

胃癌術前化学療法における P53依存性アポトーシス誘導経路の検討

昭和大学医学部第2外科学教室

長山 裕之 河村 正敏 草野 満夫

P53依存性アポトーシス誘導経路の中に化学療法の奏効度を予知する因子が存在するかどうかの検討を試みた。術前化学療法を施した胃癌30例(5'-DFUR 経口投与群17例, CDDP 静注群13例)に対し, P53, Bax および Bcl-2の免疫組織染色を行った。化学療法の効果の指標には組織学的効果判定, Ki-67 Labeling Index および Lewis Y (Le^y) 陽性率を用いた。経口投与群, 静注群のいずれでも化学療法後の Le^y陽性率は組織学的効果判定と有意な相関を認めた(p<0.05)。静注群では, 生検組織での P53陽性率は組織学的効果判定, 化学療法後 Le^y陽性率のいずれにおいても陰性群に比べて化学療法の効果が有意に低かった(p<0.05)。経口投与群でも, 生検組織での P53陽性率は化学療法の効果が低い傾向であった。以上, 生検組織での P53免疫染色は術前化学療法の効果予測因子となりえることが臨床例において示唆された。

Key words: neoadjuvant chemotherapy for gastric cancer, apoptosis, P53, Bax, Bcl-2

目 的

切除不能,あるいは遠隔転移巣を有するなど治癒切除を期待できない進行胃癌は現在なお予後不良であり,手術療法だけでなく化学療法(以下,化療と略記)などを併用する集学的治療が施されることが多い。術前化学療法(neoadjuvant chemotherapy)は,主病巣あるいは切除不能病巣の縮小により外科的切離面を得やすくし,down stagingにより郭清範囲の縮小や臓器機能温存を図るなどを目的に集学的治療の一環として施行される¹⁾。しかし,術前化学療法により必ずしも一定の効果が得られるわけではない。その効果を事前にある程度予測可能とする因子があれば,術前化学療法の施行を検討する際に大きな手がかりとなることは間違いない。胃癌の化療で多く用いられる5-FUやCDDPは癌細胞にアポトーシスを誘導することが報告されており²⁾³⁾,アポトーシス誘導に関連する物質の中には化療の奏効度について重要な情報を与えるものが存在すると考えられるが,その経路に関しては不明な点が多い。そのなかで比較的よく研究されている経路としてP53を介するアポトーシス誘導経路があげられる。今回,P53依存性アポトーシス誘導経路に関連する遺伝子産物としてP53蛋白,Bax蛋白,Bcl-2蛋白を選び,その発現と化療効果とを比較検討することによ

り術前化学療法の奏効度を予知する指標となりえるかどうかを検討した。化療効果の指標としては胃癌取扱い規約⁴⁾に準じた組織学的効果判定を用いた。また,アポトーシスの指標として糖鎖抗原Lewis Y(以下,Le^yと略記)の染色陽性率を算出,癌細胞増殖能の指標としてKi-67 Labeling Index(以下,L.I.と略記)を算出し,組織学的効果判定とともに化療効果の指標として用いた。

方 法

1988年から1995年までに,当院で胃癌と診断され術前化学療法を施行の後手術された胃癌症例30例(男:女=22:8,平均63.6歳)を対象とした。早期癌症例では患者自身に胃癌と告げ,術前の待機期間に抗癌剤投与を行う旨を説明し同意を得た。また,進行癌症例では患者自身または家族に胃癌と告げ,集学的治療の一環として術前化学療法を施行する旨を説明し同意を得た。深達度は,早期癌5例(m 4例,sm 1例),進行癌25例(mp 3例,ss 7例,se 9例,si 6例)であった。分化度は,分化型15例(pap. 4例,tub₁ 3例,tub₂ 8例),未分化型15例(por₁ 5例,por₂ 8例,muc. 2例)であった。stageはIa 3例,Ib 7例,II 3例,IIIA 6例,IIIB 2例,IVA 1例,IVb 8例であった。術前化学療法としては,17例に対しては5'-DFURを2.1g/day経口投与とし,1週間4投3休を1クールとして3~4クールを施行(経口群=p.o. group),13例に対してはEAP(etoposide, adriamycin, CDDP)療法など

<1998年1月14日受理>別刷請求先:長山 裕之
〒142-0064 東京都品川区旗ノ台1-5-8 昭和大学医学部第2外科

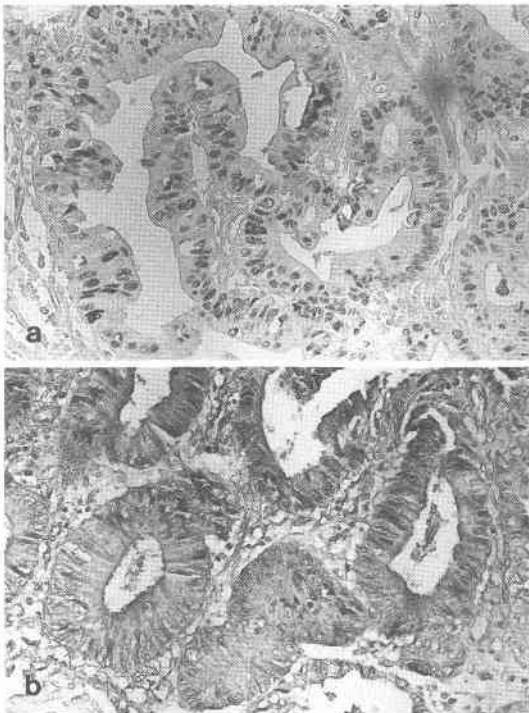
に準じて1週間にCDDP 50~100mg投与を1クールとして1~2クール静脈内投与した(静注群=i.v. group)。

