

## Flow cytometry による胃癌細胞周期とアポトーシスの検討 とくに hypodiploid と p53の関連について

獨協医科大学第1外科(主任教授 砂川正勝)

松本光正 宮地和人

Flow cytometry(FCM)を用いる方法は、短時間に多くの細胞を測定することが可能であり、multi scan で多因子を一度に測定できる利点がある。胃癌患者57例を対象として、FCMを用い、細胞周期上にて hypodiploid で示されるアポトーシス細胞と synthesis phase fraction(SPF),アポトーシスを制御する癌抑制遺伝子 p53や癌遺伝子 bcl 2の発現を比較検討した。癌組織中の hypodiploid は平均2.6%, SPF は、17.3%であり、非癌部に比較して高値であった。組織型分類における未分化型の hypodiploid および SPF は各3.38%, 18.88%であり分化型の1.64%, 16.24%より高値であった。p53陽性群では、SPFの低下はなく、S期、G2/M期のチェックポイントに作用し、アポトーシスへの誘導が示唆された。

### はじめに

Kerrら<sup>1)</sup>がアポトーシスという概念を提唱して以来、現在までに腫瘍細胞におけるアポトーシスに関して様々な内容の報告がなされている。最近では、アポトーシスの制御異常に癌遺伝子・癌抑制遺伝子が関与しているとの報告がある。このアポトーシスを誘導・抑制する癌遺伝子・癌抑制遺伝子として p53, bcl-family, Fas, c-myc, Jun/fo $\alpha$ (AP 1), mcl 1などが注目されている。これらのアポトーシスに関連する諸因子は細胞の癌化や癌の増殖、進展に関わっていることから、臨床的な癌の悪性度との関連についても検討することが重要である。

アポトーシスの検出法としては、TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling(TUNEL法)や flow cytometry(以下、FCM)を用いた方法が主である。FCMによるアポトーシスの検出はDNA histogram上の2n以下の hypodiploid 細胞を検出している<sup>2,3)</sup>。FCMの利点として、短時間に多くの細胞を処理することが可能であり、また、multi-scan で多因子を同時に測定できるので細胞周期に関与する癌遺伝子、癌抑制遺伝子等の解析に適している。今回、我々は胃癌患者57例を対象とし、FCMの multi-scan を用いて、アポトーシスの指標としての hypodiploid, アポトーシス制御因子の p53, bcl 2, 細胞周期に synthesis-phase fraction(以下、

SPF), さらに、病理学的所見との関連について検討したので報告する。

### 対 象

当科にて、平成9年7月より平成10年12月までに胃切除術を施行した胃癌57例を対象とした。背景因子として、年齢は43歳から84歳(平均67歳)で、男女比は、男性36例、女性21例である。進行度別では、早期癌14例(t1: 14例), 進行癌43例(t2: 13例, t3 t4: 30例)であった。癌組織の組織型分類(二分法)では、分化型癌25例(pap: 3例, tub1: 9例, tub2: 13例), 未分化型癌32例(por: 24例, sig: 5例, muc: 3例)で、全例術前化学療法や放射線療法などは施行していない。

### 方 法

#### 1. 単離細胞採取法

胃切除後30分以内に、胃癌先進部の癌組織および腫瘍縁より5cm以上離れた非癌部組織を約300mg採取し採取後直ちに-80℃に凍結保存した。あらかじめ、肉眼的に壊死部分と血液血管部分を切除した検体を眼科用剪刀にて細切して、コラゲナーゼ処理後、ピペットティングし35 $\mu$ m filterにて濾過して単離細胞を得て、70%エタノール固定した<sup>4)</sup>。

#### 2. 各抗体反応およびPI染色

各抗体反応は、抗p53 Ig-G抗体(OSI), 抗Ig-G FITC(SBA), bcl 2 FITC抗体(DAKO)を用いて行った。propidium iodide染色(以下、PI染色)はCycle TEST™ PLUS DNA Reagent Kit(Becton Dickinson,

Table 1 Relationship between cell cycle and each factors

		n	hypodiploid	SPF
Tissue	Cancer	57	2.60 ± 1.71	17.27 ± 12.88
	Normal	57	1.60 ± 4.11	10.32 ± 10.49
Histological type	Differentiated	25	1.64 ± 1.91	16.24 ± 13.37
	Undifferentiated	32	3.38 ± 5.16	18.88 ± 12.59
Tumor depth	t1	14	1.29 ± 1.00	17.36 ± 14.12
	t2-t4	43	3.04 ± 4.65	17.76 ± 12.64

p<0.05 (mean ± SD.)

