

유방암에서 c-erbB2, c-erbB3 및 c-erbB4 발현의 의의

연세대학교 의과대학 외과학교실¹, 내과학교실², 방사선종양학교실³, 병리학교실⁴

이경식¹ · 구자윤¹ · 정현철² · 서창옥³ · 이희대¹ · 이병천¹ · 정우희⁴ · 양우익⁴

= Abstract =

Immunohistochemical Expression of c-erbB2, c-erbB3 and c-erbB4 Protein in Breast Cancer

Kyong-Sik Lee¹, Ja-Yun Koo¹, Hyun Cheol Chung², Chang-Ok Suh³,
Hy-De Lee¹, Byung Chan Lee¹, Woo-Hee Jung⁴ and Woo-Ick Yang⁴

*Department of General Surgery¹, Internal Medicine², Radiation oncology³,
Pathology⁴ Yonsei University, College of Medicine, Seoul, Korea*

Breast cancer is the third leading cause of cancer related deaths in Korean women. Members of the erbB receptor family, the EGF receptor and c-erbB2, c-erbB3 and c-erbB4, are commonly over-expressed in human breast cancer and there is a high correlation with an aggressive breast cancer phenotype and poor patient prognosis. Since the over-expression of the EGF receptor and c-erbB2 suggested that signalling of erbB receptors may contribute to the development and progression of breast cancer, we investigated the correlation of clinicopathological factors and the immunohistochemical expression of c-erbB2, c-erbB3 and c-erbB4. To determine the c-erbB immunoreactivity, we used Rabbit anti-human c-erbB2 oncoprotein (DAKO, Denmark), mouse monoclonal c-erbB3(RTJ.2, Santa Cruz) and rabbit polyclonal antibody c-erbB4(Santa Cruz) directed against each c-erbB protein by immunohistochemistry from paraffin-embedded tissue in a series of 190 women with breast cancer. About 25.8%(49 out of 190 patients) of breast cancers overexpressed c-erbB2, and 40.0%(76 out of 190 patients) and 18.9%(36 out of 190 patients) overexpressed c-erbB3 and c-erbB4, respectively. Poor histologic grade showed tendency of positive correlation of the positivity of c-erbB2 and 3 but without statistical significance and no correlation with c-erbB4. We observed positive correlations among c-erbB2, c-erbB3 and c-erbB4 expression.($p<0.05$) Estrogen receptors (ER) showed inverse correlations with c-erbB2($p=0.001$), c-erbB3($p=0.043$) and c-erbB4($p=0.197$) and progesterone receptors also showed inverse correlation with c-erbB2($p=0.018$). Tumor size ($p>0.05$) and lymph node status($p>0.05$) were not related with c-erbB family expression. The expressions of c-erbB2, c-erbB3 and c-erbB4 showed no survival benefit or no disease free benefit compared to c-erbB family negativity in univariate analysis (Kaplan-Meier life table analysis). Our results suggest that c-erbB2, c-erbB3 and c-erbB4 may regulate the growth of breast cancer by the interactions of these family of growth factor receptor that are dependent of hormonal control. (Korean J of Breast Cancer 1998;1:215~225)

Key Words: c-erbB2, c-erbB3, c-erbB4, Breast cancer

서 론

유방암은 우리나라에서도 서구의 경우와 마찬가지로 지속적인 증가추세를 보여 여성 암의 3위를 차지하고 있다. 유방암의 발생이 복합적 인자에 의해 기인되듯이 그 이후 또한 복잡한 요인들에 관련되어 있다. 임상경과가 환자에 따라 상이한 현상은 여러 암들의 공통된 특징이지만 유방암이 지니는 특성을 여러 각도에서 관찰하면 상당히 많은 예후인자들을 발견할 수 있으며 이러한 예후인자들의 분류는 생존율 및 재발률의 예측성이라는 장점 뿐만 아니라 수술 후에 추가적인 치료를 결정하는 판단인자로도 적용할 수 있기 때문에 더욱 큰 의미가 있다.

유방암 세포는 그 표면에 세포증식과 분화를 조절하는 다양한 성장인자수용체를 가지고 있다. c-erbB2는 type I growth factor receptors family 중의 하나로 여기에는 epidermal growth factor receptor와 erbB3, erbB4 등이 포함되는데 유방암에서 흔히 과발현을 보이며 종양세포의 proliferation을 변화시킨다¹⁾. c-erbB-2 발암유전자는 epidermal growth factor receptor와 구조적으로 매우 유사한 glycoprotein을 encode 하는데 이는 tyrosine kinase oncogene family의 일종이다²⁾.

p185^{erbB2}의 과발현이 있으면 유방암과 난소암에서 생존율이 낮은 경향을 보이는 것으로 알려져 있다³⁾. 유방암에서는 10-30%에서 c-erbB-2 발현이 관찰되는데 생존기간의 감소 등의 나쁜 예후와 연관성이 많다³⁻⁶⁾.

Heregulins (HRGs) 혹은 NDF (neu differentiation factor)은 c-erbB2에 의하여 encode 되는 p185^{erbB2/neu}의 ligand로 알려져 있는데 p185^{erbB3/neu}와 p185^{erbB4/neu} 혹은 erbB2와 erbB3의 heterodimer가 HRG/NDF의 receptor이며 이들 receptor의 존재는 HRG/NDF에 의한 p185^{erbB2/neu}의 tyrosine 인산화(phosphorylation)에 필수적임이 알려졌다⁷⁻⁹⁾.

