

ORIGINAL ARTICLE

수술 전 항암화학요법을 전후한 유방암 종양수용
체(ER, PR, HER-2)의 발현 변화이종원 · 한원식 · 고은영 · 조지형 · 정소연 · 김은규 · 김범석¹ · 임석아¹ · 이호창² · 박인애² · 오승근 · 윤여규 · 김성원
황기태 · 노동영서울대학교 의과대학 외과학교실, ¹내과학교실, ²병리학교실Alteration of Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, and HER-2 Expression
in Breast Cancer after Neoadjuvant ChemotherapyJong Won Lee, Wonshik Han, Eunyoung Ko, Jihyoung Cho, So-Youn Jung, Eun-Kyu Kim, Bhumsuk Keam¹,
Seock-Ah Im¹, Ho-chang Lee², In Ae Park², Seung Keun Oh, Yeo-Kyu Youn, Sung-Won Kim, Ki-Tae Hwang,
Dong-Young NohDepartments of Surgery, ¹Internal Medicine, and ²Pathology, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: We aimed to assess the concordance of the immunohistochemical profiles of core biopsy before administering neoadjuvant chemotherapy with that of the surgical specimens after a definitive operation for breast cancer.

Methods: We retrospectively reviewed the estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and HER-2 expressions in 130 consecutive patients who received neoadjuvant chemotherapy and were followed by surgery during the period between February 2002 and March 2006. The pathologic complete tumor response rate for this group was 4.6% (6/130). Both the pre- and post-operative immunohistochemical profiles were available in 32 of the 124 patients (25.8%). Immunohistochemical staining was done on the core biopsies before chemotherapy and on the surgical specimens after operation.

Results: There were 12 markers from 11 patients that were altered out of the 96 total markers (ER, PR, or HER-2) from 32 patients: 2 ER (2/12, 16.7%), 4 PR (4/12, 33.3%), and 6

HER-2 (6/12, 50.0%). One patient simultaneously had changes in the expressions of PR and HER-2. Conversion of the hormone receptor status occurred in 3 patients (3/32, 9.4%): this was positive to negative in two, and vice versa in one. In addition, there were 6 conversions (6/32, 18.8%) of the HER-2 status from negative to positive.

Conclusion: The hormone receptor status changed in 9.4% of the 32 patients and the HER-2 status changed in 18.8% of the 32 patients after neoadjuvant chemotherapy. We have concluded that conducting only a single immunohistochemical study about ER, PR, and HER-2 may not be enough to exactly estimate the tumor marker status in the neoadjuvant setting.

Key Words : Breast cancer, Neoadjuvant chemotherapy, Tumor marker expression, Steroid hormone receptor, HER-2

중심단어 : 유방암, 수술 전 항암화학요법, 종양수용체 발현, 스테로이드 호르몬 수용체, HER-2

서론

에스트로겐 수용체(Estrogen receptor, ER)와 프로게스테론 수용체(Progesterone receptor, PR)는 내분비요법에 대한 반응을 예상할 수 있는 예측인자로서 이들에 대한 면역조직화학염

책임저자 : 노동영

110-744 서울시 종로구 연건동 28, 서울대학교 의과대학 외과
Tel: 02-760-2921, Fax: 02-3673-4250

E-mail : dynoh@plaza.snu.ac.kr

접수일 : 2007년 5월 2일 게재승인일 : 2007년 6월 21일

*본 논문의 요지는 2006년 춘계 유방암학회에서 구연되었음.

색 검사는 유방암 치료 과정에서 기본적으로 시행되고 있다. 한편 수술 전 항암화학요법은 항암제의 반응을 확인할 수 있고 유방보존술의 시행 가능성을 증가시킨다는 장점을 바탕으로 국소진행성 유방암의 치료 방법 중 하나로 시행되고 있다. 국소진행성 유방암에 대하여 수술 전 항암화학요법을 시행하는 경우 항암제를 사용한 전후로 유방암 종양수용체(ER, PR, HER-2 등) 발현에 변화가 생길 수 있음이 보고되어 있다.(1, 2) 하지만 이러한 변화의 임상적 의의성과 원인에 대해서는 논란이 있다.(1-3)

이에 저자들은 수술 전 항암화학요법을 시행한 환자들을 대상으로 항암제 사용전의 침샘검조직과 항암제 요법을 시행한 후 수술적으로 절제한 조직에서의 ER, PR, HER-2에 대한 면역조직화학염색 결과를 비교해 보았다. 이를 통하여 수술 전 항암화학요법을 전후한 종양수용체의 발현 변화 양상을 확인하고자 본 연구를 수행하였다.

