

유방암에서 c-erbB-2와 CD44 유전자의 발현

가톨릭대학교 의과대학 외과학교실

김용귀 · 서영진 · 박우찬 · 최승혜 · 오세정
조원일 · 김정수 · 정상설 · 이재학

= Abstract =

The Expression of c-erbB-2 and CD44 Gene in Breast Cancer

Yong Gui Kim, M.D., Young Jin Suh, M.D., Woo Chan Park, M.D.,
Seung Hye Chio, M.D., Se Chung Oh, M.D., Woun Il Cho, M.D.,
Jung Su Kim, M.D., Sang Seol Jung, M.D. and Jai Hak Lee, M.D.

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

There are some controversial opinions on the prognostic value of metastasis-associated tumor markers in breast cancer. Out of them, the overexpression of c-erbB-2 proto-oncogene or CD44 gene has been debated on their activities in promoting metastatic potential. To determine the relationship between expression of both genes, and, clinicopathological parameters and disease outcomes including relapse and survival, 48 archival paraffin-embedded breast-cancer tissues were stained using monoclonal antibody against each gene product by immunohistochemical staining method, and the result was analyzed. The positive expression rates of c-erbB-2 and CD44 genes were 45.8% and 18.8%, respectively. The co-expression rates of both positives and both negatives were 14.6% and 50.0%, respectively. Except the statistically significant positive correlation between CD44 and tumor size ($P=0.003$), the expression rates of c-erbB-2 or CD44 had no significant relationship with tumor size, stage, lymph node status, and disease recurrence ($p>0.05$). In the positive expression cases for CD44, disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) in months were shorter than the negative ones (53 ± 8 vs. 64 ± 5 and 67 ± 8 vs. 77 ± 5 S.E.). And, the c-erbB-2 positive cases had longer OS than the negative ones (78 ± 6 vs. 71 ± 6). The OS of positive co-expression cases with the c-erbB-2 and CD44 was shorter than that of one-gene expression ones (66 ± 6 vs. 75 ± 7). So the OS result observed in the expression of c-erbB-2 alone was reversed in the co-expression study. Though these results had no statistically significant level ($p>0.05$), we suggest a question that if there is any interaction or dependency between c-erbB-2 and CD44 expression in a view of disease process including OS. Finally, further randomized controlled studies are advisable for the reproducible and significant results. (Korean J of Breast Cancer 1998;1:79~91)

Key Words: Breast cancer, Immunohistochemical staining, CD44, c-erbB-2

서 론

한국의 여성 5대암은 자궁경부암, 위암, 유방암, 대장암, 간암의 순서인데, 자궁경부암, 위암은 줄고 있는 반면, 유방암은 그 점유율이 80-82년의 9.30%에서 91-92년의 11.4%로 꾸준히 증가하는 추세이다¹⁾. 최근 수십 년간 다양한 수술 및 치료방법의 시도에도 불구하고 유방암의 근치율은 뚜렷한 증가를 보이지 않았으며, 발달된 진단방법과 홍보를 통해 조기발견은 증가하였으나 생존율에 많은 발전을 가져오지 못하였다. Fisher 등은 유방암이 발생시초부터 전신적 질환이라 하여 종래의 영역림프절의 방어벽 역할, 광범위수술의 잇점 등에 대한 상반된 이론을 제시하였는데²⁾, 이것은 유방암이 그 예후를 예측하기 힘든 질병임을 시사하는 것이었다. 결국 유병율과 사망율을 줄이고자 하는 노력에 주요 걸림돌이 되는 것은 유방암 자체의 자연 경과(natural history)에 대한 명확한 이해의 부족이라 하겠다. 근래에 발달된 분자생물학에 기초하여 종양생성, 성장 및 침윤에 관한 연구가 이루어지고 있으며, 유방암에서도 유전학적 변화를 초래하는 생물학적 지표들이 독립적인 예후인자로서의 가능성을 보여주고 있다. 비록 이 방향의 연구보고들에 대한 통계학적 의미에 논란은 있으나, 유전자들에 대한 연구는 기존의 지표들(림프절전이, 종양크기, 임상병기, 호르몬수용체 등)과 더불어 예후에 대한 추가적인 정보를 제공할 것으로 보고 있다³⁾. 이를 통해, 진행암일지라도 더 이상의 치료를 필요로 하지 않는 경우라든지, 조기암일지라도 추가적인 화학적, 방사선 또는 호르몬치료가 필요한 환자들을 선별할 수 있을 것이며, 나아가 병의 추적관리계획 등에도 그 유용성이 확대될 것으로 기대된다. 본 연구에서는, 성장인자의 수용체 역할을 하는 막단백질을 만들어 세포신호전달체계에 관여하며, 인체의 여러 선암에서 그 증폭된 발현이 빈번히 관찰되는 c-erbB-2 세포암유전자⁴⁻⁸⁾와, 세포이동, 세포의 기질부착에 관여하는 세포표면 당단백질을 만들어 형태발생, 염증, 임파구복귀(homing) 및 종양전이기능을 가진 것으로 알려진 CD44 유전자⁹⁻¹²⁾의 발현을 유방암조직에서 면역조직화학적 염

색방법으로 검사하였다. 그리하여 개개 유전자 및 동시발현의 결과를 종양크기, 림프절전이, 병기 등 기존의 임상병리지표와 비교하고, 재발 및 생존율과의 관련성을 연구하여, 이 유전자들의 예후관정인자로서의 역할을 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

1. 연구 대상

1989년 1월부터 1991년 12월에 걸쳐 유방암으로 진단 받고 성모병원에서 수술(변형근치유방절제술)을 받은 환자 중, 그 병리조직의 파라핀포매 보존상태가 좋고 경과 추적이 가능했던 48예를 대상으로 하였다. 환자들의 수술 당시 기록과 임상병리결과를 통해 기초자료를 수집하고(연령, 종양크기, 림프절전이여부, 수술당시의 병기-AJCC/UICC stage grouping), 외래기록과 직접탐문, 사망 또는 이동자료를 이용하여 병 경과를 추적하였다. 각 환자의 파라핀포매 암조직은 종양 유전자 단백질에 대한 단클론항체를 사용하여 면역조직화학적 방법으로 염색하여 그 결과를 비교 분석하였다.

