日消外会誌　29（11）：2092～2097，1996年

進行胃癌症例におけるapoptosisと増殖活性の検討

栃木県立がんセンター外科，研究検査部*
稲田　高男　　尾形　佳郎　　市川　　明*　　五十嵐誠治*

術前未治療進行胃癌切除例101例を対象として，組織学的進行度と腫瘍細胞のS期分画（S-phase fraction），apoptosis，*bcl-2*蛋白（Bcl-2）発現を検討し，進行胃癌における増殖活性とapoptosisの関与を検討した．

腫瘍細胞のS-phase fraction，apoptosisはflow cytometryによるapoptosis-DNA二重染色により，Bcl-2発現は免疫組織染色にて検討した．S-phase fractionはstage IV症例において高かったが，他の因子と進行度との関連は見られなかった．apoptosis分画はBcl-2陽性例では陰性例に比べ有意に低く，また組織分化度より見るとBcl-2の発現は未分化型において高率であった．未分化型のS-phase fractionは分化型に比べ高く，S-phase fractionとapoptosis分画の間に逆相関の傾向が認められた．したがってapoptosisそのものは癌進行度との直接関係は認められないが，Bcl-2陽性例では低いことから，腫瘍増殖を規定する一因である可能性が示唆された．

Key words： apoptosis of advanced gastric cancer，*bcl-2* oncoprotein and apoptosis

はじめに

癌の悪性度を規定する主要な因子の1つとして，腫瘍の増殖能が考慮され，これまで主に細胞増殖能の観点から種々の検討がなされてきた[1)~3)]．しかしながら生体内における腫瘍の増殖は，腫瘍細胞の増殖能とcell lossのバランスによって規定されると考えられる．その意味でcell lossの本体と考えられるapoptosisに対する検討が必要と考えられる．またapoptosisの検討方法としても，従来の形態学的検討[4)]，DNAの電気泳動におけるladder formationの検討[5)]に加えて，GavrieliらのTUNEL法[6)]によりDNA断片化を標識することにより，apoptosisを定量的かつ組織標本上で検討する事が可能となった．一方，apoptosisは，癌遺伝子，癌抑制遺伝子により制御されていることが知られており[7)8)]，その中で癌遺伝子*bcl-2*はapoptosisを抑制することがいくつかの実験により示されている[7)9)]．また*bcl-2*蛋白（Bcl-2）は免疫組織染色において検討可能[10)11)]であり，その発現と腫瘍悪性度との関連がfollicular lymphoma，乳癌，大腸癌などにおいて報告されている[12)~15)]．今回，進行胃癌切除例101例を対象とし，apoptosis，Bcl-2の発現と細胞増殖能の指標としてのcell cycleにおけるS期分画（S-phase fraction），DNA indexと個々の症例の組織学的進行度との関連を検討した．

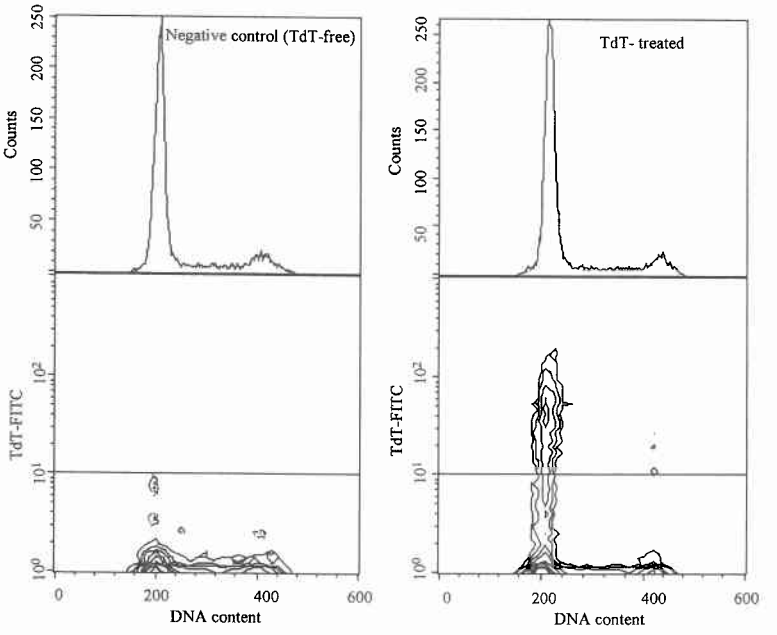
＜1996年7月10日受理＞別刷請求先：稲田　高男
〒320　宇都宮市陽南4－9－13　栃木県立がんセンター外科

