

Cathepsin-D의 발현과 유방암환자 예후와의 관계

동아대학교 의과대학 외과학교실, 병리학교실¹

권용태 · 정갑중 · 김영훈 · 조세현 · 김상순 · 홍숙희¹

= Abstract =

Prognostic Significance of Cathepsin-D Expression in Breast Cancer

Kwon, Yong-Tae, M.D., Jung Chap Joong, M.D., Kim Young Hoon, M.D.,
Cho Sac Hun, M.D., Kim Sang Soom, M.D. and Hong Sook Hee, M.D.

Department of Surgery and Pathology¹, Dong-A University College of Medicine, Pusan, Korea

Mouse monoclonal antibody was used for this study. This study was undertaken to define the prognostic value of the expression of Cathepsin-D in 121 breast cancer patients. The results were as follows: 1) Overall, 53.7% of patients were positive for Cathepsin-D 2) Positive staining did not correlate with age, estrogen receptor status, tumor size, axillary nodal status, tumor stage, menopausal status, pathologic grade, DNA ploidy and S-phase fraction. (Korean J of Breast Cancer 1998;1:45~53)

Key Words: Breast cancer, Cathepsin-D

서 론

유방암은 미국이나 유럽 여성에서 많이 발생하여 미국에서는 여성 평균 9명에 1명 정도로 많이 발생하여 여성 악성 종양 중 제일 많은 질환으로 심각한 문제가 되고 있다. 우리나라 여성암의 발생 빈도를 보면 자궁경부암, 위암에 이어서 세번째로 많은 질환으로 점차 증가하는 추세에 있다. 유방암의 빈도는 모든암의 5~6%, 여성암의 10% 정도에 이르러 여성들의 많은 관심을 끌고 있다.

유방암의 치료방법에는 수술요법, 화학요법, 방사선 치료요법, 호르몬요법 및 면역요법 등이 이용되고 있는데 대부분 이들의 복합요법이 사용되고 있다. 예후에 큰 영향을 미치는 것은 병기가 더 중요하며 액와림프절 전이가 없는 제 1기 암의 경우 근치적 수술 후 10년 생존율이 70%나 된다. 그러나 이런

제1기 암의 경우에도 30%에서 재발이 되는데 이러한 재발이 잘 되는 고위험군 환자에게 화학요법이나 호르몬요법 등의 술 후 보조치료를 할 경우 환자에게 도움을 줄 수 있으므로 모든 액와림프절 전이가 없는 폐경기전 환자에게 술 후 보조요법을 고려하여야 한다고 주장하는 보고도 있다. 그러나 나머지 70%의 환자는 필요가 없는 치료를 받게 되고 이로 인한 부작용으로 고통을 받을 수가 있으므로 재발위험군 환자를 알고 선별하여 보조 화학요법이나 방사선요법을 사용하면 이런 치료방법에 의한 부작용을 방지할 수 있기 때문에 재발위험군을 알 수 있는 예후 예측인자의 개발이 필요하다.

유방암의 예후에 영향을 미치는 전통적 인자로서 전이 액와림프절의 유무 및 개수, 종양의 크기, 호르몬 수용체 유무, 조직학적 등급 등을 들 수 있고, 최근에는 면역학과 분자생물학의 비약적 발달로 p53, 표피성장인자 수용체(epidermal growth factor recep-

tor), DNA ploidy, c-erbB-2, Cathepsin-D, PS2 protein 등이 새로운 독립적 예후인자로 연구되고 있다.

최근 Cathepsin-D는 에스트로겐 유도 용소성 단백 분해효소(lysosomal protease)로서 이물질의 증폭은 유방암에 있어서 성장자극 활동(growth promoting activity)과 세포외 단백 분해 작용(extracellular proteolytic activity)을 통하여 원격전이를 유발시켜 예후에 영향을 준다는 보고가 있어서, 본 논문에서는 Cathepsin-D의 발현과 기존의 예후인자들과의 상관관계를 규명하여 Cathepsin-D의 예후인자로서의 의의를 규명하고자 한다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

본 실험에 사용된 연구 대상은 1990년 3월부터 1995년 12월까지 5년 10개월간 동아대학교 병원에서 침윤성 유방암종으로 진단받고 유방절제술을 받은 158예 중 본 연구에 충분한 양의 종양조직이 포함되어 있으면서 파라핀 블록의 보관상태가 양호하고 또 임상기록의 검토가 가능한 121예를 택하였다.

