

## 위암환자에서 예후인자로서 EGFR, p21(ras oncogene product) 및 p53의 연구

연세대학교 의과대학 외과학교실, 병리학교실\* 및 아주대학교 의과대학 병리학교실\*\*

민진식·이희대·이기범\*\*  
최승호·박찬일\*·노성훈

=Abstract=

### A Study of EGFR, ras Oncogene Product and p53 as a Prognostic Factor in Patients with Gastric Carcinoma

Jin Sik Min, M.D., Hy De Lee, M.D., Kyi Beom Lee, M.D.\*\*

Seung Ho Choi, M.D., Chan Il Park, M.D.\* and Sung Hoon Noh, M.D.

*Department of Surgery and Pathology\*, Yonsei University College of Medicine*

*\*\*Department of Pathology, College of Medicine, Ajou University*

There are several evidences that cancer arise as the result of multiple alterations of gene, and many attempts were made recently to understand the true role of oncogene, growth factor and its receptor, and suppressor gene as a prognostic indicator.

To determine whether alterations in EGFR, ras oncogene product and p53 are associated with prognosis in gastric carcinoma, the analysis was performed on paraffin embedded tissues of 119 primary gastric carcinomas by an immunohistochemical assay using LSAB(labelled streptavidin biotin) method. EGFR was positive in 53 cases(44.5%), ras oncogene product in 21 (17.6%), and p53 in 39(32.8%). The 5-year survival rate was 57.8% in EGFR positive and 71.3% in EGFR negative, especially of the patients with serosal invasion, 44.2% in EGFR positive and 69.6% in EGFR negative( $p < 0.05$ ). Ras oncogene product positive and negative had 5 years survival rate of 47.9% and 69.0% in each, and in stage II, the survival difference was more distinct. The 5-year survival rate in p53 positive and p53 negative were 56.7% and 68.9% respectively( $p > 0.05$ ). In patients with stage II or without serosal invasion, there was slightly survival difference between p53 positive and p53 negative.

So we concluded that EGFR and ras oncogene expression are significantly associated with worse prognosis in gastric carcinomas, especially in case of serosal invasion or stage III. Although there was no significant difference in survival rate according to p53, we suggested that p53 may be prognostic indicator in patients with stage II or no serosal invasion.

---

**Key Words:** Epidermal growth factor receptor, ras-oncogene, p53, Gastric carcinoma

---

<sup>1</sup>본 연구는 연세대학교 의과대학 91년도 과 project연구비 보조로 이루어졌음.

## 서 론

지금까지 위암의 수술후 치료방침을 정하거나 예후를 예측하는데는 광학현미경에 의한 조직병리학적 소견에 의존하여 왔으나 같은 병기의 암이라도 재발율 및 생존율에 차이가 있는 경우가 적지않게 있으므로 기존의 방법을 보완하거나 새로운 예후인자를 찾는 노력이 필요하다.

최근 암발생은 축적된 유전자 변화의 결과라는 것이 정설로 받아들여지며 따라 oncogene, 성장인자 및 그의 수용체, 혹은 tumor suppressor gene을 tumor marker나 예후인자로 이용하려는 시도가 늘고 있다<sup>1)</sup>.

위암조직에서도 암유전자의 point mutation, amplification, chromosomal loss of heterozygosity, p53 mutation 등이 발견되고 있으나 이를 치료성과 상관관계를 밝히는 연구가 미진한 실정이다<sup>2)</sup>.

이에 저자들은 위암환자에서 EGFR(epidermal growth factor receptor), ras oncogene product, p53 등이 예후에 미치는 영향을 알아보기 위하여 1984년 1월부터 1986년 12월까지 연세대학교 의과대학 외과학교실에서 위암으로 근치적 위절제술을 시행한 환자 119예를 대상으로 파라핀 포매조직에서 EGFR, ras oncogene product, p53의 발현에 따른 생존율의 차이를 관찰하였다.