各症例につき、化学療法前の生検組織標本および手術後切除標本を10%ホルマリン固定パラフィン包埋し、4 μ mの連続切片を作成した。この切片に対し、H-E染色を行うとともに、P53, Bcl-2, Bax, Ki-67, Le ν についてペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン-ビオチン法にて免疫組織染色を施した。

P53染色は、ウサギポリクローナル抗ヒトP53抗体(Novocastra社, CM1)を1次抗体として100倍希釈して用いた。1次抗体を用いないプレパラートを1枚作成し、陰性コントロールとした。染色性の評価は、P53蛋白の過剰発現やP53遺伝子異常を反映し、かつアーチファクトを否定するため、他文献^{5)~10)}を参考とし、核に染色が認められる癌細胞が腺管単位でびまん性または単状集ぞく性に分布し癌組織全体の5%以上に認められるものを陽性とした(Fig. 1-a, b)。

Fig. 1 Result of P53 immunohistochemical staining in gastric carcinomas.

a: P53 immunoreactivity was apparent in the nuclei of carcinoma cells. ($\times 200$), b: negative control. ($\times 200$)



Bax染色は、ウサギポリクローナル抗ヒトBax抗体(SANTA CRUZ社, N-20)を1次抗体とし100倍希釈して用いた。1次抗体を用いないプレパラートを1枚作成し、陰性コントロールとした。癌細胞の細胞質濃染が認められるものの割合が癌組織全体の30%以上であるものを陽性とした(Fig. 2-a, b)。

Bcl-2染色は、マウスモノクローナル抗ヒトBcl-2抗体(DAKO社, Clone 124)を1次抗体として100倍希釈して用いた。1次抗体を用いないプレパラートを1枚作成し、陰性コントロールとした。癌細胞の細胞質濃染が認められるものの割合が癌組織全体の30%以上であるものを陽性とした(Fig. 3-a, b)。

Ki-67染色は、マウスモノクローナルKi-67抗体(DAKO社, MIB1)を1次抗体として100倍希釈して用いた。1症例につき癌組織中の3か所にて1,000個あたりの癌細胞中、核に濃染を認めるものの割合を百分率で表し、この平均をKi-67 L.I.とした(Fig. 4)。

Le ν 染色は、1次抗体にマウスモノクローナル抗

Fig. 2 Result of Bax immunohistochemical staining in gastric carcinomas.

a: Bax immunoreactivity was found in the cytoplasm of carcinoma cells. ($\times 200$), b: negative control. ($\times 200$)

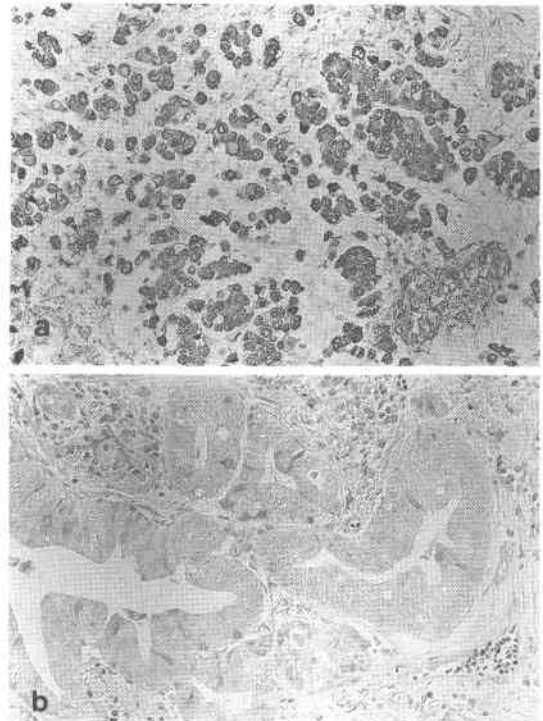


Fig. 3 Result of Bcl-2 immunohistochemical staining in gastric carcinomas.

a: Bcl-2 immunoreactivity was found in the cytoplasm of carcinoma cells. ($\times 200$), b: negative control. ($\times 200$)

