



# c-KIT receptor expression in cutaneous malignant melanoma and benign melanocytic naevi

大橋, 明子

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1997-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1635

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001635>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	大橋明子 <sup>おおはし あき こ</sup> （兵庫県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	博い第1090号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付	平成9年3月31日
学位論文題目	c-KIT receptor expression in cutaneous malignant melanoma and benign melanocytic naevi (皮膚悪性黒色腫および色素性母斑におけるc-KITレセプターの発現)
審査委員	主査 教授 市橋正光 教授 山村博平 教授 伊東宏

## 論文内容の要旨

### 緒言

癌遺伝子c-kitの産物c-KITはチロシンキナーゼ活性を持つ受容体でマウスにおいてメラノブラストの移動、分化、また、メラノサイトの増殖に重要な働きを担うことが近年明らかにされた。ヒト部分白皮症の家系においてはc-kit遺伝子の欠失および変異が見つかりこの遺伝子異常はc-KITのチロシンキナーゼ活性を損なうことが明らかになった。

チロシンキナーゼ活性を持つ増殖因子の受容体のいくつかは癌遺伝子として同定された遺伝子の発現産物であることが判明し、この遺伝子の変異によるチロシンキナーゼの常時活性状態あるいは発現増強が、癌細胞の自立性増殖を引き起こすことが指摘され、チロシンキナーゼ型受容体は正常および腫瘍細胞の増殖制御に深く関わっているとされている。そこでc-KITのヒト色素細胞の増殖制御および悪性化における機能解析をする目的で培養メラノサイト、メラノーマ細胞におけるc-KITの発現とin vivoでのc-KITの発現につき検討した。

### 方法

パラフィン包埋切片を脱パラフィン後、抗c-KITポリクローナル抗体（K963, IBL社）を一次抗体とし、アビジン ビオチン ペルオキシダーゼ法（DAKO社のLSABキット）にて増感後3-amino-9 ethylcarbazoleを発色源として用い検出した。また、培養メラノサイト、母斑細胞、メラノーマ細胞株からの抽出蛋白を抗c-KIT抗体（K963）にて免疫沈降後、電気泳動し、同抗c-KIT抗体（K963）を使用し、ECLウエスタンブロットイング検出システム（Amersham社）を用いた。

### 結果

正常皮膚及び母斑細胞性母斑におけるc-KITの発現（in vivo）

正常皮膚では表皮基底層及び毛包部のメラノサイト、真皮マスト細胞の細胞膜に一致して抗c-KITの強発現を認めた。先天性及び後天性母斑細胞性母斑では表皮内の母斑細胞は全例陽性、真皮内の母斑細胞は表皮直下にあるA型の母斑細胞を除くと陰性を示した。境界母斑は13例全例で表皮内におい

でも陰性で、青色母斑細胞は全例陰性であった。

悪性黒色腫の色素細胞増殖病変におけるc-KITの発現 (in vivo)

表在性拡大型黒色腫では4例中3例、結節型黒色腫では5例全例でc-KITは陰性化していた。転移巣においては7例中6例では全細胞陰性であったが、リンパ節転移の1例において約50%の細胞が陽性であった。一方、末端部黒子型黒色腫では8例全例において、表皮基底層に位置する黒色腫細胞及び基底層に接して胞巣を形成しているメラノーマ細胞の細胞膜に陽性所見を得たが、基底層から離れて表皮上層に存在する大型の細胞及び垂直に増殖する浸潤性の黒色腫細胞は概ね陰性であった。

培養細胞におけるc-KITの発現

正常ヒトメラノサイトと表皮真皮境界部の母斑細胞において125kDaと145kDaのバンドを認めc-KITの強い発現が見られたのに対し、真皮内の母斑細胞と2株の黒色腫細胞株ではいずれのバンドも認められずc-KITは認められなかった。また、1黒色腫細胞株において正常ヒトメラノサイトより減弱したc-KITの発現を認めた。これらの所見はin vivoの結果とほぼ一致した。

### 考按

ヒト皮膚メラノサイトにおけるc-KITの意義としては、表皮及び毛包部メラノサイトにおいてその発現がみられリガンドKLがケラチノサイトおよび線維芽細胞に生成、放出されることから、KL刺激によりc-KITのリン酸化に始まる一連のチロシンリン酸化が生じ、増殖刺激反応を示すことより、正常皮膚における表皮及び毛包部メラノサイトの正の増殖維持システムの一つと考えられる。

in vivoにおける重要な所見の一つとしては境界型母斑において通常の母斑と異なり、表皮内母斑細胞のc-KIT発現の低下あるいは消失を認めたことである。境界型母斑の名称や位置付けについては議論の多いところではあるが、今回我々が検討したものはいずれも非家族性で黒色腫の合併が見られなかった症例である。bridging等の構築異型及び真皮の変化を伴う境界型母斑はc-KITの発現に関しては通常の母斑細胞とは異なる細胞から構成されていると考えられる。