2. 면역조직화학적 검사

파라핀에 포매된 조직을 4 μm 두께로 절편을 만들어 슬라이드(Fisher Scientific 15-188-52 Pittsburgh, Ph 15219 USA)를 만들고, c-erbB-2, CD44 유전자의 단백질에 대한 각각의 마우스 IgG 단클론항체 NCL-CB11, NCL-CD44 (Novocastra Lab Ltd, Claramont Place, Newcastle, U.K.)를 일차 항체로 사용하여 LSAB Kit (DAKO, K0680 Carpinteria Ca. 93013 USA)를 사용한 immunoperoxidase 염색방법을 이용하였다. 항체희석액(DACO PLO770)을 이용하여 c-erbB-2와 CD44 일차항체를 각각 100배, 50배로 희석하여 사용하였다. 우선 파라핀 절편슬라이드를 탈파라핀용매(Histoclear/xylene)로 60℃에서 1분간 부치시키는 과정을 3회 반복 후 실온에서 1회 반복하였다. 파라핀 제거 후 100% 알코올로 실온에서 2번씩 2회 세척하였다. CD44 경우는 이후 TUF (target unmasking fluid-Kreatch diagnostics TUF 9504 Amsterdam Netherlands)로 100℃에서 5분간 부치시

킨 후 실온에서 15 분간 식히는 과정을 추가하였다. 내재성 peroxidase를 억제할 목적으로 Endo/Blocker (Biomed Corp. Cat No. M-69 Foster City, LA 94404 USA)에 40℃에서 2분간 부치시킨 후 1X

automation buffer(이하 완충액-Biomed M30)로 실온에서 4번 세척하였다. 비특이적 항원-항체결합을 억제하기 위해 조직완충액(tissue conditioner)으로 40℃에서 2분간 부치시킨 후 일차항체를 가하여 40

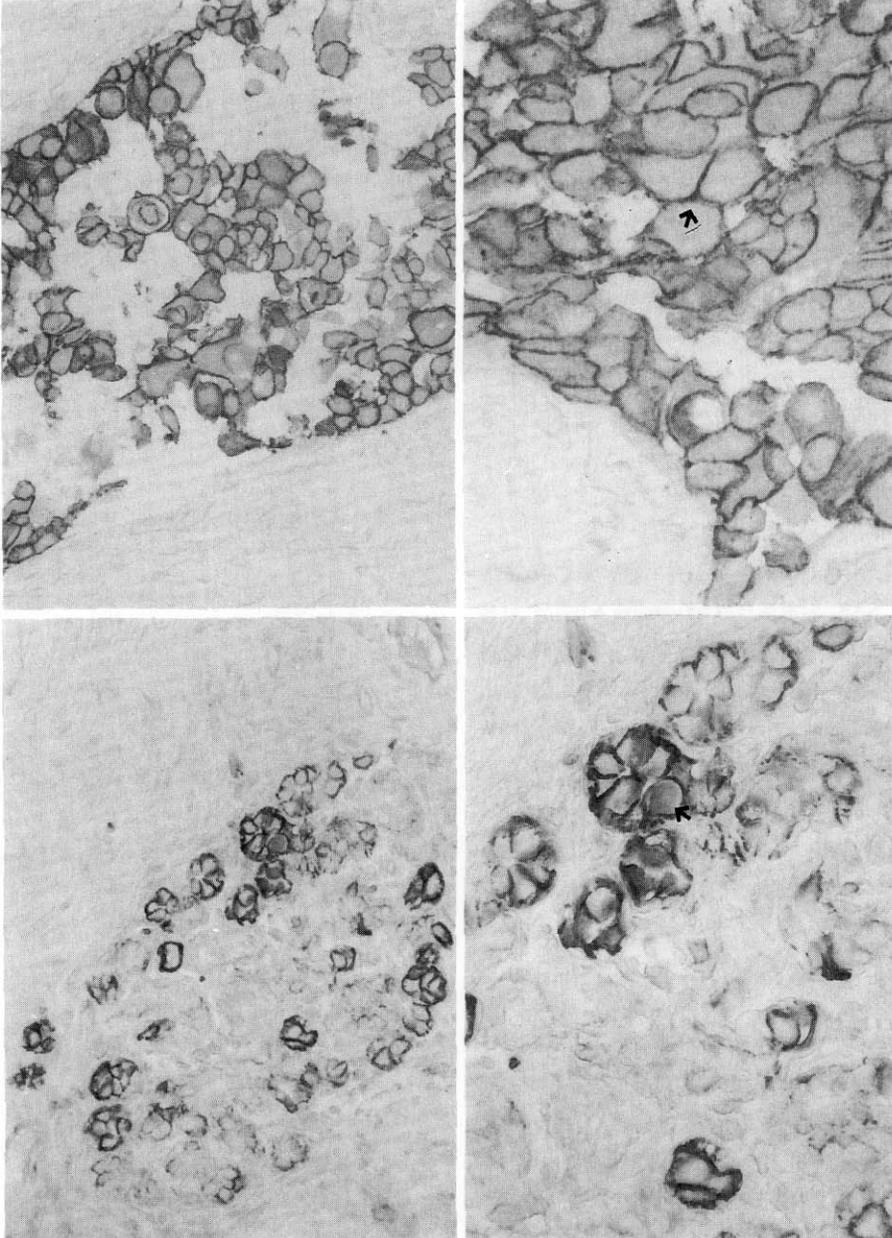


Fig. 1. Examples of immunohistochemical staining of protein expression for c-erbB-2 (upper) stained at membrane, and CD44 (lower) stained heterogenously in cytoplasm and/or near membrane. The left and right shows original magnification $\times 200$ and $\times 400$, respectively.

℃에서 12분간 부치시켰다. 완충액으로 실온에서 4회 세척 후 biotin을 붙인 이차항체에 40℃에서 4분간 부치시킨 후 완충액으로 실온에서 4회 세척하였다. avidin이 붙은 peroxidase reagent를 첨가하여 40℃에서 5분간 부치시킨 후 완충액으로 4회 세척하였다. chromogen (AEC) 용액으로 40℃에서 7분간 발색 후 증류수로 실온에서 1회 세척하였다. 양성반응을 확인하기 위해 hematoxylin 용액(Biomedica M 10)으로 30초간 대조염색 후 증류수로 실온에서 2회 세척하였다. 완충액과 증류수로 실온에서 각각 1회 세척 후 슬라이드는 Geltol을 사용하여 덩개유리를 덮었다. c-erbB-2는 세포질 염색유무에 상관없이 세포막에 진하게 갈색으로 염색된 세포가 전체암세포의 10% 이상인 경우에 양성으로 판독하였다. CD44는 암세포의 세포질에 미만성으로 중등도의 염색상을 보이거나, 세포막과 그 안쪽을 따라 염색되는 세포가 전체 암세포의 10% 이상인 경우에 양성으로 판독하였다(Fig. 1).