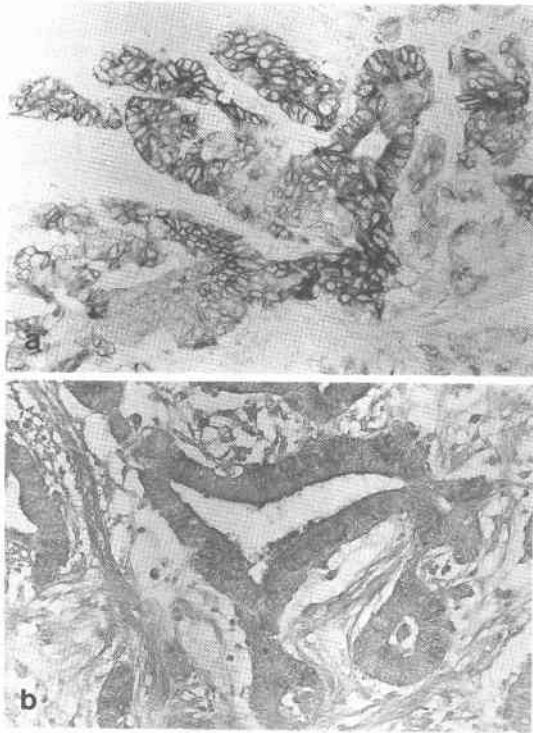


Fig. 4 Staining of gastric carcinomas with Ki-67 antibody. Ki-67 immunoreactivity was apparent in the nuclei of carcinoma cells. ($\times 40$)



Lewis Y 抗体 (DAKO 社, BM-1) を100倍希釈して使用した。面積測定には接眼マイクロメーターを用いて、癌細胞の細胞質に濃染を認める部分の占める方眼数を計測し、癌組織全体の方眼数に対する割合を算出した。

計測は最大腫瘍径を通る切片上の腫瘍部分すべてにおいて行った。そして濃染部が30%未満のもの、30%以上60%未満に濃染を認めるもの、60%以上に濃染を認めるものの3段階に分類した (Fig. 5)。

また、各症例において胃癌研究会編の胃癌取扱い規約⁹⁾における判定基準に則り病理医2人により判定された組織学的効果判定を用いた。

なお、統計処理には Wilcoxon 符号順位和検定, Mann-Whitney 検定, χ^2 検定および Fisher 法を使用し, $p < 0.05$ を有意差ありとした。また、臨床病理学的用語は胃癌取扱い規約⁹⁾に従って記載した。

成 績

1. 化療前後における各パラメーターの変化

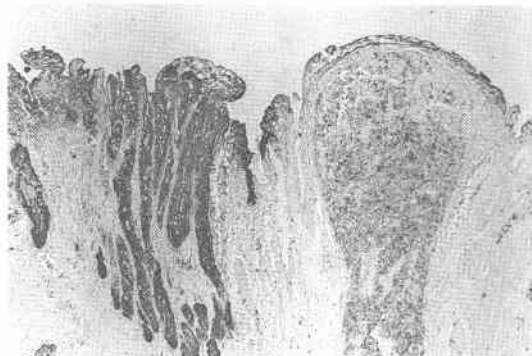
a. P53

化療前 P53陽性例は経口群 6例 (35.3%), 静注群 4例 (30.8%), 計10例 (33.3%) で薬剤別の陽性率に有意差はなかった。化療後 P53陽性例は経口群 5例 (29.4%), 静注群 4例 (38.8%), 計 9例 (30%) で薬剤別の陽性率に有意差はなかった。個々の症例において化療前後で P53の判定が一致したものは30例中29例 (96.7%) で、有意な相関を認めた ($p < 0.0001$)。

b. Bax

化療前 Bax 陽性例は経口群 4例 (23.5%), 静注群 6例 (46.2%), 計10例 (33.3%) で薬剤別の陽性率に有意差はなかった。化療後 Bax 陽性例は経口群 3例 (17.6%), 静注群 8例 (61.5%), 計11例 (36.7%) であり、化療後 Bax の陽性率は CDDP 群で有意に高かった ($p < 0.05$)。個々の症例において化療前後で Bax の判定が一致したものは30例中21例 (70%) で、

Fig. 5 Staining of gastric carcinomas with Le^y antibody. Le^y immunoreactivity was apparent in the cytoplasm of carcinoma cells ($\times 40$), but the same area was Ki-67 negative (show Fig. 4).



有意な相関は認められなかった。

c. Bcl-2

化療前 Bcl-2陽性例は経口群 3 例 (17.6%)、静注群 4 例 (23.3%)、計 7 例 (23.3%) で薬剤別の陽性率に有意差はなかった。化療後 Bcl-2陽性例は経口群 5 例 (29.4%)、静注群 6 例 (46.2%)、計 11 例 (36.7%) で薬剤別の陽性率に有意差はなかった。個々の症例において化療前後で Bcl-2の判定が一致したものは 30 例中 27 例 (90%) で、有意な相関を認めた ($p < 0.0001$)。

2. 化療前後における Ki-67L.I.の変化

Ki-67L.I. は、経口群では化療前平均 50.06 ± 13.80 、化療後平均 36.59 ± 12.47 と化療後に有意に減少し ($p < 0.005$)、静注群でも化療前平均 46.00 ± 7.67 、化療後平均 40.77 ± 13.54 と化療後に減少傾向であった。30 例全体では化療前平均 48.30 ± 11.56 、化療後平均 38.40 ± 12.89 と化療後に有意な減少を認めた ($p < 0.01$)。