2. 연구 방법

환자의 임상 기록지로부터 환자의 나이, 종양의 위치, 종양의 크기, 조직학적 분류, 병기, 림프절 전이 및 원격전이 유무, 추적검사 등을 조사하였다.

1) 병 기

임상병기는 액와림프절 전이 유무 및 전이된 림프절의 수와, 병기는 TNM 분류법²⁰⁾에 기초하여 분류하였다.

2) 병리조직학적 검색

병리조직 검사를 위해 의뢰되었던 유방조직의 육안 및 현미경 소견의 기록을 검토하였다. 유암종의 조직학적 분류는 WHO 분류²¹⁾를 기준으로 하였으며, 침윤성 관상암의 조직학적 등급은 Elston과 Ellis의 Modified Bloom and Richardson법을 사용하여 점수를 계산하여 고분화성, 중등도 분화성, 저분화성

관상암종으로 나누었다.

3) Cathepsin-D의 면역조직화학적 염색방법

모든 연구 대상 환자의 유암종 조직의 Hematoxylin-Eosin 염색표본을 재검색하고 종양을 대변할 수 있는 가장 대표적인 파라핀 포매 블록 하나를 선택하여 각 단백질의 발현을 Avidin Biotin Complex (ABC)법으로 면역조직화학적 염색을 아래와 같이 시행하였다.

Cathepsin-D는 mouse monoclonal antibody (NCL-CDm, Novocastra Laboratories Ltd., UK)를 100배 희석하여 사용하였다.

먼저 외과적으로 절제된 유방암 조직을 10% 중성 포르말린 용액에 고정하여 파라핀에 포매된 조직을 4 μ m 두께로 잘라 organosilane로 표면 처리된 슬라이드에 부착하여 파라핀을 제거한 후 여러단계의 알코올을 거쳐 재수화시켰다. 조직을 포르말린에 고정하고 파라핀으로 포매하는 과정에서 감추어졌던 종양 조직내 항원 단백질을 노출시키고 회복하여 예민도를 높이기 위하여 전 처리과정으로 0.01M sodium citrate buffer (ph 6.0)에 슬라이드를 담구어 microwave에서 15분간 가열하였다. PBS 완충액으로 씻은 후 3% H₂O₂를 떨어뜨려 5분간 두어 내인성 peroxidase 활동을 저지시킨 후 희석한 일차 항체를 떨어뜨려 습윤 상태에서 4℃ 냉장고 안에서 밤새 반응시킨 후 PSB 완충액으로 5분간 2번 씻었다. 2차 항체인 biotinylated polyvalent antibody로 30분간 반응시켜 PBS 완충액으로 씻은 후 streptavidine peroxidase로 30분간 염색하였다. 다시 PBS 완충액으로 씻고 발색 시약(ACE)으로 10분간 염색한 후 물로 세척하고 hematoxylin으로 3분간 대조염색을 한 후 다시 물로 씻고 crystal mount로 봉입하여 현미경으로 검정하였다.

3. ER/PR의 면역조직화학적 염색방법

연구 대상 환자의 유방암 조직의 Hematoxylin-Eosin 염색표본을 재검색하고 종양을 대변할 수 있는 가장 대표적인 파라핀 포매 블록 하나 혹은 2개를 선택하여 ER과 PR의 발현을 Novocastra Laboratories Ltd (UK)의 NCL-ER-Paraffin과 NCL-PGR-

Paraffin Kit를 사용하여 Avidin Biotin Complex (ABC)법으로 면역조직 화학적 염색을 아래와 같이 시행하였다.

먼저 외과적으로 절제된 유방암 조직을 10% 중성 포르말린용액에 고정하여 파라핀에 포매된 조직을 4 μ m 두께로 잘라 두장의 probe-on 슬라이드에 부착하여 크실렌에서 파라핀을 제거한 후 여러단계의 알코올을 거쳐 재수화시켰다. 조직을 포르말린에 고정하고 파라핀으로 포매하는 과정에서 감추어졌던 종양조직내 항원 단백질을 노출시키고 회복하여 예민도를 높이기 위하여 전처리 과정으로 0.01 M sodium citrate buffer (pH 6.0)에 슬라이드를 담구어 microwave 오븐에서 15분간 가열한 후 PBS 완충액으로 5분간 두번 씻었다. 내인성 peroxidase 활동을 저지시키기 위해 1.5% H_2O_2 에 10분간 둔 후 PBS 완충액으로 씻고 그 위에 정상 가토 혈청을 첨가하여 10분간 습윤상자에 두었다. 여액을 흔들어 없앤 다음 100 μ l의 일차 단클론 항체를 각각의 슬라이드에 떨어뜨려 4°C에 밤새 반응시킨 후 PBS 완충액으로 5분간 두번 씻었다. 2차 항체인 LSAB+ kit (Dako, USA)를 실온에서 한시간 반응시켜 PBS 완충액으로 5분간 두번 씻은 후 peroxidase conjugated streptavidine (LSAB+ kit, Dako, USA)로 실온에서 30분간 반응시켰다. 다시 PBS 완충액으로 씻고 AEC 발색 시약(Vector Laboratories, Inc., USA)으로 20분간 반응시킨 후 흐르는 물로 세척하고 hematoxylin으로 2분간 대조염색을 한 후 다시 물로 씻고 crystal mount로 봉입하여 현미경으로 검경하였다.