3. 통계 처리

연구를 통하여 얻어진 자료세트는 IBM 486-SX 컴퓨터에서 SAS 통계프로그램(version 6.04)을 이용하여 분석하였다. 분할표를 작성하여 변수간의 상관관계 검증에 있어 Chi-square 방법을 이용하였으며, 생존분석은 Kaplan-Meier method를 이용하여 그 곡선을 보고 Log-rank test로 검증하였다. 단, 평균생존율과 표준오차는 SPSS program (window용 version 7.0)을 사용하였다.

결 과

1. 연구대상 환자의 분포

전체환자 48명에 대한 평균 추적기간은 69.9 개월이었으며, 최연소 연령은 29세, 최고령은 71세였고, 병기는 stage IIa가 가장 많았다(39.6%). 액와 림프절 전이는 양성이 25예, 음성이 23예로 비슷하였다. 추적기간 중 13명이 사망하였으며, 암이 재발한 경우는 18예(37.5%)였다. 재발부위는 대부분이 골과 폐로 각각 7예였으며, 그 외에 간, 액와림프절 등이었다(Table 1).

2. c-erbB-2와 CD44의 발현과 임상병리지표

c-erbB-2와 CD44 유전자의 단백발현율은 각각 45.8% (22/48예), 18.8% (9/48예)였다. 림프절 전이는, c-erbB-2는 음성발현의 경우에서 양성의 경우보다 많았고(16/26예 대 9/22예), CD44는 양성발현의 경우에서 음성의 경우보다 더 많았다(6/9예 대 19/39예). 그러나 의미 있는 수치는 아니었다. 질병의 병기별로 종양단백의 발현은 비슷한 분포를 보였다. 두 유전자 중 한 유전자만 발현한 경우는 35.4% (17/48예), 두 유전자 모두 발현한 경우는 14.6% (7/48예)였는데, 이들의 동시발현여부와 병기 및 림프절전이 사이의 의미 있는 관련성은 보이지 않았다(Table 2). 종양의 크기가 클수록 CD44의 발현율은 높아 이들 사이에 의미 있는 상관관계가 있었다(P=0.003)(Table 3).

Table 1. The distribution of the studied population

	No. of cases	%
Total patient	48	100
Age (year)		
29-39	14	29.2
40-49	15	31.3
50-59	14	29.2
60-71	5	10.4
* Stage		
I	6	12.5
IIa	19	39.6
IIb	16	33.3
IIIa, b	7	14.6
*node		
Negative N0	23	47.9
Positive N1	20	41.7
N2	5	10.4
Recurrent	18	37.5
Mean follow-up	69.9 months (range from 56~93 months)	

* stage and node; from american joint committee on cancer and the international union against cancer

3. 유전자 발현과 재발율

전체 환자 중 37.5%에서 병의 재발을 보였다. c-erbB-2의 발현은 재발이 없는 경우에서 42.3%를 보여, 재발이 있는 경우의 31.9%보다 높았으나 의미 있는 수치는 아니었다. CD44에서는 양성발현 경우가 음성발현의 경우보다 재발율이 높고(55.6% 대 33.3%), 무병율은 음성발현의 경우가 높았으나 (66.7% 대. 44.4%), 이 역시 의미있는 수치는 아니었다. 두 유전자의 동시발현(co-expression)과 재발율의 비교에서 동시양성발현의 경우에서 한가지만 발현한 경우보다 재발율이 높고(42.9% 대 35.3%), 무병

율은 낮았으나(57.1% 대. 64.7%) 통계학적 의미는 없었다(Table 4).

4. 유전자 발현과 생존율

CD44 양성발현을 보인 환자들의 무병생존율(disease-free survival)과 생존율(overall survival)은 각각 53±8(표준오차) 개월과 67±8개월로 음성발현을 보인 환자들에 비해 짧았다. c-erbB-2의 경우, 무병생존율에서는 양, 음성 발현 경우에서 비슷하였고, 생존율에서는 음성발현을 보인 환자들에서 양성 의 경우보다 그 생존기간이 짧게 나타났다(71±8 대, 78±8개월). 그러나 이들은 통계학적으로 의미

Table 2. Gene expression and their relation to stage and node

Gene expression	Stage				Node		
	I (n=6)	IIa (19)	IIb (16)	IIIa, b (7)	Negative (n=23)	Positive (n=25)	%
c-erbB-2							
(+)(n=22)	3	9	6	4	13 (59.1)	9 (40.9)	100
(-)(n=26)	3	10	10	3	10 (38.5)	16 (61.5)	100
CD44							
(+)(n=9)	2	3	2	2	3 (33.3)	6 (66.7)	100
(-)(n=39)	4	16	14	5	20 (51.3)	19 (48.7)	100
co-exp [†]							
0 (n=24)	3	9	9	3	10 (41.7)	14 (58.3)	100
1 (n=17)	1	8	6	2	10 (58.9)	7 (41.1)	100
2 (n=7)	2	2	1	2	3 (42.9)	4 (57.1)	100
(n/48)		*NS				*NS	

* NS, non-specific in chi-square (χ^2) test ($p>0.05$); [†] co-exp, co-expression of c-erbB-2 and CD44; 0, no expression; 1, one gene expression; 2, two gene expression.

Table 3. The relationship between tumor size (T) and gene expression

Gene expression	T<2 cm	2 cm<T<5 cm	T>5 cm	Significance
c-erbB-2				
(-)	6	18	2	p>0.05
(+)	5	10	7	
CD44				
(-)	7	25	7	P=0.003
(+)	4	3	2	
/48	/11	/28	/9	

Table 4. Disease recurrence and gene expression

Gene expression	Recurrence (n=18)	no-recurrence (n=30)	%	*P
c-erbB-2				>0.05
(+) n=22	7 (31.9)	15 (68.1)	100	
(-) n=26	11 (42.3)	15 (57.7)	100	
CD44				>0.05
(+) n=9	5 (55.6)	4 (44.4)	100	
(-) n=39	13 (33.3)	26 (66.7)	100	
Co-exp [†]				>0.05
0 n=24	9 (37.6)	15 (62.4)	100	
1 n=17	6 (35.3)	11 (64.7)	100	
2 n=7	3 (42.9)	4 (57.1)	100	

* probability in chi-square test; [†] co-exp, co-expression of the c-erbB-2 and CD44.

