

유방암에서 HER2 단백질 발현과 유전자 증폭에 따른 생존분석

김신선, 박우찬, 이동호, 김정수, 오세정, 송병주, 정상철, 전해명, 이재학
가톨릭대학교 의과대학 외과학교실

Survival Analyses in Breast Cancer According to Over-expression and Amplification of HER2

Sin Sun Kim, Woo-Chan Park, Dong Ho Lee, Jeong Soo Kim, Se Jeong Oh, Byung Joo Song, Sang Seol Jung,

Department of Surgery, College of Medicine,
The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Purpose: HER2 is a 185-kDa transmembrane protein, which shares a considerable homology with the epidermal growth factor receptor. The over-expression of HER2 has been reported to be associated with a poor clinical outcome in breast cancer. In clinical practice and research studies, immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in-situ hybridization (FISH) have commonly been used for the detection of HER2. The aim of this study was to evaluate the prognostic significance of HER2 according to the results of IHC and FISH for HER2.

Methods: IHC and FISH were performed on the same breast cancer specimens from 388 Korean patients, with a mean follow-up duration of 59.8 months, with survival analyses were made according to the results of the HER2 detection methods; A0485 Ab (DAKO, Denmark) and the HER2 test kit (DAKO HerceptTestTM, Denmark) for IHC, and the

HER2 FISH kit (Vysis Inc., Downers Grove, Ill) for FISH were used.

Results: The IHC showed HER2 over-expression rates of 34.8% and 26.8% by the A0485 antibody and HerceptTest, respectively. The rate of HER2 amplification by FISH in the same specimen was 25.8%. HER2 was confirmed as an independent prognostic factor by multivariate analyses regardless of the detection methods. In the survival analyses, according to the IHC results for HER2, only the 3+ scoring group in the positive results was associated with a poor survival. However, the positive group in the FISH test revealed a significantly worse survival than the FISH-negative group.

Conclusion: For the prediction of survival of patients with breast cancer, the FISH test would be more useful than IHC, especially in the 2+ scoring IHC cases.

(J Breast Cancer 2005;8: 23-30)

Key Words Breast cancer, Prognosis, HER2
중심 단어 유방암, 예후, HER2

책임저자 : 박우찬

150-713 서울시 영등포구 여의도동 62번지 가톨릭대학교 성모병원 외과

Tel : 02-3779-1035, Fax : 02-786-0802, E-mail : wcpark@catholic.ac.kr

접수일 : 2005년 1월 18일 ; 게재승인일 : 2005년 3월 22일

이 논문은 2004년 가톨릭중앙의료원 성의장학 학술연구비 지원과제 연구비에 의하여 이뤄졌음.

서 론

유방암은 염증성 유방암과 같이 급격하게 진행되어 불량의 예후를 보이는 경우에서부터 점액성 유방암과 같이 수술만으로도 완치에 가까운 예후를 기대할 수 있는 경우까지 매우 다양한 예후를 보이기 때문에 유방암의 예후를 예측할 수 있는 인자의 중요성은 아무리 강조해도 지나치지 않다. 현재 유방암의 예후 인자로 잘 알려진 것으로는 액와 림프절 전이 상태, 원발 종양의 크기, 조직학적 아형, 핵등급과 조직등급, 증식지수, 에스트로겐 및 프로게스테론 수용체, HER2 유전자 증폭 혹은 과발현 등을 꼽을 수 있으며 실제로 임상적으로 널리 사용되고 있다. 이 가운데 HER2는 유방암의 예후를 예측할 수 있을 뿐만 아니라 항암화학요법의 반응을 예측할 수도 있고, 항암 내분비요법에서는 내성 발현과 연관되어 있는 것으로 알려지고 있어 관심의 대상이 되고 있다. 게다가 HER2 수용체에 대한 인체화된 단클론 항체인 trastuzumab (Herceptin)이 개발되어 유방암 치료에 사용되었고, 그 효과가 확인되면서 그 중요성이 더욱 강조되고 있다.(1-2)

HER2 유전자는 인체의 17번 염색체에 위치하는 원발암 유전자(proto-oncogene)로서 185 kDa 크기의 세포막 성장인자 수용체 단백질의 발현을 담당하여 세포내 신호전달 체계에서 신호의 증폭에 중요한 역할을 하는데,(3) 그 발현율은 유방암의 약 20 - 30% 정도로 알려져 있다.(4-7) HER2에 대한 검사법으로는 유전자 수준의 검사에서부터 혈청 내 단백질 검사까지 여러 방법이 알려져 있으나 현재 임상적으로 사용되는 주된 방법으로는 면역조직화학염색법(Immunohistochemistry: IHC)과 형광동소교잡법(Fluorescence in-situ hybridization: FISH)이 있다. IHC는 HER2 세포막 단백질에 대한 항체를 이용하는 방법으로 비교적 쉽고 간단하며 비용도 저렴하여 널리 사용되고 있지만 세포막 염색의 강도를 판정함에 있어 객관성이 부족하여 임상적인 적용에 신중을 기해야 한다. HER2 유전자에 대한 탐침을 이용하여 증폭된 유전자를 형광 발색시켜 그 결과를 확인하는 방법인 FISH는 객관적인 결과를 얻을 수 있어 임상적으로 적용이 용이한 장점이 있는 반면 비

용이 많이 드는 문제가 있어 그 사용에 제한을 받고 있다.