3. 化療前後における Le^y陽性率の変化

Le^y陽性率は、経口群では化療前平均 21.47 ± 16.56 、化療後平均 29.12 ± 20.02 と化療後に増加傾向であり、静注群でも化療前平均 16.54 ± 15.19 、化療後平均 31.92 ± 20.57 と化療後に増加傾向であった。30 例全体では化療前平均 19.33 ± 15.91 、化療後平均 30.33 ± 19.95 と化療後に有意な増加を認めた ($p < 0.01$)。なお、同一症例においては Ki-67染色と Le^y染色の陽性部分は相反する分布を呈していた (Fig. 4, 5)。

4. 組織学的効果判定

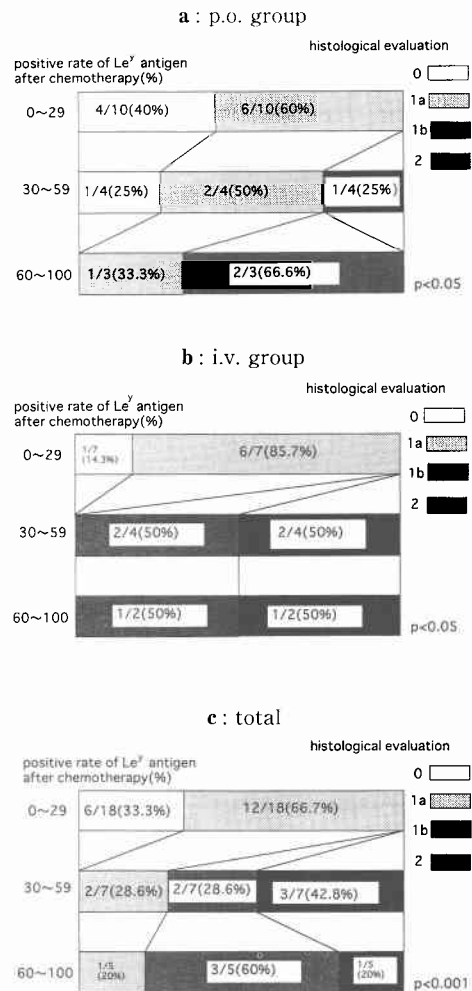
組織学的効果判定は、経口群では grade 0 が 5 例、grade 1a が 9 例、grade 1b が 2 例、grade 2 が 1 例であった。静注群では grade 0 が 1 例、grade 1a が 6 例、grade 1b が 3 例、grade 2 が 3 例であり、両群間に有意差は認められなかった。30 例全体では grade 0 が 6 例、grade 1a が 15 例、grade 1b が 5 例、grade 2 が 4 例、grade 3 は存在しなかった。

5. 組織学的効果判定と化療後 Le^y陽性率および化療後 Ki-67L.I. の関係

経口群、静注群とも、組織学的効果判定 grade 0 の症例ではすべて化療後 Le^y陽性率 30% 未満であり、組織学的効果判定 grade 1b 以上の症例ではすべて化療後 Le^y陽性率は 30% 以上であった ($p < 0.05$)。30 例全体でも組織学的効果判定と化療後 Le^y陽性率とは有意な相関を示した ($p < 0.01$) (Fig. 6)。化療後 Ki-67L.I. は組織学的効果判定とは有意な相関を認めなかった。

6. 各パラメーターと化療効果

Fig. 6 The relation between positive rate of Le^y antigen after chemotherapy and histological evaluation.

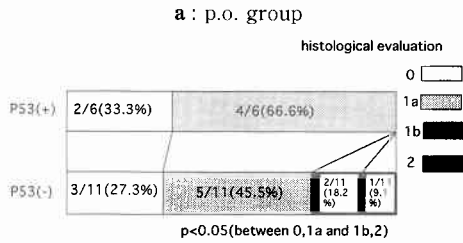


P53, Bax, Bcl-2のいずれかが化療効果予知因子となりえるかどうかを検討するため、化療前生検組織の P53, Bax, Bcl-2それぞれの陽性群と陰性群との間で組織学的効果判定、化療後の Le^y陽性率、化療後の Ki-67L.I. に差が認められるかどうか検討した。

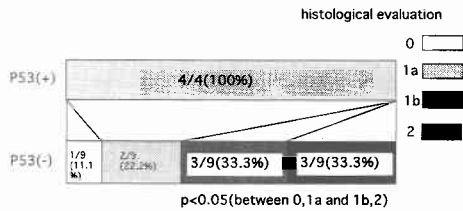
a. P53

経口群、静注群とも、化療前 P53陽性群では組織学的効果判定の grade 1b 以上は存在せず、化療前 P53陽性群は陰性群より組織学的効果判定での化療効果が有意に低かった ($p < 0.05$)。30 例全体でも化療前 P53陽性群は陰性群より組織学的効果判定での化療効果が有意に低かった ($p < 0.05$) (Fig. 7)。経口群では P53陽性

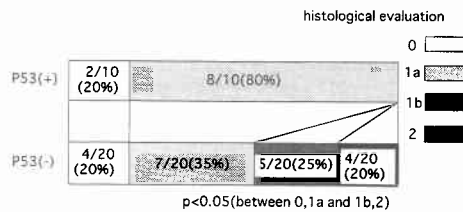
Fig. 7 Correlation between P53 before chemotherapy and histological evaluation.