## 대상 및 방법

### 1) 대상환자

1984년부터 1986년 까지 연세대학교 의과대학 외과학교실에서 위암으로 근치적 위절제술을 시행한 환자중 임상기록 및 조직표본의 보존이 양호한 119예를 대상으로 하였다. 조기위암 18예, 진행위암 101예였으며 TNM병기는 UICC(1987)분류를 따랐으며 모든 예에서 5년이상 추적조사하여 생존여부를 알아냈다.

### 2) 연구방법

파라핀 포매조직을 5 um 두께로 박절하여 오븐에서 60°C로 1시간동안 보관후 xylene에 각 10분씩 3회

통과하여 deparaffinization을 시행하였으며 100% 및 75% ethanol에 각각 10분씩 통과하여 rehydration시키고 0.05 M TRIS buffer(pH 7.5 at 25°C)에 세척하였다. 그리고 조직내 endogenous peroxidase activity를 제거하기 위하여 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액에 5분간 담근후 TRIS buffer에 세척하였다. 면역효소염색은 DAKO LSAB kit(DAKO Corp., CA)를 이용한 labelled streptavidin biotin (LSAB)방법으로 하였고 1차 항체로는 v-H-ras(Ab-1)(Oncogene Science, INC, NY) 1:20희석액, EGFR polyclonal antibody(Oncogenes Science, INC, NY) 1:20희석액, NCL-p53-DO7(Novocastra Lab. Ltd., UK) 1:50희석액을 사용하였다<sup>3)</sup>. EGFR 및 ras oncogene product에 대한 발색제로는 DAB(3,3'-diaminobenzidine; Sigma Chemical Corp., St Louis, MO), p53은 AEC(3-amino-9-ethyl carbazole; Sigma Chemical Crop., St Louis, MO)를 사용하였으며 Harris hematoxylin으로 대조염색을 하였다. 음성반응 대조군 슬라이드는 동일한 조직절편 슬라이드에 1차 항체만 점적하지 않고 나머지 모든 과정을 동일하게 시행하였다. EGFR 및 ras oncogene product 판독은 음성반응 대조군 슬라이드와 비교하여 세포막 및 세포질의 발색제 염색 여부에 따라 양성 및 음성으로 판독하였고 p53은 핵 내에 발색제 염색여부에 따라 양성 및 음성으로 판독하였으며 모든 예에서 각세포의 염색정도는 무시하였다.

전체환자에서 EGFR, ras oncogene product, p53 발현에 따른 생존율의 차이를 비교하고 림프절전이군과 비전이군, 장막침윤이 있는 군과 없는 군, stage II와 stage III, 분화도가 양호한 군과 불량한 군 등으로 나누어 이들 각각의 군에서 EGFR, ras oncogene product, p53의 발현에 따른 생존율의 차이를 관찰하였다. 분화도가 양호한 군으로는 관상선암, 고분화 및 중등도 유두선암으로 하였고 분화도가 불량한 군으로는 저분화선암, 미분화암, 환형세포암, 점액세포암으로 하였다. 생존율은 Kaplan-Meier법으로 구하였고 생존율 차이는 log rank test로 판정하였으며 유의수준 p값은 0.05로 하였다.

결 과

1) EGFR(Fig. 1)

EGFR발현이 119예중 53예(44.5%)에서 관찰되었

으며 5년생존율은 EGFR음성군 71.3%, EGFR양성군 57.8%로 EGFR발현여부에 따라 유의한 생존율 차이가 있었다(p<0.05)(Fig. 2). 장막침윤이 있는 예에서 EGFR음성군의 5년 생존율은 69.6%, EGFR 양성군은 44.2%로 장막침윤이 있는 위암에서 EGFR

Fig. 1. Immunohistochemical staining of EGFR in gastric carcinoma. The immunoreactivity is localized to the cytoplasm and cell membrane of the tumor cell(×200)