이 연구에서는 유방암의 재발 및 나쁜 예후와 연관성을 보이는 등 과격한 생물학적 양상을 예고하는 것으로 알려진 c-erbB2 단백질의 발현양상을 면역화학염색을 이용하여 조사하였고 EGFR family의 일종이

면서 상호연관성을 가지고 tyrosine 인산화의 과정에 관여하여 종양세포성장을 유발하는 것으로 알려진 c-erbB3, c-erbB4의 발현양상을 연관지어 연구하였다. 또한 이들의 발현양상이 어떠한 의미를 가지는지를 기존의 예후인자 및 임상양상과 분석을 통하여 연구하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

1991년 3월부터 1995년 12월까지 연세대학교 의과대학 세브란스병원에서 수술 당시에 원적전이가 없는 유방암으로 진단 후 유방절제술을 시행한 환자 중 c-erbB2, c-erbB3와 c-erbB4의 면역조직화학 염색에 필요한 파라핀 블록 보존이 양호하고 조직의 양이 충분한 190명씩을 대상으로 하였다.

2. 연구 방법

1) 임상기록 검토

환자들의 진단시 연령, 수술방법, 폐경 여부, 에스트로겐과 프로게스테론 수용체의 발현 여부 등을 조사하였다.

2) 병리조직학적 검색

10% 중성 포르말린에 고정 후 파라핀에 포매하여 보관된 블록을 연속 절편하여 hematoxylin-eosin염색을 시행한 후 조직학적 분류는 변형된 세계보건기구(World health organization) 분류에 따르고 조직학적 등급은 Bloom and Richardson numerical scoring system에 따랐다.

3) c-erbB2, c-erbB3 및 c-erbB4의 면역조직학적 검색

각 예의 조직 표본 중 조직학적 분류형을 대표할 만한 블록을 2개 이상 선택하여 4 μ m 두께로 연속 절편하였다. 이 절편을 xylene (2×15 minutes)에서 파라핀을 제거한 후 0.05 mol/L Tris-buffered saline (TBS) 옮긴 후 pH 7.40에서 7.60까지 순차적 에탄올에 처리한다(3×5분간 각각의 용액에 처리). TBS (3×5 minutes)에서 washing 후 슬라이드는 10 mM

sodium citrate buffer at pH 6.0에 넣어 microwave oven at 650W (2×5 minutes)에서 가열한 후 상온에서 20분간 두었다. TBS (3 x)와 상향적 알코올에서 세척 후 endogenous peroxidase (0.3% H₂O₂×30 minutes)로 세척하였다. 다시 하향적 알코올 용액처리를 통해 TBS로 옮긴 후 avidin-biotin complex method로 염색하였다. Normal horse serum (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA)으로 slides를 배양하여 비특수염색을 제거한 후 슬라이드를 Rabbit anti-human c-erbB2 oncoprotein (DAKO, Glostrup, Denmark), mouse monoclonal c-erbB3 (RTJ.2, Santa Cruz, CA, USA)와 rabbit polyclonal antibody c-erbB4 (Santa Cruz, CA, USA)를 각각 1:100, 1:100 및 1:75로 희석하여 함께 BSA에서 4℃로 밤새 배양하였다. Horse biotinylated antimouse IgG in 2% BSA를 상온에서 30분간 절편에 첨가한 후 streptavidin-peroxidase conjugate (Vector Laboratories)와 함께 상온에서 30분간 배양, 3,3'-diaminobenzidine (Polyscience Inc., Warrington, PA, USA)로 5분간 염색하였다. 모든 배양은 배습지에서 시행하였다. 마지막으로 slight Mayer hematoxylin counterstain을 시행 후 탈수 및 마운팅을 시행하였다.

일차항체를 첨가하지 않은 절편을 2% BSA in TBS로 처리하여 음성의 기준으로 삼았다. 강한 c-erbB2 양성을 보인 슬라이드를 c-erbB2에 대한 양성기준으로 삼았다. 모든 슬라이드는 광학현미경하에서 관찰하는데 암세포의 표면세포막에 있는 신호를 c-erbB2의 과발현으로 임상결과나 병리 조직적 자료를 모르는 상태에서 면역염색에 대한 평가를 하였다. c-erbB2의 양성판정은 50% 이상의 강한 membrane staining을 보인 경우로 하였다. 국소적 세포막 염색이나 세포질 염색은 음성으로 판정하였다. c-erbB3와 c-erbB4는 정상 혹은 암조직 이외의 부위의 세포막염색보다 강한 반응이 나타나는 경우를 양성으로 하였다.

4) 통계학적 처리

수집된 자료는 SPSS 통계프로그램을 이용하여 개인용 컴퓨터로 분석하였다. c-erbB2, 3, 4의 발현 유무에 따른 여러 예후인자와의 연관성은 chi-square test를 이용하여 비교하였다. 생존율 및 무병생존율

은 Kaplan Meier method를 이용하여 계산하였고 이를 Log rank test로 검증하였으며 p값은 0.05 이하인 경우를 통계적인 유의성이 있는 것으로 정의하였다.