b : i.v. group



c : total



群 6 例中 5 例が化療後 Le^y陽性率30%未満と化療効果の低い傾向であった。静注群でも P53陽性群は 4 例全例化療後 Le^y陽性率が30%未満で陰性群より有意に化療効果が低かった (p<0.05)。30例全体でも化療前 P53陽性群は陰性群より有意に化療後 Le^y陽性率が低かった (p<0.05) (Fig. 8)。経口群、静注群とも、化療前 P53陽性群と陰性群との間に化療後 Ki-67L.I. の有意差は認められなかった。

b. Bax

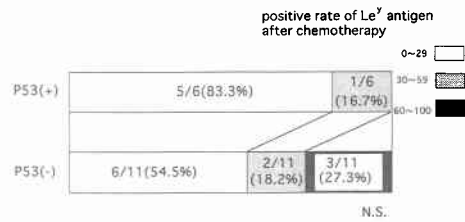
経口群、静注群とも、化療前 Bax の陽性群と陰性群との間で、組織学的効果判定、化療後 Le^y陽性率、化療後 Ki-67 L.I. のいずれにも有意差を認めなかった。

c. Bcl-2

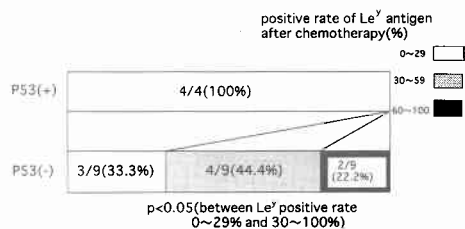
経口群、静注群とも、化療前 Bcl-2陽性群と陰性群との間で、組織学的効果判定、化療後 Le^y陽性率のいずれにも有意差を認めなかった。しかし、経口群の化療後 Ki-67L.I. は化療前 Bcl-2陽性群で46.33±5.51、化療前 Bcl-2陰性群で34.50±12.65と化療前 Bcl-2陰性

Fig. 8 Correlation between P53 before chemotherapy and positive rate of Le^y antigen after chemotherapy.

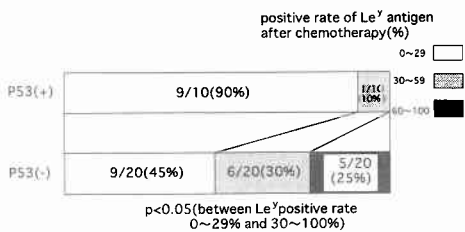
a : p.o. group



b : i.v. group



c : total



群で低い傾向にあり、静注群でも化療後 Ki-67L.I. は化療前 Bcl-2陽性群で47.75±16.07、化療前 Bcl-2陰性群で37.67±11.96と化療前 Bcl-2陰性群で低い傾向であった。30例全体でも化療後 Ki-67L.I. は化療前 Bcl-2陽性群で47.14±1.82、化療前 Bcl-2陰性群で35.73±12.21と化療前 Bcl-2陰性群で有意に低かった (p<0.05) (Table 1)。

7. Bax と Bcl-2の発現パターンと化療効果

Bax と Bcl-2とは二量体を形成し、その組み合わせによりアポトーシス誘導における役割が異なるという説¹⁾を考慮し、Bax と Bcl-2の発現パターンを Bax (-) Bcl-2 (-)、Bax (-) Bcl-2 (+)、Bax (+) Bcl-2 (-)、Bax (+) Bcl-2 (+) の 4 パターンに分け、化療効果と比較してみた。

化療前生検組織における Bax と Bcl-2の発現パ

Table 1 Correlation between Bcl-2 before chemotherapy and Ki-67 L.I.

	Bcl-2	before chemotherapy	after chemotherapy
p.o. group	(+)	47.00 ± 5.29	46.33 ± 5.51
	(-)	50.71 ± 15.09	34.50 ± 12.65
i.v. group	(+)	42.00 ± 4.55	47.75 ± 16.07
	(-)	47.78 ± 8.30	37.67 ± 11.96
total	(+)	44.14 ± 5.18	47.14 ± 11.82*
	(-)	49.57 ± 12.72	35.73 ± 12.21*

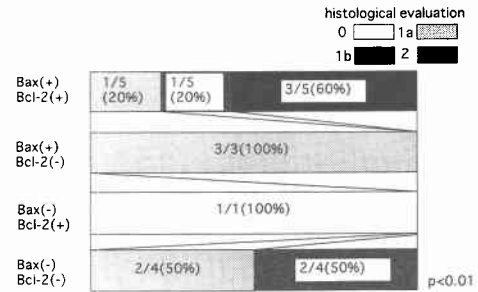
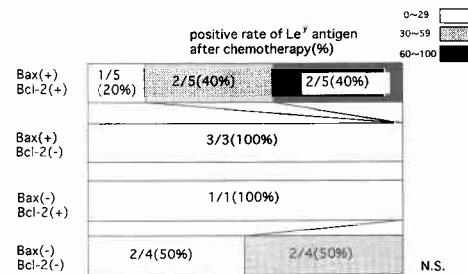
*p<0.05