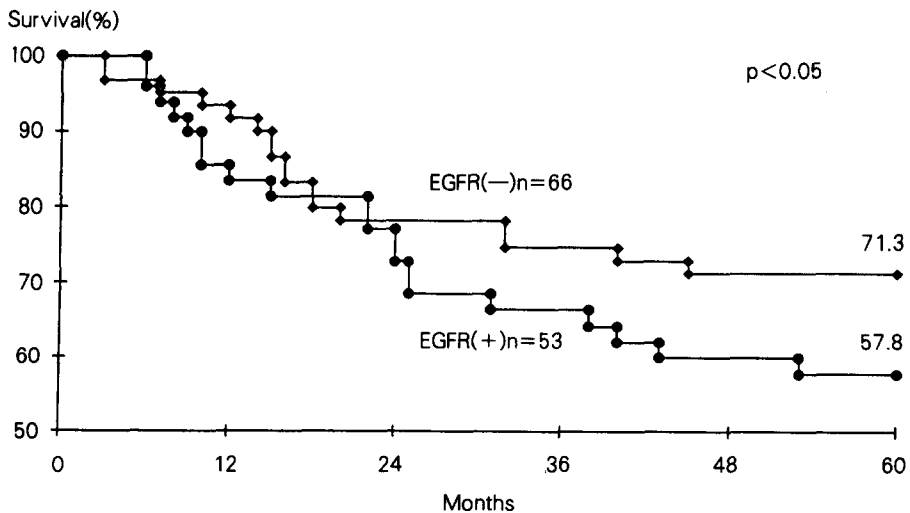


Fig. 2. Overall survival rate in EGFR negative and EGFR positive patients.

양성군이 불량한 예후를 보였다( $p < 0.05$ )(Table 1).

**2) ras oncogene product(Fig. 3).**

21예(17.6%)에서 ras oncogene 발현이 관찰되었

으며, ras 음성군의 5년생존율 69.0%, ras 양성군 47.9%로 ras oncogene 발현이 관찰된 예에서 낮은 생존율을 보였다( $p < 0.05$ )(Fig. 4). stage III에서 ras oncogene의 발현에 따른 5년 생존율은 ras 음

**Table 1.** 5 year survival rate in EGFR negative and EGFR positive in relation to status of other prognostic factors

	EGFR(-) (No. of patients)	EGFR(+) (No. of patients)	
LN meatstasis			
Negative	91.9(23)	92.3(18)	NS
Positive	54.3(43)	44.3(35)	NS
Serosal invasion			
Negative	72.9(34)	73.0(25)	NS
Positive	69.6(32)	44.2(28)	$p < 0.05$
Degree of differentiation			
Well	83.3(15)	75.5(10)	NS
Poor	68.0(51)	58.4(43)	NS
Stage			
II	83.6(20)	79.2(19)	NS
III	56.7(30)	32.1(29)	NS

NS: not significant

**Table 2.** 5 year survival rate in ras negative and ras positive in relation to status of other prognostic factors

	EGFR(-) (no. of patients)	EGFR(+) (No. of patients)	
LN metastasis			
Negative	93.8(36)	80.0( 5)	NS
Positive	54.3(62)	36.5(16)	NS
Serosal invasion			
Negative	76.3(49)	57.1(10)	NS
Positive	61.9(49)	40.0(11)	NS
Degree of differentiation			
Well	75.2(24)	40.0( 1)	NS
Poor	67.0(74)	50.7(20)	NS
Stage			
II	78.9(35)	100.0( 4)	NS
III	52.0(47)	18.3(12)	$p < 0.05$

NS: not significant

**Fig. 3.** Immunohistochemical staining of ras oncogene product in gastric carcinoma. The immunoreactivity for ras oncogene product is localized to the cell membrane of the tumor cell( $\times 200$ )

성군 52.0%, ras 양성군 18.3%로 매우 유의한 생존율 차이를 보였다( $p < 0.05$ )(Table 2).

3) p53(Fig. 5).