결 과

1. 환자의 특성

1) 환자의 연령 분포

연령별 분포는 서구의 유방암 호발 연령이 50대

Table 1. Distribution of age

| Age | No of patients (%) |
|-------|--------------------|
| <31 | 7 (3.7) |
| 31-40 | 51 (26.8) |
| 41-50 | 75 (39.5) |
| 51-60 | 47 (24.7) |
| 61-70 | 9 (4.7) |
| >70 | 1 (0.5) |
| Total | 190 (100.0) |

Table 2. Characteristics of patients

| Characteristics | No | % |
|---------------------------|---------|------|
| Estrogen receptor (+) | 79/177 | 44.6 |
| Progesterone receptor (+) | 94/177 | 53.1 |
| Tumor size | | |
| < 2 cm | 32/190 | 16.8 |
| 2-5 cm | 143/190 | 75.3 |
| > 5 cm | 15/190 | 7.9 |
| Histologic grade | | |
| I | 51/138 | 37.0 |
| II | 73/138 | 52.9 |
| III | 14/138 | 10.1 |
| Nuclear grade | | |
| I | 13/118 | 11.0 |
| II | 92/118 | 78.0 |
| III | 13/118 | 11.0 |
| Lymph node metastasis | | |
| 0 | 95/189 | 50.3 |
| 1-3 | 43/189 | 22.8 |
| 4-9 | 26/189 | 13.8 |
| over and 10 | 25/189 | 13.2 |

인데 비하여 40대가 가장 많았으며 30대가 2위로 50대보다 많은 비율을 보여 젊은 연령에서의 유방암 발생이 서구에 비하여 두드러진 차이점으로 나타났으며 60대, 70대로 갈수록 유방암 발생이 급격히 감소하는 경향을 보였는데 각 연령 군별 분포는 Table 1과 같다.

2) 환자군의 특성

진단 당시 환자군의 평균연령은 46세였으며 중앙치 추적기간은 32개월이었다. 조직학적 유형은 침습성관상피암이 171예로 가장 많았으며 관상피내암은 19예이었다. 환자군의 특성은 Table 2와 같다.

2. c-erbB2, c-erbB3 및 c-erbB4의 면역조직화학염색 및 임상적 연관성

c-erbB2 과발현의 양성판정은 50% 이상의 강한 세포막염색을 보인 경우로 하였는데 25.8% (190예

중 49예)였으며 c-erbB3 단백질의 과발현은 정상 유방 조직의 염색도보다 강한 염색을 보이는 경우로 하였는데 양성도는 40.0% (190예 중 76예)였다. c-erbB4

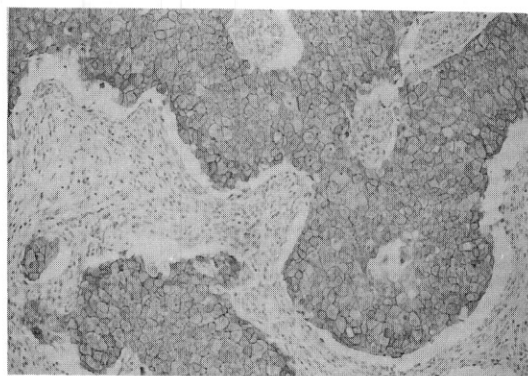


Fig. 2. Breast carcinoma cells with a positive membranous staining for c-erbB3: Ductal carcinoma in situ, $\times 200$.

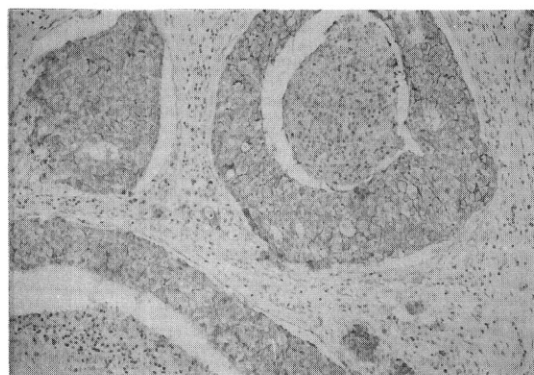


Fig. 1. Breast carcinoma cells with a positive membranous staining for c-erbB2: infiltrating ductal carcinoma, $\times 200$.

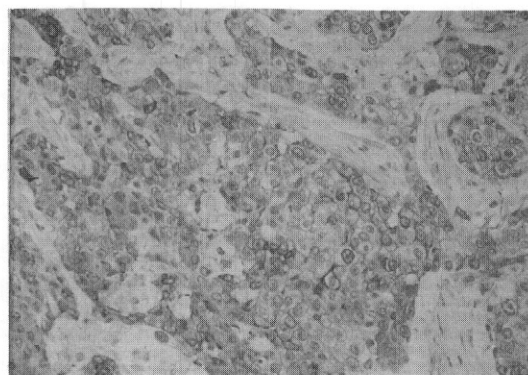


Fig. 3. Breast carcinoma cells with a positive membranous staining for c-erbB4: infiltrating ductal carcinoma, $\times 200$.

Table 3. Tumor size and the expression of c-erbB2, c-erbB3, and c-erbB4

| | c-erbB2 | | c-erbB3 | | c-erbB4 | |
|------------|---------|-----|---------|-----|---------|-----|
| | (+) | (-) | (+) | (-) | (+) | (-) |
| Tumor size | | | | | | |
| < 2 cm | 8 | 24 | 10 | 22 | 2 | 30 |
| 2-5 cm | 38 | 105 | 59 | 84 | 29 | 114 |
| > 5 cm | 3 | 12 | 7 | 8 | 5 | 10 |
| p-value | 0.853 | | 0.498 | | 0.062 | |