Table 2 Relationship between depth of invasion and factors

	t1 (n: 14)	t2 (n: 13)	t3-t4 (n: 30)	
hypodiploid	1.29 ± 1.00	2.58 ± 4.15	3.22 ± 4.92	(mean ± SD.)
SPF	17.36 ± 14.12	14.89 ± 9.28	18.30 ± 13.88	
p53	3/14 (21.4)	4/13 (30.8)	12/30 (40)	n (%)
bcl-2	6/14 (42.9)	7/13 (53.8)	9/30 (30)	

USA)を用いて行った。

### 3. 測定

単離細胞浮遊液を約 $1 \times 10^6$  cells/mlにして, FCM (FACS Calibur: Becton Dicknson, USA)にて測定した。まず, Fig. 1 a 1 bの順にて, hypodiploid cellsを含むゲートに入る10,000細胞について細胞各々のPI量 (= DNA含量)を測定した。また, PI染色によりDNA histogramを作製して解析ソフト (Mod Fit LT 2.0, CELL Quest: Becton Dicknson, USA)を用いてhypodiploidおよびSPFを出した (Fig. 2)。各抗体処理検体も同様に histogramを作り測定した。なお, 今回の症例では, coefficient of value (%CV)は, 8%未満であった。

### 4. 判定

各抗体反応に対して, 同一症例における非癌部の測定結果における10%陽性範囲を基準 (M1)として, 同じ設定にて, 同じ範囲の癌部の測定結果の%gatedを出した。各結果において, histogramを作製してp53は20%, bcl 2は15%以上を陽性とした (Fig. 3)。各 cut offは, 免疫組織染色の文献の陽性率を参考にして, 今回の対象57例の結果より決定した<sup>5)-7)</sup>。なお, 臨床病理学的所見は FCM 測定用に採取した組織に近接した組織を用い HE 染色し, 胃癌取扱い規約<sup>8)</sup>に従い分類した。統計学的処理は F 検定をして, Student t 検定または, Welch の t 検定をもちいて, p<0.05の場合に有意差

ありとした。

## 結 果

### 1. hypodiploid と SPF

癌部における hypodiploid は, 平均 $2.60 \pm 1.71$  (平均 ± SD), 非癌部 hypodiploid は $1.60 \pm 4.11$ であった。癌部の SPF は,  $17.27 \pm 12.88$ , 非癌部は $10.32 \pm 10.49$ であった。hypodiploid および SPF 共に癌部の方が高値であったが SPF のみ有意差を認めた (p<0.05)。

進行度別で比較すると, 早期癌における hypodiploid は $1.29 \pm 1.00$ , SPF は $17.36 \pm 14.12$  進行癌における hypodiploid は $3.04 \pm 4.65$ , SPF は $17.76 \pm 12.64$ であり, 進行癌の方が hypodiploid は高値であった (p<0.05) (Table 1)。

また, t 分類別の hypodiploid では t1:  $1.29 \pm 1.00$ , t2:  $2.58 \pm 4.15$ , t3 t4:  $3.22 \pm 4.92$ で胃壁深達度が深くなる程 hypodiploid が高値になる傾向があった。SPF は t1:  $17.36 \pm 14.12$ , t2:  $14.89 \pm 9.28$ , t3 t4:  $18.30 \pm 13.88$ であった。SPF には, 一定の傾向は認めなかった (Table 2)。

癌の組織型分類の検討では, 分化型の hypodiploid は $1.64 \pm 1.91$ , SPF は $16.24 \pm 13.37$ であった。未分化型の hypodiploid は $3.38 \pm 5.16$ , SPF は $18.88 \pm 12.59$ であり, 未分化型の方が hypodiploid, SPF 共に高値であったが明らかな有意差は認められなかった (Table 1)。