39예(32.8%)에서 p53의 발현이 관찰되었으며, 5년

생존율은 p53음성군 68.9%, p53양성군 56.7%로 통계적으로 유의한 차이가 없었다( $p > 0.05$ )(Fig. 6). 장막에 침윤이 없는 예에서 p53발현에 따른 5년 생존율은 음성군 78%, 양성군 61.1%였으며( $p = 0.06$ ), stage II에서는 음성군 85.7%, 양성군 64.2%(=0.06)

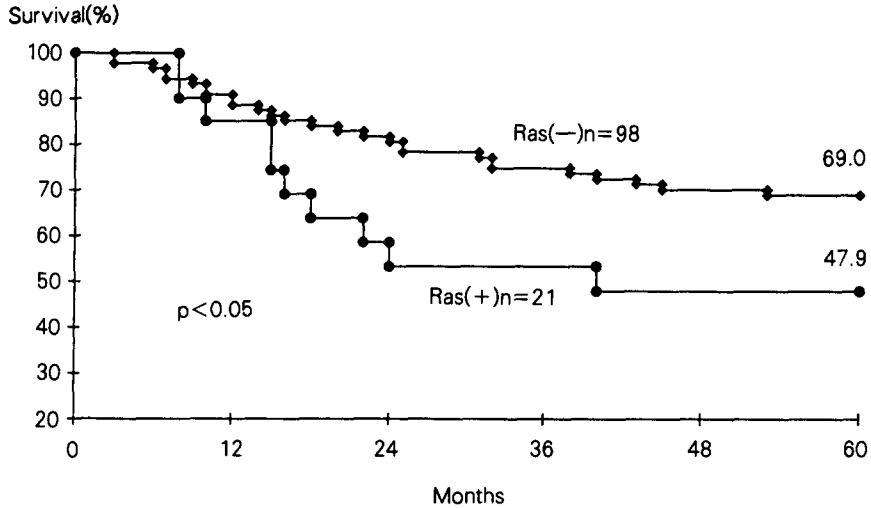


Fig. 4. Overall survival rate in ras negative and ras positive patients.

Fig. 5. Immunohistochemical staining of p53 in gastric carcinoma. The immunoreactivity for p53 is localized to the nucleus of the tumor cell ( $\times 200$ ).

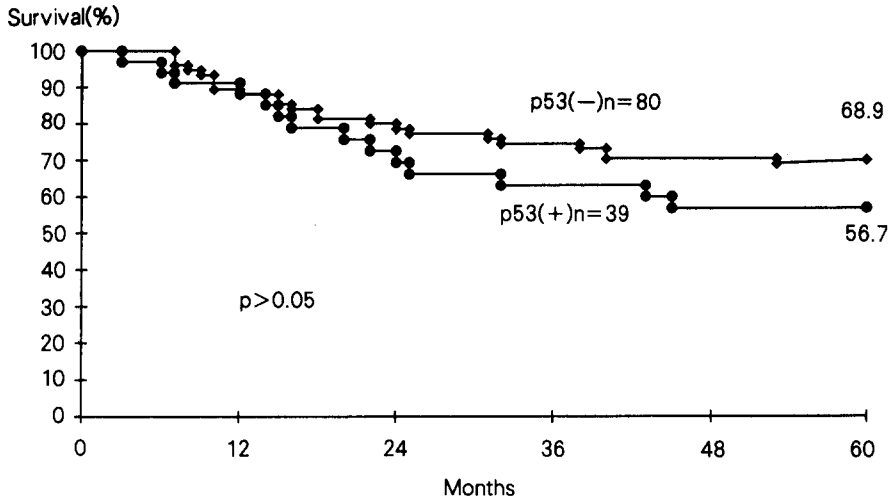


Fig. 6. Overall survival rate in p53 negative and p53 positive patients.

Table 3. 5 year survival rate in p53 negative and p53 positive in relation to status of other prognostic factors

	p53(-) (No. of patients)	p53(+) (No. of patients)	
LN metastasis			
Negative	90.0(33)	100.0( 8)	NS
Positive	54.3(47)	44.3(31)	NS
Serosal invasion			
Negative	78.0(40)	61.1(19)	p=0.06
Positive	60.0(40)	52.9(20)	NS
Degree of differentiation			
Well	85.7( 8)	64.6(17)	NS
Poor	67.2(72)	50.5(22)	NS
Stage			
II	85.7(32)	64.2( 7)	p=0.06
III	46.6(36)	42.1(23)	NS

NS: Not significant

로 통계적으로 의의는 없었으나 비교적 초기병변에서 p53발현이 있는 경우 나쁜 예후를 보였다(Table 3).