対象と方法

対象：対象は1986年から1995年の間に当センターにおいて切除された進行胃癌症例101例で，すべて腺癌症例であり，術前に化学療法，放射線療法などは施行されていない切除材料である．腫瘍は切除後20％緩衝ホルマリンで1～2日間固定し，パラフィン包埋した．

*Apoptosis*の検出および*Flow cytometer*による解析：主病巣部位の厚さ50μmパラフィン切片よりHedley等[16)]の方法に準じ，単離細胞を得た．すなわち脱パラフィンの後，37°C，citrate buffer trypsinと16時間振盪接触し，濾過後，70％ethanolにて再固定した．apoptosisの同定は，MEBSTAIN Apoptosis kit（Medical & Biological Laboratories Co.，Ltd.，名古屋）を使用し，TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling法[6)]にて行い，Flow cytometerにて解析を行った．すなわち腫瘍細胞を40％proteinase Kと37°C，20分接触後，TdT加ビオチン化dUTPと1時間，37°C下で振盪接触させた．1時間後，TB bufferと15分間接触にて反応を終了させた後，ビオチン化FITCにて標識した．さらにRNase A（Sigma，St. Louis，USA）と反応の後，propidium iodideにて核染色を行った．また各症例ごとにTdT加ビオチン化dUTPと反応させず，それ以外は同様の処理を行った

Fig. 1 An example of DNA-apoptosis dual analysis by flow cytometry

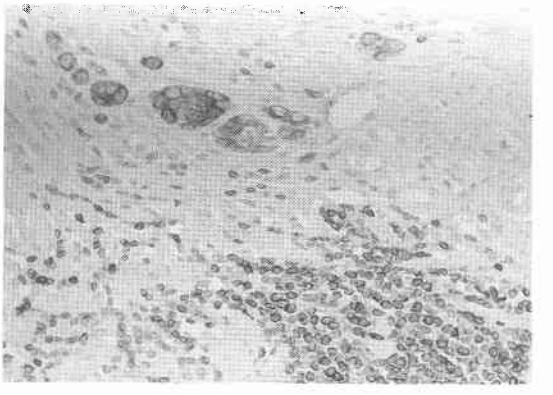


陰性対照を設定した．Apoptosis分画はFACScan flow cytometer(Becton Dickinson, SanJose, USA)にて計測し，CELL Quest (Becton Dickinson) にて計算の後，陰性対照における値を除した数値をapoptosis分画とした．また同時に腫瘍細胞のDNA index，S-phase fractionをMod Fit (Becton Dickinson) にて計算した．

Bcl-2 染色：Apoptosisの検討に用いた同一パラフィン・ブロックより厚さ3μmの切片を作成し，免疫染色を行った．脱パラフィン後，H_2O_2加methanolおよびスキムミルクにて内因性ペルオキシダーゼ阻止後，オートクレーブにて121°C，5分間処理し，抗原賦活を行った．一次抗体としてマウス抗ヒト *bcl-2* 抗体(DAKO，東京)と20倍希釈にて室温で60分反応させた後，avidin-biotin peroxidase complex法(LSAB kit, DAKO)にて行い，核染色はhematoxylinにて行った．染色結果の検討は，胃粘膜下リンパ濾胞あるいは腫瘍周囲に浸潤するリンパ球を対照として，Bcl-2陽性，陰性に分類した．なお，各症例の臨床病理学的因子の分類は，胃癌取扱い規約[17]に従った．