방 법

1. 연구대상

2002년 2월부터 2006년 3월까지 서울대학교병원에서 유방암 진단 하에 수술 전 항암화학요법을 시행한 뒤 근치적 수술을 시행한 130명의 환자를 대상으로 하였다. 세 사이클의 Docetaxel과 adriamycin 병합요법 후 Pathologic Complete Response (pCR)는 6명에서 나타났으며(6/130, 4.6%) 이들을 제외한 124명 중 항암제 사용 전 침샘검조직과 근치적 수술에 의한 조직에서 면역조직화학검사가 중복 시행된 32명의 환자를 대상으로 ER, PR, HER-2의 면역조직화학검사상 발현 양상을 비교하였다.

연구 대상자 32명의 평균 연령은 42.8세였으며, 수술 전 항암

화학요법 전의 임상적 병기는 IIA에서 IIIC까지 분포하였으며, 수술 전 항암화학요법 후의 근치적 절제표본의 병리학적 병기는 I에서 IIIC까지 분포하였다. 30예는 조직학적으로 침윤성관암이었으며 1예는 점액성암, 1예는 침윤성미세유두암이었다(Table 1). Docetaxel과 adriamycin 병합요법에 의한 반응은 Partial Response (PR) 19예(59%), Stable Disease (SD) 11예(35%), Progressive Disease (PD) 2예(6%)였다. 근치적 수술로는 유방전절제술 18예(56%)와 보존술 14예(44%)가 시행되었다(Table 2).

2. 방법

면역조직화학염색을 위하여 파라핀 포매된 조직을 4 μ m 두께로 절단하고 saline 또는 poly-L-lysine이 처리된 slide에 얹어 통상의 방법대로 탈-파라핀하고 증류수로 세척한 후, 3% 과산화수소로 5분간 처리하였다. 이후 10 mM citrate buffer (pH 6.0)에 담근 채 750 W microwave에 5분, trypsin에 5분간 처리하고 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 세척한 후 정상 쥐 혈청으로 20분간 반응시켰다. 이 후 각각에 해당하는 단클론 항체와 반응시켜 관찰하였다. 반응 후 PBS 용액으로 세척한 후 표지항체(labeled antibody; avidin-biotinylated peroxidase complex)로 30분간 반응시켰다. Diaminobenzidine으로 발색하고 hematoxylin으로 대조 염색하여 10배의 고배율 시야에서 관찰하였다.

결과는 한 명의 병리전문의에 의해 판독되었으며, ER과 PR은 면역조직화학염색 후, 고배율 시야에서 10% 이상 유방암 세포의 핵이 명확히 염색된 경우 발현 양상으로 판정하였고 HER-2는 NCL-CB-11 (Novocastra, New Castle, UK)를 이용하여 염색한 후 세포막에 염색된 정도에 따라 0에서 3+까지 나누어 2+와 3+를 발현양상으로 판정하였다.

Table 1. Clinicopathologic characteristics

Characteristics	No. of patients	%
Mean age (yr)	42.8 \pm 9.4	
Stage (pre-chemotherapy, clinical)		
IIB	4	13
IIIA	16	50
IIIB	9	28
IIIC	3	9
Stage (post-operative, pathologic)		
I	5	16
IIA	1	3
IIB	10	31
IIIA	8	25
IIIB	2	6
IIIC	6	19
Histology		
Infiltrating ductal	30	94
Mucinous	1	3
invasive micropapillary	1	3

Table 2. Treatment characteristics

Characteristics	No. of patients	%
Number of cycles (Docetaxel+Adriamycin)		
2	4	13
3	25	78
4	3	9
Chemotherapy response		
PR	19	59
SD	11	35
PD	2	6
Type of operation		
Mastectomy	18	56
BCS	14	44

PR=partial response; SD=stable disease; PD=progressive disease; BCS=breast conserving surgery.

결 과

대상 환자 32명에 대해 각기 ER, PR, HER-2 3가지 종류의 종양 수용체, 총 96개 종양수용체의 발현여부를 항암제 사용 전후로 나누어 비교하였다. 이 중 12개(12/96, 12.5%)의 수용체가 발현양상에 변화가 있었으며, ER이 2예(2/12, 16.7%), PR이 4예(4/12, 33.3%), HER-2가 6예(6/12, 50.0%)였다. 항암제 사용 전

Table 3. Alteration patterns of ER and PR expression on IHC after neoadjuvant chemotherapy (n=32)

Specimen type & IHC results	Surgical specimen	
	+	-
ER		
Pre-chemotherapy gun biopsy		
+	12	1
-	1	18
Conversion rate=6.25% (2/32)		
PR		
Pre-chemotherapy gun biopsy		
+	9	3
-	1	19
Conversion rate=12.5% (4/32)		
Hormone receptor status		
Pre-chemotherapy gun biopsy		
+	14	2
-	1	15
Conversion rate=9.4% (3/32)		

ER=estrogen receptor; PR, progesterone receptor; IHC=immunohistochemistry.

