰性であった²⁾。

2) *c-kit* を介したヒト白血病細胞の増殖

c-kit を発現している白血病細胞株や AML 細胞の *c-kit* リガンド [stem cell factor (SCF)] に対する反応性を 3 日間短期培養したのち MTT アッセイ法にて検討した²⁾。

白血病細胞株を用いた検討では, Table 1 に示すように *c-kit* を発現している細胞株でも, SCF に対する反応性に差異が認められた。例えば, ヒト巨核芽球性白血病細胞株 (M07E) は, GM-CSF および IL-3 に反応して増殖し, G-CSF, M-CSF, IL-1, IL-6 には反応しない細胞株であるが, M07E 細胞は, BALB/3T3 細胞の培養上清 (マウス SCF を含む) やヒトリコンビナント SCF にて増殖した⁴⁾。一方, ヒトマスト細胞株 HMC-1 細胞では M07E 細胞とほぼ同等の *c-kit* の発現が認められるにもかかわらず SCF による増殖反応は認められなかった³⁾。

AML 症例を用いた検討では, *c-kit* を発現しているもののうち約 72% の症例で, SCF 単独刺激で AML 細胞の増殖が促された。また, SCF 単独で増殖する AML 症例, 及び, SCF 単独では増殖しない AML 症例でも, GM-CSF などの他の造血因子により相乗的に AML 細胞の増殖が促された (Fig.1)²⁾。

3) *c-kit* を介したヒト白血病細胞の分化

次に, SCF により増殖する AML 症例のうち AML 細胞が未分化な芽球細胞のみで構成されている AML 症例 7 例を用いて SCF による長期培養を試みた。SCF 非存在下ではいずれの症例も AML 細胞の増殖は維持されず, AML 細胞の分化傾向も認められなかった。

Fig.1. Proliferation of AML cells in response to SCF (100 ng/ml) and/or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF, 10 ng/ml). Cell proliferation was measured using MTT assay. The results are shown as the mean $\pm$ SEM of triplicate cultures.

Fig.2. Changes in numbers of AML cells in the long-term culture with or without SCF (100 ng/ml). At various times after the initiation of the culture, the number of viable cells were counted by trypan blue dye exclusion. The data are shown as the mean $\pm$ SEM of triplicate cultures.

しかし、SCF 存在下では、7 例中 5 例で、3~4 週間 SCF により AML 細胞の増殖が維持された (Fig.2). また、培養開始前では、AML 細胞は芽球の形態を示していたが、SCF で 2~4 週間培養後には 5 例中 4 例の AML 細胞は分化傾向を示し、顆粒球/マクロファージ系細胞 (cases 1, 4) あるいはマスト細胞様 (case

Fig.3. Light micrographs of AML cells before and 2-3 weeks after the culture with SCF. Cytospin preparations were stained with May-Grunwald-Giemsa.

7) へと変化した (Fig. 3)⁵⁾. この AML 細胞の形態学的変化は、表面抗原でも確認され、形態変化とともに血液幹細胞抗原 CD34 の低下ならびに各種分化抗原の出現が認められた. 一方、*c-kit* の発現に関しては顆粒球/マクロファージ系細胞への変化の場合には低下し、マスト細胞への変化の場合には発現の低下は認められなかった⁵⁾.

さらに、自己再生能と赤芽球系および好塩基球系に分化能をもつヒト慢性骨髄性白血病 (CML) 細胞株 KU812F を用いても、SCF の増殖および分化に及ぼす作用について検討した. flow cytometry による解析では、*c-kit* は KU812F 細胞の約 20% のみに発現されていた. *c-kit* 陽性 KU812F 細胞を抗 *c-kit* モノクローナル抗体 (YB. B8) を用いて単離し、*c-kit* 陽性 KU812F 細胞を SCF 存在下で培養すると、増殖ばかりでなく赤芽球系への分化が促進された⁶⁾.

以上のことから、SCF は *c-kit* 受容体を介したヒト白血病細胞の増殖ならびに分化を促す作用を有することが示唆された.

4) ヒト白血病細胞における *c-kit* の活性化

現在までにマウス、ラット、ヒトにおいて様々な *c-kit* の遺伝子異常が報告されている¹⁾. これらの *c-kit* 遺伝子異常は、すべてチロシンキナーゼ活性を低下させるものばかりであり、*c-kit* のチロシンキナーゼ活

Fig. 4. (A) Proliferation of M07E cells in response to the indicated concentration of SCF for 52 h with or without genistein (A). Cell proliferation was assessed by MTT assay in the absence of DMSO/genistein (-), or in the presence of 0.03% DMSO (DMSO) or DMSO/genistein (10 or 30 µg/ml). (B) Effect of genistein (30 µg/ml) on SCF-induced tyrosine phosphorylation of *c-kit* product.