統計学的解析はt検定およびカイ2乗検定により行い$p<0.05$をもって，有意差ありと判定した．数値は平均値±標準偏差で表した．

Fig. 2 Immunohistochemical staining for *bcl-2* oncoprotein (×180): positive staining cancer cells and lymphocytes



結　果

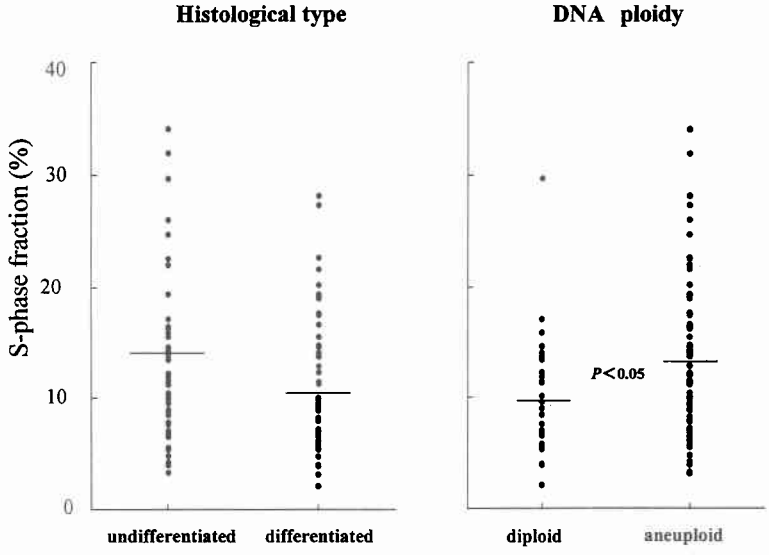
Apoptosis分画値は，症例により，かなりの差異が認められ，最小値0.02%，最大値21.95%であり，その平均は6.21±4.75%であった．また殆どの症例においてFITCで標識されたapoptosis分画はDNAヒストグラム上G_0G_1期に分布していた(**Fig. 1**)．また個々の症例のS-phase fractionもapoptosis分画と同様に症例による差異が認められ，最小値2.21%，最大値34.15%，平均値12.17±6.79%であった．

Table 1　Apoptosis, Bcl-2 expression, S-phase fraction and DNA ploidy of each histogical stage of gastric cancer

Stage	n	Apoptotic fraction (%)	Bcl-2 positive case (%)	S-phase fraction (%)	Aneuploid case (%)
I	13	5.93±3.52	53.8	8.26±4.61	76.9
II	21	8.96±5.78	23.8	11.03±5.49	66.7
III	32	5.80±4.88	50.0	10.83±6.28	65.6
IV	35	6.05±5.00	31.4	15.52±7.37*	77.1

*p<0.02 to other stages

Fig. 3　S-phase fraction on histological type and DNA ploidy



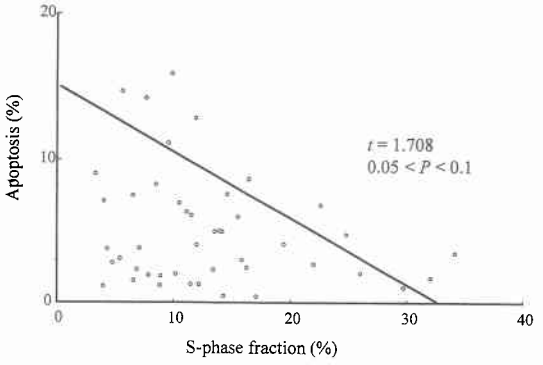
免疫染色による Bcl-2陽性細胞は，正常胃粘膜においても粘膜下リンパ濾胞のリンパ球および腫瘍に浸潤するリンパ球において陽性所見が認められた．また腫瘍においては101症例中，39例（38.6%）において陽性細胞が認められ，陽性症例においては，一般的に腫瘍先進部において陽性強度が高く，かつ核膜において著明であった（**Fig. 2**）．