*Hormone receptor (+)=ER (+) and/or PR (+); †Hormone receptor (-)=ER (-) and PR (-).

침생검조직과 비교하여 항암제 사용 후 수술적 절제 조직에서의 결과를 보았을 때, ER의 경우 1예는 발현 음성에서 양성으로 1예는 발현 양성에서 음성으로 변화였다. PR의 경우 1예는 발현 음성에서 양성으로 3예는 발현 양성에서 음성으로 변화였다. HER-2의 경우 6예 모두 발현음성에서 양성으로 변화였다. 1명의 환자에서 PR의 발현음성 변화와 HER-2의 발현양성 변화가 동시에 발생하였기 때문에 수용체 자체의 변화는 12예(12/96, 12.5%)였으나 수용체 변화가 있는 환자는 11예(11/32, 34.4%)였다(Table 3, 4).

보조적 호르몬요법의 임상적 관점에서 볼 때, ER과 PR 각각의 수용체 변화로 인해 스테로이드 호르몬 수용체의 전체적인 발현 상태가 변화한 환자는 3예(환자 1, 4, 5)로 9.4% (3/32)였다. 환자 1의 경우 스테로이드 호르몬 수용체 양성(ER과 PR 중 최소 하나 이상이 발현 양성인 경우)으로 변화하였으며, 환자 4와 5는 스테로이드 호르몬 수용체 음성(ER과 PR 모두 음성)으로 변화하였다(Table 3, 5).

Table 4. Alteration patterns of HER-2 on IHC after neoadjuvant chemotherapy

Specimen type & IHC results	Surgical specimen			
	-	1+	2+	3+
Pre-chemotherapy gun biopsy				
-	14	3	2	1
1+	1	1	3	0
2+	0	0	1	0
3+	0	0	0	6
Conversion* rate=18.8% (6/32)				

IHC=immunohistochemistry.

*Conversion=(- or 1+) to (2+ or 3+) or vice versa.

Table 5. Clinicopathologic characteristics of 11 female patients who experienced receptor expression changes after neoadjuvant chemotherapy

Pt	Age	Stage		Dx	NG/HG	CTx response	Op	Marker status (ER/PR/HER-2)	
		Clinical	Pathologic					Initial	After
1	31	T2N1	T1N0	IDC	3/III	PR	BCS	-/-/2+	+/-/2+
2	47	T4N1	T4N1	IDC	2/III	SD	MRM	+/+/-	-/+/-
3*	45	T3N2	T3N2	IDC	3/III	SD	MRM	+/+/+	+/-/2+
4	46	T4N1	T2N1	IDC	3/NA	PR	BCS	-/+/-	-/-/-
5	36	T3N2	T3N0	IDC	3/III	SD	MRM	-/+/-	-/-/-
6	29	T2N2	T2N3	MC	2/NA	PR	BCS	+/-/-	+/+/+
7	61	T2N2	T2N2	IDC	3/III	SD	MRM	+/+/+	+/+/2+
8	37	T4N1	T2N2	IDC	2/II	PR	BCS	+/+/-	+/+/2+
9	47	T3N1	T3N1	IDC	3/III	SD	MRM	-/-/+	-/-/2+
10	55	T4N1	T4N2	IDC	2/II	PD	MRM	+/-/-	+/-/2+
11	64	T2N2	T1N3	IMC	NA	PR	BCS	-/-/-	-/-/3+

Pt=patient's number; Dx=histologic diagnosis; NG=nuclear grade; HG=histologic grade; CTx=chemotherapy; Op=operation type; ER=estrogen receptor; PR, progesterone receptor; IDC=infiltrating ductal carcinoma; MC=medullary carcinoma; IMC=invasive micropapillary carcinoma; PR=partial response; SD=stable disease; PD=progressive disease; BCS=breast conserving surgery; MRM=modified radical mastectomy; NA=not available.

*One patient (pt 3) simultaneously experienced PR down-expression and HER-2 up-expression.