ターンは、経口群では Bax(-) Bcl-2(-) 10例, Bax(-) Bcl-2(+) 3例, Bax(+) Bcl-2(-) 4例, Bax(+) Bcl-2(+) 0例で、静注群では Bax(-) Bcl-2(-) 5例, Bax(-) Bcl-2(+) 2例, Bax(+) Bcl-2(-) 4例, Bax(+) Bcl-2(+) 2例であり、両群間に有意差はなかった。化療前の Bax と Bcl-2 の発現パターンは、経口群、静注群とも、組織学的効果判定、化療後 Le^y発現率、化療後 Ki-67L.I. のいずれにも有意差を認めなかった。

化療後の Bax と Bcl-2 の発現パターンは、経口群では Bax(-) Bcl-2(-) 9例, Bax(-) Bcl-2(+) 5例, Bax(+) Bcl-2(-) 3例, Bax(+) Bcl-2(+) 0例, 静注群では Bax(-) Bcl-2(-) 4例, Bax(-) Bcl-2(+) 1例, Bax(+) Bcl-2(-) 2例, Bax(+) Bcl-2(+) 5例で、静注群で有意に Bax(+) Bcl-2(+) が多かった(p<0.05)。経口群では組織学的効果判定、化療後 Le^y陽性率、化療後 Ki-67L.I. のいずれも各群間で有意差を認めなかった。静注群では、組織学的効果判定 grade 1b 以上は Bax(-) Bcl-2(-) か Bax(+) Bcl-2(+) で有意差を認め(p<0.01) (Fig. 9), 化療後 Le^y陽性率30%以上は Bax(-) Bcl-2(-) か Bax(+) Bcl-2(+) で、化療効果の高い傾向にあった (Fig. 10)。

考 察

癌に対する化学療法の研究は最近まで癌細胞の強い増殖能に主眼が置かれてきた。近年、アポトーシスの概念が提唱され、細胞死と抗癌剤との関係が見直されるようになったが、抗癌剤によるアポトーシス誘導の機序はまだ解明されていない。一方で癌抑制遺伝子として脚光を浴びた p53はその遺伝子産物 P53蛋白の転写誘導因子としての性質が明らかとなり、その primary-response gene として bax¹²⁾などが挙げられ

Fig. 9 Correlation between patterns of Bax, Bcl-2 after chemotherapy and histological evaluation in i.v. group.**Fig. 10** Correlation between patterns of Bax, Bcl-2 after chemotherapy and Le^y positive rate after chemotherapy in i.v. group.

るようになった。Baxはそのhomodimerがアポトーシスを誘導し、Bcl-2はBaxとheterodimerを形成することによりアポトーシスを阻害すると言われて¹¹⁾。またP53はBaxのinducerかつBcl-2のrepressorであると報告され¹³⁾、P53を介するアポトーシス誘導経路が次第に明らかとなりつつある。また、マウス線維芽細胞を用いた実験ではP53の欠損による抗癌剤耐性化が報告されており¹⁴⁾、P53を介するアポトーシス誘導経路の異常は化療効果の低下につながる可能性がある。臨床例でもP53依存性アポトーシス誘導経路と化療効果との関係を明確にすることは重要であると考え、術前化学療法の前後でP53, Bax, Bcl-2の発現の有無を評価し、それぞれの発現がアポトーシス誘導などの化療効果に影響するかどうかを検討した。アポトーシスの評価法としてはTUNEL (TdT-mediated dUTP-X nick end labeling) 法や、光顕による形態学的評価法などが現在よく用いられる。しかし、TUNEL法では壊死組織も検出され、2~3年以上前の標本では検出感度が著しく低く、光顕による評価はかなりの習熟を要する。そこで今回、糖鎖抗原であるLe^yをアポ

トーススの指標として選択した。Le^vは、胃癌などのヒト癌に高頻度に発現が認められ、癌関連抗原と考えられてきた¹⁵⁾。最近、抗 Le^v抗体を用いた免疫組織染色では①PCNAと相反する陽性像の分布を示す、②TUNEL法の陽性部分と相関する陽性像の分布を示すが、ネクロシス部分は検出されない、③形態学的にアポトーシスの前段階の細胞も陽性となる、という結果が見られ、アポトーシス細胞やその前段階の細胞に Le^vが高頻度に出現すると報告された¹⁶⁾。今回の結果でも、化療後 Le^v陽性率の高値群では組織学的効果判定でも化療効果が高く、Le^v発現率がアポトーシスを反映することを示唆していた。また、化療後に Ki-67 L.I. が有意に減少し、Le^vの陽性率が有意に増加したことは、化療により胃癌細胞にアポトーシスが誘導され、残存細胞において休止期細胞の割合が増加したことが考えられる。すなわち、CDDP や 5'-DFUR は増殖期にある胃癌細胞にアポトーシスを誘導したと考えられる。