DNA index では，29例が DNA index が 1 であり，diploid 症例，72例が DNA index が 1 より大きく aneuploid 症例であった．

これら 4 因子と組織学的進行度との関係を検討してみると，apoptosis，Bcl-2陽性率，aneuploid 症例の率と組織学的進行度との間に，一定の関係は認められなかった（**Table 1**）．しかしながら S-phase fraction と組織学的進行度との間には，組織学的進行度が増すに従い，S-phase fraction が高くなる傾向が認められ，stage IV 症例と他 stage との間には有意差が認められた（p<0.02）．

そこで次に個々の症例の増殖活性を最も表現していると考えられる S-phase fraction と他の factor との関連を検討した．また上記の Bcl-2，DNA index，apoptosis と共に，癌組織型による差異を検討した．組織型は por1，por2，sig，muc を未分化型，pap，tub1，tub2を分化型として分類した．対象症例101例中，未分化型は45例，分化型は56症例であった．その結果，apoptosis，Bcl-2と S-phase fraction との間には特に一定の関係を見いだせなかったが，他の 2 因子，すなわち組織型と S-phase fraction の間には，未分化型腺癌症例において S-phase fraction（13.03±7.54%）が高く，分化型腺癌において S-phase fraction（11.47±6.09%）が低い傾向であった（p<0.1）（**Fig. 3**）．diploid，aneuploid の別においては，diploid 症例の S-

Fig. 4 Relationship between apoptosis and S-phase fraction of undifferentiated cell type



phase fraction 10.06±5.46%，aneuploid症例のS-phase fraction 13.02±7.11%とaneuploid症例においてS-fractionは有意に高かった（$p<0.05$）.

Bcl-2発現とapoptosisの間にはBcl-2陰性群のapoptosis分画は7.25±5.16%(n=62)，陽性群においては4.56±3.48%（n=39）と陽性群において有意にapoptosis分画が少なかった.

次に対象症例を組織型別に未分化型45例と分化型56例に分けてみると，Bcl-2陽性率は未分化型53.3%(24例/45例)，分化型26.8%（15例/56例）と有意差（$p<0.01$）をもって未分化型において陽性率が高かった．またapoptosis分画は未分化型4.99±3.95%，分化型7.20±5.13%と有意差（$p<0.05$）をもって分化型においてapoptosis分画の占める割合が高かった.

未分化腺癌症例においては，S-phase fractionとapoptosisの間でS-phase fractionが高い症例で，apoptosis分画が低い傾向が認められた（**Fig. 4**）．しかしながら分化型腺癌症例においては，全対象症例の検討と同様の結果であった.

考　察

組織切片より細胞の増殖活性を検討する方法としては，PCNA染色，Ki-67染色などが行われており[3)18)19)]，両者とも細胞周期のS期周辺の細胞を特異的に検討する方法であり，今回検討したflow cytometryによるS-phase fractionはさらに特異的に腫瘍細胞の増殖活性を直接的に表現していると考えられる.

今回の検討においてS-phase fractionにより検索した増殖活性は，組織学的進行度と相関がうかがわれ，増殖活性の高い腫瘍は，結果として進行度も高く，細胞学的悪性度が高い可能性が示唆された．またそのS-phase fractionとDNA indexと相関が認められたことは，従来からaneuploid症例はdiploid症例に比べて，悪性度が高く，増殖活性も高いという報告[16)]と一致した．apoptosis，Bcl-2は全対象症例の検討では，組織学的進行度とも，S-phase fractionとも，一定の関係は見出せなかった．しかし，Bcl-2陽性群と陰性群においてはapoptosisの陽性率に差が認められ，Bcl-2陽性例においては，apoptosisが抑制されている可能性が認められた．Bcl-2は，follicular lymphoma，乳癌，非小細胞肺癌，結腸癌などにおいて悪性度との関連が指摘されている．今回の検討においては，Bcl-2発現そのものとS-phase fraction，組織学的進行度と関連は認められず，悪性度との関連は認められなかった．胃癌は組織分化度によるbehaviorの差が認められ[20)~22)]，それぞれ浸潤，転移形式が異なり，胃癌全体で検討する事における困難性があげられる.