본 연구에서는 유방암의 예후 예측에 중요한 역할을 담당하는 HER2 유전자의 증폭과 HER2 단백질의 과발현을 각각 FISH와 IHC를 통하여 확인하고, 그 결과에 따른 유방암 환자의 후향적 생존을 분석을 통하여 HER2 검사 방법이 가지는 생존을 예측 능력을 비교하고자 하였다.

방 법

(1) 재료

1994년 1월부터 1999년 12월까지 가톨릭대학교 의과대학 부속병원에서 침윤성 유관암(invasive ductal carcinoma, NOS)으로 유방절제술을 시행 받았던 환자의 파라핀 포매 조직 중 보존 상태가 양호한 388 예를 대상으로 하였다.

(2) 방법

1) 조직 집적 블록 제작 및 면역조직화학염색

대상 조직 표본을 동일한 조건에서 면역조직화학염색을 시행하기 위해서 조직 집적 블록을 만들었다. 각 중재의 파라핀 포매 조직에서 조직 소견을 대표하는 부위를 현미경으로 확인하고, 그 부위에서 직경 3 mm 크기의 펀치를 이용하여 조직을 얻어 한 블록 당 30예의 조직을 배열하였다. 파라핀에 포매되어 있는 조직 집적 블록을 4 mm 두께로 박절하여 슬라이드에 부착시켜 탈파라핀화 및 함수과정을 거쳐 중류수로 세척한 후 10 mm 구연산 완충액(citrate buffer, pH 6.0)에 넣고 Microwave에서 15분간 끓인 후 트리스 완충액(Tris buffer)으로 세척한 후 3% 과산화수소로 10분간 처리하였다. 다시 트리스 완충액으로 세척하고 정상 억제 혈청에 20분 간, 반응시킨 후 polyclonal rabbit anti-human HER2 항체(A0485, DAKO, Denmark)로 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 트리스 완충액으로 세척 후 이차항체를 30분 간 반응시켰으며, 세척 후 streptavidin-peroxidase를 실온에서 30분 간 처리하였다. 세척 후 발색제 3,3-Diaminobenzidine (DAB)를 8분간 처리하여 발색

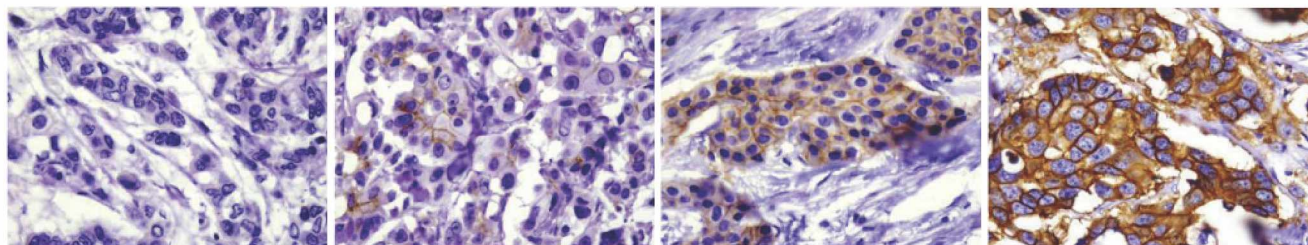


Fig 1. Immunohistochemical staining targeting HER2 by polyclonal rabbit anti-human HER2 antibody (A0485, DAKO, Denmark) in breast cancer. Representative pictures (x400) were shown according to HER2 scoring patterns; upper left (0), upper right (1+), lower left (2+), lower right (3+).

시킨 후 헤마톡실린으로 대조 염색하여 봉입하였다. 결과는 암세포의 세포막의 염색 정도에 따라서 점수를 매겨 판정하였으며, 전체 암세포 중에서 10% 미만이 염색되는 경우는 0으로 판정하였고, 10% 이상의 세포가 염색되는 경우 세포막 일부가 약하게 염색되는 경우 1+, 세포막 전체가 중등도로 염색되는 경우 2+, 세포막 전체가 강하게 염색되는 경우를 3+로 하였고, 2+ 이상의 결과를 양성으로 판정하였다 (Fig 1).

일반적으로 면역조직화학염색 과정에서 발생할 수 있는 오차를 줄이기 위해서 추가로 상품화된 HER2 검사 kit (DAKO HerceptTest™, Denmark)를 사용하여 제조회사의 지침에 따라 면역조직화학염색을 시행하였고 그 결과를 위와 같은 방법으로 판정하여 비교분석하였다.

2) 형광동소교잡법

파라핀에 포매되어 있는 조직 집적 블럭을 4 μm 두께로 박질하여 슬라이드에 부착시키고, 탈파라핀화 및 합수과정을 거쳐 상용화된 HER2 FISH kit (Vysis Inc, Downers Grove, Ill)를 이용하여 제조회사의 지침에 따라 실험을 진행하였다. 우선 희석된 wash buffer로 2분 간 처리한 후, 95 - 99 °C에서 pretreatment solution으로 10분간 처리하고 wash buffer로 3분 간 2회 세척하였다. Pepsin Reagent를 10분 간 처리한 후 wash buffer로 3분 간 2회 세척한 후 탈수시켰다. HER2/CEN-17 Probe Mix를 82 °

C에서 5 분간 처리한 후 45 °C humidified hybridization chamber에서 14 - 20시간 동안 배양한 후 stringent wash buffer로 65 °C에서 10분 간 처리하였다. 다시 wash buffer로 3분 간 2회 세척한 후 탈수시키고 DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole)가 포함된 형광 mounting medium 용액을 슬라이드에 적용한 후 판독하였다. 정상 세포에서는 17번 염색체의 centromere 부위에 CEN-17 DNA probe가 결합하여 1-2개의 녹색 형광신호를 보이고, HER2 유전자 부위에서 HER2 DNA probe와 결합하여 1-2개의 붉은 형광신호를 보이는데, HER2/CEN-17 비가 2보다 큰 경우 HER2 유전자의 증폭이 있는 것으로 판정하였다 (Fig 2).