Table 4. Histologic grade and the expression of c-erbB2, c-erbB3 and c-erbB4

| | c-erbB2 | | c-erbB3 | | c-erbB4 | |
|------------------|---------|-----|---------|-----|---------|-----|
| | (+) | (-) | (+) | (-) | (+) | (-) |
| Histologic grade | | | | | | |
| I | 12 | 39 | 19 | 32 | 11 | 40 |
| II | 24 | 49 | 29 | 44 | 13 | 73 |
| III | 6 | 8 | 9 | 5 | 40 | 10 |
| p-value | 0.305 | | 0.176 | | 0.630 | |
| Nuclear grade | | | | | | |
| I | 3 | 10 | 7 | 6 | 9 | 4 |
| II | 28 | 64 | 36 | 56 | 42 | 50 |
| III | 4 | 9 | 6 | 7 | 7 | 6 |
| p-value | 0.859 | | 0.564 | | 0.264 | |

Table 5. Hormonal receptor status and the expression of c-erbB2, c-erbB3 and c-erbB4

| | c-erbB2 | | c-erbB3 | | c-erbB4 | |
|-----------------------|---------|-----|---------|-----|---------|-----|
| | (+) | (-) | (+) | (-) | (+) | (-) |
| Estrogen receptor | | | | | | |
| Negative | 36 | 62 | 47 | 51 | 21 | 77 |
| Positive | 11 | 68 | 26 | 53 | 11 | 68 |
| p-value | 0.001 | | 0.043 | | 0.197 | |
| Progesterone receptor | | | | | | |
| Negative | 29 | 54 | 39 | 44 | 18 | 65 |
| Positive | 18 | 76 | 34 | 60 | 14 | 80 |
| p-value | 0.018 | | 0.145 | | 0.241 | |

Table 6. Correlations of expression among c-erbB2, c-erbB3 and c-erbB4

| | c-erbB3 | | c-erbB4 | |
|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| | Negative (%) | Positive(%) | Negative(%) | Positive(%) |
| c-erbB2 | | | | |
| Negative (%) | 93 (66.0) | 48 (34.0) | 122 (86.5) | 19 (13.5) |
| Positive (%) | 21 (42.9) | 28 (57.1) | 32 (65.3) | 17 (34.7) |
| | p=0.004 | | p=0.001 | |

는 역시 세포질염색과 세포막염색이 주위의 암세포 이외의 부위보다 강한 염색도를 보이는 경우를 양성으로 판정하였는데 18.9% (190예 중 90예)가 양성인

었다(Fig. 1-3).

종괴 크기와의 연관성을 보면 c-erbB2와 c-erbB3는 연관성이 없었지만 c-erbB4의 경우 종괴의 크기

Table 7. Correlations of expression between c-erbB3 and 4

| | c-erbB3 | |
|--------------|--------------|-------------|
| | Negative (%) | Positive(%) |
| c-erbB4 | | |
| Negative (%) | 100 (64.5) | 54 (35.1) |
| Positive (%) | 14 (38.9) | 22 (61.1) |
| p=0.004 | | |

Table 8. Lymph node status and the expression of c-erbB2, c-erbB3 and c-erbB4

| | Lymph node status | | p value |
|---------|-------------------|--------------|---------|
| | Negative (%) | Positive (%) | |
| c-erbB2 | | | p=0.90 |
| (-) | 70 (50.0) | 70 (50.0) | |
| (+) | 25 (51.0) | 24 (49.0) | |
| c-erbB3 | | | p=0.26 |
| (-) | 53 (46.9) | 60 (53.1) | |
| (+) | 42 (55.3) | 34 (44.7) | |
| c-erbB4 | | | p=0.148 |
| (-) | 73 (47.7) | 80 (52.3) | |
| (+) | 22 (61.1) | 14 (38.9) | |

가 증가함에 따라 발현도가 증가하는 양상을 보였지만 통계적인 연관성은 없었다(Table 3).

조직학적 등급은 c-erbB2와 c-erbB3 단백에서 분화도가 나뉠수록 발현이 증가하는 경향을 보였는데 통계적 유의성은 없었으며 c-erbB4도 연관성이 없었다. 핵등급은 단백발현과 연관성이 없었다(Table 4).

호르몬 수용체와 c-erbB2, c-erbB3 및 c-erbB4 발현의 연관성을 보면 세 가지 단백질에서 모두 발현이 증가할수록 estrogen receptor의 양성률이 감소하고 반대로 발현이 낮을수록 estrogen receptor의 발현이 많아지는 관계를 보였는데 특히 c-erbB2와 c-erbB3는 통계적으로도 유의한 역관계를 보였다(Table 5).

c-erbB2 단백발현이 양성인 경우 c-erbB3단백발현의 양성률은 57.1%로 c-erbB2 음성의 경우 양성률인 34.0%에 비하여 높았으며 통계적으로도 연관성이 있어 이 두 단백질의 발현이 양적인 상관관계를 가

짐을 알 수 있다. 또한 c-erbB2와 c-erbB4 및 c-erbB3와 c-erbB4도 양적인 상관관계를 보였다(Table 6, 7).

림프절전이 여부는 c-erbB2, c-erbB3 및 c-erbB4의 발현여부와 통계적으로 유의한 연관성이 없었다(Table 8).