経口群、静注群とも、化療前の生検標本における P53 陽性群は、陰性群に比べて組織学的効果判定で化療効果が低く、化療後の Le^v陽性率も低かった。免疫組織化学的に染色される P53 蛋白はほとんどが変異型であると言われ¹⁷⁾、この結果は化療前生検標本において変異型 P53 の発現している胃癌では、アポトーシスが誘導され難く、5'-DFUR や CDDP による化療効果が低くなることを示唆する。しかし、今回の症例の中には化療前 P53 が陰性にもかかわらず組織学的には化療効果が全く認められない例があり、P53 非依存性のアポトーシス誘導経路が化療効果に関与している可能性も考えられ、今後の検討を要する。また、P53 陽性例は化療効果が高かったとする乳癌¹⁸⁾や食道癌¹⁹⁾における報告もあり、臓器別や組織別による検討を重ねることも重要である。

Bax の発現は今回の検討では化療前、化療後ともに組織学的効果判定、Le^v発現率、P53 発現などに有意な相関を認めなかった。Bax は同一症例において化療前後で発現の有無が一致しない例が多く、静注群では化療後の Bax 陽性率が増加している。この結果から Bax は化療により発現が変化する可能性がある。卵巣癌の培養細胞による実験では、CDDP 処理後 12~24 時間で Bax の mRNA も Bax 蛋白も著名に増加したと報告されている²⁰⁾。Bax は、ある一時点の標本で免疫組織化学的に評価するのは難しく、経時的な定量が必要であると考えられた。定量による評価と化療効果と

の比較が今後の課題であろう。

化療前生検標本での Bcl-2 陽性群と陰性群との間では、組織学的効果判定、Le^v陽性率、P53 発現などに有意な相関を認めなかった。しかし、Ki-67 L.I. は全体平均で化療後に低下していたにもかかわらず、Bcl-2 陽性群では陰性群に比べて化療後に Ki-67 L.I. が有意に高かった。このことは、Bcl-2 陽性例では増殖活性が高い癌細胞も化療後に死滅せず残存している可能性を示唆している。Bcl-2 陽性癌細胞は増殖活性が相対的に低い故に、Bcl-2 陽性群のほうが予後良好であるという肺癌での報告もあり²¹⁾、Bcl-2 発現の有無と細胞増殖活性が相互に関連を持って化療や予後に影響する可能性が考えられる。

基礎実験より推察されたアポトーシス誘導における Bax と Bcl-2 の相互作用¹¹⁾から考えると、切除標本では Bax 陽性 Bcl-2 陰性の発現パターンにおいて最もアポトーシスが誘導されていることが予想され、未治療の胃癌切除標本においては Bax 陽性 Bcl-2 陰性に最もアポトーシス誘導が認められたとの報告も見られる²²⁾。しかし、今回の結果では静注群において化療後の切除標本で Bax 陽性 Bcl-2 陽性または Bax 陰性 Bcl-2 陰性の発現パターンにおいて組織学的な化療効果が有意に高かった。化療後の標本において Bax 陽性 Bcl-2 陽性のパターンで化療効果が高いということは、Bcl-2 の存在下で化療により Bax が発現した時に初めて量的関係によるアポトーシス誘導が起こると考えれば理解できる。すなわち、Bcl-2 がアポトーシス抑制的に働いているところに Bax がその作用を中和するという「Bcl-2 アクティブ説」を肯定することになる。しかし、Bax 陰性 Bcl-2 陰性のパターンでも一方のみ陽性の場合より化療効果が高いことは説明できず、Bax と Bcl-2 の量的関係によらないアポトーシス誘導経路の存在も考慮する必要があると思われる。また、免疫組織染色では、Bax と Bcl-2 の正確な定量は不可能であり、Bax と Bcl-2 の双方が存在すれば Bax 陽性 Bcl-2 陽性となる可能性は高い。よって、Bax と Bcl-2 の相互作用を今回の結果より説明することは難しく、Bax および Bcl-2 の蛋白定量による発現パターンの分析が今後の課題である。しかし、化療後の Bax 発現率は静注群で有意に高く、また、化療後に Bax 陽性かつ Bcl-2 陽性のパターンを認めるのは静注群のみであったことなどを考慮すると、抗癌剤の種類によってアポトーシス誘導における Bax と Bcl-2 の相互作用の様式が異なることも考えられ、化療における Bax と Bcl-2 の

相互作用はいまだ研究の余地があると考えられる。

以上、胃癌術前化学療法におけるアポトーシス誘導とP53に関連した遺伝子産物の発現および遺伝子異常について述べた。治療前生検での変異型P53発現の有無は術前化学療法の効果予測因子となる可能性があるが、Bax, Bcl-2については今後も検討を要すると考えられた。癌細胞におけるアポトーシス誘導経路の異常を検索することは、化学療法の効果予測につながる可能性があり、今後の臨床応用が期待される。