3) 생존조사 및 생존분석

대상 환자의 의무기록조사와 외래 방문 기록을 통하여 환자의 생존 상태를 확인하였고, 6개월 이상 내원기록이 없는 환자는 전화조사를 통하여 생존 조사를 시행하였다. 환자의 생존 분석은 Kaplan-Meier 생존곡선을 구하여 Log rank test로 비교 분석하였고, 생존에 독립적으로 영향을 미치는 인자에 대한 판정은 Cox Regression Model을 이용한 다변량 분석을 시행하였으며, *p*값이 0.05 이하인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다.

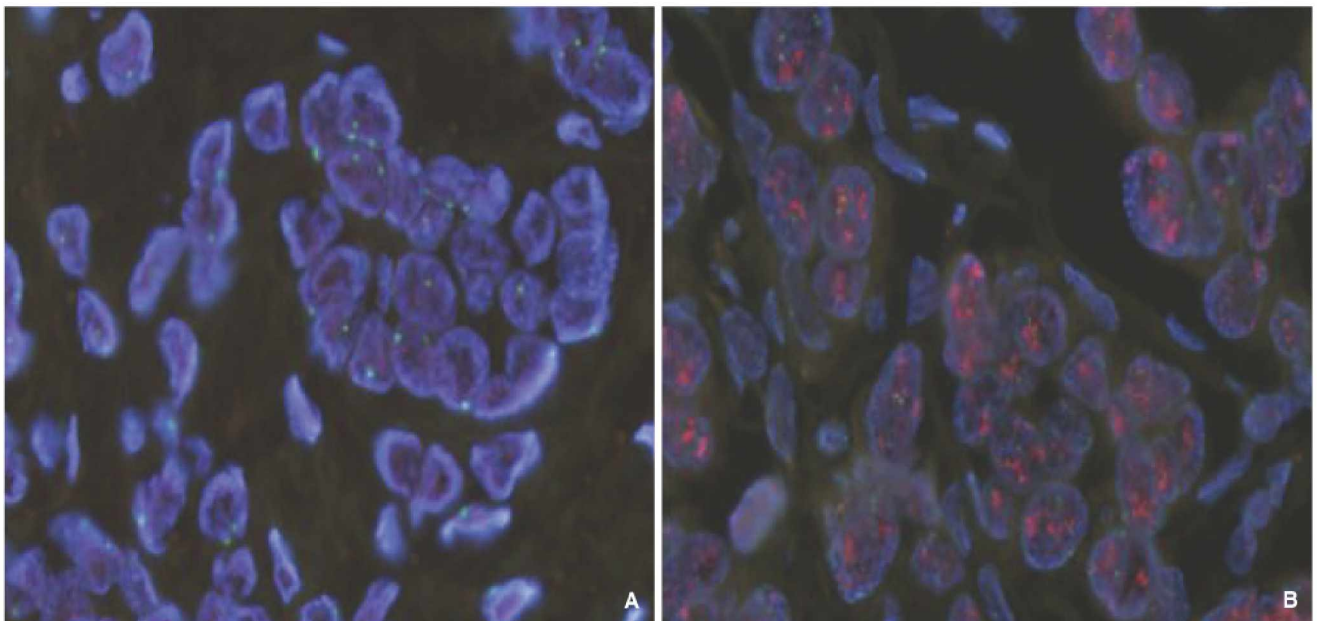


Fig 2. Fluorescence in situ hybridization (FISH, Vysis Inc, Downers Grove, Ill) targeting HER2 in breast cancer(x400). Green signal indicates centromere of chromosome 17 and orange signal reveals HER2 amplification. The ratio of orange signals to green signals above 2 means HER2 gene amplification; FISH negative control(left), and FISH positive HER2 amplified cancer(right).

결 과

(1) 대상

대상 증례는 모두 388례로 평균 나이는 47.8 ± 0.54 세 (18 ~ 78 세)였으며, 평균 추적기간은 59.8 ± 14 개월이었다.

Table 1. Clinical characteristics of 388 patients with breast cancer.

Parameters	No.	Parameters	No.
T stage (n=388)		ER/PR(N=307)	
T1	126(32.5%)	(+ / +)	137(44.6%)
T2	213(54.9%)	(+ / -)	34(11.1%)
T3	43(11.1%)	(- / +)	30(9.8%)
T4	6(1.5%)	(- / -)	106(34.5%)
N stage (n=388)		Surgery(n=388)	
N0	192(49.5%)	MRM	342(88.1%)
N1	91(23.5%)	BCS	41(10.6%)
N2	51(13.1%)	others	5(1.3%)
N3	54(13.9%)		
Stage (n=388)		Adjuvant chemotherapy	
I	72(18.6%)	(+)	226(58.2%)
IIA	140(36.1%)	(-)	64(16.5%)
IIB	64(16.5%)	unknown	98(25.3%)
IIIA	58(14.9%)		
IIIB	0(0.0%)	Adjuvant hormonal therapy	
IIIC	54(13.9%)		
LVI (n=387)		(+)	213(55.7%)
(+)	217(55.9%)	(-)	42(10.8%)
(-)	170(43.8%)	unknown	133(34.3%)

ER/PR=estrogen receptor/progesterone receptor; MRM=modified radical mastectomy; BCS=breast conserving surgery; LVI=lymphovascular invasion.

