

## 유방암 환자에서 HLA-A2와 *c-erbB2*의 발현

연세대학교 의과대학 외과학교실<sup>1</sup>, 병리학교실<sup>2</sup>, 미생물학교실<sup>3</sup>, 분당제생병원 일반외과<sup>4</sup>

이희대<sup>1</sup> · 구자윤<sup>4</sup> · 김도일<sup>1</sup> · 정우희<sup>2</sup> · 장윤수<sup>3</sup> · 박전환<sup>3</sup>

= Abstract =

### Expression of *c-erbB2* and HLA-A2 in Breast Cancer Patients

Hy-De Lee, M.D.<sup>1</sup>, Ja Yun Koo, M.D.<sup>4</sup>, Do Yil Kim, M.D.<sup>1</sup>, Woo-Hee Jung, M.D.<sup>2</sup>,  
Yun Soo Jang<sup>3</sup> and Jeon Han Park, M.D.<sup>3</sup>

Department of General Surgery<sup>1</sup>, Pathology<sup>2</sup>, Microbiology<sup>3</sup>, Yonsei University,  
Department of Surgery<sup>4</sup>, Pundang Jesaeng Hospital

**Purpose:** Oncogene *c-erbB2* produces a transmembrane protein similar in structure to the surface growth factor receptor, and this protein belongs to the tyrosine kinase family. Overexpression of *c-erbB2* is known to lower the survival rate of breast cancer patients. *c-erbB2* protein is an important antigen for tumor specific cytotoxic T lymphocytes induction that is dependent on its presentation as stably complexed with HLA-A2. In 1997, Nistico P reported low frequency of *erbB-2* proto-oncogene overexpression in HLA A2 positive breast cancer patients. And then in this study, correlation of HLA-A2 and the *c-erbB2* expression was investigated in breast cancer patients. **Materials and Methods:** HLA-A DNA typing by locus-specific generic PCR and by hybridization with sequence-specific oligonucleotide probes (SSOP) was performed on peripheral blood lymphocytes from 52 breast cancer patients (a PCR-SSOP typing method, involving a PCR amplification in conjunction with digoxigenin labelled sequence-specific oligonucleotide probes). To determine *c-erbB2* expression, immunohistochemistry from paraffin-embedded tissues in a series of 47 patients with available tissue blocks was performed by use of rabbit anti-human *c-erbB2* oncoprotein (DAKO, Glostrup, Denmark). And then we statistically analyzed the relation between the expressions of HLA-A2 and *c-erbB2* in breast cancer patients. **Results:** 29 out of 52 patients (55.8%) were HLA-A2 positive. 23.4% (11 out of 47 patients) of breast cancer patients overexpressed *c-erbB2*. The patients with *c-erbB2* overexpression showed lower estrogen receptor positivity compared to those without *c-erbB2* overexpression (10.5% vs 33.3%). HLA-A2 positive patients showed 18.5% (5/27) of *c-erbB2* overexpression and HLA-A2 negative patients showed 30.0% (6/20) of *c-erbB2* overexpression ( $p=0.283$ ). **Conclusions:** We observed no correlation between HLA-A2 and prognostic factors in breast cancer such as tumor size, axillary nodal status. However, our results showed a tendency without statistical significance between HLA-A2 and high frequency of *c-erbB2* overexpression. More accumulation of patients will be needed for better conclusions. (Journal of Korean Breast Cancer Society 1999;2:152~158)

**Key Words:** Breast cancer, *c-erbB2*, HLA-A2

연락처: 이희대, 135-270, 서울특별시 강남구 도곡동 146-92, 영동세브란스병원 외과

Tel: 02-3497-3373, Fax: 02-3462-5994, E-mail: hdlee@yumc.yonsei.ac.kr

※ 연구는 1997년 연세대학교 의과대학 교수연구비(Grant Number 97-13) 지원으로 이루어졌음.