염색된 유방암 조직을 광학 현미경에서 관찰하여 종양세포의 핵이 적갈색으로 염색되었을 때 양성으로 판정하였다. 염색강도는 정상 유방 조직의 관세포의 핵 염색을 강 양성으로 하고 이를 기준으로 종양세포의 핵 염색 정도를 비교하여 약 양성, 중등도 양성, 강 양성으로 표현하였다.

각 종양조직에서 염색되는 종양세포 전부가 염색이 안되거나 종양세포의 5% 미만에서 염색된 종양은 ER과 PR 음성 종양으로 하였고, 5% 이상의 종양세포가 약 양성 이상의 강도로 염색되면 ER과 PR 양성 종양으로 하였다.

4. DNA ploidy, S-phase fraction의 검사방법

DNA ploidy 및 S-phase fraction의 검사 방법은 0.5×0.5cm 크기의 조직을 완충용액 내에서 잘게 부수어 세포가 완충용액으로 흘러나오는 것을 확인하고 Nylon Mesh (35 μ m)로 세포 외의 것을 걸러낸다. 회수된 세포는 1,500 rpm, 1,200 rpm, 1,000 rpm의 순으로 각각 5분간 원심 세척한다. 완충용액에 대한 세포의 수를 1×10^6 cells/ml로 조정한다. 세포에 reagent A (Trypsin) 250 ml 가하고 실온에서 10분간 반응시킨 후 reagent B (Trypsin inhibitor & RNase) 200 ml 가한 후 10분간 반응시킨다. 냉장 보관된 reagent C (propidium iodide) 200 ml 가한 후 빛이 차단된 냉장고에서 10분간 반응시킨 후 세시관 이내에 Flow cytometry로 분석한다.

5. 면역조직화학적 염색의 판독

염색된 유방암종 조직을 광학 현미경에서 관찰하여 Cathepsin-D는 세포질내 적갈색 파립으로 염색되면 양성반응으로 판독하였다.

각 종양조직에서 염색되는 종양세포 전부가 염색이 안되거나 종양세포의 5% 미만에서 염색된 종양은 단백질 발현 음성 종양으로 하였고, 5% 이상의 종양세포가 염색되면 염색 강도에는 관계없이 모두 단백질 발현 양성 종양으로 하였다.

6. 통계학적 분석

모든 통계학적 검정은 미국 North Carolina 주의 SAS institute에서 개발된 SAS program을 이용하였다. Cathepsin-D의 발현율을 연령, 에스트로겐 수용체 양성 유무, 암종의 크기, 액와림프절 전이 유무, 암종의 stage, 폐경 유무, 병리학적 등급, DNA ploidy, S-phase fraction에 따라 각각 비교 분석하기 위하여 Chi-square를 시행하여 p 값이 0.05미만일 때 유의성 있는 것으로 판정하였다.

결 과

대상 환자는 전부 121명으로 모두 여자였다. 121예 중에서 65예에서 Cathepsin-D가 양성반응을 보였

다. 양성반응을 보인 환자의 평균 연령은 47.4세였고 음성반응을 보인 환자의 평균 연령은 47.2세를 보여 나이에 따른 Cathepsin-D 양성 반응률의 통계적 의의성은 없었다($p=0.468$)(Table 2).

에스트로겐 수용체에 관한 조사가 실시된 98예를 대상으로 Cathepsin-D와의 상관관계를 조사하였다. ER (+)인 55예 중에서 CD (+)는 31예(56.36%)였고, CD (-)는 24예(43.64%)였으며, ER (-)인 43예 중에서 CD (+)는 21예(48.84%)였고, CD (-)는 22예(51.16%)를 보여 통계학적 차이는 보여주지 못하였다($p=0.459$)(Table 3).