Table 2. The results of HER2 detection by immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in-situ hybridization (FISH).

IHC		Subgroup by FISH	
Results	No.	within the results	
by 0485 Ab		(-)	(+)
0	128 (33%)	124 (96.9%)	4 (3.1%)
+1	125 (33.2%)	123 (98.4%)	2 (1.6%)
+2	41 (10.6%)	31 (75.6%)	10 (24.4%)
+3	94 (24.2%)	10 (10.6%)	84 (89.4%)
by HercepTes			
0	216 (55.7%)	206 (95.4%)	10 (4.6%)
+1	68 (17.5%)	59 (86.8%)	9 (13.2%)
+2	18 (4.6%)	10 (55.6%)	8 (44.4%)
+3	86 (22.2%)	13 (15.1%)	73 (84.9%)
FISH			
(-)	288 (74.2%)		
(+)	100 (25.8%)		

대상 증례의 병기 및 임상적 특징은 Table 1 과 같다.

(2) HER2 검사 결과

A0485 HER2 항체를 이용한 IHC 검사에서 HER2 단백질 과발현 양성율은 34.8%였으며, 음성율은 65.2%였다. HercepTest를 이용한 IHC 검사에서 HER2 양성율은 26.8% 였으며, 음성율은 73.2% 였다. FISH 검사를 통한 HER2 유전자의 증폭 양성율은 25.8% 이었고, 음성율은 74.2% 이었다 (Table 2). IHC에서 HER2 단백질 발현 양성으로 판단하는 2+ 이상의 결과에서 유전자 증폭여부를 확인하였다. IHC 2+ 점수군의 HER2 유전자 증폭율은 A0485 항체를 이용한 검사에서는 24.4%, HercepTest를 사용한 검사에서는 44.4%로 전체의 절반 이하에서만 확인된 반면에 3+ 점수군의 유전자 증폭율은 A0485 항체 검사에서는 89.4%, HercepTest 검사에서는 84.9%로 높은 일치율을 보였다 (Table 2).

(3) 예후인자 분석

대상 환자의 예후에 영향을 미치는 인자들을 모아서 Cox Regression Model로 시행한 다변량 분석 결과에서 HER2는 검사 방법에 관계없이 생존에 영향을 미치는 유의한 인자로 판단되었다 (Table 3). 무병생존에 영향을 미치는 독립 인자로는 전이 림프절 수, 림프관 및 혈관 침습, HER2 검사 (FISH, IHC by HercepTest)가 유의한 것으로 확인되었고, 전체생존에 영향을 미치는 독립인자로는 전이 림프절 수, 림프관 및 혈관 침습, 에스트로겐 수용체, HER2 검사 (FISH, IHC by HercepTest and A0485 Ab)가 유의한 것으로 확인되었다 (Table 3).

(4) HER2 단백질 발현 결과에 따른 생존분석

HER2에 대한 A0485 항체를 이용한 HER2 점수에 따른 생존분석 결과에서는 HER2가 3+ 점수군의 생존곡선은 다른 점수를 보인 군들에 비해 전체생존곡선과 무병생존곡선 모두에서 Log rank Test의 P 값이 각각 0.0028, 0.0258로 유의하게 불량한 예후를 보였다. 그러나 3+를 제외한 나머지 0, 1+, 2+ 점수군의 생존곡선의 비교에서는 P값이 전체 생존곡선에서 0.4154, 무병생존곡선에서 0.8090으로 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았으며 (Fig 3), 0 점수군을 기준으로 다른 점수군의 재발 및 생존 위험도는 다변량 분석 결과에서 3+군만이 각각 1.38 배 ($p = 0.278$), 1.46 배 ($p = 0.260$)로 증가하였지만 유의하지는 않은 것으로 확인되었다 (Table 3).

Hercep Test를 이용한 IHC 점수에 따른 생존분석에서도 대상 증례의 전체생존곡선과 무병생존곡선 모두에서

3+점수군의 생존곡선은 나머지 다른 점수군의 생존 곡선에 비해 통계적으로 유의하게 불량한 것이 확인되었고 (Log rank Test $p=0.0006$, $p=0.0028$), 3+를 제외한 나머지 0, 1+, 2+ 점수군의 생존곡선 비교분석에서는 Log rank test의 P값이 전체생존곡선에서 0.2632 무병생존곡선에서 0.6878로 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다 (Fig 4). 그러나 A0485 항체를 이용한 검사 결과와 달리 0 점수군을 기준으로 다른 점수군의 재발 및 생존 위험도는 다변량 분석 결과에서 3+군에서 2.00배 ($p=0.000$), 2.17배 ($p=0.000$)로 유의하게 증가하는 것으로 확인되었다 (Table 3).