そこで対象症例を組織型別に検討してみると，まず*bcl-2*蛋白陽性率において，未分化型腺癌において陽性率が高かった．S-phase fractionは未分化型腺癌が，分化型腺癌に比べて高く，逆にapoptosisは未分化型に比べて，分化型において高いという，両群間における差異が認められ，またapoptosisとS-phase fractionは逆相関の傾向が認められた．すなわち未分化型腺癌においては，分化型に比べ，Bcl-2発現が高く，その結果としてapoptosisは低く，増殖活性は高く，悪性度が高い可能性が示唆された．同様の検討としてはKasagiら[23)]は高分化型9例，未分化型5例と少数例の検討ではあるが，高分化型胃癌においてapoptosis分画が有意に高いがPCNA，P53，Le^yの発現との関連は認められなかったと報告しており，またSaegusaら[24)]は胃癌におけるBcl-2発現を検討し，われわれの結果とは逆に，分化型においてBcl-2陽性率が未分化型に比べて高いと報告している.

また今回検討した癌遺伝子*bcl-2*がapoptosisを抑制するのとは，逆に癌抑制遺伝子p53はapoptosisを促進するとされており[8)]，また一方，p53の異常発現と癌の悪性度との検討も胃癌を含めた種々の癌において検討され，多くの報告においてp53の異常発現と悪性度との相関が報告されている[25)~28)]．さらにwild typeのp53がBcl-2発現自体を抑制するbax protein発現を促進するとの報告もある[29)]．したがって今後，さらに症例数を増加し，p53を含めた詳細な検討が必要と考えている.

文 献

1) Okazaki N, Yoshino M, Yoshida T, et al: Evaluation of the prognosis for small hepatocellular carcinoma based on tumor volume doubling time. Cancer 63: 2207—2210, 1989
2) Ohyama S, Yonemura Y, Miyazaki I: Proliferative activity and malignancy in human gastric cancers. Significance of the prliferation rate and its clinical application. Cancer 69: 314—321, 1991
3) Inada T, Imura J, Ichikawa A et al: Proliferative activity of gastric cancer assessed by immunostaining for proliferating cell nuclear antigen. J Surg Oncol 54: 146—152, 1993
4) Wyllie A, Kerr JFR, Kurrie AR: Cell death: the significance of apoptosis. Int Rev Cytol 6: 251—306, 1980
5) Selins KS, Cohen JJ: Gene induction of irradiation leads to DNA fragmentation in lymphocytes. J Immunol 139: 3199—3206, 1987
6) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SS: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol 119: 493—501, 1992
7) Stewart BW: Mechanism of apoptosis: integration of genetic, biochemical, and cellular indicators. J Natl Cancer Inst 86: 1286—1296, 1994
8) Liu T, El-Naggar AK, McDonnell TJ et al: Apoptosis induction mediated by wild-type p53 adenoviral gene transfer in squamous cell carcinoma of head and neck. Cancer Res 55: 3117—3122, 1995
9) Korsmeyer S: bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. Blood 80: 879—886, 1992
10) Hockenbery D, Zutter M, Hickey W et al: Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. Proc Natl Acad Sci USA 88: 6961—6965, 1991
11) Umeyama S, Kawai K, Osamura RY et al: Antigen retrieval for bcl-2 protein in formalin-fixed, paraffin-embedded sections. Pathol Int 45: 103—107, 1995
12) Yunis JJ, Mayer MG, Arnesen MA et al: bcl-2 and other genomic alternations in the prognosis of large-cell lymphoma. N Engl J Med 320: 1047—1054, 1989
13) Pezzela F, Turley H, Kuzu I et al: bcl-2 protein in non-small-cell lung carcinoma. N Engl J Med 329: 690—694, 1993
14) Hague A, Moorghren M, Hicks D et al: Bcl-2 expression in human colorectal adenomas and carcinomas. Oncogene 9: 3367—3370, 1994
15) Gasparini G, Barbareschi M, Doglioni C et al: Expression of bcl-2 protein predicts efficacy of adjuvant treatments in operable node-positive breast cancer. Clin Cancer Res 1: 189—198, 1995
16) Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW: Application of DNA flow cytometry to paraffin-embedded archival material for the study of aneuploidy and its clinical significance. Cytometry 6: 327—333, 1985
17) 胃癌研究会編：胃癌取扱い規約. 改訂12版. 金原出版，東京，1993
18) Leonardi E, Girlando S, Serio G et al: PCNA and Ki-67 expression in breast carcinoma: Correlations with clinical and biological variables. J Clin Pathol 45: 416—419, 1992
19) Bravo R, MacDonald-Bravo H: Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: Association with DNA replication sites. J Cell Biol 105: 1549—1554, 1987
20) Ming SC: Gastric carcinoma: A pathological classification. Cancer 39: 2475—2483, 1980
21) Noda S, Soejima K, Inokuchi K: Clinicopathological analysis of the intestinal type and diffuse type of gastric carcinoma. Jpn J Surg 10: 227—283, 1980
22) Lauren P: The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. Acta Pathol Microbiol Scand 64: 31—49, 1965
23) Kasagi N, Gomyo Y, Shirai H et al: Apoptotic cell death in human gastric carcinoma: Analysis by terminal deoxynucleotydyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling. Jpn J Cancer Res 85: 939—945, 1994
24) Saegusa M, Takano Y, Okayasu I: Bcl-2 expression and its association with cell kinetics in human gastric carcinoma and intestinal metaplasia. J Cancer Res Clin Oncol 121: 357—363, 1995
25) Yamaguchi A, Kurosaka Y, Fushida S et al: Expression of p53 protein in colorectal cancer and its relationship to short-term prognosis. Cancer 70: 2778—2784, 1992
26) Iwaya K, Tsuda H, Hiraide H et al: Nuclear p53 immunoreaction associated with poor prognosis of breast cancer. Jpn J Cancer Res 82: 835—840, 1991