Table 5. The relationship between gene expression and survival by Kaplan-Meier method (log-rank test)

Gene expression	No. of patient	disease-free survival (mean±*S.E.)	overall survival (mean±*S.E.)
cd44			
(+)	9	53±8	67±8
(-)	39	64±5	77±5
c-erbB2			
(+)	22	59±5	78±6
(-)	26	59±7	71±6
	/48	NS [†]	NS [†]

* S.E., standard error in months; [†] NS, non-specific in Log-Rank test (p>0.05).

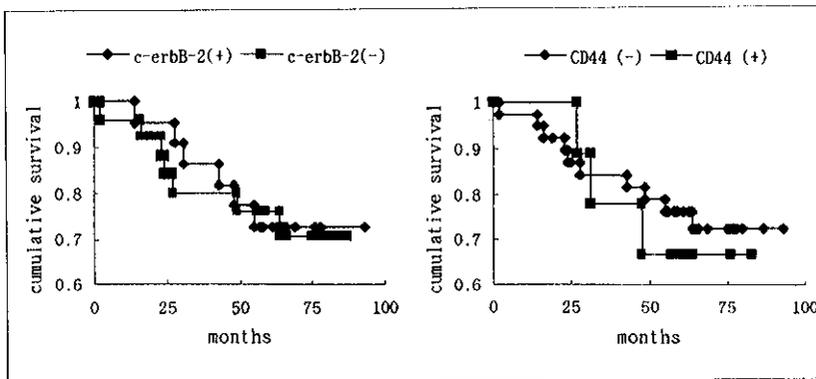


Fig. 2. The overall survival curve according to c-erbB-2 and CD44 expression (Kaplan-Meier method). (+): positive (-): negative expression.

있는 수치는 아니었다(Table 5, Fig. 2).

5. 유전자의 동시발현과 생존율

두 유전자 중 한가지 또는 두가지 모두를 발현한

Table 6. Co-expression of c-erbB-2 and CD44 gene and survival by Kaplan-Meier method (log-rank test)

Gene expression	No. of patient	disease-free survival (mean±S.E.*)	overall survival (mean±*S.E)
No gene expression	24	60±7	72±6
One gene expression	17	56±5	75±7
Two gene expression	7	54±10	66±6
	48	NS [†]	NS [†]

* S.E., standard error in months; [†] NS, non-specific in Log-Rank test (p>0.05).

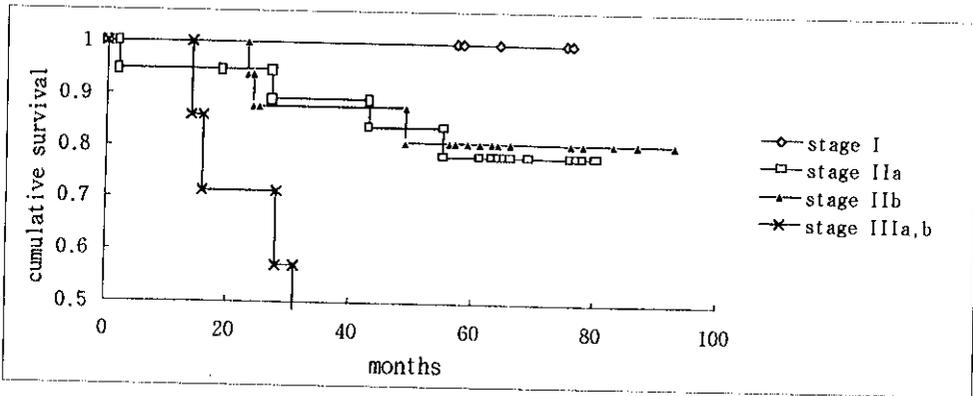


Fig. 3. The overall survival curve according to co-expression of c-erbB-2 and CD44 genes by Kaplan-Meier product limit method 0: no expression, 1: one expression, 2: two expression.

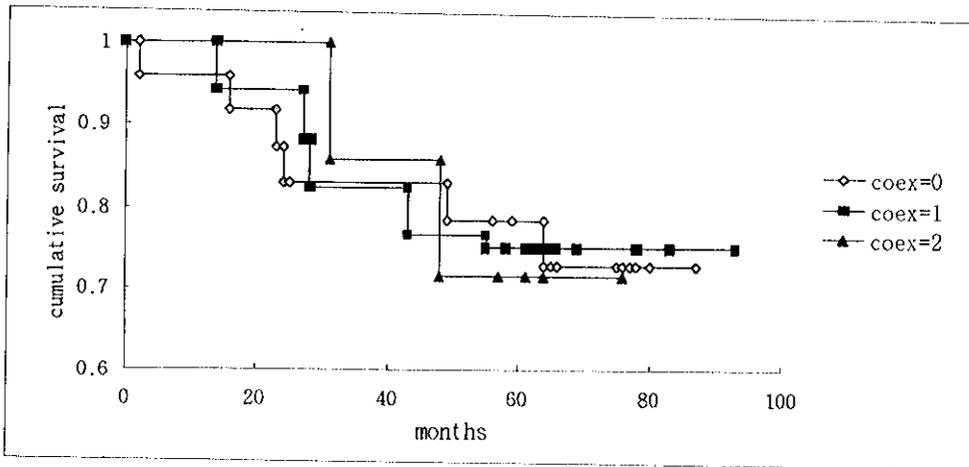


Fig. 4. The overall survival curves according stages to (Kaplan-Meier method).

경우에 이들 사이의 무병생존율은 비슷하였으나(56±5, 54±10개월), 아무 것도 발현하지 않은 경우(60±7개월) 보다는 낮았다. 생존율에 있어, 두가지 유전자 모두를 발현한 경우가 그 외의 경우들보다 낮

은 생존율을 보였다. 특히 한 유전자만을 발현한 경우보다 약 9개월의 차이를 보였다(66±6 대 75±7개월). 그러나 이들 수치가 의미있는 정도는 아니었다 (Table 6, Fig. 3).