(5) FISH 결과에 따른 생존분석

HER2 유전자의 증폭을 확인하는 FISH 검사에서 얻은 결과에 따라서 생존곡선 비교를 시행하여, FISH 양성군의 생존곡선은 전체생존곡선과 무병생존곡선 분석 모두 FISH 음성군에 비해 통계적으로 유의하게 불량한 결과를 보였으며, 통계분석에 사용된 Log rank test의 p값이 각각 0.0000, 0.0021로 매우 강력한 통계적 의미가 있음을 확인할 수 있었다 (Fig 5).

고찰

유방암의 예후를 예측할 수 있는 인자들에 대하여 1999년 미국 병리학자들이 도출해낸 합의 의견 (8)에 따르면 예후에 미치는 영향과 임상적으로 환자의 치료에 사용되는 유용성에 따라 예후인자를 3개의 범주로 분류하였다. 제 1 범주에는 예후에 중요한 영향을 미치면서 임상적으로 사용

Table 3. Multivariate analyses for disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) in all cases of breast cancer(Cox regression model).

	DFS			OS		
	R.R.	95% C.I.	p	R.R.	95% C.I.	p
Tumor(size)	1.096	0.969-1.241	0.145	1.084	0.929-1.265	0.306
Node(number)	1.039	1.018-1.061	0.000	1.041	1.014-1.068	0.003
LVI	2.920	1.637-5.210	0.000	5.384	2.234-12.976	0.000
MI	1.011	0.998-1.024	0.094	1.013	0.999-1.028	0.074
ER	0.996	0.992-1.001	0.109	0.991	0.983-0.999	0.027
FISH	1.682	1.048-2.700	0.031	1.974	1.129-3.449	0.017
IHC(HerceptTest)			0.005			0.007
1+	0.664	0.323-1.365	0.266	0.602	0.226-1.605	0.311
2+	0.499	0.149-1.672	0.260	0.210	0.026-1.682	0.142
3+	2.003	1.228-3.368	0.006	2.168	1.211-3.880	0.009
Tumor(size)	1.105	0.977-1.250	0.105	1.092	0.938-1.270	0.256
Node(number)	1.042	1.021-1.063	0.000	1.043	1.017-1.070	0.001
LVI	2.830	1.585-5.056	0.000	5.269	2.189-12.680	0.000
MI	1.014	1.000-1.029	0.052	1.018	1.001-1.036	0.042
ER	0.997	0.993-1.002	0.259	0.992	0.985-1.000	0.061
IHC(A0485 Ab)			0.113			0.034
1+	0.686	0.379-1.241	0.213	0.469	0.215-1.023	0.057
2+	0.783	0.333-1.842	0.575	0.870	0.335-2.258	0.774
3+	1.380	0.772-2.466	0.278	1.457	0.755-2.812	0.261

R.R.=relative risk; C.I.=confident interval; LVI=lymphovascular; MI=mitotic index; ER=estrogen receptor; FISH=fluore in sifn hybridigahion; IHC=immune histoclemlcal staining.

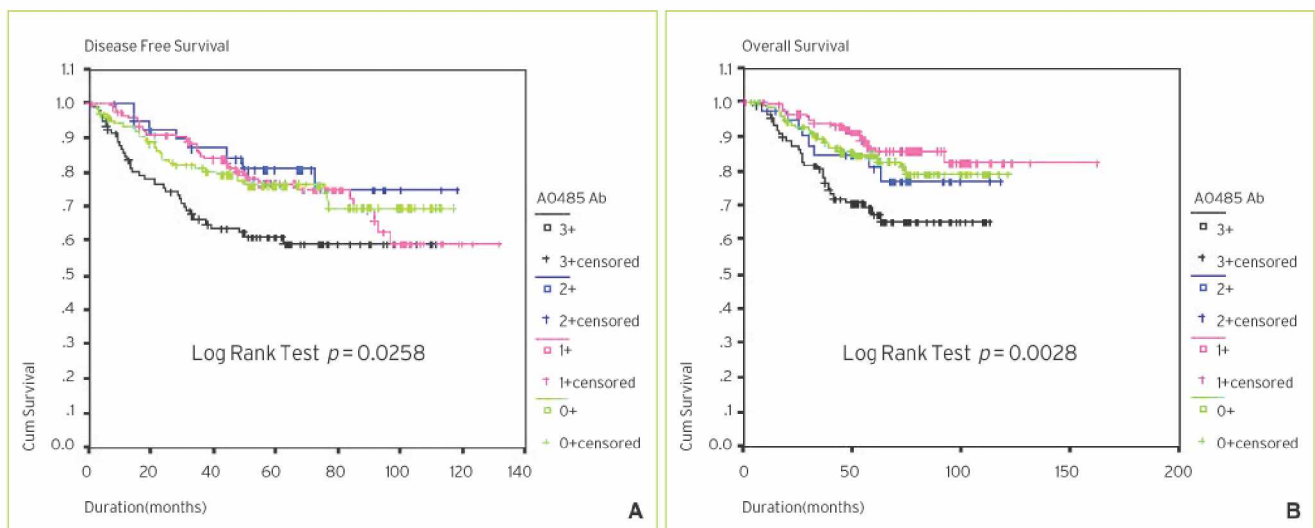


Fig 3. Survival curves according to HER2 scoring using A0485Ab. Statistically significant differences were noted in disease-free survival (A) and overall survival (B) curves with log rank test. However, excluding 3+ result, survival curves did not show statistically significant difference; P values were 0.4154 in overall survival and 0.8090 in disease-free survival.