### 고 안

위암의 생물학적 성상을 이해하는데는 기존의 광학

현미경을 통한 형태학적 분류가 한계가 있어 환자의 예후를 좀 더 정확하게 예측하기 위하여 유전자적 수준의 이해를 넓히고자하는 시도가 늘고 있다.

EGFR(epidermal growth factor receptor) 단백질은 세포막 내외에 걸쳐 존재하는 수용체로서 extracellular EGF binding domain, transmembrane domain, cytoplasmic domain으로 이루어져 있고 세포질내에 있는 부분은 tyrosine kinase 기능이 있으며 EGF나 TGF(transforming growth factor)- $\alpha$ 와 결합하여 세포성장 및 분화에 중요한 역할을 한다<sup>12,16</sup>.

Kameda등은 EGFR gene amplification이 있던 위암조직에서 tyrosine kinase 활성의 증가와 함께 강한 면역화학염색반응을 관찰하여 위암조직의 면역화학염색에서 보인 EGFR 양성반응이 gene amplification에 의한 것임을 시사하였다<sup>6</sup>. 그러나 Tsujino등은 89예의 위암조직중 진행위암 1예(1.4%)에서만 EGFR gene amplification을 관찰하여 위암에서 EGFR gene amplification이 매우 드문 것임을 보여 주었다<sup>14</sup>. Yoshida등은 위암세포에서 EGF, TGF- $\alpha$ 등의 성장호르몬이 생성되며 EGF는 EGFR 발현을 촉진시킴을 관찰하여, 암세포에서 성장호르몬이 생성되고 이 호르몬이 자신의 세포막에 있는 EGF 수용체를 통하여 세포내로 신호가 전달되는 autocrine 기전으로 위암조직의 성장에 관여한다고

하였다<sup>21~24</sup>). 또 Yasui 등은 EGF 및 EGFR이 동시 발현되면 발현되지않은 군에 비하여 예후가 나쁘다고 하였다<sup>19</sup>). v-erbB 단백질은 5~20%만 세포막에 붙게 되고 나머지는 세포질에 남게되는데 면역조직화학염색을 하면 정상세포는 세포막에 주로 염색되는 반면, 위암조직에서는 세포막 뿐만아니라 세포질내에도 염색이 되어 위암조직의 EGFR이 비정상적 암유전자 발현일 수 있음을 시사한다.

위암에서 면역조직화학염색에 의한 EGFR 양성율은 약 30~40% 정도로 보고되고 있으나<sup>15</sup>) 저자들의 예에서는 44.5%로 약간 높은 분포를 보였다. Tsujino 등은 EGFR의 발현이 면역조직화학염색에서 조기위암은 3.8%인 반면, 진행위암에서는 43.4%로 암침윤 정도나 암병기와 깊은 관련이 있으며 EGFR gene amplification도 암이 진행될수록 높은 비율로 나타난다고 하였다<sup>14</sup>). 본 연구에서는 암진행 정도에 따른 EGFR의 발현에 큰 차이가 없었으나 EGER 발현에 따른 생존율 차이가 있으며, 특히 장막에 침윤이 있는 진행암에서 EGFR 발현이 있는 경우 더욱 불량한 예후를 보여 예후인자로 이용될 수 있다고 생각되었다.

EGF 수용체, PDGF수용체 같은 성장호르몬수용체로부터의 자극들은 세포내에서 일련의 생화학적 과정을 시발하기위하여 일정한 경로를 거치게되는데 ras p21은 신호전달계 초기과정에서 GTP와 결합하는 G 단백질로서 protein kinase 활성화를 유발한다. 지금까지 알려진 바로는 EGF수용체, PDGF수용체같은 tyrosine kinase로부터의 신호들은 항상 ras p21를 통하여 전달되며 세포증식에 있어 필수적인 과정중 하나다. 정상적인 위조직중 epithelial cell, chief cell, mucous cell에서는 ras p21의 발현이 관찰되지 않으나 parietal cell, smooth muscle, ganglion cell에서는 ras p21의 발현이 관찰되며 상피세포가 intestinal metaplasia, atypical hyperplasia 등의 암전구단계로 변한 경우나 암세포에서는 ras p21의 발현을 관찰할 수 있다<sup>13</sup>). 이 ras p21의 발현이 발암 과정에 관여하는 기전으로는 돌연변이 ras p21 생성이나 정상 ras p21의 과다발현 등으로 생각되고 있다<sup>4,22</sup>).