Table 3 p53 analysis

		p53	n (%)	% gated
hypodiploid		+	19/57 (33.3)	3.58 ± 6.01
		-	38/57 (66.7)	2.14 ± 2.80
SPF		+	19/57 (33.3)	18.57 ± 14.50
		-	38/57 (66.7)	16.43 ± 12.12
Differentiated	hypodiploid	+	7/25 (28)	0.79 ± 0.75
		-	18/25 (72)	1.97 ± 2.14
Undifferentiated	hypodiploid	+	11/32 (34.4)	5.36 ± 7.23
		-	21/32 (65.6)	2.30 ± 3.33
early	hypodiploid	+	3/14 (21.4)	0.60 ± 0.25
		-	11/14 (78.6)	1.47 ± 1.05
advance	hypodiploid	+	16/43 (37.2)	4.18 ± 6.45
		-	27/43 (62.8)	2.41 ± 3.23

mean ± SD.

Table 4 bcl-2 analysis

		bcl-2	n (%)	% gated
hypodiploid		+	22/57 (38.6)	1.78 ± 1.82
		-	35/57 (61.4)	3.87 ± 6.03
SPF		+	22/57 (38.6)	14.81 ± 8.85
		-	35/57 (61.4)	18.86 ± 14.83
Differentiated	hypodiploid	+	7/25 (28)	0.79 ± 0.75
		-	18/25 (72)	1.97 ± 2.14
Undifferentiated	hypodiploid	+	11/32 (34.4)	5.36 ± 7.23
		-	21/32 (65.6)	2.30 ± 3.33
early	hypodiploid	+	3/14 (21.4)	0.60 ± 0.25
		-	11/14 (78.6)	1.47 ± 1.05
advance	hypodiploid	+	16/43 (37.2)	4.18 ± 6.45
		-	27/43 (62.8)	2.41 ± 3.23

mean ± SD.

## 2. p53

p53陽性は19例、陰性は38例であった。p53陽性の hypodiploid は  $3.58 \pm 6.01$ 、陰性は  $2.14 \pm 2.80$  であり p53陽性の方が hypodiploid が高値であった。p53陽性の SPF は  $18.57 \pm 14.50$ 、陰性は  $16.43 \pm 12.12$  であった。

早期癌における p53陽性は3/14例 (21.4%)。進行癌は16/43例 (37.2%) であった (Table 3)。

t分類での p53陽性は t1: 3/14例 (21.4%)、t2: 4/13例 (30.8%)、t3 t4: 12/30例 (40%) であった (Table 2)。

癌の組織型分類では、分化型の p53陽性は7/25例 (28%)、未分化型 p53陽性は11/32例 (34.4%) であり高い傾向があった (Table 3)。

## 3. bcl 2

bcl 2陽性は22例で、陰性は35例であった。bcl 2陽性の hypodiploid は  $1.78 \pm 1.82$ 、陰性は  $3.87 \pm 6.03$  であり、bcl 2陰性で hypodiploid が高値であったが有意差は認めなかった。bcl 2陽性の SPF は  $14.81 \pm 8.85$ 、陰性は  $18.86 \pm 14.83$  であった。

早期癌における bcl 2陽性は6/14例 (42.9%)、進行癌

Table 5 Relationship between p53 and bcl-2 in gastric cancers : correlation with hypodiploid and SPF

		n	hypodiploid	SPF
p53 ( + )	bcl-2 ( + )	12	2.42 ± 1.79	14.41 ± 10.54
	bcl-2 ( - )	7	4.32 ± 7.62	25.11 ± 18.13
p53 ( - )	bcl-2 ( + )	10	1.69 ± 1.84	15.39 ± 7.66
	bcl-2 ( - )	28	3.39 ± 4.44	17.13 ± 13.58

( mean ± SD )

は16/43例 ( 37.2% ) であった ( Table 4 ) .

t 分類での bcl 2陽性は t1 : 6/14例 ( 21.4% ) , t2 : 4/13例 ( 30.7% ) , t3 t4 : 9/30例 ( 30% ) , であった ( Table 2 ) .

組織型分類での bcl 2陽性では , 分化型9/25例 ( 36% ) , 未分化型13/32例 ( 40.62% ) であった ( Table 4 ) .

4 . p53と bcl 2の関係

p53・bcl 2の組み合わせで , p53陽性/bcl 2陽性 ( + / + ) は12例 , p53陽性/bcl 2陰性 ( + / - ) は7例 , p53陰性/bcl 2陽性 ( - / + ) 10例 , p53陰性/bcl 2陰性 ( - / - ) 28例であった . 各群の hypodiploid・SPF は , それぞれ ( + / + ) : 2.42 ± 1.79・14.41 ± 10.54 ( + / - ) : 4.32 ± 7.62・25.11 ± 18.13 ( - / + ) : 1.69 ± 1.84・15.39 ± 7.66 ( - / - ) : 3.39 ± 4.44・17.13 ± 13.58であり , p53陽性 bcl 2陰性で hypodiploid・SPF 共に最も高値であった ( Table 5 ) .

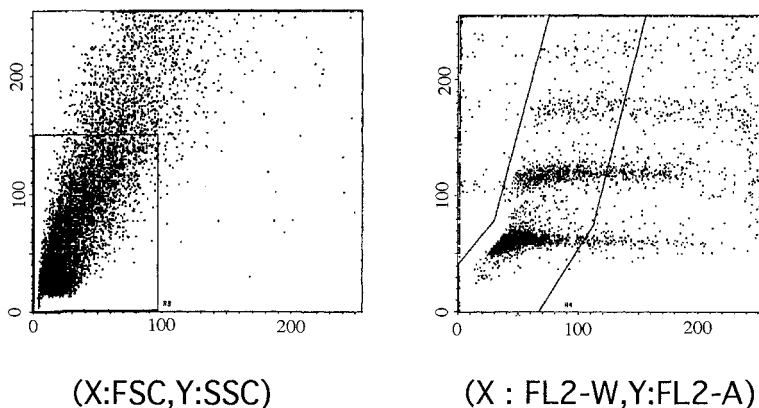
考 察

1 . hypodiploid と SPF

アポトーシス細胞では , 核内の DNA 含量が減少し , 核の分葉化という , いわゆる hypodiploid の状態にある<sup>2)</sup> . すなわち DNA 含量がアポトーシスの指標となることから , ある一定量以下の DNA を持つ細胞が全体の何%であるかを算出することが , アポトーシス細胞の検出に有効である . この DNA 含量の少ない細胞は , DNA histogram において , 2n ( G期 ) の以下 ( 左側 ) で示される . 文献によっては , hypoploid と記載されている<sup>2)3)</sup> . 胃癌の TUNEL 法による Apoptosis Labeling Index は既往の報告<sup>9)~12)</sup>によると0.5~4%程度との結果であり今回の結果では2.60% . 非癌部で1.60%であった .

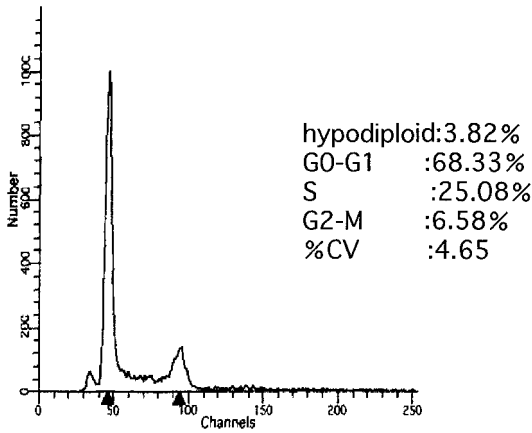
今回の検討で非癌部に比べ癌部の hypodiploid , SPF 共に高値でありアポトーシスへの移行が非癌部よりも癌部が高率であった . Kroemer は , 癌化の過程で , DNA 損傷の刺激に対して癌細胞が高感受性を示し , アポトーシスを起こしやすくなると報告しているがこれは今回の検討結果を支持するものと考えられる<sup>13)</sup> . 組織型分類での hypodiploid と SPF は共に , 未分化型において分化型よりも高値であった . よって , 未分化型は分化型より , アポトーシスへの移行が盛んであると考えられた . 乳癌や非小細胞肺癌における , アポトーシスと予後の検討によると , アポトーシスが高発現の場合予後が不良との報告があり , 今回の検討にて進行癌 , 未分化型が hypodiploid 値が他に比べ高値のことに一致していると思われた<sup>14)~16)</sup> . また , 生体内において , ごく初期の癌より高頻度にアポトーシスを起こしている報告もあるが<sup>4)</sup> , 今回の検討において

Fig. 1 Flow cytometry and cytogram



path: por.ss.INF-γ.ly3.v1

Fig. 2 DNA histogram



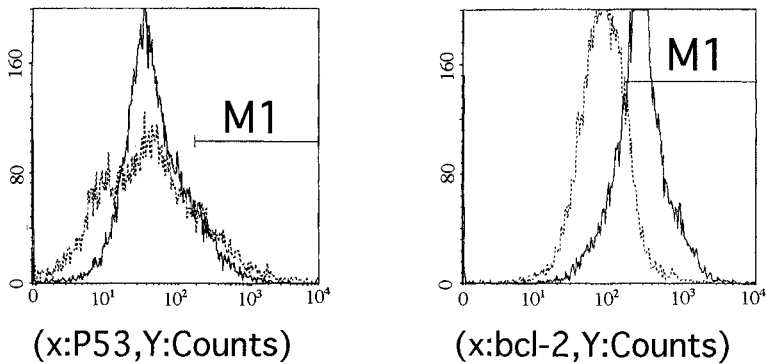
(X : Channels,Y:Number)

は、t 分類において hypodiploid は、t1に比較し t2 , t 3 t4へ進むにつれ、徐々に増加していた。癌細胞は進行するほど遺伝子の安定性が減り正常の増殖を続けることが不可能であるためアポトーシスが促進されたものと考えられた。

2 . p53

細胞周期上には、いくつかのチェックポイントがあり、G1/S、S 期、G2/M 期などでチェックポイントの存在が認められている。これらのチェックポイントのいくつかは p53 の関与が指摘されている。G1/S チェックポイントにて p53 に誘導された p21 がサイクリン依存性キナーゼ (cdk) と結合し、このキナーゼ活性を阻害して細胞周期を G1 期で停止させる。S 期チェックポイントは S 期の進行を遅らせ、S2/M チェックポイントは、M 期への進行を阻止していると考えられているがヒトにおける S 期、G2/M 期の詳細は不明である<sup>(17)(18)</sup>。野生型 p53 レベルが上昇すると損傷細胞は G1 で停止し、DNA 損傷が修復不可能の場合、bcl 2 の発現を抑制、bax 発現を誘導してアポトーシスを誘導する。しかし、この p53 の G1 期を制御する機構に異常が生じた場合、異常増殖や分化異常から発癌を引き起こすと考えられる<sup>(19)</sup>。今回の研究では、p53 陽性の場合、陰性と比較すると hypodiploid・SPF 共に高値であった。これは、SPF の蓄積が起こりその結果アポトーシス細胞の増加していることが推定される。これは一般に癌組織で認められる p53 は変異型が多くアポトーシスを導くことは出来ないと考えられているのとは異なった結果であった。S 期のチェックポイントにより S 期の進行を遅らせ S 期が高値となる。さらに、p53 が関与する G

Fig. 3 p53, bcl 2 expression

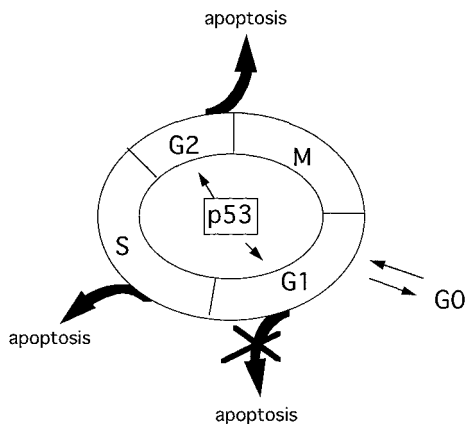


— Tumorous Stomach  
 - - non Tumorous Stomach

p53 M1 %gated:2.48  
 decision (-)

bcl-2 M1 %gated:71.13  
 (+)

Fig. 4 Cell cycle and apoptosis



2/M期チェックポイントの働きにより、M期への進行を阻止したと推測された<sup>20)</sup>。すなわち今回の結果より癌組織中に認められるp53はG1/S期のチェックポイントの作用は消失していたがSPFの高値、hypodiploid高値より、S期、G2/M期のチェックポイント作用は保持しているものと推定された (Fig. 4)。

### 3. bcl 2

bcl 2はヒト濾胞性リンパ腫においてt(14;18)(q32;q21)染色体転座点の解析により発見された癌遺伝子であり<sup>21)22)</sup>、細胞死(アポトーシス)を抑制する遺伝子である<sup>23)~25)</sup>。bcl 2が、アポトーシスを抑制することにより発癌に必須な遺伝的変化の起こるチャンスが増加する<sup>26)27)</sup>。アポトーシスを調節するにあたり、bcl 2 familyの中で、bcl xL, bcl xS, mcl 1, bax, badなどがhomodimerやheterodimerを形成して調節することが見い出されている<sup>28)~31)</sup>。また、胃癌のbcl 2の陽性率は免疫組織染色、competitive RT-PCR法で約4~6割とばらつきがある。進行度別や組織型分類の検討においても、明らかな有意差は認められないが進行癌、低分化癌のほうが高値との報告もある<sup>32)~35)</sup>。今回の研究においては、bcl 2陽性ではhypodiploid・SPF共に陰性に比べ低値であった。このことから、bcl 2陽性では、SPFは蓄積がなく、また、アポトーシスも抑制されていると推定される。また、進行度別では進行癌の方が高値であった。組織型分類では陽性率、hypodiploid共に未分化型が高値であるのは、癌細胞をアポトーシスへと誘導させているためと考えられる。

アポトーシスは、遺伝的にプログラム化された細胞

死の過程の一つであり、正常細胞の不要細胞や有害細胞の除去の機能である。しかし、癌細胞はアポトーシス制御異常が生じていると考えられている。FCMを用いた今回の検討で、胃癌細胞においてG1/S期のチェックポイントの作用は消失していたが、S期、G2/M期の作用は保持されており、これによりアポトーシス細胞へ誘導されているものと考えられた。

しかし、細胞周期、アポトーシスは、多因子が関与して調節されており、cyclins, cyclin dependent kinases, bcl 2 family, p21, p16などについても今後さらに検討する必要がある。

### 文 献

- 1) Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257, 1972
- 2) 松井 聖, 柏村信一郎, 中西憲司: アポトーシスの検出法とその評価. *消外* 20: 1923-1932, 1997
- 3) Ormerod MG: DNAの分析. 大熊勝治, フローサイトメトリー, 広川書店, 東京, 1996, p69-112
- 4) 野村和弘: 試料作成法. 太田和雄, 野村和弘, 高本滋編. フローサイトメトリー. 癌と化学療法社, 東京, 1994, p37-44
- 5) 仲田文造, 鄭 容錫, 小川佳成: 胃癌生検標本中の変異型 p53発現と化学療法感受性の相関. *日外科学系連合誌* 21: 948-950, 1996
- 6) 宇都出公也, 柳沢昭夫, 加藤 洋: 腸上皮化生における強い胃の非癌粘膜における p53陽性腺管. *胃と腸* 30: 1309-1313, 1995
- 7) Yonemura Y, Fushida S, Fonseca L: over-expression of p53 protein in gastric adenoma and cancer. *Jnt J Oncol* 13: 497-501, 1993
- 8) 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
- 9) 後藤俊義, 田中紀章, 日伝晶夫: 胃癌・大腸癌のDNA障害性抗腫瘍治療における変異型 p53発現の意義. *癌と化療* 23: 1081-1083, 1996
- 10) 富家隆樹: 胃癌における p53遺伝子変異と予後およびアポトーシスとの関連性. *帝京医誌* 19: 555-562, 1996
- 11) Saegusa M, Takano Y, Wakabayashi T et al: Apoptosis in gastric carcinoma and its association with cell proliferation and differentiation. *Jpn J Cancer Res* 86: 743-748, 1995
- 12) Ishida M, Gomyo Y, Ohfuji S et al: Evidence that expression of a mutated p53 gene attenuates apoptosis cell death in human gastric intestinal-type carcinomas in vivo. *Jpn J Cancer Res* 88: 468-475, 1997
- 13) Kroemer G: The proto-oncogene Bcl 2 and its role in regulating apoptosis. *Nature Med* 3: 614-620, 1997
- 14) Vakkala M, Lahteenmaki K, Raunio H et al: Apo-

- tosis during Breast carcinoma progression. Clin Cancer Res 5 : 319 324, 1999
- 15) Tormanen U, Eeola A-K, Rainio P : Enhanced apoptosis predicts shortened survival in non-small cell lung carcinoma. Cancer Res 55 : 5595 5602, 1995
- 16) Lipponen P, Aaltomaa S, Kosma V-M : Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. Eur J Cancer 30 A : 2068 2073, 1994
- 17) 野島 博 : 細胞周期のチェックポイント制御 . 実験医 16 : 1154 1159, 1998
- 18) 上村陽一郎, 荒木弘之 : 複製装置と細胞周期チェックポイント . 実験医 16 : 1167 1171, 1998
- 19) 井本正哉 : 細胞周期阻害剤を用いた細胞周期制御機構の解析 . Cytometry Res 8 : 29 33, 1998
- 20) 近藤多恵, 杉本勝則 : DNA 損傷チェックポイントコントロール . 実験医 16 : 1160 1166, 1999
- 21) Hockenbery G, Nunez G, Milliman C et al : Bcl 2 is an innermitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. Nature 348 : 334 336, 1990
- 22) 片岡政子 : Bcl 2 蛋白の細胞内局在の解析 . 大阪大医誌 48 : 7 14, 1997
- 23) 蒲原英伸, 小川道雄 : アポトーシスの分子機構 . 消外 20 : 1913 1921, 1997
- 24) 安達淳一, 横田 淳 : p53による細胞周期制御機構とアポトーシス誘導機構 . 実験医 15 : 1969 1974, 1997
- 25) Tujimoto Y, Finger FR, Yunis J et al : Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14 ; 18) chromosome translocation. Science 226 : 1097 1099, 1984
- 26) Tsujimoto Y : Stress-resistance conferred by high level of bcl 2  $\alpha$  protein in human B lymphoblastoid cell. Oncogene 4 : 1331 1336, 1989
- 27) 辻本賀英 : bcl 2 遺伝子とは . Med Immunol 22 : 127 131, 1991
- 28) Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE et al : bcl x, a bcl 2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. Cell 74 : 597 608, 1993
- 29) Krajewski S, Krajewski M, Shabaik A et al : Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of bcl x expression. Cancer Res 54 : 5501 5507, 1994
- 30) 高山晋一 : Bcl 2 ファミリー蛋白質 . 血腫瘍 32 : 289 294, 1996
- 31) 藤田直也, 鶴尾 隆 : がんにおけるアポトーシス . 最新医 54 : 877 883, 1999
- 32) 稲田高男, 尾形佳朗, 市川 明 : 進行胃癌症例における apoptosis と増殖活性の検討 . 日消外会誌 29 : 2092 2097, 1996
- 33) 山崎武志 : 胃, 大腸癌の 5-FU と Cisplatin を中心とした化学療法により MDR と Bcl 2 発現が誘導される . 昭和医会誌 57 : 373 377, 1997
- 34) 近藤真也, 篠村恭久, 北村信次 : 胃腺腫および胃癌における bcl x $\alpha$  遺伝子発現の検討 . Prog Med 17 : 2227 2231, 1997
- 35) Uesugi H, Saegusa M, Takano Y : Different expression of Bcl 2 protein in gastric adenomas and carcinomas. Pathol Int 46 : 274 280, 1996

Studies of Apoptosis and Cell Cycle of Gastric Cancer by using Flow Cytometry  
Especially on the Relationship between Hypodiploid Cells and p53 Supreser Gene

Mitsumasa Matsumoto and Kazuhito Miyachi

First Department of Surgery, Dokkyo University School of Medicine

The advantage of flow-cytometry is to analyze many cells and multi factors in a short time. We measured the expression of p53 and bcl 2 in 57 gastric cancer patients by using flow-cytometry. The synthesis phase fraction (SPF) and frequency of hypodiploidy of cells were also analyzed. Hypodiploidy and SPF tended to be higher in cancer cells compared to normal cells. Hypodiploidy and SPF were 3.38% and 18.88%, respectively, in undifferentiated type of cancer, whereas they were 1.64% and 16.24% in differentiated type. In patients with positive p53 expression, the level of SPF was higher than expected together with a high apoptosis index. We speculated that p53 leads apoptosis of cancer cells in the G<sub>2</sub>/M phase.

Key words : gastric cancer, apoptosis, p53, hypodiploid, syntheesis-phase fraction

[Jpn J Gastroenterol Surg 33 : 142 148, 2000]

Reprint requests : Mitsumasa Matsumoto First Department of Surgery, Dokkyo University School of Medicine

880 Kitakobayashi, Mibumachi, Shimotsugagunn, Tochigi, 321 0293 JAPAN