되는 인자이고, 제 2범주에는 임상적으로나 생물학적으로 광범위하게 연구되었으나 아직 통계적으로 뒷받침할 연구가 더 필요한 인자이고, 제3 범주에는 아직 충분하게 연구되지 않은 인자들로 나누었는데, HER2는 제 2 범주에 포함된다고 하였다. 그 이유로는 현재 흔히 사용되는 검사법인 HER2 단백질의 발현을 확인하는 방법이나 HER2 유전자의 증폭을 확인하는 방법 모두 수용체 단백질 기능의 활성을 의미하는 것은 아니기 때문이고, 또 다른 이유는 아직까지 표준화된 HER2 검사법이 결정되지 않았기 때문에 그 검사 결과의 신뢰도에 문제가 있기 때문이다. 실제로 HER2 단백질의 발현과 유전자의 증폭이 가지는 임상적 의미에 대하여 발표된 많은 연구의 결과를 살펴보면 상반되는 결과와 주장을 흔히 보는데 그 이유도 같은 맥락에서 이해할 수 있다.

1999년 Slamon (6)은 HER2 유전자 증폭이 림프절 전이 양성인 유방암 환자에서 생존에 영향을 미치는 독립인자로 보고하였고, 이후 많은 연구 결과가 발표되었다. 일반적으로 HER2의 양성(+)은 유방암의 불량한 예후와 관련된 것으로 받아들여지고 있으나, (9-11) 일부 학자들은 그렇지 않다는 주장을 보이고 있다. (12-13) 이러한 주장은 특히 림프절 전이가 없는 유방암 환자에서 많이 제기되고 있는데, HER2의 발현이 유방암의 불량한 예후와 관련된다는 보고들 (13-18)과 림프절 전이가 없는 경우에는 유방암의 예후에 영향을 미치지 못한다는 보고 (19)가 상충하면서 아직까지 이에 대한 분명한 결론은 내려지지 않은 상황이다.

본 연구의 목적은 HER2 검사법에 따라서 환자의 예후

예측 능력의 차이를 확인하는 것이다. HER2 검사 결과는 FISH와 IHC에서 모두 재발 및 사망에 유의한 독립인자로 확인되었으나 (Table 3), 일반적으로 HER2 검사 양성으로 판정하는 기준인 FISH+와 IHC2+, 3+ 중에서 IHC2+의 예후 인자로서의 의미는 다변량 분석과 생존곡선 비교에서 확인할 수 없었다 (Table 3, Fig 4, 5). 따라서 HER2 양성 결과에 따른 불량한 예후의 예측은 FISH+군과 IHC 3+군에서만 가능하며, IHC 2+군의 결과는 FISH로 다시 확인하는 것이 바람직할 것으로 판단되며, 이는 현재 개발되어 임상에서 사용 중인 HER2에 대한 인체화된 단클론항체 trastuzumab의 적용 기준 설정과도 같은 맥락에 있다고 생각된다.

본 연구 방법에서 후향적으로 생존조사가 가능한 유방암 환자의 조직을 대상으로 검사를 시행하였고, 같은 대상 중別の 검체를 다른 방법으로 검사하여 그 결과가 예후에 미치는 영향을 같은 결과로 생존분석을 시행하였기 때문에 이질적인 비교군간 연구보다는 결과의 해석이 수월하고 그 의미 전달이 직접적이고 강력하다고 판단된다.

위에서와 같이 임상적으로 IHC 양성으로 판정하는 2+점수군의 예후가 음성군과 유의한 차이를 보이지 못한 이유로는 이미 잘 알려진 바와 같이 양성 판정의 기준이 판독하는 의사의 주관적 판단에 의존하기 때문에 그 결과에 적지 않은 편차가 존재하리라는 것과 IHC 검사 방법상의 차이에 의해서도 결과 차가 있을 수 있다는 것을 생각할 수 있다. 이번 연구에서 Kit화된 검사법과 A0485 항체를 이용한 일반적인 IHC 검사법의 결과에서 약간의 차이를