Chesa 등은 저분화 선암보다 고분화 선암에서 ras p21의 발현이 자주 관찰된다고 하였으나<sup>3</sup>) 저자들은 이러한 차이를 관찰할 수 없었으며 분화도가 다른 암

에서 ras p21 발현여부가 생존율에 차이를 보이지 않았다. 지금까지 보고된 바로는 K-ras 발현은 소화기계 및 폐암 등에서, N-ras 발현은 혈액암에서 주로 발견되며, 폐암, 아동기의 림프아구 백혈병, myelodysplastic syndrome 등에서 ras oncogene의 발현이 나쁜 예후를 보이는 것으로 되어 있다<sup>11,22</sup>). 저자들의 경우에서도 ras 양성군이 ras 음성군에 비하여 나쁜 예후를 보일 뿐아니라 Stage III에서 ras oncogene의 발현에 따라 생존율의 차이가 더욱 뚜렷하였다.

소화기암중 발암과정에서 가장 흔히 발견되는 유전자 변화중 하나가 p53 유전자 변화이다<sup>5</sup>). 정상적으로 암발생 억제기능을 가진 p53 유전자는 세포증식의 조절에 중요한 역할을 하지만 p53이 비활성화되면 in vitro에서는 cell transformation이, in vivo에서는 암발생이 유도될 수 있다<sup>2,19</sup>). 이러한 p53 비활성화의 주요 기전은 p53 유전자돌연변이, 그리고 p53과 oncoprotein의 결합 등으로 설명되고 있다. 대부분의 p53 유전자돌연변이는 변형된 단백질을 생산케하는 'missense mutation'으로서 암발생에서 가장 높은 빈도로 발견되는 유전자 변화이다<sup>2,5</sup>). 또 p53이 SV40 Large T antigen, adenovirus E1B 단백질, papillomavirus E6 단백질 등과 결합하면 정상적인 p53의 기능이 상실되는데<sup>2</sup>) 이때 oncoprotein과 결합한 p53의 반감기가 정상 p53에 비해 매우 길어진 다.

Wild type 즉 정상적인 p53은 반감기가 6~20분으로 매우 짧아서 통상적인 면역화학염색으로는 검출할 수가 없으나<sup>9,11</sup>) p53이 비활성화되면 반감기가 6시간까지도 늘어나게 되고, 따라서 핵내에 많은 양이 축적되며<sup>9</sup>) 결국 면역조직화학염색에서 검출된 p53은 비활성화된 p53임을 의미한다. Bartek 등은 면역조직화학염색으로 위에서 발생한 양성종양에서는 p53을 발견하지 못하였으나 악성종양에서는 13예중 10예(77%)에서 p53을 발견하였고<sup>1</sup>) Martin 등은 125예중 72예(58%)에서 면역조직화학반응에 양성반응을 관찰하였다<sup>10</sup>). 저자들의 예에서는 169예중 39예(32.8%)에서 관찰되어 이들 보다 약간 낮은 분포를 보였다. Uchino 등은 p53에 대한 면역조직화학염색으로 조기위암에서 22%, 진행위암에서 34%의 양성율을 관찰하였고, 특히 papillary adenocarcinoma, 고분화 및 중