6. 종양크기, 림프절전이, 병기와 생존율

본 연구에서 종래의 임상병리학적 지표들은 무병 생존율과 생존율 모두에서 의미있는 차이를 보였다. 즉, 종양의 크기가 클수록($P=0.0256, 0.0150$), 액와림프절 전이가 양성일 경우($P=0.0358, 0.0014$) 그리고 병기가 진행될수록($P=0.0002, 0.0001$) 생존율이 낮았다(Fig. 4).

고 찰

유방암 환자들에 대한 최근의 치료는 여러 예후 인자들에 따라 시행되고 있는데, 주로 절제 당시의 액와림프절의 전이유무, 에스트로겐 수용체와 프로게스테론 수용체의 존재여부, 원발성 암의 크기, 그리고 진단당시의 임상병기 등이다^{13,14}. 더불어, 현재 많은 암에서 다루어지고 있는 분자생물학적 연구를 통한, 종양관련 유전자와 그 단백질발현 등의 생물학적 지표들이 보조적인 예후인자로서의 가능성을 보여주고 있다. 이러한 종양관련표식자를 이용한 연구는 암발생의 고위험군에 대한 진단적 정보를 얻고, 예후를 가늠해보며, 기존의 호르몬치료와 화학요법에 더불어 새로운 치료항목의 하나인 유전자요법에 대한 선택의 가능성을 시도해 볼 수 있어 주목이 되고 있다.

고형성 종양의 전이는 여러단계를 거치는 복잡한 병태생리학적 과정으로, 종양세포 표면수용체와 혈관내피세포, 내피세포 하부의 세포의 기질간의 부착성 등의 상호작용이 중요한 역할을 한다고 하였다¹⁵. 림프구의 복귀(homing)에 관여하는 여러 분자 중의 하나로서 세포부착분자(cell adhesion molecule)를 만드는 CD44 유전자는 림프구가 말단 림프절, 점막, 염증성 활액상부내피소정맥 등에 부착하는데 관여하며, 림프암의 파급에 관련이 있고, CD44를 발현하는 non-Hodgkin's lymphoma 에서는 조직학적 악성도가 적더라도 예후가 불량하다고 하였다^{16,17}. 분자생물학적 분석에 의하면, 15번 염색체에 있는 CD44 유전자에 5개의 유전자 외부구역(extra domain)이 존재하며, 이들은 19개의 exon을 가지고 있음이 밝혀졌는데, 단백질의 형성과정에서 고대적으로 분리 조합

되어 다양한 변형(CD44v)을 만들어 낸다고 하였다. 많은 세포에 CD44의 표준형(90 kd)이 발현되나 그 변형(140-160 kd)은 상피세포에서 발견되고 있다¹⁸. 이 중 150 kd의 상피형의 발현은 선암세포주에서 증가되어 나타나는데, 조직침윤 역할을 한다고 하였다^{11,19}. CD44의 발현이 종양세포의 전이성향과 관련이 있다는 보다 직접적인 증거는, Gunthert 등의 연구에서, 비전이성 쥐췌장 세포주에 CD44v를 만드는 cDNA를 주입시키면 전이성형질로 전환됨을 발견한 것이었다¹¹. Dall 등은 exon v6를 이용한 CD44변형의 발현연구에서 정상세포에서는 발현이 관찰되지 않았으나 유방암세포의 대부분에서 면역조직화학적 염색상에 변형의 발현이 관찰되었고(19/21예), 정상 세포에서보다 유방암세포에서 그 변형의 범위가 광범위하였다고 한다²⁰. Culty 등은 인간유방암 세포주를 이용한 비생체(in vitro) 실험에서 CD44v를 과발현하는 경우에 hyaluronan과 결합능이 증가하고 이를 파괴하는 정도가 높으며, 이 현상은 종양세포의 침윤성을 증대시킨다고 하였다²¹. 본 연구에서 CD44의 양성발현율은 18.8% (9/48예)를 보여 비슷한 조건으로 연구한 Heikki 등의 16%와 비슷하였는데²², 박 등은 염색강도에 따라 3단계로 나누어 43예 중 1예를 제외하고 모두에서 양성이 나왔다고 하였다²³. 이들은 분화도가 좋지 않거나 조직학적 등급이 높은 경우와, 액와림프절 침윤이 있는 경우에 강양성의 염색조건을 보여 공격적인 조직양상과 연관이 있다고 하였다. 본 연구에서 림프절 전이가 있는 경우에 양성발현율이 66.7%로 음성의 경우인 33.3%보다 높았으나, 위 저자들의 연구에서와 같은 통계학적 의미는 없었다. 또한 각 병기별로 고른 발현을 보여, 임상병기의 진행이 발현의 증가와 관련이 있다고 한 박 등의 결과와 차이가 있었으며, 단, 종양의 크기가 증가할수록 발현율이 증가한다는 점은 일치하였다. 박 등은 CD44의 발현정도에 따라 의미 있는 5년생존율의 차이를 보였다고 하였다. 본 연구에서 CD44 양성발현의 경우가 병의 재발율이 높고 생존율과 무병생존율이 음성발현의 경우보다 낮았으나, 의미있는 수치는 아니었으며, 이것은 Heikki 등이, CD44발현과 공격적인 조직양상과의 연관에도 불구하고 독립적인 예후인자로서의 역할은 보이지

않는다고 한 것과 비슷하였다.