4. c-erbB2, c-erbB3 및 c-erbB4의 발현과 예후와의 연관성

c-erbB2의 과발현과 예후와의 연관성을 보면 5년 무병생존율은 c-erbB2 음성인 경우가 78.9%로 양성인 경우의 84.6%에 비하여 낮은 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다(p=0.78). 5년 생존율의 경우도 c-erbB2 양성은 88.3%, 89.3%으로 통계적인 차이는 없었다(p=0.76).

c-erbB3 및 c-erbB4의 경우도 발현군과 비발현군 간의 생존율 및 무병생존율에 있어서 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

고 찰

유방암에서 흔히 발견되는 유전변이 중의 하나인 c-erbB2의 증폭은 이 유전자에 의하여 생성되는 단백질산물의 과발현과 함께 중요한 연구대상으로 되어있다. c-erbB2 oncogene은 185 kDa의 세포막단백(membrane glycoprotein)을 형성하는데 이의 구조는 epidermal growth factor receptor와 유사하며 tyrosine kinase activity를 가진다^{2,10,11}. neu gene은 BDIX rat의 neuro/glioblastoma에서 분리된 purified DNA를 NIH3T3 cell에 transfection하여 발암성장을 유발함으로써 이 유전자를 함유한 DNA가 발암작용이 있음이 발견되었는데¹² neu의 human homologue는 molecular cloning technique을 통하여 c-erbB2 혹은 HER-2로 규명되었으며^{10,13,14} 17번 염색체의 q12-q22 band에 위치한다¹⁰. 이 유전자의 증폭은 사람의 염색체 17 (17q21)에서 관찰되며¹⁵ 많은 다른 선종암에서도 관찰된다^{16,17}.

erbB2는 1255 아미노산으로 이루어진 185 kDa receptor tyrosine kinase (RTK)를 encode하는데^{10,11,13,18} 이 단백질은 p185 또는 erbB2로 표기한다.

유방암세포는 세포분열과 분화를 조절하는 다양

한 성장인자수용체를 세포표면에 가지고 있다. Epidermal growth factor receptor (EGFR) family of tyrosine kinase-linked receptors, EGFR, erbB2/neu, erbB3, erbB4 등은 주로 유방암에서 자주 과발현을 보이며 중앙세포종식을 변형 조절한다¹⁾.

c-erbB2는 type I growth factor receptors family 중의 하나로 여기에는 epidermal growth factor receptor와 c-erbB3, c-erbB4 등이 포함된다. c-erbB2 gene이 형성하는 경세포막 당단백(p185^{erbB2})은 extracellular ligand binding domain과 intracellular tyrosine kinase activity를 가지고 있으며 epidermal growth factor receptor (EGFR), c-erbB3와 c-erbB4 등의 수용체 계열들과 구조적 유사성이 많다^{10,19)}.

c-erbB3 유전자는 염색체 12의 장완(12q13)에 위치하는데 6.2 kb mRNA를 전사(transcription)하고 이것이 180 kDa 당단백을 translation하게 된다. 대부분의 유방암 세포주에서는 c-erbB2의 과발현이 있는 경우 c-erbB3의 과발현을 보이며 두 유전자가 상호 조절작용을 보이는지는 명확하지는 않지만 c-erbB3 유전인자 전구체가 c-erbB2 유전인자의 전구체와 전반적인 구조가 매우 유사하다²⁰⁾.

Lemoine 등에 의하면 195예의 유방암 중에서 22%가 c-erbB3 단백질의 발현이 주위의 정상유방조직에 비하여 높은 발현을 보였으며 종괴의 크기, 호르몬수용체양성여부, EGFR, c-erbB2 등과는 연관성이 없었으나 림프절전이는 c-erbB3의 과발현시 증가하는 경향을 보였다. 여기서 c-erbB3는 EGFR나 c-erbB2 receptor expression과는 무관한 결과를 보였다²¹⁾. 유방암세포주와 36예의 유방암에서 DNA를 southern blot 분석한 결과 c-erbB3의 유전자 수나 유전자복제숫자가 이상이 없었으므로 유방암에서의 과발현은 c-erbB3 유전자 전사의 상향조절기전에 기인하는 것으로 생각된다.

Gasparni 등은 212예의 림프절전이가 없는 유방암에서 c-erbB3 발현과 생물학적 예후인자와의 연관성을 연구하였는데 유방암환자의 65%에서 다양한 정도의 c-erbB3 과발현을 보였고 종양의 13%에서만 이 정상조직보다 높은 정도의 발현을 보였으며 c-erbB3 발현은 모든 조직학적유형에서 관찰되지만 c-erbB2는 관상피암에서만 관찰되었는데 독립적인

예후인자로서의 역할은 없었다. 림프절 전이가 없는 유방암에서는 c-erbB3의 발현이 c-erbB2의 발현과만 통계적으로 유의한 연관성을 보였다²²⁾. 본 연구에서는 관상피암만을 대상으로 하여 기타 조직학적유형에서의 발현양상은 알 수 없었으며 c-erbB2, c-erbB3 및 c-erbB4가 모두 상호간에 양적인 상관관계를 보였다.

c-erbB4 protein은 type I 성장인자수용체 계열의 일종으로 180kDa의 분자량을 가지며 mRNA가 정상 골격근, 심장, 뇌하수체, 부갑상선, 비장, 유방, 고환, 뇌 및 신장 등에서 관찰된다. Heparin binding c-erbB4 stimulatory factor가 HepG2 간암세포주에서 부분적으로 분리되었는데 이것이 c-erbB2, c-erbB3와 c-erbB4가 과발현되는 MDA-MB-453 유방암 세포주에서 c-erbB4의 phenotype differentiation과 tyrosine 인산화를 유발한다⁷⁾.

EGFR, c-erbB2와 c-erbB4는 kinase domain의 아미노산 순서상 구조적 유사성(homology)이 c-erbB3 단백질에 비하여 많으며¹⁾ c-erbB4의 extracellular domain은 c-erbB3와 유사성이 많은데⁷⁾ family member들의 sequence identity는 extracellular domain의 경우 40-60%이고 intracellular tyrosine kinase domains의 경우 60-80% 정도였다. c-erbB3는 EGFR, c-erbB2와 같이 tyrosine kinase activity를 자극하는 역할을 가지고 있다²³⁾.