性を上昇させる分子異常については明らかにされていない。

SCFにて増殖するM07E細胞を用いてSCFによる増殖反応ならびにSCFによる*c-kit*のチロシンリン酸化を検討した。Fig. 4に示すように、M07E細胞の増殖ならびに*c-kit*のチロシンリン酸化はSCFの濃度依存性に増強された⁴⁾。このSCFによる*c-kit*のチロシンリン酸化の程度と増殖反応性とはきわめて良く相関し、チロシンキナーゼインヒビターであるゲネスチンにより*c-kit*のチロシンリン酸化とM07E細胞の増殖は抑制された⁴⁾。

また、SCF刺激前ならびに刺激後3分、15分後のM07E細胞よりcell lysateを作製し抗*c-kit*抗体を用いて得られた免疫沈降物を用いて、immune complex kinase assayを行うと、SCF刺激前では*c-kit*はほとんど活性化されていないが、SCF刺激により*c-kit*が活性化された (Fig. 5)⁴⁾。

各種AML細胞における*c-kit*の活性化を検討する目的で、*c-kit*蛋白を免疫沈降した後、抗リン酸化チロシン抗体を用いて*c-kit*のチロシンリン酸化を検討した。2症例のAMLについての解析結果をFig. 6に示すが、AML細胞ではSCF刺激により*c-kit*蛋白

Fig. 5. Immune kinase complex assay. M07E cells were stimulated with SCF (100 ng/ml) for the indicated time and lysed, and then *c-kit* product was immunoprecipitated with anti-*c-kit* antibody. The immunoprecipitates were incubated with kinase buffer containing 10 µCi of γ -³²P-ATP for 10 min, and subjected to SDS-PAGE.

Fig. 6. Tyrosine phosphorylation of *c-kit* product in AML cells before and 15 min after stimulation with SCF. The product of *c-kit* was immunoprecipitated with anti-*c-kit* antibody, and immunoblot was performed with anti-phosphotyrosine antibody.

白のチロシンリン酸化が増強された。また、12例中7例で軽微ではあるが、SCF刺激前より*c-kit*のチロシンリン酸化が認められた²⁾。

各種白血病細胞株についてもSCF刺激前後における*c-kit*の活性化を検討するため*c-kit*のチロシンリン酸化をしらべた²⁾。SCFで刺激前後の細胞株より得たwholeのcell lysateを電気泳動した後、抗リン酸化チロシン抗体でimmunoblotを行うと、M07EやHELではSCF刺激前では*c-kit*のチロシンリン酸化はほとんど認められず、SCF刺激により*c-kit*のチロシンリン酸化が増強された。一方、mast cell leu-

Fig.7. Changes in tyrosine phosphorylation of *c-kit* product by SCF-stimulation. HMC-1, M07E and HEL cells were incubated with or without SCF for 15 min, and cell lysates were subjected to immunoblotting with anti-phosphotyrosine antibody.

kemia cell line である HMC-1 細胞では SCF 刺激前より既に *c-kit* はリン酸化されており SCF 刺激による *c-kit* のチロシンリン酸化はほとんど増強されなかった (Fig. 7). そこで, SCF 刺激前の HMC-1, M07E, HEL 細胞より cell lysate を作製し抗 *c-kit* 抗体を用いて得られた免疫沈降物を用いて, immune complex kinase assay を行った. M07E や HEL 細胞では, SCF 刺激前では *c-kit* はほとんど活性化されていなかったのに対し, HMC-1 細胞では, SCF 刺激前より既に *c-kit* が活性化されていた.

c-kit は活性化されるとフォスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3 キナーゼ) と結合することが知られている. そこで, これらの細胞株を用いて SCF 刺激前後における *c-kit* と PI3 キナーゼとの association についても検討した. SCF 刺激前後の細胞株より抗 *c-kit* 抗体を用いて免疫沈降をおこない抗 *c-kit* 抗体あるは抗 PI3 キナーゼ抗体を用いて immunoblot を行った. これらの 3 細胞株ともに, SCF 刺激前後ではほぼ同じ量の *c-kit* 蛋白が免疫沈降された. 一方, PI3 キナーゼは, M07E や HEL 細胞では, *c-kit* が SCF により活性化されて *c-kit* と PI3 キナーゼの結合が生ずるため, PI3 キナーゼは SCF 刺激後のみに抗 *c-kit* 抗体にて免疫沈降されたが, HMC-1 細胞では, SCF 刺激前より *c-kit* は PI3 キナーゼと結合していた⁷⁾.

HMC-1 細胞における *c-kit* の活性化機構を検討するため, まず HMC-1 細胞における SCF 産生能について検討した. RT-PCR 法にて, 陽性対照のヒト線維芽細胞株が SCF を産生していたのに対し, HMC-1 細胞では SCF を産生しておらず, HMC-1 細胞における *c-kit* の活性化はオートクリンな機構によるものではないと考えられた.