세포암유전자(proto-oncogene)인 c-erbB2는 상피 성장인자 수용체를 만드는 유전자와 많은 상동성을 보이는 유전자로 처음 발견되었고²⁴⁾, 성장인자의 수용체 역할을 하며 tyrosine kinase 활성을 가지는 당단백의 세포막분자를 만들어, 세포의 종양형성과 전이형성 등의 신호전달체계를 조절하는 것으로 알려져 있다²⁵⁾. Venter 등에 의해, c-erbB-2 유전자의 증폭이 이 유전단백을 생성시키며 증폭된 단백질의 존재를 면역조직화학적 염색을 이용하여 관찰할 수 있음이 보고된 이래²⁶⁾ 많은 연구가 이루어졌다. 비 종양형성 세포주인 MTSV1-7를 이용한 항생쥐(nude mouse) 실험에서 c-erbB-2를 과다 발현한 경우 부착비의존성(anchorage independent) 성장과 종양형성을 보였으며²⁷⁾, $\alpha 2\beta 1$ integrin의 하향조절을 통해 형태학적 변화에 기여하여, 유방암세포주 및 모든 침윤성암에서 정상적인 조직형성의 소실을 일으킨다고 하였다^{28,29)}. 결국 c-erbB-2의 발현은 유방암 및 악성 종양에서 증가되어 있고 불량한 예후를 가져온다고 하였으며, 현재는 이 단백질수용체에 대한 항체를 개발하여 치료약제를 운반하는 도구로의 응용을 기대하고 있다. 한편, 침윤성 임파구를 많이 가지며 c-erbB2를 과발현하는 암에서는 면역방어계의 작동이 용이한, 가능 목표물이 될 수 있어 예후가 좋을 수 있다는 보고도 있다²⁹⁾. Pier 등은 p185단백질의 단클론항체를 사용하여 암에서 c-erbB-2의 발현을 관찰하였는데, 유방암에서 46%로, 다른 종양보다(난소암 28%, 대장암 30% 등) 발현율이 높았으며, 특히 전이성 유방암에서 80%의 높은 발현율을 보였다고 한다³⁰⁾. 황 등, 남 등, 이 등은 각각 유방암의 40%, 34.2%와 30%정도에서 c-erbB-2 유전단백의 과표현이 관찰되었다 하였고³¹⁻³³⁾, 본 연구에서는 45.8% (22/48예)의 발현율을 보여 Pier 등과 비슷하였으며, 50%이상의 세포에서 염색된 강양성을 보인 경우는 23% (11/48예)였다. 남 등은 c-erbB-2의 발현이 증가할수록 액와림프절 전이빈도가 높아져 이들 사이에 유의한 상관관계가 있었다고 하였으나³²⁾, 본 연구에서 c-erbB-2 음성발현의 경우가(16/26예) 양성발현의 경우(9/22예)보다 림프절 전이개수도 많아서 이들과는 상이한 결과를 보였다. Marx 등, Barbaresch 등의 보

고에서도 c-erbB-2의 발현이 림프절전이, 종양크기와 사이에 의미있는 관계는 보이지 않았으며^{34,35)} 종양의 크기와도 의미있는 관련성은 없었고, 각 임상병기별로 균등한 발현을 보였다.

c-erbB-2의 발현과 예후에 대하여 다양한 결과의 보고가 있는데, Prost 등은 비염증성 유방암에서 c-erbB-2의 발현이 다발성 전이성상과 밀접한 관계에 있다고 하였으며³⁶⁾, Sainsbery 등, Slamon 등, Battifora 등은 유방암에서 이유전자의 발현 또는 과다발현이 있으면 예후가 좋지 않다고 하였다³⁷⁻³⁹⁾. 그러나 Clark 등, Thor 등은 C-erbB-2의 과다발현 또는 발현유무에 따른 무병생존율의 차이는 없으며(62%/62%, 68%/69%)^{40,41)}, Heintz 등, Zhou 등, Wolman 등은 전체 생존율에서 의미있는 차이가 없다고 하였다^{42,31)}. 본 연구의 생존율에서는 유전자 발현유무와 의미있는 차이를 보이지 않았으며, 무병생존율도 Clark 등, Thor 등의 경우처럼 유전자발현 여부에 따른 차이가 없었다. 생존율에서는 c-erbB-2발현 양성의 경우가, 의미있는 수치는 아니지만, 음성의 경우보다 높아서 Heintz 등의 결과에 근접하였다. 이러한 결과의 다양성에 대한 근본적인 원인은 아직 뚜렷이 밝혀지지 않고 있다.

한편, 개개 유전자들의 예후인자로서의 가능성을 종합하여, 서로의 의존성을 연구함으로써, 예후추정의 확률을 높여보고자 한 보고들이 있었다. Kirby 등은 종양형성과정에서 관련유전자들의 동시활성이 다발성 유전적 변화(multiple genetic hits)를 가져온다는 생각아래, Ha-ras, c-myc, c-fos, p53 유전자를 종합하여 그들의 동시발현을 연구하였는데, 이들 중 Ha-ras와 c-fos의 동시발현이 독립적인 예후인자로서 의미가 있었다고 한다⁴³⁾. Mattia 등은 종양형성, 증식 및 전이에 있어 다단계가 복합적으로 관여한다는 관점에서, p53과 c-erbB-2의 단백질에 대한 이중면역조직화학적 염색방법을 통해 두 유전자의 동시발현을 연구함으로써, p53의 억제조절능력의 상실로 인한 c-erbB-2 악성활성화인자의 획득을 통해 생길 수 있는 예후의 차이를 보고자 하였다. 그러나 이들 유전자의 동시발현이 없는 경우와 비교하여 병기나 생존율에 의미있는 차이를 발견하지 못하였다⁴⁴⁾. 박 등은 종양세포의 침윤표지자인 CD44와 기질세포의

표지자인 Matrix metalloproteinase 3 (Stromelysin 3)의 발현에 관한 연구에서 이들의 발현과 예후인자들의 상관관계에서 특별한 의미를 찾지 못했다고 하였다²³⁾.

본 연구에서는 종양형성과 전이에 관여하는 것으로 알려진 c-erbB-2 세포암유전자와 종양세포 침윤 표지자인 CD44유전자의 동시발현여부를 조사하여 예후인자로서의 의존성과 가능성을 알아보려고 하였다. 두 유전자를 모두 발현한 경우가 한가지만 발현한 경우보다 재발율은 약간 높고(42.9% 대 35.3%), 무병생존율은 비슷했으나(54 ± 10 대 56 ± 5 개월), 생존율은 낮게 나타났다(66 ± 6 대 75 ± 7 개월). 이 중 낮게 나온 생존율의 결과에 주목해 보면, c-erbB-2 단독발현의 결과, 즉 양성발현때의 생존율이 음성인 경우보다 높게 나온 것(78 ± 6 대 71 ± 6 개월)에 상반되는 것으로서, CD44 단독발현에서 보여준 생존율의 저하가(67 ± 8 대 77 ± 5 개월) 이러한 결과에 작용하였을 것을 감안하더라도 그 역전의 정도가 크다고 하겠다. 여러 세포주실험이나 생체내,외 연구를 통해 c-erbB-2유전자가 세포의 형태학적 변화에 기여하며, 종양형성과 전이형성역할을 하는 것이 인정되면서도, 생존율연구에서는 각 연구마다 다양한 결과를 보고하였던 점을 고려할 때, 본 연구에서 보인 CD44와의 동시발현 연구결과는 저자들로 하여금 c-erbB-2유전자가 생존율 등 병의 경과에 관련하여 CD44유전자에 의존성이 있는지에 대한 의문을 갖게 하였다.