종양의 크기에 대한 조사는 106예에서 이루어 졌

으며, T1 20예 중 CD (+)는 14예(70%), CD (-)는 6예(30%)였고 T2 64예 중 CD (+)는 34예(53.13%), CD (-)는 30예(46.88%)였고 T3 16예 중 CD (+)는 8예(50%), CD (-)는 8예(50%)였고, T4 6예 중 CD (+)는 4예(66.7%), CD (-)는 2예(33.33%)로서 통계적으로 유의한 상관관계는 없었다($p=0.511$)(Table 4).

림프선 전이와 Cathepsin-D와의 상관관계에서 106예 중 림프선 전이가 양성인 59예 중에서 CD (+)는 35예(59.32%)였고, CD (-)는 24예(40.68%)로 었으며, 림프선 전이가 음성인 47예 중에서 CD (+)는 25예(53.19%), CD (-)는 22예(46.81%)로 통계적으로 유의한 상관관계가 없었다($p=0.527$)(Table 5).

병기와 Cathepsin-D와의 상관관계에서 stage I인 9예 중에서 CD (+)는 8예(88.89%)였고, stage II인

Table 1. Summary of semiquantative method for assessing histological grade in infiltrative ductal carcinoma

Feature	Score
Tubule formation	
Majority of tumor (>75%)	1
Moderate degree (10-75%)	2
Little or none (<10%)	3
Nuclear pleomorphism	
Small, regular uniform cells	1
Moderate increase in size and variability	2
Marked variation	3
Mitotic counts per 10 fields ($\times 400$)	
0-5	1
6-10	2
>11	3
Grade I : 3-5 points-well differentiated	
Grade II : 6-7 points-moderately differentiated	
Grade III : 8-9 points-poorly differentiated	

Table 2. Positive rate of Cathepsin-D and age distribution

CD	No. of cases (%)	Median age, years (range)
+	65 (53.7)	47 (29-80)
-	56 (46.3)	47 (27-74)
Total	121	

Table 3. Correlation between the Cathepsin-D and estrogen receptor

CD	Estrogen receptor		Total
	+	-	
+	31 (56.36)	21 (48.84)	52 (53.06)
-	24 (43.64)	22 (51.16)	46 (46.94)
Total	55	43	98 (100.00)

Table 4. Correlation between the Cathepsin-D and tumor size

CD	Tumor size				Total (%)
	T ₁ (%)	T ₂ (%)	T ₃ (%)	T ₄ (%)	
+	14 (70.00)	34 (53.13)	8 (50.00)	4 (66.67)	60 (56.60)
-	6 (30.00)	30 (46.88)	8 (50.00)	2 (33.33)	46 (43.40)
Total	20	64	16	6	106 (100.00)

69예 중에서 CD (+)는 37예(53.62%), CD (-)는 32예(46.38%)였고, stage III인 26예 중에서 CD (+)와 CD (-)가 각각 13예(50%), stage IV는 2예 중 2예 모두 CD (+)(100%)가 나왔으나 통계적으로 유의한 상관관계는 없었다($p=0.109$)(Table 6).

폐경 전인 64예 중에서 CD (+), CD (-)는 각각 32

예(50%)였으며, 폐경 후인 47예 중에서 CD (+)는 27예(57.45%), CD (-)는 20예(42.55%)로서 통계적으로 유의한 상관관계는 없었다($p=0.437$)(Table 7).

병리학적 등급에 대한 조사는 99예에서 이루어졌으며 고분화성 32예 중 CD (+)는 19예(59.38%), CD (-)는 13예(40.63%)였고, 중등도 분화성 50예 중 CD (+)는 26예(52.00%), CD (-)는 24예(48.00%)였으며 저분화성 17예 중에서 CD (+)는 8예(47.06%), CD (-)는 9예(52.94%)로서 통계적으로 유의한 상관관계는 없었다($p=0.680$)(Table 8).