본 연구에서는 c-erbB2의 과발현은 25.8%에서 관찰되었으며 c-erbB3는 40.0%, c-erbB4는 18.9%에서 과발현이 관찰되었다. Lemoine 등은 다클론항체를 이용하여 c-erbB3의 발현이 정상조직에 비하여 세포막에 강하게 나타나는 경우는 15% 정도라고 하였는데 본 연구에서는 단일클론항체를 이용하여 40%의 과발현이 관찰된 것으로 생각된다²¹⁾. c-erbB4의 발현은 현재까지 특별히 알려진 바는 없는데 본 연구에서는 세포막염색이 정상 조직보다 강하게 된 경우만을 보면 18.9% 정도였고 세포질 등 일부의 염색을 보인 경우는 67.9%였다. 특히 이들 단백질의 발현은 서로 양적인 상관관계를 보여 c-erbB2의 과발현시 c-erbB3와 c-erbB4의 과발현이 동반되는 경향이 많다. 이는 tyrosine kinase receptor family의 일종인 이들 인자들이 60-80%의 상동성을 가지며 상호 ho-

modimerization, heterodimerization의 과정을 통하여 신호전달과정에 관여한다는 점에서 이해가 가는 부분이다. neuregulins은 사람의 염색체 8p22-p11에 위치하는 alternative splicing of single gene으로²⁴⁾ 여기에는 HRG (Heregulins), NDF (neu differentiation factors), gp30 acetylcholine receptor inducing activity, glial growth factor와 sensory and motor neuron derived factor 등이 포함되는데 c-erbB3와 c-erbB4의 ligand이다. 이들 수용체의 특징은 heterodimerization을 할 수 있다는 것인데 ligand stimulation을 통하여 c-erbB2의 transphosphorylation과 transactivation을 유발한다는 사실이다.²⁵⁾ 또한 Heregulins은 c-erbB4가 없이는 c-erbB2의 인산화를 유발할 수 없다는 사실에서 신호전달체계에 필수적임을 알 수 있으며 상호 보완적인 관계를 가짐을 알 수 있다.²⁶⁾ Heregulin의 결합에는 c-erbB3나 c-erbB4가 필요하며 erbB2에 대한 항체가 HRG의 결합을 억제하는 것으로 보아 high affinity binding site는 c-erbB2와 c-erbB3 혹은 c-erbB2와 c-erbB4 사이의 heterodimerization의 결과로 생긴다고 볼 수 있다.²⁷⁾

생물학적 특성으로 알려진 바는 다른 성장인자수용체처럼 세포성장을 조절하며¹¹⁾ 또한 포피성장인자수용체와 마찬가지로 종양의 증식능력을 향상시킨다.^{28,29)} 본 연구에서는 data로 표시하지 않았지만 유세포분석을 통하여 S-상분획을 비교하였으나 모두 통계적으로 유의한 연관성이 없었다.

c-erbB2 단백, 즉 p185^{erbB2}(이하에서는 c-erbB2로 사용)의 과발현은 유방암과 난소암에서 생존율의 감소를 가져오는 것으로 알려져 있는데³⁾ 특히 유방암에서는 10-30%에서 c-erbB2의 발현이 관찰되며 이 경우에는 생존율의 감소하는 등 예후가 나쁜 것으로 알려져 있으며³⁻⁶⁾ 특히 일부 예외는 있지만 림프절 전이가 있는 유방암에서 c-erbB2의 과발현이 있는 경우는 예후가 나쁜 것으로 알려져 있다.^{3,10,16,30)} 본 연구에서는 c-erbB2, c-erbB3와 c-erbB4에서 생존율 및 무병생존율을 년의 중앙생존기간으로 추적한 결과 통계적으로 유의한 연관성이 없었다.²²⁾

림프절 전이가 없는 유방암에서 c-erbB2의 발현이 예후에 미치는 영향은 논란이 많은데 c-erbB2 및 c-erbB3를 면역조직화학염색으로 연구한 결과 재발

이나 사망률에는 영향이 없다는 연구도 있으며 또한 많은 환자를 대상으로 연구한 결과에서는 무병생존율³²⁾ 및 생존율^{33,34)}이 감소하는 것으로 보고 있다. 그러나 다른 예후인자와의 차이점 및 독립적인 예후인자로서의 가능성은 연구마다 매우 상이하다. 이러한 논란과 예후인자로서 p185가 비교적 제한적인 유용성만을 인정받고 있는 이유는 기술적인 문제가 그 원인이며 좀더 기술적인 발전을 이루면 해결되리라 예상된다. 종양에서의 c-erbB2를 분석하여 보면 homologous hormone이나 transmodulating hormone에 의하여 활성화되는 p185나 agonist가 없는 경우와 구분이 되지 않는다. 이는 p185의 호르몬에 의한 활성화가 신호작용(signaling activity)을 매우 증가시키므로 의의가 있으나 수용체 하향조절(receptor down regulation)을 유발하여 steady state receptor를 감소시킬 수 있으며 면역화학적으로 p185가 낮거나 음성인 경우를 보일 수도 있다. 따라서 p185 signaling activity를 직접 측정하여 보면 예후와 더욱 의의 있는 연관성을 보이는데 이 수용체의 Tyr autophosphorylation의 정도가 signaling activity를 잘 반영할 수 있으며 p185 Tyr autophosphorylation의 정량을 통하여 측정할 수 있는데 immunoblotting에 의한 혈청내 anti-phosphotyrosine의 측정으로 알 수 있다.³⁵⁾