이로써, 예후와 관련이 있을 것으로 추정되는 많은 생물학적지표(biological markers)에 대한 결과의 다양성을 서로 보다 근접시키기 위해, 개개 유전자에 대한 지속적인 연구와 동시에, 완벽한 예후인자의 조합을 위한 동시발현연구는 매우 의미있는 것으로 생각된다. 본 연구도 그 예를 충분히 늘려 의미있는 결과의 재산출이 필요하며, 그 결과가 반복적이라면, c-erbB-2의 경우처럼 동시발현연구에서 개개 유전자의 발현과 상이한 생존율을 가져오는 요인에 대한 연구를 위해, 잘 조절되고 계획된 cohort를 통한 전향적 연구가 필요할 것으로 보인다.

요 약

본 연구는 유방암으로 진단 받고 수술(변형 근치적유방절제술) 받은 48예를 대상으로, 유방암에 관련된 종양관련 유전자 중 전이와 관련이 있는 것으로 알려진 c-erbB-2 세포암유전자와 CD44 유전자의 발현을 면역조직화학적 염색방법으로 검사하여, 그 결과를 종래의 임상병리적 지표와 연관시켜보고, 재발 및 생존율과의 관련성을 알아보았다.

1) c-erbB-2는 45.8% (22/48예), 그리고 CD44 유전자는 18.8% (9/48예)의 발현율을 보였으며, CD44 유전자에서 종양의 크기가 클수록 발현율이 의미있게 높았다. 두 유전자의 발현과 임상병기, 림프절전이 여부와는 의미있는 상관관계를 보이지 않았다.

2) 전이와 관련이 있다고 여겨지는 c-erbB-2와 CD44의 발현을 조합하여 시행한 동시발현에 대한 분석에서 암의 병기나 림프절전이 여부와는 의미있는 관련성을 보이지 않았다.

3) 두 유전자 중 한 유전자만 발현한 경우에 재발율은 35.3% 였으나, 두 가지의 유전자의 동시발현 경우 재발율이 42.9%로 높게 나타났다. 또한 무병율에서는 동시발현의 경우가 한 유전자만 발현한 경우보다 낮게 나타났으나(57.1% 대 62.4%), 의미있는 수치는 아니었다.

4) 병기, 림프절전이 여부, 종양크기는 각각 무병 생존율 또는 생존율에 있어 의미있는 양의 상관관계를 보였다. CD44 음성발현의 경우가 양성발현의 경우보다 생존, 무병생존율이 길게 나타났으나 의미있는 수치는 아니었으며, c-erbB-2 경우 무병생존율은 양성, 음성발현에서 모두 비슷하였고, 생존율의 경우는 양성인 경우가 길었으나 의미있는 수치는 아니었다.

5) c-erbB-2와 CD44 유전자가 동시 발현한 경우의 무병생존율은 한 유전자만 발현한 경우와 비슷하였다(54 ± 10 대 56 ± 5 개월). 생존율은 동시 발현한 경우가 짧아서(66 ± 6 대 75 ± 7 개월), c-erbB-2 단독 양성발현 때 보인, 음성발현보다 높은, 생존율을 역전시켰다. 그러나 통계학적으로 의미있는 수치는 아니었다.

생물학적 지표들에 대한 여러 연구와 같이 본 연구에서도 결과의 다양성을 보였다. 그러나 c-erbB-2 단독발현 때의 생존율과 CD44와의 동시발현에서의 생존율사이의 결과의 역전을 보임으로써 두 유전자의 상호작용 내지 의존가능성에 대한 의문을 갖게 되었으며, 유전자 등을 포함한 생물학적 지표들의 동시발현 연구는 예후인자로서의 유용성 증대를 위해 의미있는 일이라 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) 김진복: 한국인 5대 암집환의 진료현황과 생존율. 대한의사협회지 38:157-158, 1995
- 2) Fisher B, Redmond C, Fisher ER: The contribution of recent NSABP clinical trials of primary breast cancer therapy to an understanding of tumor biology. *Cancer* 46:1009, 1980
- 3) Walker RA, Varley JM: The molecular pathology of human breast cancer. *Cancer Survey* 16:31-57, 1993
- 5) van de Vijver M, van de Bersselaar R, Devilee P: Amplification of the neu (c-erbB-2) oncogene in human mammary tumors is relatively frequent and is often accompanied by amplification of the linked c-erbA oncogene. *Molecular and Cellular Biology* 7:2019-2023, 1987
- 6) Varley JM, Swallow JE, Brammar WJ, Whittaker JL, et al: Alterations to either c-erbB-2 (neu) or c-myc proto-oncogenes in breast carcinomas correlate with poor shortterm prognosis. *Oncogene* 1:423-430, 1987
- 7) Yokota J, Tsunetsugu-Yokota Y, Battifora H, Le Fevre C, et al: Alterations of myc, myb, and ras proto-oncogenes in cancers are frequent and show clinical correlation. *Science* 231:261-265, 1986
- 8) Zhou D, Battifora H, Yokota J, Yamamoto T, et al: Association of multiple copies of the c-erbB-2 oncogene with the spread of breast cancer. *Cancer Research* 47:6123-6125, 1987
- 9) Haynes BF, Liao HX, Patton KL: The transmembrane hyaluronate receptor (CD44); multiple functions, multiple forms. *Cancer* 3:347-350, 1991
- 10) Underhill CB: The hyaluronan receptor. *J Cell Sci*