본원에서는 95년부터 DNA ploidy를 유암 환자에게 시행하였는데 DNA ploidy에 대한 조사가 실시된 26예에서 Cathepsin-D와의 상관 관계를 조사하였다. 이수배수체(anueploidy) 14예 중에서, CD (+)와 CD (-) 각각 7예(50%)였고, 이배성(diploidy) 12예 중에

Table 5. Correlation between the Cathepsin-D and lymph node

CD	Lymph node		Total (%)
	+	-	
+	35 (59.32)	25 (53.19)	60 (56.60)
-	24 (40.68)	22 (46.81)	46 (43.40)
Total	59	47	106 (100.00)

Table 6. Correlation between the Cathepsin-D and staging

CD					Total (%)
	I (%)	II (%)	III (%)	IV (%)	
+	8 (88.89)	37 (53.62)	13 (50.00)	2 (100.0)	60 (56.60)
-	1 (11.11)	32 (46.38)	13 (50.00)	0 (0.00)	46 (43.40)
Total	9	69	26	2	106 (100.00)

Table 7. Correlation between the Cathepsin-D and menopausal state

CD	Menopausal status		Total (%)
	Postmenopause (%)	Premenopause (%)	
+	27 (57.45)	32 (50.00)	59 (53.15)
-	20 (42.55)	32 (50.00)	52 (46.85)
Total	47	64	111 (100.00)

Table 8. Correlation between the Cathepsin-D and pathologic grade

CD	Pathologic grade			Total (%)
	well (%)	mod (%)	poor (%)	
+	19 (59.38)	26 (52.00)	8 (47.06)	53 (53.54)
-	13 (40.63)	24 (48.00)	9 (52.94)	46 (46.46)
Total	32	50	17	99 (100.00)

Table 9. Correlation between the Cathepsin-D and DNA ploidy

CD	DNA ploidy		Total (%)
	Aneuploidy (%)	Diploidy (%)	
+	7 (50.00)	6 (50.00)	13 (50.00)
-	7 (50.00)	6 (50.00)	13 (50.00)
Total	14	12	26 (100.00)

Table 10. Correlation between the Cathepsin-D and S-phase fraction

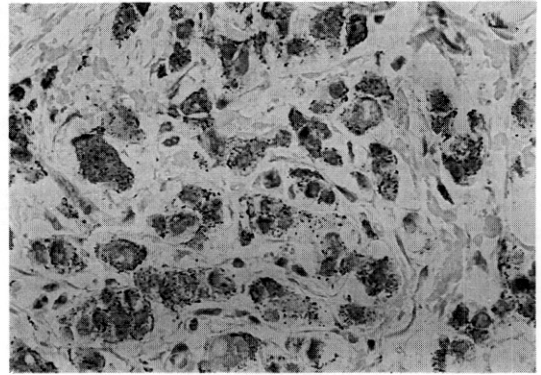
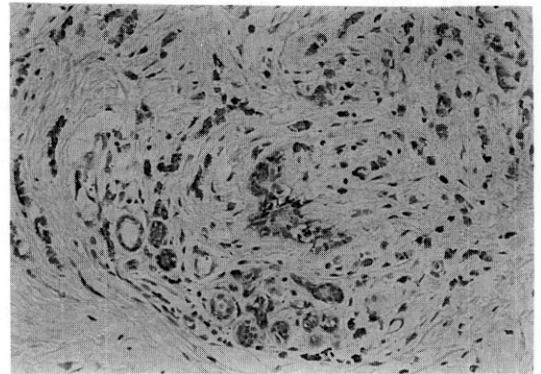
CD	S-phase fraction		Total (%)
	High (%)	Low (%)	
+	7 (46.67)	6 (54.55)	13 (50.00)
-	8 (53.33)	5 (45.45)	13 (50.00)
Total	15 (57.69)	11 (42.31)	26 (100.00)

서 CD (+)와 CD (-)가 각각 6예(50%)였으나 통계적으로 유의한 상관관계는 없었다($p=1.000$)(Table 9).

또한 S-phase fraction과 Cathepsin-D와의 상관관계를 조사하였는데 이수배수체(aneuploidy)에서는 14%이상 이배성(diploidy)에서는 7%이상을 high S-phase fraction으로 정하고 그 이하는 low S-phase fraction으로 정하였다. high S-phase fraction 15예 중에서 CD (+)는 7예(46.67%)였고 CD (-)는 8예(53.33%)였으며 low S-phase fraction 11예 중에는 CD (+)는 6예(54.55%)였고 CD (-)는 5예(45.45%)였으며 통계적으로 유의한 상관관계는 없었다($p=0.691$)(Table 10).

고 안

현재 전신 전이가 없는 유방암 치료는 술 후 보조요법을 하여야 하는지, 한다면 어떤 치료 방법을 선택해야 하는지에 대해서는 논란이 많다. 수술 가능한 유방암 환자의 50% 정도가 수술이나 방사선 치료로 완치가 되거나 장기간 재발이 없지만, 나머지 50%에서 재발하기 때문에 재발 가능성의 환자를 감별하는 것이 중요하다.