悪性黒色腫においては、表在拡大型黒色腫、結節型黒色腫および転移巣の細胞においてc-KIT発現の低下あるいは消失を認めたのに対し、末端黒子型黒色腫では表皮基底層に沿った水平増殖部の黒色腫細胞はc-KIT陽性であった。末端黒子型黒色腫の水平増殖部の黒色腫細胞はその他の黒色腫細胞とは異なることがわかり、末端黒子型黒色腫の起源、および多段階癌化過程を解析する一つの手がかりとなると思われる。さらに基底層から離れて孤立性に増殖する細胞が陰性との結果は良性の色素細胞性病変においても表皮直下を除いた真皮内細胞がc-KIT発現の低下あるいは消失を示したことを併せて考えると表皮基底層ケラチノサイトから離れて増殖することができる、すなわち色素細胞が表皮基底層にて増殖制御を受けない場合、c-KIT発現消失が起きると考えられる。

c-KIT発現低下の生化学的機序としては培養前駆マスト細胞においてIL-3, GM-CSF, IL-4添加にてc-kit遺伝子の発現低下が、また肺小細胞癌においてc-mycの強発現に伴いc-kit遺伝子発現低下が生じることが報告されている。色素細胞においても境界型母斑、転移性黒色腫においてPDGF, IL-1, bFGF, TGF- $\alpha$ , IL-3, GM-CSFの発現が見られることが報告されており、色素細胞におけるc-kit発現低下の機序の一つとして、これらサイトカインによるc-kit発現のダウンレギュレーションが考えられる。

結節型黒色腫及び末端黒子型黒色腫の垂直に増殖する黒色腫細胞の少数のクローンにおいてではあるがc-KITの陽性化が見られた。培養黒色腫細胞においてc-KIT陽性黒色腫細胞株はKL刺激に対し増殖抑制を受ける。c-KIT陽性化クローンの意義としてadvanced melanomaにみられるgenetic in

stabilityによりrandomに各種の遺伝子発現がクローナルに誘導されていることを反映しているだけなのか、周囲環境細胞のKLの供給とのバランスによるパラクリンの制御を受けているのかは今後検討の余地が残る。c-KIT発現の制御機序が明らかになれば色素細胞の多段階癌化過程、および発生系列のさらなる解明につながるのではないかとと思われる。

## 論文審査の結果の要旨

癌遺伝子c-kitの産物c-KITはチロシンキナーゼ活性を持つ受容体である。ヒト部分白皮症の家系においてはc-kit遺伝子の欠失および変異が見つかっている。また表皮及び毛包部メラノサイトにおいてc-kit遺伝子の発現がみられる。ケラチノサイトおよび線維芽細胞で生成、放出されるリガンドKLの刺激によりc-KITに始まる一連のチロシンリン酸化が生じ、増殖刺激反応を示すことより、c-KITリガンド系は正常表皮及び毛包部メラノサイトの増殖維持システムの一つと考えられる。チロシンキナーゼ型受容体は正常および腫瘍細胞の増殖制御に深く関わっているとされており、c-KITの正常ヒト色素細胞の増殖制御および悪性化における機能解析の目的で培養メラノサイト、黒色腫細胞におけるc-KITの発現とin vivoでのc-KITの発現につき検討した。方法はパラフィン包埋切片を、抗c-KITポリクローナル抗体(K963, IBL社)を一次抗体とし、アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ法にて免疫染色し、培養メラノサイト、母斑細胞、黒色腫細胞株からの抽出蛋白を抗c-KIT抗体(K963)にて免疫沈降後、電気泳動し、同抗体を使用し、ウェスタンブロッティングを行った。正常皮膚及び母斑細胞性母斑におけるc-KITは表皮基底層及び毛包部のメラノサイト、真皮マスト細胞の細胞膜に一致して強発現を認めた。母斑細胞性母斑では表皮内の母斑細胞は全例陽性、真皮内の母斑細胞は表皮直下にあるA型の母斑細胞を除くと陰性を示した。境界母斑は全例で表皮内においても陰性で、青色母斑細胞は全例陰性であった。悪性黒色腫におけるc-KITの発現は表在性拡大型黒色腫では4例中3例、結節型黒色腫では全例でc-KITは陰性化していた。転移巣においてはリンパ節転移の1例においてのみ約50%の細胞が陽性であったが他は陰性であった。一方、末端部黒子型黒色腫では全例において、表皮基底層に位置する黒色腫細胞及び基底層に接して胞巣を形成している黒色腫細胞の細胞膜に陽性所見を得たが、基底層から離れて表皮上層に存在する大型の細胞および垂直に増殖する浸潤性の黒色腫細胞は概ね陰性であった。また培養細胞におけるc-KITの発現は、in vivoの結果とほぼ一致した。in vivoにおける重要な所見の一つとしては境界型母斑は通常之母斑と異なり、表皮内母斑細胞のc-KIT発現が低下あるいは消失していることである。bridging等の構築異型及び真皮の変化を伴う境界型母斑はc-KITの発現に関して悪性腫瘍細胞と同様の特徴を示したことは臨床的にも異型境界母斑から黒色腫が生じたことと矛盾しない結果であった。末端黒子型黒色腫の水平増殖部の黒色腫細胞はその他の黒色腫細胞とは異なりc-KIT蛋白陽性であることから、末端黒子型黒色腫の起源、および多段階癌化過程を解析する一つの手がかりを提示する重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。