103:293-298, 1992

- 11) Gunthert U, Hoffman M, Rudy W, Reber S, et al: A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 65:13-24, 1991
- 12) Albeda SM: Biology of disease: role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab Invest* 68:4, 1993
- 13) Clark GM, McGuire WL, Hubay CA: Progesterone receptor as a prognostic factor in stage II breast cancer. *N Eng J Med* 309:1343-1347, 1983
- 14) Tandon AK, Clark GM, Channess GC: HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *J Clin Oncol* 7:1120-1128, 1989
- 15) Weilenga VJM, Heider KH, Offerhaus GJA, Adolf GR, et al: Expression of CD44 variant proteins on human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res* 53:4754, 1993
- 16) Jalkanen S, Bargatze R, de los Toyos J, Butcher EC: Lymphocyte recognition of high endothelium: antibodies to distinct epitopes of an 85-95kD glycoprotein antigen differentially inhibit lymphocyte binding to lymph node, mucosal or synovial endothelial cells. *J Cell Biol* 105:983-990, 1987
- 17) Picker LJ, Medeiros LJ, Weiss LM, Warnke RA: Expression of lymphocyte homing receptor antigen in non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol* 130:496-504, 1988
- 18) Sramenkovic IM, Amiot J, Pesando M, Seed B: A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family. *Cell* 56:1057-1062, 1989
- 19) Brown TA, Bouchard T, St. John T, Wayner E, et al: Human keratinocytes express a new CD44 core protein (CD44E) as a heparan-sulfate intrinsic membrane proteoglycan with additional exons. *J Cell Biol* 113:207-221, 1991
- 20) Dall P, Heider KH, Sinn HP, Skroch AP, et al: Comparison of immunohistochemistry and RT-PCR for detection of CD44v-expression, a new prognostic factor in human breast cancer. *Int J Cancer* 60:471-7, 1995

- 21) Culty M, Shizari M, Thompson EW, Underhill CB: Binding and degradation of hyaluronan by human breast cancer cell lines expressing different forms of CD44: Correlation with invasive potential. *J Cell Phys* 160:275-286, 1994
- 22) Heikki J, Pekka JK, Sakari T, Sirpa J: Glycoprotein CD44 expression and its association with survival in breast cancer. *Cancer* 143:867-874, 1993
- 23) 박혜립, 손진희, 박영희: 유방암에서 에후인자로서 CD44 및 Matrix Metalloproteinase 3 (Streptomyelin 3)의 임상연구. *대한암학회지*. 27:593-601, 1995
- 24) King CR, Kraus MH, Aaronson SH: Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* 229:974-976, 1985
- 25) Lonaldo F, Marco ED, Kind CR, Pierce JH, et al: The normal erbB-2 product is an atypical receptor-like tyrosine kinase with constitutive activity in the absence of ligand. *New Biologist* 2:992-1003, 1990
- 26) Venter DJ, Kumor S, Tuzi NL, Gullick WJ: Overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein in human breast carcinomas: Immunohistochemical assessment correlates with gene amplification. *Lancet* 2:69-72, 1987
- 27) D'souza B, Berdichevsky F, Kyprianou N, Taylor JP: Collagen induced morphogenesis and expression of the $\alpha 2$ integrin subunit is inhibited in c-erbB2 transfected human mammary epithelial cells. *Oncogene* 8:1797-1806, 1993
- 28) Sheaper M, Bartkova J, Bartek J, Berdichevsky F, et al: Studies of clonal cell line developed from primary breast cancers indicate that the ability to undergo morphogenesis in vitro is lost early in malignancy. *Int J Cancer* 51:602-612, 1992
- 29) Taylor-Paradimitriou J, D'souza B, Burchell J, Kyprianou N, et al: The Role of tumor-associated antigen in the biology and immunotherapy of breast cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 698:31-35, 1993
- 30) Natali PG, Nicotra MR, Bigotti A, Venturo I, et al: Expression of the p185 encoded by HER2 oncogene in normal and transformed human tissues. *Int J Cancer*. 15:457-61, 1990
- 31) 황태숙, 조경자, 김영배, 허주령 등: 유방암에서 c-erbB-2 종양단백 과발현에 관한 연구. *대한병리학회지*. 28:1-7, 1994
- 32) 남종희, 김경수, 박창수, 정상우: 유방암에후인자와 c-erbB-2 암유전자 발현과의 상관성에 관한 연구. *대한병리학회지*. 29:136-144, 1995
- 33) 이은희, 김동석, 이태숙, 이수정: 유방암에서 p53 및 c-erbB-2의 발현. *대한병리학회지*. 29:596-606, 1995
- 34) Marx D, Schauer A, Riche C, May A, et al: c-erbB-2 expression in correlation to other biological parameters of breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 10:15-20, 1993
- 35) Barbareschi M, Leonarai M, Mauri FA, Serio G, et al: p53 and c-erbB-2 protein expression in breast carcinomas. An immunohistochemical study including correlations with receptor status, proliferation markers, and clinical stage in human breast cancer. *Am-J-Clin-Pathol*. 98:408-18, 1992
- 36) Prost S, Te MG, Douc Lasy-S, Ahomadegbe JC, et al: Association of c-erbB2-gene amplification with poor prognosis in non-inflammatory breast carcinomas but not in carcinomas of the inflammatory type. *Int J Cancer* 58:763-8, 1994
- 37) Sainsbury JRC, Gk Needham, JR Farndon AJ, et al: Epidermal Growth Factor receptor status as predictor of early recurrence of and death from breast cancer. *Lancet* I:1398-1402, 1987
- 38) Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, et al: Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235:177-182, 1987
- 39) Battifora H, Gaffey M, Esteban J: Immunohistochemical assay of neu/c-erbB-2 oncogen product on paraffin-embedded tissues in early breast cancer. *Mod Pathol* 4:466-474, 1991
- 40) Clark GM, McGuire WL: Follow-up study of HER-2/neu amplification in primary breast cancer. *Cancer Res* 51:944-948, 1991
- 41) Thor AD, Schwartz LH, Komer FC: Analysis of c-erbB-2 expression in breast carcinomas with clinical follow-up. *Cancer Res* 49:7147-7152, 1989
- 42) Kathleen PJ, Marc EL: Overview of the biologic markers of breast cancer. *Hemato-Onco Clin Nor-*

Am 8:73-100, 1994

- 43) Kirby IB, Manos MK, Michael PV, Harold JW: Oncogene protein co-expression; value of H-ras, c-myc, c-fos and p53 as prognostic discriminants for

breast carcinoma. Ann Surgery 221:706-720, 1995

- 44) Mattia B, Elena L, Francesco A, Mauri, et al: Palma. p53 and c-erbB-2 protein expression in breast carcinomas. Am J Clin Pathol 98:408-418, 1992
-