**Fig. 1.** Diffuse but moderate staining of Cathepsin-D in the nests of infiltrating ductal carcinoma (ABC method, $\times 400$).**Fig. 2.** Diffuse but moderate staining of Cathepsin-D in the nest of infiltrating ductal carcinoma, duct (+)(ABC method, $\times 100$).

대부분의 보고자들은 에스트로겐 수용체 양성인 환자가 음성인 환자보다 생존율이 높다고 보고하고 있으며, 암종의 크기가 작을수록, 환자의 나이가 증가할수록 에스트로겐 수용체 양성율이 높다고 보고하고 있다. 에스트로겐 연관 단백질은 유방암 세포주에서 에스트로겐에 의해 조절되는데 에스트로겐 수용체 단독으로도 유방암 예후인자로서의 가치가 있으나, 에스트로겐 연관 단백질 단독 혹은 수용체와 함께 좋은 예후의 지표로 이용될 수 있다. 이러한 에스트로겐 연관 단백질에는 논란의 여지는 있지만 Cathepsin-D, HSP-27 등이 있고, Cathepsin은 단백질 내부결합을 분해시키는 효소의 일종으로 여러 종류가 있는데 Cathepsin-D는 그중의 하나이다.

Cathepsin-D는 대부분의 인체세포에 존재하는 산성 용소성 단백분해효소(acidic lysosomal protease)로서 아직까지 논란의 여지는 있지만 유방암세포의 세포질내 이 단백질의 증폭이 유방암환자의 무전이 생존율과 무재발 생존율과 밀접한 관계가 있다는 많은 보고가 있다. RIA법이나 immunoenzymatic assay 등의 방법으로 유방암의 세포질내 Cathepsin-D나 혈중 Cathepsin-D의 농도를 측정함으로써 증폭군과 비증폭군간의 예후의 차이를 밝히려는 수많은 연구 보고가 있다.

Cathepsin-D는 정상 유방조직이나 양성 조직에서보다 유방암의 세포질 내에도 높은치를 보이고, 만성 유방염에서 약간의 증폭이 있을 수 있다고 한다. 또한 이 물질은 대개 에스트로겐 유도성이기는 (estrogen inducible) 하지만 Rochefort¹⁴⁾ 등은 유방암 세포주의 하나인 MCF-7세포에서 에스트로겐에 의해 직접 혹은 전사(transcription)를 통하여 Cathepsin-D의 m-RNA가 유도될 뿐 아니라 여러 성장인자(growth factor)들에 의해서도 유도된다고 하였고, 또한 Cavaillès¹¹⁾ 등은 MCF-7 세포로부터 Cathepsin-D의 유전자의 5'-upstream 부위의 구조와 기능을 분석하여 호르몬 의존성 유방암에서는 estradiol에 의해 TATA 의존성 전사(TATA-dependent transcription)가 Cathepsin-D의 m-RNA의 과발현과 관련이 있고, 또한 에스트로겐과는 무관하게 mixed promoter에 의해서도 Cathepsin-D의 m-RNA의 과발현이 있는 것을 밝혔다.

Cathepsin-D의 증폭은 이 물질이 단백분해효소(protease) 작용으로 기저막을 포함한 세포 외의 기질을 파괴하고, 성장 인자(growth factor)와 같은 작용으로 유방암의 침윤성(invasiveness)를 증가시키는데 기여하리라는 가설에 대한 시험관(in vitro) 확인 실험에서 Rochefort 등은 procathepsin-D가 유방암세포주의 autocrine mitogen으로 작용하는 것과 acidic microenvironment에서 세포외 기질을 파괴하는 것을 관찰하였고¹⁵⁾, 또한 nude mice에서 SV40 promoter의 조절하에 human cDNA Cathepsin-D expression vector를 정맥주사로 전이(transfection) 시켰을 때 3YA1-AD12 rat의 tumorigenic 세포의 전이력(metastatic potential)이 증가되는 것을 관찰하였다¹⁴⁾. 반대

로 Johnson 등은 유방암세포주 MCF-7 세포 9 clone들에서 Cathepsin-D의 과발현과 Boyden chamber의 인공기저막에 대한 침윤정도 간의 상관성을 관찰한 결과, Cathepsin-D의 과발현과 침투성(invasive behavior)간에는 상관성이 없다는 상반된 실험결과를 발표하였다¹⁰⁾. 이와같이 아직까지 유방암조직의 Cathepsin-D 과발현과 유방암환자의 예후와의 관련성에 대한 연구 결과들이 많은 논란의 여지를 가지고 있는 것을 알 수 있다.