등도 분화 선암, 미분화 선암중 solid nest나 focal tubular structure를 지닌 예가 환형세포암, 점액세포암, scattered pattern의 미분화암보다 높은 발현을 보인다고 하였는데<sup>15)</sup> 저자들의 예에서는 이러한 분포를 관찰할 수 없었다. Yamada등과 Kim등은 일차 위암병소에서는 돌연변이 p53의 검출이 드물지만 전이병소에서는 약 절반에서 돌연변이 p53이 검출된다고 하여 p53이 암진행과 관련이 깊고 돌연변이 p53의 발현으로 나쁜 예후를 보일 수 있음을 시사하였다<sup>17)</sup>. 반면 Yokozaki 등은 조기위암을 포함한 16예의 위암병소중 9예(56.3%)에서 p53 point mutation을 관찰하여 위암진행에서 일찍부터 p53이 변화함을 DNA sequencing을 통하여 보여주었다<sup>20)</sup>. 저자들의 경우 p53이 양성인 예와 음성인 예에서 생존율의 차이를 관찰할 수 없었으나 장막에 침윤이 없는 예에서 p53 발현에 따른 5년 생존율이 음성군 78%, 양성군 61.1%였으며(p=0.06), Stage II에서는 음성군 85.7%, 양성군 64.2%(p=0.06)로 비교적 초기 병변에서 p53의 발현은 예후에 나쁜 영향을 줄수 있다는 점을 시사하였으나 향후 많은 예수를 축적하여 분석해야 할 것으로 사료된다.

## 결 론

위암환자에서 EGFR, ras oncogene product, p53등이 예후에 미치는 영향을 알아보기 위하여 1984년부터 1986년까지 연세대학교 의과대학 외과학교실에서 위암으로 근치적 위절제술을 시행한 환자를 대상으로 면역조직화학염색을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 대상환자 119예중 53예(44.5%)에서 EGFR의 발현이 관찰되었다. 5년생존율은 EGFR음성군 71.3%, EGFR양성군 57.8%로 EGFR발현에 따라 통계적으로 유의한 생존율의 차이를 보였다(p<0.05). 장막침윤 예중 EGFR음성군의 5년 생존율 69.6%, EGFR양성군 44.2%로 장막침윤이 있는 위암에서 EGFR 양성군이 불량한 예후를 보였다(p<0.05).

2) ras oncogene product의 발현은 21예(17.6%)에서 관찰되었으며, 5년생존율은 ras 음성군 69.0%, ras 양성군 47.9%로 ras oncogene의 발현이 관찰된 예에서 낮은 생존율을 보였다(p<0.05). 또 stage III

인 예에서 ras oncogene의 발현에 따른 5년 생존율은 음성군 52.0%, 양성군 18.3%로 유의한 차이를 관찰하였다(p<0.05).

3) p53 발현은 39예(32.8%)에서 관찰되었고, 5년 생존율은 음성군 68.9%, 양성군 56.7%였다(p>0.05). 장막에 침윤이 없는 예에서 p53 발현에 따른 5년 생존율은 음성군 78%, 양성군 61.1%였으며(p=0.06), stage II에서는 음성군 85.7%, 양성군 64.2%(p=0.06)로 통계적으로 의의는 없었으나 향후 주목할 필요가 있다고 생각하였다.

이상으로 위암에서 EGFR, ras oncogene product등의 발현은 예후에 나쁜 영향을 미치며 특히 장막침윤이나 stage III인 예에서 통계적으로 의의가 있으며, p53의 발현에 따른 생존율의 차이는 관찰할 수 없었으나 장막침윤이 없는 예나 stage II에서 생존율에 영향을 미칠 수 있음을 시사하였다.

## REFERENCES

- 1) Bartek J, Barkova J, Vojtesek B: *Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. Oncogene 6: 1699, 1991*
- 2) Chang F, Syrjanen S, Kurvinen K, Syrjanen K: *The p53 tumor suppressor gene as a common cellular target in human carcinogenesis. Am J Gastroenterol 88: 174, 1993*
- 3) Chesa PG, Rettig WJ, Melamed MR, Old LJ, Niman HL: *Expression of p21 in normal and malignant human tissues: lack of association with proliferation and malignancy. Proc Natl Acad Sci USA 84: 3234, 1987*
- 4) Der CJ, Krontiris TG, Cooper GM: *Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. Proc Natl Acad Sci USA 79: 3637, 1982*
- 5) Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC: *p53 mutations in human cancers. Science 253: 49, 1991*
- 6) Kameda T, Yasui W, Tsujino T, Nakayama H, Ayhan A, Ito H, Tahara E: *Tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptor in human gastric carcinomas. Pathol Res Pract 188:*