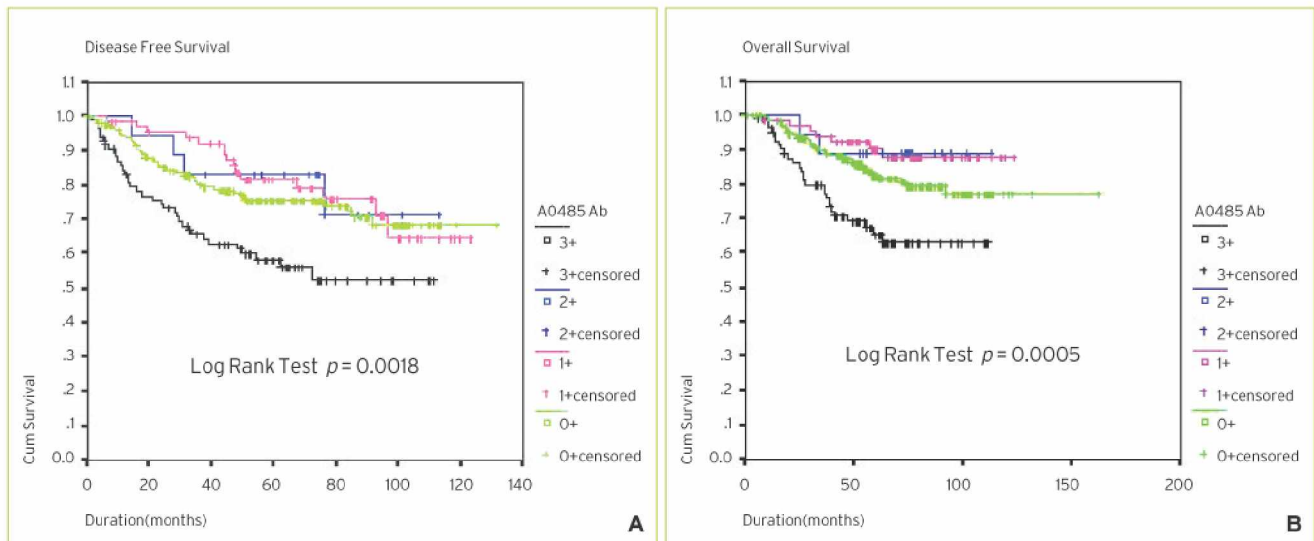


Fig 4. Survival curves according to HercepTest. Statistically significant differences were noted in disease-free survival (A) and overall survival (B) curves with log rank test. However, excluding 3+ result, survival curves did not show statistically significant difference and P values were 0.2632 in overall survival and 0.6878 in disease-free survival.

HER2 발현률 (Table 2) 과 다변량분석 (Table 3) 에서 확인 할 수 있었다. 이에 반하여 FISH는 비록 검사 방법에 많은 비용과 시간이 들더라도 탐침에 의해 발색된 형광 신호 유 무에 따라 판단하기 때문에 그 결과가 보다 객관적이고 예 민하다는 장점이 잘 알려져 있다.(20-21) 또한 HER2 유전 자의 증폭을 보이는 종양의 대부분은 HER2 단백질의 과 발현을 보인다고 알려져 있으며,(22-23) HER2 유전자의 증폭과 단백질의 과발현의 일치도는 여러 연구에서 90% 이상으로 보고되고 있다.(24-29) 본 연구에서도 FISH 결 과는 대상 증례의 예후를 예측하는 데 매우 강력한 인자로 통계적으로 생존분석을 통하여 확인되었고, FISH 양성과 단백질의 과발현은 IHC 3+ 점수군에서 90%에 가까운 일 치도를 보여 외국과 유사한 결과를 확인할 수 있었다.

결 론

유방암에서 HER2는 독립적인 예후 인자로 확인되었고, HER2 검사 양성 결과 중에서 IHC 검사에서 3+ 점수군과 FISH 검사 양성군의 예후가 다른 음성군에 비해 불량한 것 으로 확인되었다. 따라서 임상에서 흔히 사용되는 HER2 IHC 검사의 2+ 점수군의 예후는 FISH 검사를 통해서 재 확인하여 판단하는 것이 바람직한 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1 Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, Baughman S, Benz CC, Dantis L, et al. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal anti-
- 2 Pegram MD, Lipton A, Hayes DF, Weber BL, Baselga JM, Tripathy D, et al. Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *J Clin Oncol* 1998;16: 2659-71.
- 3 Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA. The neu onco-gene encodes an epidermal growth factor receptor-relat-ed protein. *Nature* 1986;319: 226-30.
- 4 Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Kurisu W, Thor A, Chen LC, Smith HS, et al. ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89: 5321-25.
- 5 Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu onco-gene. *Science* 1987;235: 177-82.
- 6 Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989;244: 707-12.
- 7 Thor AD, Schwartz LH, Koerner FC, Edgerton SM, Skates SJ, Yin S, et al. Analysis of c-erbB-2 expression in breast carcinomas with clinical follow-up. *Cancer Res* 1989;49: 7147-52.
- 8 Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC,