Spyratos 등과 Duffy 등은 각각 122명과 331명의 유방암환자에서 유방암조직의 세포질 내의 Cathepsin-D의 농도(RIA법)가 무전이 생존율, 무재발 생존율 및 누적 생존율과 밀접한 상관성이 있다고 하였던 반면에^{5,17)}, Domagala 등은 136명의 유방암 환자를 대상으로 같은 조사를 한 결과(면역조직화학법)에서 Cathepsin-D 과발현과 장기누적 생존율간에는 상관성이 없다고 하였으며³⁾ 액와림프절 전이가 없었던 환자에서도 Grunata 등은¹⁾ 상관성이 없었다고 한 반면에 Isola 등은 262명의 액와림프절 전이가 없었던 환자들에서 단일세포군 항체를 이용한 면역조직화학법으로 조사한 결과 Cathepsin-D 과발현군과 음성군의 8년 생존율이 각각 64%, 90%로 통계적으로 유의한 차이를 보였다고 하였다⁹⁾. 이와같이 다수의 문헌에서 selective subset에서만 의미가 있거나, Cathepsin-D 단독으로 보다는 종양의 크기, 액와림프절 전이 여부, 호르몬 수용체의 상태, 조직학적 분화도, DNA ploidy 및 각종 oncogene들의 과발현 여부 등의 다른 예후인자들과 보완적으로 분석하는 것이 중요하다고 강조하고 있다.

세포질 내의 Cathepsin-D의 측정법을 살펴보면 radioimmunoassay, immunoenzymatic assay 등에서 면역조직화학 염색 후 computer imaging analysis로 좀더 간편한 쪽으로 개발이 되고 있으며, 면역조직화학법에서 쓰는 항체도 rabbit polyclonal 항체를 쓰던 것이³⁾ 점차 단일세포군 항체를 쓰는데⁹⁾, 그 이전은 tumor infiltrating macrophage에서 발견되는 false high level expression을 배제할 수 있다. Polyclonal 항체를 사용한 문헌에서 보면, Cathepsin-D 양성율이 60%이고, 음성군 중에서 대식세포의 Cathepsin-D의 양성율이 33%였다고 하였던 반면에³⁾ 단일세포

군 항체를 사용한 문헌에서는 Cathepsin-D의 양성율이 52.5%였다.

Cathepsin-D의 과발현과 다른 예후인자와의 상관성에 대한 연구결과를 살펴보면 대부분의 문헌에서 모든 예후인자와 상관성이 없다고 하였고^{3,6,11,17}, Isola 등은 종양의 크기와만 상관성이 있다고 하였다. 본 저자들의 경우도 전통적 예후인자인 폐경기 유무(menopausal status), 종양의 크기 및 액와림프선 절 전이여부 등과의 상관성을 본 결과 전혀 통계적 연관성이 없었다.

이상과 같이 유방암조직 세포질 내에 Cathepsin-D의 과발현 여부가 예후에 영향을 미치는가 하는 문제는 아직 논란의 여지가 남아 있다고 생각되며, 액와림프절 전이가 없는 유방암 환자에서 약 30%의 재발을 국소치료 직후 식별하여 전신보조요법을 강구함으로써 유방암의 치료 성적을 향상시키는 것이 중요하므로 이러한 환자에 대한 식별수단의 하나로 최근 개발된 Cathepsin-D의 연구가 더욱 간편하게 그 농도를 측정할 수 있는 단일 세포군항체를 이용한 면역조직화학법으로 염색을 행하고 computer imaging analyzer로 분석하는 것이 보편화되어 전향적인 많은 연구가 뒤따라야 예후인자로서의 가치를 정확히 평가할 수 있을 것으로 사료되는 바이다.