27) Martin HM, Filipe I, Morris RW et al: p53 expression and prognosis in gastric carcinoma. Int J Cancer 50 : 859—862, 1992
28) Tamura G, Kihana T, Nomura T et al: Detection of frequent *p53* gene mutations in primary gastric cancer by cell sorting and polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism analysis. Cancer Res 51 : 3056—3058, 1991
29) Miyashita T, Reed JC: Tumor suppresser p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. Cell 80 : 293—299, 1995

Apoptosis and Proliferative Activity of Advanced Gastric Cancer

Takao Inada, Yoshiro Ogata, Akira Ichikawa* and Seiji Igarashi*
Department of Surgery and Laboratory*, Tochigi Cancer Center

We investigated the significance of apoptosis in advanced gastric cancer and its relation to the expression of *bcl-2* oncoprotein, S-phase fraction and DNA ploidy. We examined apoptosis by the TUNEL method using flow cytometer, *bcl-2* oncoprotein by immunohistochemistry and clinicopathological features in 101 resected advanced gastric carcinomas, which were not treated by preoperative chemotherapy or radiotherapy. DNA ploidy and S-phase fraction were also determined by flow cytometry. Among these factors, only the S-phase fraction showed a correlation with the histological stage of gastric carcinoma. The expression of *bcl-2* oncoprotein was significantly correlated with a low apoptotic positive cell fraction and frequently observed in undifferentiated cell type carcinoma than differentiated type. The S-phase fractions of undifferentiated cell type were greater than those of differentiated cell type and showed a tendency of a reverse correlation with apoptosis. These results indicate that apoptosis which is regulated *bcl-2* has some influence on the proliferative activity of gastric carcinoma.

Reprint requests: Takao Inada Department of Surgery, Tochigi Cancer Center
Yohanan 4-9-13, Utsunomiya-city, 320 JAPAN