- 37, 1992
- 7) Kim JH, Takahashi T, Chiba I, Park JB, Birrer MJ, Roh JK, Lee HD, Kim JP, Minna JD, Gazdar AF: Occurrence of p53 gene abnormalities in gastric carcinoma tumors and cell lines. *J Natl Cancer Inst* **83**: 938, 1991
  - 8) Lee KB, Chung HC: A study of expression of EGFR and ER as prognostic factors of breast cancer. *J Kor Can Asso* **25**: 368, 1993
  - 9) Levine AJ, Momand J, Finlay CA: The p53 tumor suppressor gene. *Nature* **351**: 453, 1991
  - 10) Martin HM, Filipe MI, Morris RW, Lane DP, Silvestre F: p53 Expression and prognosis in gastric carcinom. *Int J Cancer* **50**: 859, 1992
  - 11) Milner J, Medealf EA, Cook AC: Tumor suppressor p53: Analysis of wild-type and mutant p53 complexes: *Mol Cell Biol* **11**: 12, 1991
  - 12) Owen OJ, Stewart C, Leake RE, McNicol AN: A comparison of biochemical and immunohistochemical assessment of EGFR expression in ovarian cancer. *Anticancer Res* **12**: 1455, 1992
  - 13) Rodenhuis S: ras and human tumors. *Semin Cancer Biol* **3**: 241, 1992
  - 14) Tsujino T, Yoshida K, Nakayama H, Ito H, Shimosato T, Tahara E: Alterations of oncogenes in metastatic tumours of human gastric carcinomas. *Br J Cancer* **62**: 226, 1990
  - 15) Uchino S, Noguchi M, Hirota T, Itabachi M, Saito T, Kobayashi M, Hirohasi S: High incidence of nuclear accumulation of p53 protein in gastric cancer. *Jpn J Clin Oncol* **22**: 225, 1992
  - 16) Wahl GM: The importance of circular DNA in mammalian gene amplification. *Cancer Res* **49**: 1333, 1989
  - 17) Yamada Y, Yoshida T, Hayashi: P53 gene mutations in gastric cancer metastases and in gastric cancer cell lines derived from metastases. *Cancer Res* **51**: 5800, 1992
  - 18) Yasui W, Sumiyoshi H, Hata J, Kameda T, Ochiai A, Ito H, Tahara E: Expression of epidermal growth factor receptor in human gastric and colonic carcinomas. *Cancer Res* **48**: 137, 1988
  - 19) Yokota J, Wada M, Shimosato Y, Terada M, Sugimura T: Loss of heterozygosity on chromosomes 3, 13 and 17 in small-cell carcinoma and on chromosome 3 in adenocarcinomas of the lung. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 9252, 1987
  - 20) Yokozaki H, Kuniyasu H, Kitadai Y, Nishimura K, Todo H, Ayhan A, Yasui W, Ito H, Tahara E: p53 point mutations in primary human gastric carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* **119**: 67, 1992
  - 21) Yoshida K, Kyo E, Tsujino T, Sano T, Niimoto M, Tahara E: Expression of epidermal growth factor, transforming growth factor- $\alpha$  and their receptor genes in human gastric carcinomas: implication for autocrine growth. *Jpn J Cancer Res* **81**: 43, 1990
  - 22) Yoshida K, Hamatani K, Koide H, Ikeda H, Nakamura N, Akiyama M, Tsuchiyama H, Nakayama E, Shiku H: Preparation of anti-ras Mr 21,000 protein monoclonal antibodies and immunohistochemical analyses on expression of ras genes in human stomach and thyroid cancers. *Cancer Res* **48**: 5503, 1988
  - 23) Yoshida K, Takanashi A, Kyo E, Ito H, Niimoto M, Hattori T, Tahara E: Epidermal growth factor induces the expression of its receptor gene in human gastric carcinoma cell line TMK-1. *Jpn J Cancer Res* **80**: 734, 1989
  - 24) Yoshida K, Tsuda T, Makashi M, Tsujino T, Hattori T, Ito H, Tahara E: Amplification of epidermal growth factor receptor(EGFR) gene and oncogenes in human gastric carcinomas. *Virchows Archiv B Cell Pathol* **57**: 285, 1989