결 론

1990년 3월부터 1995년 12월까지 5년 10개월 동안 아대학교 병원에서 침윤성 유방암종으로 진단받고 유방절제술을 받은 138예 중 본 연구에 충분한 양의 종양조직이 포함되어 있으면서 파라핀 블록의 보관 상태가 양호하고 또 임상기록의 검토가 가능한 121예를 대상으로 Cathepsin-D를 면역 조직학적 방법으로 측정하였다. 그리고 폐경유무(menopausal status), 림프절 전이수 및 종양의 크기, 연령, 에스트로젠 수용체의 유무, 병기(stage), 병리학적 등급, DNA ploidy, S-phase fraction 등을 조사하여 Cathepsin-D의 발현성 유무와의 연관성을 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) Cathepsin-D의 발현율은 53.7% (65/121)였다.
- 2) Cathepsin-D의 발현은 에스트로젠 수용체, 암

의 크기 및 폐경유무와 연관성이 없었으며, 그 외에 전이 림프절 수, 나이, 병기(stage), 병리학적 등급(pathologic grade), DNA ploidy, S-phase fraction들과도 통계적인 상관성이 없었다.

3) 5년 비재발 누적 생존율과 Cathepsin-D와의 관계는 추적조사를 시작한 시기가 짧고 충분한 추적조사가 되지않아 규명할 수가 없었다.

이상의 본 연구 결과, Cathepsin-D의 발현이 유방암의 예후에 영향을 주는 독립인자라고 인정하기 어려웠고 앞으로 더 많은 중례에서 전향적인 방법에 의한 연구가 필요하다고 생각되며 유방암으로 수술한 환자의 계속적인 추적조사와 정확한 환자의 생존율의 산출이 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Cavalles V, Augereau P, Rochefort H: Cathepsin D gene is controlled by a mixed promoter, and estrogens stimulate only TATA-dependent transcription in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(1):203, 1993
- 2) Deckers PJ: Current strategies in operable cancer. *Hospital Practice* 22(1):41, 1987
- 3) Domagala W, Striker G, Szadowska, et al: Cathepsin D in invasive ductal carcinoma as defined by immunohistochemistry, No correlation with survival at 5 years. *Am J Pathol* 141(5):1003, 1992
- 4) Donegan WL, Spratt JS: Cancer of the breast. 2nd ed, WB Saunders, Philadelphia, 1988
- 5) Duffy MJ, Reilly D, Brouillet JP, et al: Cathepsin D concentration in breast cancer cytosols: correlation with disease-free interval and overall survival. *Clin Chem* 38(10):2114, 1992
- 6) Duffy MJ, Brouillet JP, Reilly D, et al: Cathepsin D concentration in breast cancer cytosols: correlation with biochemical, histological and clinical findings. *Clin Chem* 37(1):101, 1991
- 7) Granata G, Coradini D, Cappelletti V, Di Fronzo G: Prognostic relevance of cathepsin D versus estrogen receptors in node negative breast cancers. *Eur J Cancer* 27(8):970, 1992

- 8) H M, Kaur AE, Lesnick GJ: Carcinoma of the breast-Thirty years' experience with radical mastectomy. *Am J Surg* 115:341, 1998
- 9) Isola J, Weitz S, Visakorpi T, et al: Cathepsin D expression detected by immunohistochemistry has independent prognostic value in axillary node negative breast cancer. *J Clin Oncol* 11(1):36, 1993
- 10) Johnson MD, Torri JA, Lippman ME, Dickson RB: The role of cathepsin D in the invasiveness of human breast cancer cells. *Cancer Res* 53(4):873, 1993
- 11) Marsigliante S, Bischoff L, Greco S, et al: Relation of cathepsin D level to the estrogen receptor in human breast cancer. *Int J Clin Lab Res* 22(1):52, 1992
- 12) Ouch N: Oncogene and breast cancer. *Geka shinryo (Tokyo)* 35:1993
- 13) Rochefort H: Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer. *Acta Oncol* 31(2):125, 1992
- 14) Rochefort H, Capony F, Garcia M: Cathepsin D: a protease involved in breast cancer metastasis. *Cancer metastasis Rev* 9(4):321, 1990
- 15) Rochefort H: Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer. *Semin Cancer Biol* 1(2):153, 1990
- 16) Sabiston DC: Textbook of surgery. 14th ed, WB Saunders, Philadelphia, 1991
- 17) Strydom F, Maudelonde T, Brouillet JP, et al: Cathepsin D: An independent prognostic factor for metastasis of breast cancer. *Lancet* 11:1115, 1989
- 18) Devita VT: Breast cancer therapy: exercising all our options. *N Engl J Med* 320:527, 1989
- 19) Fisher B, Bauer M, Margolese K: Five year results of a randomized clinical trial comparing total mastectomy and segmental mastectomy with and without radiation in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med* 312:665, 1985
- 20) American Joint Committee on Cancer 1992
- 21) World Health Organization Classification of Breast Tumors