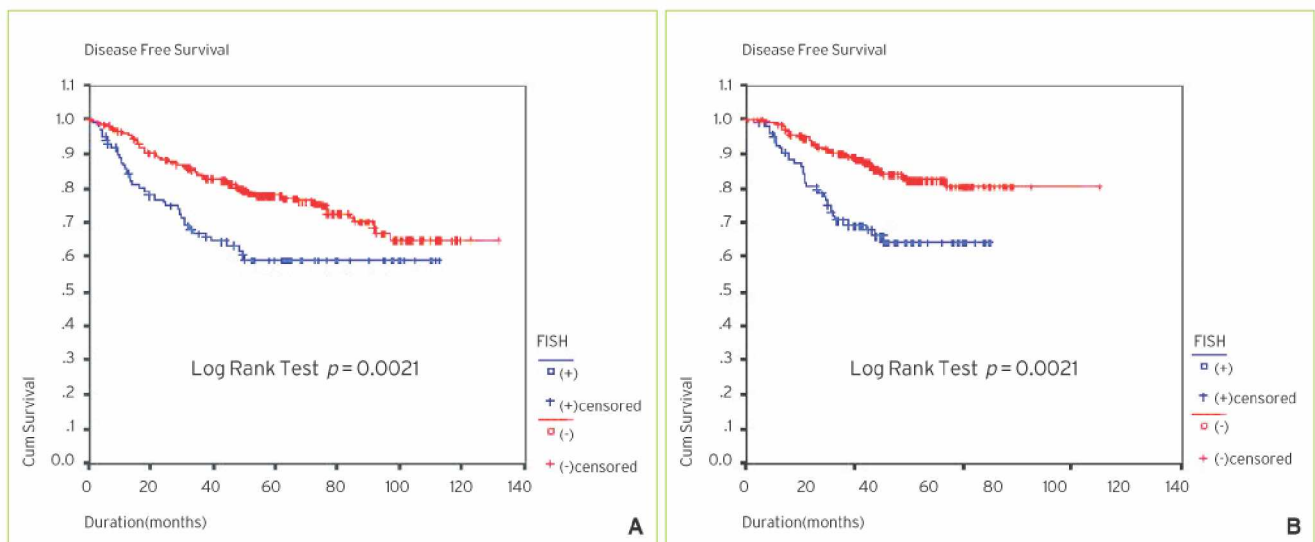


Fig 5. Survival curves according to FISH. Statistically significant differences were noted in disease-free survival (A) and overall survival (B) curves with log rank test.

- Clark GM, et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124: 966-78.
- 9** Revillion F, Bonnetterre J, Peyrat JP. ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance. *Eur J Cancer* 1998;34:791-808.
- 10** Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cells* 1998;16: 413-28.
- 11** Tagliabue E, Menard S, Robertson JF, Harris L. c-erbB-2 expression in primary breast cancer. *Int J Biol Markers* 1999;14: 16-26.
- 12** Ali IU, Campbell G, Lidereau R, Callahan R. Lack of evidence for the prognostic significance of c-erbB-2 amplification in human breast carcinoma. *Oncogene Res*, 1988;3: 139-46.
- 13** Dykins R, Corbett IP, Henry JA, Wright C, Yuan J, Hennessy C, et al. Long-term survival in breast cancer related to overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein: an immunohistochemical study using monoclonal antibody NCL-CB11. *J Pathol* 1991;163: 105-10.
- 14** Andrulis IL, Bull SB, Blackstein ME, Sutherland D, Mak C, Sidlofsky S, et al. neu/erbB-2 amplification identifies a poor-prognosis group of women with node-negative breast cancer. Toronto Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 1998;16: 1340-49.
- 15** Hartmann LC, Ingle JN, Wold LE, Farr GH Jr, Grill JP, Su JQ, et al. Prognostic value of c-erbB2 overexpression in axillary lymph node positive breast cancer. Results from a randomized adjuvant treatment protocol. *Cancer* 1994;74: 2956-63.
- 16** Press MF, Pike MC, Chazin VR, Hung G, Udove JA, Markowicz M, et al. Her-2/neu expression in node-negative breast cancer: direct tissue quantitation by computerized image analysis and association of overexpression with increased risk of recurrent disease. *Cancer Res* 1993;53: 4960-70.
- 17** Seshadri R, Firgaira FA, Horsfall DJ, McCaul K, Setlur V, Kitchen P. Clinical significance of HER-2/neu oncogene amplification in primary breast cancer. The South Australian Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 1993;11: 1936-42.
- 18** Tetu B, Brisson J. Prognostic significance of HER-2/neu oncoprotein expression in node-positive breast cancer. The influence of the pattern of immunostaining and adjuvant therapy. *Cancer* 1994;73: 2359-65.
- 19** Bianchi S, Paglierani M, Zampi G, Cardona G, Cataliotti L, Bonardi R, et al. Prognostic significance of c-erbB-2 expression in node negative breast cancer. *Br J Cancer* 1993;67: 625-29.
- 20** Press MF, Bernstein L, Thomas PA, Meisner LF, Zhou JY, Ma Y, et al. HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J Clin Oncol* 1997;15: 2894-904.
- 21** Ratcliffe N, Wells W, Wheeler K, Memoli V. The combination of in situ hybridization and immunohistochemical analysis: an evaluation of Her2/neu expression in paraffin-embedded breast carcinomas and adjacent normal-appearing breast epithelium. *Mod Pathol* 1997;10: 1247-52.
- 22** Hynes NE, Gerber HA, Saurer S, Groner B. Overexpression of the c-erbB-2 protein in human breast tumor cell lines. *J Cell Biochem* 1989;39: 167-73.
- 23** Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ. Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene* 1996;13: 63-72.
- 24** Hoang MP, Sahin AA, Ordonez NG, Sneige N. HER-2/neu gene amplification compared with HER-2/neu protein overexpression and interobserver reproducibility in invasive breast carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2000;113: 852-9.
- 25** Isola J, Chu L, DeVries S, Matsumura K, Chew K, Ljung BM, et al. Genetic alterations in ERBB2-amplified breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 1999;5: 4140-5.
- 26** Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ. Comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer. *J Clin Oncol* 1999;17: 1974-82.
- 27** Jimenez RE, Wallis T, Tabasczka P, Visscher DW. Determination of Her-2/Neu status in breast carcinoma: comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol* 2000;13: 37-45.
- 28** Ridolfi RL, Jamehdor MR, Arber JM. HER-2/neu testing in breast carcinoma: a combined immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization approach. *Mod Pathol* 2000;13: 866-73.
- 29** Wang S, Saboorian MH, Frenkel E, Hynan L, Gokaslan ST, Ashfaq R. Laboratory assessment of the status of Her-2/neu protein and oncogene in breast cancer specimens: comparison of immunohistochemistry assay with fluorescence in situ hybridisation assays. *J Clin Pathol* 2000;53: 374-81.