그러나 c-erbB2는 기존의 예후인자에 비하여 명확한 우수성을 보여주지 못하던 중 최근의 여러 연구에서 치료에 대한 반응을 예측하는 예측인자(predictive factor)로서의 가능성 때문에 다시 중요성이 대두되게 되었다. c-erbB2의 과발현이 있는 경우 항암요법 중에서 CMF용법(cyclophosphamide, methotrexate, fluorouracil)으로 치료한 경우에 저항성을 보인다고 하였으며³¹⁾ CAF(cyclophosphamide, doxorubicin, fluorouracil) regimen을 용량별로 비교한 결과 c-erbB2의 과발현이 있는 경우 고용량의 항암요법이 저용량보다 생존율 및 무병생존율의 향상을 가져오는 것으로 나타났다.³⁶⁾ 따라서 CAF regimen의 용량 대 치료효과(dose response effect)는 c-erbB2과 발현의 경우에 한하여 동반됨을 짐작할 수 있다. 이 상에서 c-erbB2의 예후적인, 또는 예측적인 역할에 대한 논란이 많지만 발현여부에 따라 항암요법의 종

류 및 용량에 따른 치료효과를 예측할 수 있을 것으로 예상되므로 수술 후 항암요법의 선택에 있어서 참고가 되리라 기대된다.

최근에는 c-erbB2의 발현을 유방암에서 예후 및 치료에 대한 반응의 예측인자로서의 역할과 연관시키는 연구가 활발하며 c-erbB2 수용체는 단일클론항체를 이용한 종양치료의 목표로서 연구 중에 있어 머지 않아 유방암에서 c-erbB2의 역할에 대한 규명이 이루어질 것으로 보이므로 자료의 구축을 하여 두는 것이 좋으리라 판단된다.

결 론

1) c-erbB2 과발현의 양성판정은 50% 이상의 강한 세포막염색을 보인 경우로 하였는데 25.8% (190예 중 49예)였으며 c-erbB3 단백질의 과발현은 정상 유방조직의 염색도보다 강한 염색을 보이는 경우로 하였는데 양성도는 40.0% (190예 중 76예)였다. c-erbB4는 역시 세포질염색과 세포막염색이 주위의 암조직 이외의 부위보다 강한 염색도를 보이는 경우를 양성으로 판정하였는데 18.9% (190예 중 90예)가 양성이었다.

2) 림프절 전이 여부와 c-erbB2, c-erbB3 및 c-erbB4의 발현양상은 3가지 모두 통계적으로 유의한 연관성이 없었으며 핵등급도 연관성이 없었다. 조직학적 등급은 c-erbB2와 c-erbB3 단백질에서 분화도가 나뉘수록 발현이 증가하는 경향을 보였는데 통계적 유의성은 없었고 c-erbB4도 연관성이 없었다.

3) 호르몬 수용체와 c-erbB2, c-erbB3 및 c-erbB4 단백질발현의 연관성을 보면 세 가지 단백질에서 모두 발현이 증가할수록 estrogen receptor의 양성률이 감소하고 반대로 발현이 낮을수록 estrogen receptor의 발현이 많아지는 관계를 보였는데 특히 c-erbB2와 c-erbB3는 통계적으로도 유의한 역관계를 보였다.

4) c-erbB2가 발현이 많으며 c-erbB3, c-erbB4도 높은 발현을 보여 3가지 단백질이 모두 양적인 상관관계를 보였다.

5) c-erbB2, c-erbB3와 c-erbB4는 모두 생존율 및 무병생존율과는 연관성을 보이지 않았다.

이상의 결과를 통해 유방암에서 c-erbB2, c-erbB3와 c-erbB4는 상호 연관관계를 통하여 유방암에서 작용을 하는 것으로 추측할 수 있다. 본 연구에서는 생존율과의 연관성이 없는 것으로 나타났지만 호르몬 수용체와의 역관계는 유방암에서의 호르몬 조절 작용에 관여하는 기전에 의하여 조절됨을 예측할 수 있으므로 이에 관한 연구가 필요하며 항암약물치료 및 호르몬치료에 관한 반응을 예측하는 인자로서의 역할에 관한 더욱 많은 연구가 이를 규명하리라 기대된다.

참 고 문 헌

- 1) Prigent SA, Lemoine NR: The type I (EGFR-related) family of growth factor receptors and their ligands. *Prog Growth Factor Res* 4:1-24, 1992
- 2) Yamamoto T, Ikawa S, Akiyama T, Semba K, et al: Similarity of protein encoded by the human c-erbB-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* 319:230-234, 1986
- 3) 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
- 4) Venter DJ, Tuzi NL, Kumar S, Gullick WJ: Overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein in human breast carcinomas: immunohistochemical assessment correlated with gene amplification. *Lancet* 2:69-72, 1987
- 5) Zhou D, Battifora H, Yokota J, Yamamoto T, et al: Association of multiple copies of the c-erbB-2 oncogene with spread of breast cancer. *Cancer Res* 47:6123-6125, 1987
- 6) Wright C, Angus B, Nicholson S, Sainsbury JR, et al: Expression of c-erbB-2 oncoprotein: a prognostic indicator in human breast cancer. *Cancer Res* 49: 2087-2090, 1989
- 7) Plowman GD, Culouscou JM, Whitney GS, Green JM, et al: Ligand specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth members of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci*

- USA 90:1746-1750, 1993
- 8) Carraway KL III, Sliwkowski MX, Akita R, Platko JV, et al: The erbB3 gene product is a receptor for heregulin. *J Biol Chem* 269:14303-14306, 1994
- 9) Sliwkowski MX, Schaefer G, Akita RW, Lofgren JA, et al: Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin. *J Biol Chem*. 269:14661-14665, 1994
- 10) Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, et al: Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 230:1132-1139, 1985
- 11) Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, Toyoshima K, et al: The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science* 232:1644-1646, 1986
- 12) Shih C, Padly LH, Murray M, Weinberg RA: Transforming gene of carcinomas and neuroblastoma introduced into mouse fibroblasts. *Nature* 290:261-263, 1981
- 13) King CR, Kraus MH, Aaronson SA: Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* 229:974-976, 1985
- 14) Semba K, Kamata N, Toyoshima K, Yamamoto T: v-erbB-related protooncogene, c-erbB-2, is distinct from the c-erbB-1/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82:6497-6501, 1985
- 15) Schechter AL, Hung MC, Vaidyanathan L, Weinberg RA, et al: The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked th the gene encoding th EGF receptor. *Science* 229:976-978, 1985
- 16) Yokota J, Yamamoto T, Toyoshima K, Terada M, et al: Amplification of c-erbB-2 oncogene in human adenocarcinoma in vivo. *Lancet* 1:765-767, 1986
- 17) Tal M, Wetzler M, Josefberg Z, Deutch A, et al: Sporadic amplification of c-erbB-2 oncogene in human adenocarcinomas of various tissues *Cancer Res* 48:1517-1520, 1988
- 18) Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA: The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 310:226-230, 1986
- 19) Tzahar E, Waterman H, Chen X, Levkowitz G, et al: A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 16:5276-5287, 1996
- 20) Skinner A, Hurst HC: Transcriptional regulation of the c-erbB-3 gene in human breast carcinoma cell lines. *Oncogene* 8:3393-3401, 1993
- 21) Lemoine NR, Barnes DM, Hollywood DP, Hughes CM, et al: Expression of erbB3 gene product in breast cancer. *Br J Cancer* 66:1116-1112, 1992
- 22) Gasparini G, Gullick WJ, Maluta S, Palma PD, Caffo O, et al: c-erbB-3 and c-erbB-2 protein expression in node-negative breast carcinoma--an immunocytochemical study. *Eur J Cancer* 30A:16-22, 1994
- 23) Kraus MH, Fedi P, Starks V, Muraro R, et al: Demonstration of ligand-dependent signalling by the erbB-3 tyrosine kinase and ist constitutive activation in human breast tumour cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2900-2904, 1993
- 24) Lee J, Wood WI: Assignment of heregulin (HGL) to human chromosome 8p22-p11 by PCR analysis of somatic cell hybrid DNA. *Genomics* 16:790-791, 1993
- 25) Earp HS, Dawson TL, Li X, Yu H: Heterodimerization and functional interaction between EGF receptor family members: a new signaling paradigm with implications for breast cancer research. *Breast Cancer Res Treat* 35:115-132, 1995
- 26) Plowman GD, Green JM, Culouscou JM, Carlton GW, et al: Heregulin induces tyrosine phosphorylation of HER4/p180erbB4. *Nature* 366:473-475, 1996
- 27) Lewis GD, Lofgren JA, McMurtrey AE, Nuijens A, et al: Growth regulation of human breast and ovarian tumor cells by heregulin:evidence for the requirement of erbB2 as critical component in mediating heregulin responsiveness. *Cancer Res* 56:1457-1465, 1996
- 28) Barnes DM, Meyer JS, Gonzalez JG, Gullick WJ, et

- al: Relationship between c-erbB2 immunoreactivity and thymidine labelling index in breast carcinoma in situ. *Breast Cancer Res Treat* 18:11-17, 1991
- 29) Kallioniemi OP, Holli K, Visakorpi T, Koivula T, et al: Association of c-erbB-2 protein over-expression with high rate of cell proliferation, increased risk of visceral metastasis and poor long-term survival in breast cancer. *Int J Cancer* 49:650-655, 1991
- 30) Paik S, Hazan R, Fisher ER, Sass RE, et al: Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project. Prognostic significance of erbB-2 protein overexpression in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 8:103-112, 1990
- 31) Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, Price KN, Senn HJ, for the international (Ludwig) Breast Cancer Study Group, et al: Prognostic importance of c-erbB2 expression in breast cancer. *J Clin Oncol* 10:1049-1056, 1992
- 32) Sauer R, Schauer A, Rauschecker HF, Schunacher M, et al: Therapy of small breast cancer: a prospective study on 1036 patients with special emphasis on prognostic factors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 23:907-914, 1992
- 33) Gusterson BA, Machin LG, Gullick WJ, Gibbs NM, et al: Immunohistochemical distribution of c-erbB-2 in infiltrating and in situ breast cancer. *Int J Cancer* 42:842-845, 1988
- 34) Allred DC, Clark GM, Tandon AK, Molina R, et al: HER-2/neu in node negative breast cancer: Prognostic significance of overexpression influenced by the presence of in situ carcinoma. *J Clin Oncol* 10: 599-605, 1992
- 35) Wildenhain Y, Pawson T, Blackstein ME, Andrulis IL: p185neu is phosphorylated on tyrosine in human primary breast tumors which overexpress neu/erbB-2. *Oncogene* 5:879-883, 1990
- 36) Muss HB, Thor AD, Berry DA, Kute T, et al: c-erbB2 expression and response to adjuvant therapy in women with node positive early breast cancer. *N Engl J Med* 330:1260-1266, 1994