고 찰

이 연구는 수술 전 항암화학요법에 의한 ER, PR, HER-2의 면역조직화학검사의 결과 변화와 그 변화의 임상적 의의와 보조적 치료에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 본 연구에서는 총 32예의 환자 중 3예의 환자에서 수술 전 항암화학요법을 전후하여 면역조직화학검사에서 스테로이드 호르몬 수용체 상태가 변화하였다. 구체적으로 환자 1의 경우에 ER/PR (-/-)에서 ER/PR (+/-)로 스테로이드 호르몬 수용체 양성으로 변화하여 보조호르몬요법의 대상자가 되었다. 환자 4와 5의 경우에는 ER/PR (-/+)에서 ER/PR (-/-)로 스테로이드 호르몬 수용체 음성으로 변화하여 보조 호르몬 요법의 대상에서 빠지는 결과가 되었다(Table 3, 5).

Piper 등(2)은 수술 전 항암화학요법을 받은 35명의 대상환자들을 34명의 항암화학요법을 받지 않은 대조군과 비교하여 ER, PR, HER-2의 발현 변화율이 수술 전 항암화학요법을 받은 군에서 유의하게 높다고 보고하였다. Taucher 등(3)은 수술 전 항암화학요법을 전후한 ER과 PR의 발현 변화 양상이 특히 발현양성에서 발현음성으로 유의하게 변함을 보고하였다. 하지만 이러한 종양수용체 음성발현은 조직 고정 과정의 불완전성에 의해서도 발생할 수 있는데 Mann 등(4)은 침샘샘 조직이 수술적 절제 조직보다 유의하게 진하게 염색되었다고 보고하였다. 또한 수술적 절제조직보다 침샘샘샘에 의한 조직이 고정이 더 완전하게 되기 때문에 면역조직화학검사에서 보다 신뢰도가 높은 것으로 간주하였다. 이들의 연구는 항암제에 의한 종양세포의 단백질 발현양상의 변화보다는 조직 고정 과정의 차이에 의한 염색상의 문제에 초점을 맞춘 것이었다.

이에 반하여 유방암 종양수용체의 면역조직화학염색상의 발현 변화가 항암요법과는 무관하다는 주장도 있는데, Arens 등(5)은 수술 전 항암화학요법을 받은 군과 받지 않은 군에서 ER, PR, Ki67, p53, HER-2의 발현 변화율에서 통계적인 유의성을 찾을 수 없었다. 또한 Fluorescent in situ hybridization (FISH)에 의한 HER-2 gene copy number에서도 두 군 간에 유의한 차이를 발견할 수 없었다. Lee 등(1)도 56명의 수술 전 항암화학요법을 받은 환자군을 동수의 항암화학요법을 받지 않은 대조군과 비교하였는데 양군 모두 동일하게 3명(5%)에서 스테로이드 호르몬 수용체 상태의 변화가 있었으며, 그 원인으로는 조직 채취 과정에서 차이에 기인한 것으로 결론지었다. 그러나 이러한 변화는 향후 보조적 치료에 영향을 끼칠 수 있기 때문에 수술적으로 절제한 조직에서 수용체 발현에 대한 재검을 권장하였다.

한편 종양수용체 중 HER-2가 ER이나 PR보다 항암제에 의한 영향에 안정적이라는 주장이 있다. Varga 등(6)은 특히 ER과 PR의 면역조직화학검사에서 발현 변화율은 30%인데 비해 HER-

2 gene의 증폭 변화율은 FISH 검사에서 13%로 상대적으로 적었다. 앞서 기술한 Taucher 등(3)의 연구에서 ER과 PR의 발현이 수술 전 항암화학요법을 전후하여 발현양성에서 발현음성으로 유의하게 변화하였으나 비슷한 시기의 그의 연구에서 Epirubicin과 Docetaxel 병용요법에 의한 수술 전 항암화학요법이 HER-2 발현 변화에 미치는 영향은 유의하지 않았다. 본 연구와 달리 이들은 FISH를 이용하여 HER-2의 발현 변화를 비교하였다. 이미 면역조직화학염색은 경제성 면에서는 장점이 있으나 판독 시 발생할 수 있는 병리전문의에 의한 주관성의 문제로 인해 결과의 일관성이 결여되며 특히 약양성의 경우에는 FISH와 비교할 때 면역조직화학염색법이 HER-2의 발현을 정확히 예측하지 못한다.(8-10) 본 연구에서는 HER-2의 발현 변화가 전체 12예 중 6예로 가장 많았다. 비록 1명의 병리전문의가 판독을 하여 주관성의 문제를 극복하려 하였으나, HER-2 발현의 변화가 있었던 6예 중 5예에서 그 변화의 양상이 0 혹은 1+에서 2+로 변한 경우임을 고려해야 하겠다(Table 4, 5).