そこで, *c-kit* 遺伝子の coding region についての遺伝子解析を行った. 2 個の *c-kit* 対立遺伝子の内, 1 個の *c-kit* 遺伝子は正常であったが, もう一個の *c-kit* 遺伝子内には membrane domain 直下 (アミノ酸コドン 560) とチロシンキナーゼ domain 中の c-terminal に近い領域 (アミノ酸コドン 816) に 2 個の point mutation が認められ, これらの点突然変異が *c-kit* の活性化に関係している可能性が示唆された⁷⁾.

考 案

ヒト血球の増殖・分化には様々な造血因子が関与していることが知られている. 造血因子による血球産生調節機構の中でも, *c-kit*/SCF システムは, 解析の最も進んでいるレセプター/リガンド系の一つであり, *W/W^u* と *Sl/Sl^d* 突然変異マウスで示されたように構造的造血に重要な役割を果たしている.

我々のヒト白血病細胞を用いた検討では, *c-kit* 受容体は, AML 細胞や赤芽球, 巨核球あるいはマスト細胞の形質を有する白血病細胞株において高頻度に *c-kit* の発現が認められた. また, *c-kit* 受容体を発現している症例では, *c-kit* は SCF により活性化され, 約 7 割の症例で AML 細胞の増殖が促されるばかりでなく, 一部の症例では, SCF により白血病細胞の分化も認められた.

c-kit は, CSF-1 (M-CSF) 受容体 (*c-fms*) と類似の構造を有するチロシンキナーゼ型受容体の一種である. *c-fms* 遺伝子に関しては, 一部の白血病症例においていくつかの点突然変異が存在すると報告されており, この *c-fms* 遺伝子の突然変異が, 白血病細胞の腫瘍性増殖に関与している可能性が示唆されている⁸⁾. しかし, CSF-1 はヒト白血病細胞に対しての増殖刺激活性はあまり高くない. 一方, SCF は白血病細胞の増殖を促す作用を有していることを考慮すると, *c-kit* に“活性化突然変異”が存在すれば, 造血幹細胞の白血化, あるいは白血病細胞の異常な分化増殖機構の一端が明らかになると考えられる.

一般に, SCF の非刺激下では *c-kit* はほとんど活性化されておらず, SCF と結合することにより活性化さ

れ、自己リン酸化、PI3 キナーゼなどの基質との結合などの諸反応が惹起されシグナルが伝達されると考えられている。しかし、一部のヒト白血病細胞株あるいは AML 細胞では、SCF の刺激のない状態でも *c-kit* のチロシンリン酸化、活性化が認められた。可種ヒト白血病細胞や細胞株を用いて *c-kit* の活性化の有無について検討すると、ヒトマスト細胞白血病細胞では SCF を全く産生していないにもかかわらず、SCF 刺激前より *c-kit* の恒常的チロシンリン酸化と活性化が認められ、*c-kit* は SCF 刺激前より PI-3 キナーゼと結合していた。また、この白血病細胞では *c-kit* 遺伝子に点突然変異が認められ、この点突然変異が *c-kit* の活性化に関与していることが示唆された。

以上のことから、*c-kit* はヒト骨髄性白血病細胞などに発現されており、リガンドを介し、正常造血ばかりでなく、ヒト白血病細胞の増殖や分化に関与しており、また、ある種のヒト白血病細胞では *c-kit* は恒常的に活性化されており、*c-kit* は腫瘍化あるいは白血病細胞の過剰増殖にも関与している可能性が示唆された。今後、*c-kit* ならびに *c-kit* を介するシグナル伝達経路の詳細な解析を行うことにより、正常造血ばかりでなく、白血病細胞の腫瘍性増殖のメカニズムが明らかになることが期待される。

稿を終わるに当たって、本研究は大阪大学医学部第

二内科の振津琢磨、池田弘和、北山等、菅原浩之、金山良男、松沢佑次諸先生、ならびに大阪大学医学部病理の辻村享、北村幸彦両先生との共同研究であり、共同研究者の方々に深謝いたします。

文 献

- 1) Reith, A.D. and Bernstein, A. : *Genome Analysis*, Volume 3, *Genes and Phenotypes*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p.105 (1991)
- 2) Ikeda, H., Kanakura, Y., Tamaki, T. *et al.* : *Blood*, **78**, 2962 (1991)
- 3) Kanakura, Y., Ikeda, H., Kitayama, H. *et al.* : *Leuk. Lymphoma* (in press)
- 4) Kuriu, A., Ikeda, H., Kanakura, Y. *et al.* : *Blood*, **78**, 2834 (1991)
- 5) Ikeda, H., Kanakura, Y., Furitsu, T. *et al.* : Changes in proliferative potential and phenotype of acute myeloblastic cells in a long-term culture with a ligand for *c-kit*, stem cell factor (submitted)
- 6) Kitayama, H., Kanakura, Y., Furitsu, T. *et al.* : *Int. J. Oncol.* (in press)
- 7) Furitsu, T., Kanakura, Y., Tsujimura, T. *et al.* : *Blood*, **80**, 302a (1992)
- 8) Ridge, S., Worwood, M., Oscier, D. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 1377 (1990)