文 献

- 1) Frei E III: Clinical Cancer Research: An embattled species. *Cancer* 50 : 1979—1992, 1982
- 2) Yoshioka A, Tanaka S, Hiraoka O et al: Deoxyribonucleoside triphosphate imbalance. *J Biol Chem* 262 : 8235—8241, 1987
- 3) Barry MA, Behnke CA, Eastman A: Activation of programmed cell death (Apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem Pharmacol* 40 : 2353—2362, 1990
- 4) 胃癌研究会編: 胃癌取扱い規約, 改訂第12版, 金原出版, 東京, 1993
- 5) Iggo R, Gatter K, Bartek I et al: Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 335 : 675—679, 1990
- 6) Tohdo H, Yokozaki H, Haruma K et al: p53 gene mutations in gastric adenomas. *Virchows Arch B Cell Pathol* 63 : 191—195, 1993
- 7) 片岡正文, 岡林孝弘, 中島 明ほか: 大腸癌, 胃癌, 肺癌症例における癌抑制遺伝子 p53の免疫組織学的検討およびSSCP法による点突然変異検出との比較. *日消外会誌* 27 : 71—77, 1994
- 8) Sinicrope FA, Ruan SB, Cleary KR et al: bcl-2 and p53 Oncoprotein Expression during Colorectal Tumorigenesis. *Cancer Res* 55 : 237—241, 1995
- 9) 西倉 健, 渡辺英伸, 加藤法導ほか: 微小胃癌の組織学的種々像と鑑別診断. *胃と腸* 30 : 1295—1307, 1995
- 10) 辻本広紀, 市倉 隆, 玉熊正悦: 胃癌における悪性腫瘍の家族内集積とp53蛋白発現との関連に関する検討. *日消外会誌* 29 : 1729—1733, 1996
- 11) Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ: Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74 : 609—619, 1993
- 12) Miyashita T, Reed JC: Tumor Suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80 : 293—299, 1995
- 13) Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M et al: Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9 : 1799—1805, 1994
- 14) Lowe SW, Bodis S, McClatchey A et al: p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science* 266 : 807—810, 1994
- 15) Sakamoto J, Watanabe T, Tokumaru T et al: Expression of Lewis a, Lewis b, Lewis x, Lewis y, Sialyl-Lewis a, Sialyl-Lewis x blood group antigens in human gastric carcinoma and normal gastric tissue. *Cancer Res* 49 : 745—752, 1989
- 16) Hiraishi K, Suzuki K, Hakomori S et al: Le^y antigen expression is correlated with apoptosis (programmed cell death). *Glycobiology* 3 : 381—390, 1993
- 17) Finlay CA, Hinds PW, Tan TH et al: Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc 70-p53 complex with an altered half life. *Mol Cell Biol* 8 : 531—539, 1988
- 18) Fan S, Smith ML, Rivet DJ et al: Disruption of p53 function sensitizes breast cancer MCF-7 cells to cis-platin and pentoxifylline. *Cancer Res* 55 : 1649—1654, 1995
- 19) Muro K, Ohtsu A, Boku N et al: Association of p53 protein expression with responses and survival of patients with locally advanced esophageal carcinoma treated with chemoradiotherapy. *Jpn J Clin Oncol* 26 : 65—69, 1996
- 20) Eliopoulos AG, Kerr DJ, Herod J et al: The control of apoptosis and drug resistance in ovarian cancer: influence of p53 and Bcl-2. *Oncogene* 11 : 1217—1228, 1995
- 21) Pezzella F, Turley H, Kuzu I et al: Bcl-2 protein in non-small-cell lung carcinoma. *N Engl J Med* 329 : 690—694, 1993
- 22) Koshida Y, Saegusa M, Okayasu I: Apoptosis, cell proliferation and expression of Bcl-2 and Bax in gastric carcinomas: immunohistochemical and clinicopathological study. *Br J Cancer* 75 : 367—373, 1997

P53 Dependent Apoptosis Pathway Correlates to Responses to Preoperative Chemotherapy in Patients with Gastric Cancer

Hiroyuki Nagayama, Masatoshi Kawamura and Mitsuo Kusano
Second Department of Surgery, Showa University School of Medicine

To determine the clinical role of abnormality in the P53-dependent apoptosis pathway, immunohistochemical analysis was performed in patients with gastric carcinomas. The subjects of this study were 30 patients who were treated by preoperative chemotherapy for gastric carcinomas. 17 patients were medicated with 5'DFUR (p.o. group) and 13 patients were injected with CDDP (i.v. group). We choiced p53, Bax and Bcl-2 in the biopsy materials before chemotherapy for parameters. And we choiced histological evaluation, Ki-67 labeling index after chemotherapy and positive rate of Lewis Y antigen after chemotherapy for grades of chemotherapeutic effect. The positive rate of Lewis Y antigen after chemotherapy correlated with histological evaluation of chemotherapy both in p.o. group and in i.v. group ($p < 0.05$). At i.v. group, the p53-positive group showed poor responses to chemotherapy both in histological evaluation and in positive rate of Lewis Y antigen after chemotherapy ($p < 0.05$). At p.o. group, the P53-positive group showed poor response to chemotherapy in histological evaluation ($p < 0.05$). These results indicate that, in gastric carcinomas, expression of P53 in the biopsy materials before chemotherapy predicts a poor response to preoperative chemotherapy.

Reprint requests: Hiroyuki Nagayama Second Department of Surgery, Showa University School of Medicine
1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo, 142-0064 JAPAN