본 연구는 대조군과의 비교가 없어 Docetaxel과 Adriamycin 병용요법에 의한 수술 전 항암화학요법이 ER, PR, HER-2의 면역조직화학적 발현에 의미있는 영향을 미치는지는 알 수 없다. 그러나 본 연구 결과를 통해서 수술 전 항암화학요법을 전후하여 스테로이드 호르몬 수용체에 대한 면역조직화학 검사 결과가 9.3% (3/32)에서 달라질 수 있음을 알 수 있었다. 만일 이 환자들이 수술 전 항암화학요법을 전후한 면역조직화학검사의 스테로이드 호르몬 수용체 결과 중 공교롭게도 음성의 결과를 근거로 보조적 호르몬 요법 여부를 결정하게 된다면 이를 통해 얻을 수 있는 치료 효과를 잃는 결과가 될 것이다. 따라서 수술 전 항암화학요법의 사용이 늘어나는 현실에서 수술 전 항암화학요법이 ER과 PR의 발현에 미치는 영향은 아직 명확히 알 수 없으나 임상적 면역조직화학 검사를 수술 전 항암화학요법 전후로 중복 시행하여 둘 중 어느 한 경우에서라도 호르몬 수용체 양성인 경우에는 보조적 호르몬 요법을 시행하고, anti-HER-2 therapy가 필요한 경우-특히 면역조직화학염색이 약양성(2+)일 때에는 FISH 검사법으로 확진하는 차선책을 고려해야 할 것이다. 향후 면역조직화학염색법의 단점을 극복하고, (11) 항암제가 유방암 종양수용체 발현에 미치는 영향에 대한 기전을 파악하기 위해서는 보다 세밀한 연구가 필요할 것이다.

결 론

유방암의 예후 및 예측인자로서 중요한 ER, PR, HER-2의 면역조직화학검사에 의한 발현 양상은 수술 전 항암화학요법을 전후하여 변할 수 있다. 따라서 항암제 사용을 전후하여 면역조직화

학검사의 재검이 필요하며 이 결과를 유방암 환자의 보조적 치료 방침을 결정하는데 고려할 필요가 있다.

참고문헌

1. Lee SH, Chung MA, Quddus MR, Steinhoff MM, Cady B. The effect of neo- adjuvant chemotherapy on estrogen and progesterone receptor expression and hormone receptor status in breast cancer. *Am J Surg* 2003;186:348-50.
2. Piper GL, Patel NA, Patel JA, Malay MB, Julian TB. Neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer results in alterations in preoperative tumor marker status. *Am Surg* 2004;70:1103-6.
3. Taucher S, Rudas M, Gnant M, Thomanek K, Dubsky P, Roka S, et al. Sequential steroid hormone receptor measurements in primary breast cancer with and without intervening primary chemotherapy. *Endocr Relat Cancer* 2003;10:91-8.
4. Mann GB, Fahey VD, Feleppa F, Buchanan MR. Reliance on hormone receptor assays of surgical specimens may compromise outcome in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:5148-54.
5. Arens N, Bleyl U, Hildenbrand R. HER2/neu, p53, Ki67, and hormone receptors do not change during neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Virchows Arch* 2005;446:489-96.
6. Varga Z, Caduff R, Pestalozzi B. Stability of the HER2 gene after primary chemotherapy in advanced breast cancer. *Virchows Arch* 2005;446:136-41.
7. Taucher S, Rudas M, Mader RM, Gnant M, Sporn E, Dubsky P, et al. Influence of neoadjuvant therapy with epirubicin and docetaxel on the expression of HER2/neu in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2003;82:207-13.
8. Lebeau A, Deimling D, Kaltz C, Sendelhofert A, Iff A, Luthardt B, et al. HER-2 analysis in archival tissue samples of human breast cancer: comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *J Clin Oncol* 2001;19:354-63.
9. Perez EA, Roche PC, Jenkins RB, Reynolds CA, Halling KC, Ingle JN, et al. HER2 testing in patients with breast cancer: poor correlation between weak positivity by immunohistochemistry and gene amplification by fluorescence in situ hybridization. *Mayo Clin Proc* 2002;77:148-54.
10. Hammock L, Lewis M, Phillips C, Cohen C. Strong HER-2 protein overexpression by immunohistochemistry often does not predict oncogene amplification by fluorescence in situ hybridization. *Hum Pathol* 2003;34:1043-7.
11. Tawfik OW, Kimler BF, Davis M, Donahue JK, Persons DL, Fan F, et al. Comparison of immunohistochemistry by automated cellular imaging system (ACIS) versus fluorescence in-situ hybridization in the evaluation of HER-2 expression in primary breast carcinoma. *Histopathology* 2006;48:258-67.