## 서 론

일반적으로 암 발생의 기전은 여러 가지가 있는데 과거에는 세포성장을 촉진함으로써 세포가 변형(transformation)되어 암이 된다고 하였으며, 최근에 와서는 세포성장 억제인자가 감소 또는 유전적 변이를 유발하여 암이 발생한다는 개념이 많이 도입되고 있다. 유방암에서 발견된 유전적 변이 중의 하나는 c-erbB2의 증폭으로, 이는 이 단백질의 과발현을 가져온다. 즉, Her-2/neu gene (c-erbB2)는 transmembrane glycoprotein (gp185neu)을 encode하며, 이 당단백은 tyrosine kinase의 type I family 중의 하나로 여기에는 epidermal growth factor receptor (EGFR)와 erbB3, erbB4 단백질 등이 포함된다<sup>1)</sup>. 특히 c-erbB2 단백질의 과발현은 Tumor initiation에 관여할 뿐만 아니라 유방암과 난소암에서 생존율을 감소시키는 것으로 알려져 있다<sup>2)</sup>. 또한 Peptide analysis에서 c-erbB2 peptide는 필수적인 T-cell epitope로 밝혀져 있는데, 이는 HLA-A2 restricted tumor specific cytotoxic T-lymphocytes (CTLs)에 의하여 인식되는 것으로 알려져 있다<sup>3-5)</sup>. Nistico 등<sup>6)</sup>은 *in vitro*에서 HLA-A2.1-binding motifs를 함유하는 c-erbB2 peptide를 가진 유방암환자의 CD8+ peripheral blood lymphocyte를 자극할 수 있게 된 것에 기초하여 c-erbB2의 과발현과 HLA-A2는 유의한 연관성이 있는 것을 관찰하였다.

따라서 이 연구에서는 한국 여성 유방암 환자에서 HLA-A2와 c-erbB2의 과발현 양상과의 연관성을 조사하여 이를 호르몬 수용체, 조직학적 등급 및 림프절 전이 등의 여러 예후인자들과의 연관성 여부를 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 대 상

연세대학교 의과대학 영동세브란스병원에서 수술 당시엔 원격전이 없는 유방암으로 진단 후, 유방 절제술을 시행한 환자 중 c-erbB2의 면역조직화학 염색에 필요한 파라핀 블록 보존이 양호하고 조직의

양이 충분한 52명 중 외래에서 HLA-A2 검사를 위한 혈액채취가 가능한 경우를 대상으로 하였다.

### 2. 방 법

#### 1) 임상기록 검토

환자들의 진단당시 연령, 수술방법, 폐경여부, 에스트로겐과 프로게스테론 수용체의 발현 여부 등을 조사하였다.

#### 2) 병리조직학적 검색

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

#### 3) c-erbB2의 면역조직학적 검색

각 예의 조직 표본 중 조직학적 분류형을 대표할 만한 블록을 2개 이상 선택하여 4 mm 두께로 연속 절편하였다. 이 절편을 xylene으로 15분간 2회씩 파라핀을 제거한 후, 0.05 M Tris-buffered saline (TBS)으로 옮겨 pH 7.40에서 pH 7.60까지 각 용액에서 5분간 3회씩 순차적 에탄올처리를 하였다. TBS에서 5분간 3회 세척한 슬라이드를 10 mM sodium citrate buffer, pH 6.0에 넣어 650 W microwave oven에서 5분간 2회 가열한 후, 상온에서 20분간 두었다. TBS로 3회, ascending alcohol series에서 세척한 후, endogenous peroxidase를 blocking하기 위해 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액에서 30분간 2회 처리하였다. 다시 descending alcohol series를 통해 TBS로 옮긴 후, avidin-biotin complex method로 염색하였다. 약술하면, normal horse serum (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA)로 blocking한 후, 조직표본 슬라이드를 1:80으로 희석한 마우스 항 사람 c-erbB2 단클론항체/BSA에서 4℃로 밤새 배양하고 다음날 세척하였다. 2% BSA에 희석한 biotinylated-horse anti-mouse IgG로 상온에서 30분간 배양한 후, streptavidin-peroxidase conjugate (Vector Laboratories)와 함께 상온에서 30분간 배양, 3,3'-diaminobenzidine

(Polyscience Inc., Warrington, PA)로 5분간 염색하였다. 모든 배양은 humidified chamber에서 시행하였다. 마지막으로 slight Mayer hematoxylin counterstain 시행 후 dehydration 및 mounting을 시행하였다.

Primary antibodies를 첨가하지 않은 조직표편을 TBS/2 % BSA로 처리하여 음성판정의 기준으로 삼았다. 강한 *c-erbB2* 반응을 보인 조직표편을 *c-erbB2* 발현에 대한 양성판정의 기준으로 삼았다. 모든 조직표편 슬라이드는 광학현미경으로 관찰하였으며, 암세포표면에 있는 증강된 신호를 *c-erbB2*의 과발현

으로 정의하였고, 임상결과나 병리 조직적 자료를 모르는 상태에서 면역염색에 대한 평가를 하였다. *c-erbB2*의 양성판정은 50% 이상의 강한 세포막 염색을 보인 경우로 하였다. 국소적 세포막 염색이나 세포질 염색은 음성으로 판정하였다(Fig. 1).

#### 4) HLA-A2 DNA typing

말초혈액 림프구 genomic DNA는 유방암 환자의 말초혈액에 TE buffer (10 mM Tris-Cl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0)를 가하여 적혈구를 용해시키고

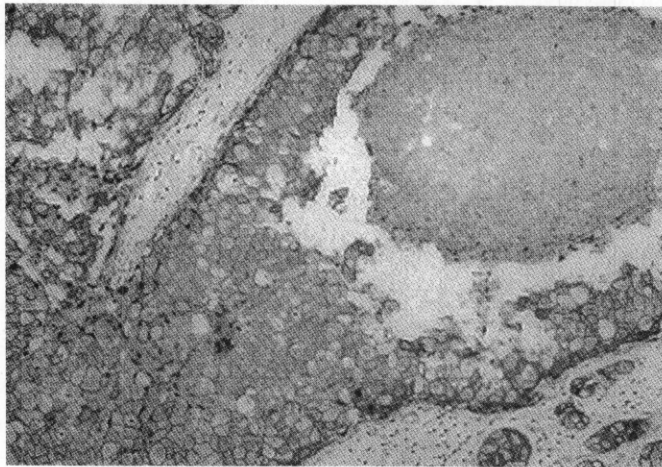


Fig. 1. Breast carcinoma cells with a positive membranous staining for *c-erbB2*: infiltrating ductal carcinoma,  $\times 200$ .

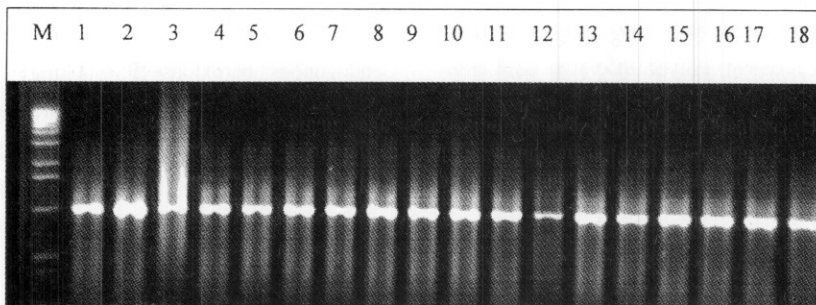


Fig. 2. A representative agarose gel electrophoresis of the HLA-A generic PCR products. DNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells of breast cancer patients, then the HLA-A generic PCR was done with the primer set (sense: 5'-GGCCTCTGY-GGGGAGAAGCAA-3', antisense: 5'-AGCAGGGCGGAACCTCAGAGT CAC-3'). Y=pyrimidine (C, T). M: DNA molecular size marker, 1 kb ladder. Each number indicates amplified product of the HLA-A generic PCR of genomic DNA extracted from peripheral blood of breast cancer patients.

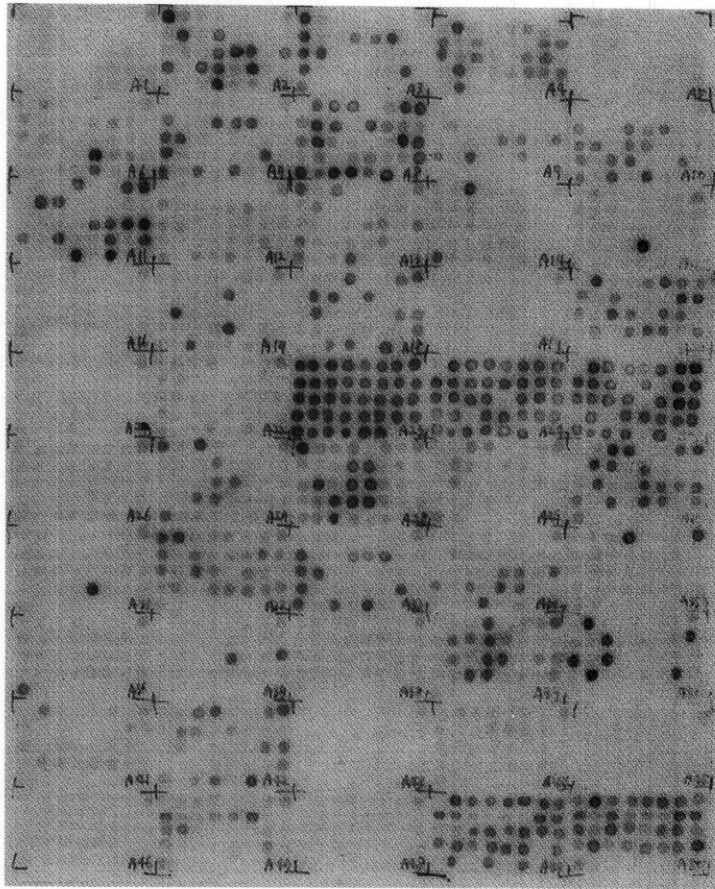


Fig. 3. A representative dot blot of HLA-A genotyping by use of the sequence-specific oligonucleotide probes. HLA-A generic PCR products were blotted on the nylon membranes. Blot was hybridized with digoxigenin-labeled sequence-specific oligonucleotide probes (see materials and methods).

14,000×g에 3회 세척한 후, lysis buffer (20 mM Tris-Cl, pH 8.0, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mg/ml proteinase K, 0.5% Tween 20)를 넣어 56℃에서 1시간 동안 반응시키고 95℃에서 10분간 가열하여 추출하였다.

얻어진 genomic DNA는 HLA-A generic primer set (sense: 5'-GGCCTCTGYGGGAGAAGCAA-3', antisense: 5'-AGCAGGGCGGAACCTCAGAGTCAC-3')를 이용하여 PCR [16.6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 mM Tris-Cl pH 8.8, 67 mM EDTA, 1% Gelatin, 10% DMSO, 10 mM 2-mercaptoethanol, 200 mM dNTP, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 U Taq polymerase (Perkin Elmer,

Branchburg, NJ)]을 시행하였다. 94℃에서 30초의 denaturation, 63℃에서 30초의 annealing, 72℃에서 45초의 PCR을 32 cycle 시행한 후, 1% agarose electrophoresis로 PCR product를 확인하였다(Fig. 2). 이후 nylon membrane에 PCR product의 일정량씩 dotting 하여 붙이고 denaturation 용액에 담가 DNA를 변성시켰다. 다시 neutralization buffer에서 중화시키고, UV-crosslinker를 이용하여 membrane에 부착시켰다. Membrane에 부착된 DNA는 digoxigenin-11-ddUTP가 표지된 각 allele에 특이한 sequence-specific oligonucleotide probe (SSOP)로 교잡시키고, 다시 alkaline phosphatase가 표지된 anti-digoxigenin

Fab 항체로 반응시켰다. 그 후 기질인 CSPD 용액을 membrane에 떨어뜨린 후 X-ray film에 감광시켜 나타난 signal로 allele를 확인하였다(Fig. 3).

##### 5) 통계학적 처리

수집된 자료는 SPSS 통계프로그램을 이용하여 개인용 컴퓨터로 분석하였다. HLA-A2 발현과 여러 예후인자와의 연관성은 chi-square test를 이용하여 비교하였다.

## 결 과

환자군의 특성은 Table 1과 같았다. 환자의 평균 연령은 46.2세(최저 27세, 최고 74세)였다. 총 52명의 환자 중 HLA-A2 양성반응을 보인 경우는 29명으로 55.8%의 환자에서 HLA-A2 대립유전자를 가지고 있었다(Table 2). *c-erbB2* 면역화학반응 검사가 가능하였던 47명의 환자 중 *c-erbB2* 과발현을 보인 경우는 11명으로 23.4%였다(Table 2). *c-erbB2*의 과

Table 1. Characteristics of Patients

Characteristics	No	%
Tumor size		
<2 cm	22/52	42.3
2-5 cm	26/52	50.0
>5 cm	4/52	7.7
Lymph node metastasis		
Negative	23/52	44.2
Positive	29/52	55.8
Estrogen receptor (+)	19/43	44.2
Progesterone receptor (+)	16/43	37.2

Table 2. HLA-A2 Status and the Expression of *c-erbB2*

	HLA-A2		p value
	Negative (%)	Positive (%)	
<i>c-erbB2</i>			p=0.283
(-)	14 (70.0)	22 (81.5)	
(+)	6 (30.0)	5 (18.5)	

발현의 양상과 호르몬수용체의 발현양상을 비교하여보면 과발현을 보인 환자는 ER 양성인 10.5%, *c-erbB2* 과발현이 없는 환자의 33.3%에 비하여 낮은 양상을 보였다.

## 고 찰

HLA-A2는 백인에게는 50%<sup>3)</sup>, 한국인에서는 59% 정도에서 나타나며<sup>7)</sup>, 여러 종양에서 antigen presentation의 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

*c-erbB2* protein은 T-cell mediated immunotherapy의 대상으로 가능성이 많아 다양한 연구가 진행 중이다. 이는 이 단백질이 크고(1255 amino acids) 또한 다양한 MHC molecule이 결합하기에 적합한 epitopes를 보유하고 있기 때문이다. CD8+ T cell은 MHC class I molecule을 통하여 종양세포를 인식하며, 이때 세포 내 단백질에서 기원하는 8-10 amino acid residue 길이를 가진 peptide가 관여한다. 최근에는 많은 tumor-associated antigens 혹은 그에 해당하는 epitope들이 분자생물학 및 peptide isolation 기술의 발달로 발견되었다<sup>8)</sup>. Peptide analysis에서 *c-erbB2* peptide가 필수적인 T-cell epitopes로 밝혀져 있는데, 이는 HLA-A2 restricted tumor specific CTLs에 의하여 인식되는 것으로 알려져 있다<sup>3,5)</sup>. 즉, tumor associated cytotoxic T-lymphocyte가 *c-erbB2*에서 기원한 peptide epitope를 인식하게 되는데 이 과정에서 HLA-A2가 관여하게 되고 결국에는 tumor specific cytotoxicity를 나타내게 된다.

본 연구에서는 HLA-A2 음성인 경우 *c-erbB2*의 과발현이 30.0% 환자에서 관찰되었으나, HLA-A2 양성인 경우는 *c-erbB2* 과발현이 18.5%로 감소하는 경향을 보여, Nistico 등이 보고 한 HLA-A2 양성인 경우 *c-erbB2*의 과발현이 12%, HLA-A2 음성인 경우는 *c-erbB2* 과발현이 29%와 큰 차이가 없었다<sup>6)</sup>. Nistico 등의 보고에서는 206명의 환자를 대상으로 하여 HLA-A2와 *c-erbB2*의 과발현 사이에 유의한 연관성을 보였다고 하였으나, 본 연구에서는 47명의 환자를 대상으로 하여 HLA-A2 양성인 경우는 *c-erbB2* 과발현이 감소하는 경향을 관찰할 수 있었으나, 통계적으로 유의한 수준은 아니었다(p=0.283).

Differentiation antigen에 대한 tolerance는 변형된 세포의 양과 비례하여 출현될 수 있으며, 이는 특이 면역반응에 의하여 소실되는 것으로 알려져 있다<sup>9,10</sup>. 이러한 변화는 이들 antigen이 세포변형에 의하여 과발현이라는 형태를 통하여 이루어 지는 것으로 보인다. 유방암에서 이에 해당하는 것이 c-erbB2이며 항체<sup>11</sup>와 세포매개<sup>3-5</sup> 면역반응을 유발할 수 있는 것으로 보인다. 즉, HLA-A2+ phenotype과 c-erbB2 과발현의 소실이 연관성이 있으며, 이를 통하여 host immune response가 tumor cell phenotype의 modulation에 관여할 수 있음이 보고되고 있다.

이 가설은 HLA-A2 restricted CTLs<sup>3-5</sup> 및 c-erbB2/HLA-A2 specific CTLs 의 분리가 synthetic peptides에 의하여 가능하여짐으로서 보고되었다. 말초혈액에서는 정상적으로 tolerance를 보이는 많은 수의 T-cell을 thymus에서는 positive selection할 수 있다. 따라서 이러한 anergy는 특수한 상황하에서 이들 self peptide들이 과발현을 보이면서 아직 밝혀지지 않은 co-stimulatory signal과 상호작용으로 불활성화할 수 있고, 결국은 c-erbB2 음성의 종양을 selection할 수 있게 된다는 이론이다.

많은 종류의 암세포에서 c-erbB2의 과발현이 있어 암세포의 선택적 파괴가 가능하고, 정상세포는 발현이 적으므로 불필요한 파괴를 줄일 수 있어 독성을 최소화하면서 T-cell therapy를 할 수 있을 것으로 판단된다. 그러나 종양이 성장하면서 MHC class I-restricted tumor specific T cell에 저항을 보일 수도 있다. 또한 진행된 암 환자의 경우 impaired host response가 나타난다. 이러한 가설은 autologous tumor specific, MHC class I restricted CD8+ T cells에 의한 종양세포의 인식과 tumor specific T-cell로부터의 escape를 설명해 주기는 하지만 정확한 종양세포의 인식 및 거부반응의 기전은 알려져 있지 않다<sup>12</sup>.

Tumor associated cytotoxic T-lymphocyte는 유방암의 c-erbB2에서 기원한 peptide epitope를 HLA-A2와 연관하여 인식하게 되고 이에 따라 유방암에 대한 cytotoxicity를 보이게 된다.

결론적으로 c-erbB2 단백질의 발현은 유방암에서 예후 및 치료에 대한 반응의 예측인자로서의 가능성

을 연구 중에 있으며 c-erbB2는 단클론항체를 이용한 tumor directed therapies의 target으로서 연구 중에 있다<sup>13</sup>. 또한 HLA-A2와의 상호작용하에 c-erbB2 peptide를 인식하는 T-cell precursor의 연구를 통하여 임상병리학적 특성과의 연관성을 통하여 유방암환자의 예후 예측에 새로운 가능성을 가져올 것이며, 유방암치료에서 면역치료의 새장을 열게 될 가능성이 있다.

## 참 고 문 헌

- 1) Hynes NE, Stern DF: The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1198:165-84, 1994
- 2) 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* 244:707-12, 1989
- 3) Disis ML, Smith JW, Murphy AE, Chen W, Cheever MA: *In vitro* generation of human cytolytic T-cells specific for peptides derived from the HER-2/neu protooncogene protein. *Cancer Res* 54: 1071-6, 1994
- 4) Fisk B, Blevins TL, Wharton JT, Ioannides CG: Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T-lymphocytes lines. *J Exp Med* 182:2109-17, 1995
- 5) Peoples GE, