大腸腺腫の悪性化過程におけるアポトーシス関連蛋白の 影響に関する免疫組織学的検討

岐阜大学医学部第2外科

堅田 昌弘 杉山 保幸 国枝 克行 佐治 重豊

大腸腺管腺腫174病変を対象に変異型 p53と Bcl-2の発現, TUNEL 染色による AI 値を免疫組織学的に検討した。その結果, Bcl-2陽性率は異型度が軽度から中等度に進行すると有意に増加し, 高度および早期癌では逆に低下した。変異型 p53陽性率は異型度の進行に伴って増加し, 早期癌ではさらに高値を示した。AI 値は正常粘膜に比べ軽度群, 中等度群, 高度群および早期癌がいずれも低値を示した。変異型 p53と Bcl-2陽性率は腺腫径では6mm 以上, 形態では I sp, I p 型が有意の高値を示した。

以上の結果, 1) 腺腫の増大や異型度の早期には Bcl-2が, 癌化の段階には変異型 p53が関与する可能性が示唆された。2) 異型度が中等度以上で大きさが6mm を越える有茎性腺腫は, 生物学的悪性度が高いと推察された。

Key words : colorectal adenoma, mutant p53, Bcl-2 protein, TUNEL stain, apoptosis

はじめに

1972年に Kerr¹⁾がアポトーシスの概念を提唱して以来, 発癌過程のイニシエーションからプロモーション段階での, アポトーシス制御機構の乱れが注目されており²⁾, またアポトーシス実行段階では, 癌抑制遺伝子 p53が情報処理過程で主要な役割を演ずると考えられている³⁾。すなわち, Vogelstein⁴⁾が大腸癌の多段階発癌過程の遺伝子変異モデルを提唱して以来, 大腸腺腫の悪性化過程で p53遺伝子変異が高頻度に検出されることが確認されている⁵⁾。そこで, 著者らも内視鏡的に摘除した大腸腺腫を用い, proliferating cell nuclear antigen(以下, PCNA⁶⁾)と変異型 p53蛋白(以下, p53⁷⁾)の発現程度を異型度別に検索した。その結果, 異型度の進展に伴い PCNA の labeling index (以下, LI)と p53の発現が有意に増加し, アポトーシスの関与が示唆され先に報告した⁸⁾。そこで今回同じ症例を用い, Bcl-2蛋白⁹⁾の発現程度から悪性化過程におけるアポトーシスの役割を検索し, TdT-mediated dUTP-biotin nickend labeling(以下, TUNEL)染色¹⁰⁾による apoptotic index(以下, AI)から細胞死実行程度を評価した。また, 先に報告⁸⁾した p53の発現程度も併せて検討し, 大腸腺腫の悪性化過程におけるアポ

トーシスの役割を検討した。

対象と方法

1. 対象

対象は1992年1月から4年間に教室および関連病院で, 内視鏡的に摘除した大腸腺管腺腫109例, 174病変である。なお, 同期間に内視鏡的に摘除した癌が粘膜内にとどまり, 粘膜下層に及んでいない早期大腸癌10例, 10病変と, 大腸癌手術時に採取した大腸正常粘膜組織10例, 16個を対象群として用いた。

2. 方法

1) 組織標本の作製法

摘除検体を10%ホルマリン固定パラフィン包埋後, 4 μ m の連続薄層切片を作製し通常の Hematoxylin Eosin(以下, HE)染色と免疫組織染色用に供した。

2) 大腸腺腫の異型度と大きさの評価法

細胞異型度は, HE 染色標本を用い大腸癌取扱い規約¹¹⁾に従って, 軽度異型腺腫(以下, 軽度群), 中等度異型腺腫(以下, 中等度群), 高度異型腺腫(以下, 高度群)および早期癌に分類した。大きさは, 内視鏡所見から最大径で6mm 未満を小, 6 から10mm 未満を中, 10mm 以上を大と分類した。

3) 免疫組織染色の方法

Bcl-2染色: キシレンにて脱パラフィン・親水処理後, マイクロウェーブ処理し抗 Bcl-2マウスモノクローナル抗体(clone124, DAKO 社)を用い avidine-biotinyl-

Fig. 1 Positive expression of Bcl-2 (a) and TUNEL (b) by immunohistochemical stain ($\times 200$)

ated peroxidase complex (以下 , ABC) 法にて染色した . 次いで , 3,3-diaminobenzidine・過酸化水素水反応液 (以下 , DAB) で発色後 , ヘマトキシリンにて核染色し , わずかでも細胞質が染色されたものを陽性と判定した (Fig. 1a) .

TUNEL 染色 : 脱パラフィン・親水処理しプロテインナーゼ K にて核蛋白を消化後 , 3% 過酸化水素水にて内因性ペルオキシダーゼを不活化した . 次いで , Apop-Tag Plus TM・Peroxidase in situ Apoptosis Detection Kit (Oncor 社) を用い , TdT で断片化された DNA 鎖の 3'-OH に biotin-16dUTP を end labeling した . 室温下で Anti-Digoxigenin-Peroxidase を反応させ DAB で発色後 , メチルグリーンにて核染色した . 判定は核が茶褐色に染色されたものを陽性細胞とし (Fig. 1b) , 光学顕微鏡下で腫瘍細胞 1,000 個中の陽性細胞数を百分率表示し , AI 値として検討に用いた .

p53 染色 : 既報⁸⁾の方法で抗 p53 マウスモノクローナル抗体 (DO-7, DAKO 社) を用いて ABC 染色後 , DAB で発色し , わずかでも核内が顆粒状に染色されたものを陽性と判定した .

4) 統計学的解析

数値は , 平均値 $\pm$ 標準偏差 (Mean $\pm$ SD) で表し , χ^2 検定 , Mann-Whitney's U test を適宜選択して p 値を計算した . なお , 危険率 5% 未満を有意差ありと判定した .

結 果

1. 対象症例の概要

年齢は 30 歳から 83 歳 , 平均 61.3 ± 10.9 歳 , 性別は男性 74 例 , 女性 35 例 . 大腸腺管腺腫 174 病変の組織学的異型度は , 軽度群が 36 病変 , 中等度群が 94 病変 , 高度群が 44 病変 , 腫瘍径は 2 から 30mm で平均 6.6 ± 3.4 mm で

Table 1 Comparison on positive expression of Bcl-2 and mutant p53, and value of apoptotic index (AI) evaluated by TUNEL stain according to the grade of histological atypia of colorectal adenoma

	Bcl-2 (%)	value of AI	p53 (%)
normal (10)	0 (0) ^{a)}	4.70 ± 8.20 ^{f)}	0 (0) ^{k)}
mild (36)	7 (19.4) ^{b)}	0.98 ± 1.28 ^{g)}	0 (0) ^{l)}
moderate (94)	48 (51.1) ^{c)}	1.50 ± 2.34 ^{h)}	29 (30.9) ^{m)}
severe (44)	23 (52.3) ^{d)}	1.91 ± 2.30 ⁱ⁾	22 (50.0) ⁿ⁾
cancer (10)	4 (40.0) ^{e)}	1.65 ± 0.89 ^{j)}	8 (80.0) ^{o)}
(n)	(mean $\pm$ SD)		

a) c): p = 0.001 , a) d): p = 0.002 , a) e): p = 0.04 ,
b) c): p = 0.001 , b) d): p = 0.002 , f) g), f) h),
f) i), p = 0.0001 , f) j): p < 0.01 , k) n), k) o), l)
m), l) n), l) o): p < 0.0001 , m) n): p = 0.02 ,
m) o): p = 0.004

あった . 大きさは小が 83 病変 , 中が 56 病変 , 大が 35 病変で , 形態分類上は I s が 30 病変 , I sp が 98 病変 , I p が 46 病変であった . 占居部位では , 盲腸が 2 例 , 上行結腸が 22 例 , 横行結腸が 25 例 , 下行結腸が 13 例 , S 状結腸が 72 例 , 直腸が 40 例であった . なお , 併存病変で早期大腸癌が 2 例 5 病変 , 進行大腸癌が 9 例 14 病変にみられた . 一方 , 対象群の早期癌 10 例はいずれも高分化腺癌で , 腫瘍径は 6 から 50mm , 平均 14.5 ± 12.9 mm , 中が 4 例 , 大が 6 例であった . 早期癌の形態は de novo 発生を示唆する表面型や陥没型はなく , I sp が 4 例 , I p が 6 例にみられた . 占居部位は下行結腸が 2 例 , S 状結腸が 5 例 , 直腸が 3 例であった⁸⁾ .

2. 免疫組織染色所見の結果

1) 細胞異型度との関連

Bcl-2 陽性率は正常粘膜と軽度群から , 中等度群 , 高度群と増加したが , 中等度群と高度群との間に差はみ

Table 2 Comparison on positive expression of Bcl-2 and mutant p53, and value of apoptotic index(AI)evaluated by TUNEL stain according to the clinico-pathological findings of patients with colorectal adenoma

		Bcl-2(%)	value of AI	p53(%)
Tumor size	2 5 mm	29(34.9) ^{a)}	1.40 ± 2.55	11(13.3) ^{c)}
	6 9 mm	31(55.4) ^{b)}	1.48 ± 1.91	27(48.2) ^{d)}
	10 mm	18(51.4)	1.74 ± 1.48	13(37.1) ^{e)}
subtype	s	8(26.7) ^{f)}	1.74 ± 3.73	2(6.7) ^{h)}
	sp	48(49.0) ^{g)}	1.25 ± 1.34	29(29.6) ⁱ⁾
	p	22(47.8)	1.87 ± 2.22	20(43.5) ^{j)}
number of adenoma	1 3	69(50.0) ^{k)}	1.49 ± 2.06	42(30.4)
	4	9(25.0) ^{l)}	1.54 ± 2.58	9(25.0)
with cancer		3(15.8) ^{m)}	2.26 ± 4.56	4(21.1)
without		75(48.4) ⁿ⁾	1.40 ± 1.66	47(30.3)

(mean ± SD)

a) b): p = 0.01, c) d): p < 0.0001, c) e): p = 0.003, f) g): p = 0.02, h)

i): p = 0.007, h) j): p = 0.0004, k) l): p = 0.04, m) n): p = 0.01

られず、早期癌では逆に低値を示した。

AI 値は正常粘膜に比べ軽度群, 中等度群, 高度群および早期癌がいずれも低値を示した。

p53陽性率は正常粘膜と軽度群がともに陰性で, 中等度群, 高度群, 早期癌の順に増加し, 中等度群と高度群および早期癌との間に有意差がみられた (Table 1)。

2) 臨床病理学的所見との関連

大きさ別検討で Bcl-2陽性率は, 小が34.9%, 中が55.4%, 大が51.4%で, 中は小に比べて有意の高値を示したが, 中と大との間に差はみられなかった。AI 値は小から中, 大へと増加したが有意差はみられなかった。p53陽性率は中および大は小に比べ有意の高値を示したが, 中と大との間に差はみられなかった。

形態別検討では Bcl-2陽性率は, 1sp が 1s に比べ有意の高値を示し, AI 値は各群間で差はみられなかったが, p53陽性率は 1s, 1sp, 1p の順に増加し, 1s と 1sp および 1s と 1p との間に有意差がみられた。

病変数別では Bcl-2陽性率は3個以下群で有意の高値を示したが, p53陽性率と AI 値は両群間で差がみられなかった。

癌併存例の Bcl-2陽性率は非併存例に比べ有意の低値を示したが, AI 値と p53陽性率に差はみられなかった (Table 2)。

3) 変異型 p53と Bcl-2発現程度との関連

平均腫瘍径は p53と Bcl-2がともに陽性群が, ともに

Fig. 2 Cut off value on positive rate of mutant p53 and Bcl-2 according to tumor size by receiver operating characteristic curve

陰性群に比べ有意の高値を示した。一方, 大きさ別に p53と Bcl-2の陽性率を receiver operating characteristic (ROC) 曲線¹²⁾で検討すると, cut-off 値はともに 6mm となった (Fig. 2)。そこで, 6mm 以上群と未満群に分け検討すると, ともに陽性となる頻度は, 6mm 以上群が6mm 未満群に比べ有意に高かった。細胞異型度別では, 軽度群と中等度群, 高度群, 早期癌の間に有意差を認めた (Table 3 a)。一方, ともに陰性群は6mm 以上群が未満群に比べ有意の低値を示し, 細胞異型度別では, 正常粘膜および軽度群と中等度群以上との間に有意差がみられた。なお, ともに陽性群はとも

Table 3 Significance of colorectal adenoma showing both positive or negative expression(%) of mutant p53 and Bcl-2 protein(mean $\pm$ SD)

	a) p53(+) & Bcl-2(+)(%)	b) p53(-) & Bcl-2(-)(%)
tumor size	8.1 $\pm$ 2.6 a)	5.4 $\pm$ 2.8 d)
< 6 mm	4/83(4.8) b)	47/83(56.6) e)
6 mm	20/91(22.0) c)	22/91(24.2) f)
histological atypia		
normal	0/16(0) g)	16/16(100) l)
mild	0/36(0) h)	29/36(86.6) m)
moderate	13/94(13.8) i)	30/94(31.9) n)
severe	11/44(25.0) j)	10/44(22.7) o)
cancer	3/10(30.0) k)	1/10(10.0) p)
A.I.	1.55 $\pm$ 1.21	1.36 $\pm$ 2.66

(mean $\pm$ SD)

a) d), b) c), e) f): p < 0.001, h) i): p = 0.04, h) j): p = 0.004, h) k): p = 0.008, l) n), l) o), l) p), m) n), m) o), m) p), g) l), h) m): p < 0.001, i) n): p = 0.003

Table 4 Significance of colorectal adenoma showing either positive or negative expression(%) of mutant p53 and Bcl-2 protein

	a) p53(+) & Bcl-2(-)(%)	b) p53(-) & Bcl-2(+)(%)
tumor size	8.2 $\pm$ 5.0	6.74 $\pm$ 3.0
< 6 mm	7/83(8.4) a)	23/83(30.1)
6 mm	20/91(22.0) b)	29/91(31.9)
histological atypia		
normal	0/16(0) c)	0/16(0) h)
mild	0/36(0) d)	7/36(19.4) i)
moderate	16/94(17.0) e)	35/94(37.2) j)
severe	11/44(25.0) f)	12/44(27.3)
cancer	5/10(30.0) g)	1/10(10.0)
A.I.	1.89 $\pm$ 2.76	1.41 $\pm$ 1.31

(mean $\pm$ SD)

a) b): p < 0.01, c) g): p = 0.02, d) e): p = 0.004, d) g): p < 0.0001, e) g): p = 0.03, h) j): p = 0.04, d) i): p = 0.006, e) j): p < 0.001

に陰性群に比べ異型度別の正常群, 軽度群および中等度群で低値を, A.I 値は軽度高値を示した(Table 3 b).

次に, p53が陽性で Bcl-2が陰性の場合, 6mm 以上群は未満群に比べ高値を示した. 異型度別では, 異型度の進行に伴って漸増し, 正常粘膜と早期癌, 軽度群と中等度群, 高度群および早期癌との間に有意差がみられた(Table 4 a). 一方, p53が陰性で Bcl-2が陽性となる場合は, 6mm 以上群と未満群の間に差はみられなかった. 異型度別では, 正常粘膜から中等度群までは増加し, その後, 中等度群, 高度群から早期癌と逆に減少し, 正常粘膜と中等度群との間に有意差がみられた(Table 4 b). なお, p53が陽性で Bcl-2が陰性例は前

Table 5 The value apoptotic index according to positive or negative expression of Bcl-2 and mutant p53

	positive expression	negative expression
Bcl-2	1.45 $\pm$ 1.27	1.53 $\pm$ 2.69
p53	1.77 $\pm$ 2.17	1.38 $\pm$ 2.17

(mean $\pm$ SD)

者が陰性で後者が陽性例に比べ, 平均腫瘍径で差はみられなかったが, 異型度別で軽度群と中等度群は有意差がみられた. なお, A.I 値は軽度高値であった.

4) A.I 値と Bcl-2および p53との関連

AI 値は Bcl-2陽性群が陰性群に比べ低値を示したが有意差はみられなかった。また、p53陽性群は陰性群に比べ高値を示したが有意差はみられなかった (Table 5)。

考 察

ヒト大腸の正常粘膜より腺腫を経ての悪性化過程は、家族性大腸腺腫症の原因遺伝子である APC の不活性化に始まる軽度異型腺腫から、K-ras, p53などの点突然変異を経て大腸癌へ進展し、DCC 異常が浸潤・転移に関与する癌化のモデル⁴⁾が知られている。一方、発癌機構のイニシエーション過程で、癌抑制遺伝子や DNA 修復遺伝子が効率的に機能すれば異常細胞のクローナルな増殖が抑制され、癌化へのステップが中断されるが、この段階でアポトーシス制御メカニズムが重要な役割を担うと推察されている¹³⁾。そこで本研究では、大腸前癌病変である腺管腺腫を対象に p53と Bcl-2を免疫組織学的に検索し、悪性化過程におけるアポトーシス関連蛋白の役割とアポトーシスの関係を解明せんと試み、上記諸結果を得た。すなわち、野生型 p53は種々のストレスが細胞に加わった際に c-fos や c-myc などの増殖・分化に関わる遺伝子を制御して、G1期から S 期への細胞周期移行を抑制し Bax の転写を賦活することでアポトーシスを誘導し、異常細胞の増殖を制御する機能が知られている¹⁴⁾。この p53の変異・欠失はさまざまな癌腫で高頻度に確認され、癌抑制遺伝子として理解されているが⁷⁾変異型 p53の作用は本来の機能喪失と野生型との複合体形成による機能失活の両者が知られている¹⁵⁾。それゆえ、大腸癌の adenoma-carcinoma sequence で p53遺伝子異常が腺腫から大腸癌への段階で重要な役割を演ずると考えられており、今回の検索でも p53の陽性率は、正常粘膜と軽度群とともに 0%であったが、腺管腺腫異型度の進行に伴って有意に増加し、早期癌ではさらに高値を示したことから、同様機序の存在が確認された。

一方、bcl-2遺伝子はヒト濾胞性 B 細胞リンパ腫付随の t(14; 18)(q32; q21)転座点の解析から単離されたがん遺伝子で⁶⁾、3 エクソンからなり、分子量は26Kdで、核外膜、小胞体膜、ミトコンドリア膜など多くの膜コンパートメントに存在し¹⁶⁾、アポトーシス抑制作用を示すと考えられている¹⁷⁾。一般に、bcl-2遺伝子発現は造血系やリンパ系に顕著であるが、小腸や大腸クリプトの基底部でも観察され¹⁸⁾、正常大腸粘膜、過形成ポリープ、腺腫、癌腫での免疫組織学的検索で bcl-2遺伝子異常が認められ、発癌過程に関与する可能性が

Table 6 The values of PCNA LI according to positive or negative expression of Bcl-2 and mutant p53 (mean $\pm$ SD)

a) value of PCNA

	positive expression	negative expression
Bcl-2	65.9 $\pm$ 26.2 ^{a)}	48.3 $\pm$ 30.0 ^{b)}
P53	62.7 $\pm$ 27.8	53.5 $\pm$ 30.0

a) b): p < 0.0001 (mean $\pm$ SD)

b) apoptotic index according to low LI and high LI of PCNA

high LI *	1.57 $\pm$ 1.82
low LI	1.41 $\pm$ 2.49

(* high LI 50) (mean $\pm$ SD)

報告されている¹⁹⁾。今回の検討でも、Bcl-2陽性率は腺管腺腫の異型度が軽度群から中等度群までは高値を示し、その後中等度群から高度群、さらに早期癌で逆に低値を示した。すなわち、Bcl-2は正常細胞が変異をきたす早期段階で関与する可能性が示唆されたわけである。この所見と先に報告⁸⁾した PCNA LI との関連を検討すると、Bcl-2陽性例は PCNA LI 値が有意の高値を示し、PCNA LI 高値群では AI 値が高値を示した (Table 6)。この結果は、発癌過程の早期段階では細胞増殖能とアポトーシスによる細胞喪失がともに高く、このバランスで癌化への過程が抑制されていたが、その後アポトーシス細胞が減少し早期癌へと進展する可能性が確認された。また、変異型 p53は腺管腺腫の中等度異型段階で発現し、その後有意に増加したことから腺腫の増大や異型度の増加段階では bcl-2遺伝子の活性化が優位で、癌化の段階では p53遺伝子異常がアポトーシスによる細胞死回避を引き起こし、細胞不死化状態に至ると推察された。

ところで、自験例での TUNEL 染色による AI 値でのアポトーシス実行程度は、正常粘膜に比べ軽度群、中等度群、高度群および早期癌がいずれも低値を示した。この腺管腺腫の異型度と AI 値との関連は、相関ありとする報告と²⁰⁾、なしとする報告²¹⁾があり、一定の見解はみられていない。理由として、アポトーシスの検索手段で形態学的方法と生化学的方法による差、高度異型腺腫と癌化する腺腫が異なる可能性などが推察される。また、AI 値と p53あるいは Bcl-2の発現との間に有意の関連はみられなかった。この結果は、細胞異型度の進行段階で細胞増能が亢進すると、2 次的に p53以外の経路を介してアポトーシスが促進される可能性が推察され、Clarke ら²²⁾は p53を介さないアポトー

シスの経路の存在を示しており、アポトーシス関連遺伝子の発現とアポトーシス実行程度との間には複雑な要因が関与するものと考えている。

ところで、大腺癌切除後に発見される異時性腺腫に対し家田ら²³⁾は、早期の過程から Bcl-2 と p53 が過剰発現しており、分子生物学的悪性度が高いと指摘している。著者らの癌併存例での検討で、Bcl-2 陽性率は非併存例に比べ逆に低値で、p53 陽性率とも有意の関連はみられなかった。また、adenoma-carcinoma sequence に関連する腫瘍性病変の数でも、4 個以上群は未満群に比べ p53 や Bcl-2 の陽性率は有意に低値であった。それゆえ、今回の検討結果からは、癌に併存した腺腫や多発腺腫でも分子生物学的悪性度は必ずしも高いともいえず、癌化への可能性を規定する因子としての貢献度は少ないと推察している。

以上の結果から、p53 や Bcl-2 蛋白の発現程度を免疫組織学的に検索する意義は、病理組織学的に細胞異型度が中等度以上で、大きさが 6mm を越え、lsp あるいは lp の形態を呈する例では、細胞増殖能が亢進するとともにアポトーシスも促進されるが、その後アポトーシスが抑制されて癌化へ進む可能性が推察された。

文 献

- 1) Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR : Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26 : 239-257, 1972
- 2) 田沼靖一 : アポトーシス . 東京大学出版会 , 東京 , 1994, p106-108
- 3) 武藤徹一郎 : 大腸ポリープ・ポリポーシス . 医学書院 , 東京 , 1993, p96-98
- 4) Fearon ER, Vogelstein B : A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61 : 759-777, 1990
- 5) Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM et al : Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244 : 217-221, 1989
- 6) Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM : Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 121 : 2228-2234, 1978
- 7) Nigro JM, Baker SJ, Presinger AC et al : Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. *Nature* 342 : 705-708, 1989
- 8) 堅田昌弘, 杉山保幸, 国枝克行ほか : 大腸腺腫の悪性化過程における細胞増殖能と変異型 p53 蛋白発現に関する免疫組織学的検討 : 日本大腸肛門病会誌 52 : 16-22, 1999
- 9) Tsuchimoto Y, Finger LR, 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
- 10) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA : Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119 : 493-501, 1992
- 11) 大腸癌研究会編 : 臨床・病理大腸癌取り扱い規約 . 改訂第 5 版 . 金原出版 , 東京 , 1994, p73
- 12) Knottnerus JA, Leffers P : The influence of referral patterns on the characteristic of diagnostic tests. *J Clin Epidemiol* 45 : 1143-1154, 1992
- 13) Hayflick L, Moorhead PS : The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25 : 585-621, 1965
- 14) Imaseki H, Hayashi H, Taira M et al : Expression of c-myc oncogene in colorectal polyps as a biological marker for monitoring malignant potential. *Cancer* 64 : 704-709, 1989
- 15) Hainaut P, Milner J : Interaction of heat-shock protein 70 with p53 translated in vitro : evidence for interaction with dimeric p53 and for a role in the regulation of p53 conformation. *EMBO J* 11 : 3513-3520, 1992
- 16) Akao Y, Otsuki Y, Kataoka S et al : Multiple subcellular localization of bcl-2 : detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes. *Cancer Res* 54 : 2468-2471, 1994
- 17) Vaux DL, Cory S, Adams JM : Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335 : 440-442, 1988
- 18) Hockenbery DM, 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
- 19) Bronner MP, Culin C, Reed JP et al : The bcl-2 proto-oncogene and the gastrointestinal epithelial tumor progression model. *Am J Pathol* 146 : 2026, 1995
- 20) Arai T, Kino I : Role of apoptosis in modulation of growth of human colorectal tubular and villous adenomas. *J Pathol* 176 : 37-44, 1995
- 21) Koike M : Significance of spontaneous apoptosis during colorectal tumorigenesis. *J Surg Oncol* 62 : 97-108, 1996
- 22) Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ et al : Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 363 : 849-852, 1993

23) 家田真太郎, 綿谷正弘: 大腸癌切除後異時性腺腫
発生における p53遺伝子蛋白発現と bcl-2遺伝子蛋

白発現の生物学的役割 初発腺腫との比較か
ら : 日本大腸肛門病会誌 49: 191 198, 1996

Influence of Apoptosis Related Protein for Carcinogenesis of Colorectal
Adenoma Evaluated by Immunohistochemical Stain

Masahiro Katada, Yasuyuki Sugiyama, Katsuyuki Kunieda and Shigetoyo Saji
Second Department of Surgery, Gifu University School of Medicine

The expression of mutant p53, bcl-2 and the apoptotic index(AI)was investigated by immunohistochemical stain in a total of 174 colorectal tubular adenomas obtained from endoscopic polypectomy. The following results were obtained. The positive expression of bcl-2 was significantly higher in tubular adenoma with moderate atypia in comparison with mild atypia, while it slightly decreased in early cancer. The positive expression of mutant p53 increased in proportion to the degree of atypia of the adenoma and was highest in early cancer. AI value was significantly lower in tubular adenoma with mild atypia, moderate atypia, severe atypia, early cancer than in normal tissues. The both positive expression of both p53 and bcl-2 were significantly higher in tubular adenomas more than 6 mm in size and in the shape of I sp and I p.

1) From the above results, it is suggested that bcl-2 and mutant p53 probably play an important role in the early and late stages of the adenoma-carcinoma sequence. 2) Moreover, tubular adenomas with more than moderate atypia, of more than 6 mm and pedunculated, should have a high malignant potential.

Reprint requests : Masahiro Katada Second Department of Surgery, Gifu University School of Medicine
40 Tsukasamachi, Gifu, 500 8076 JAPAN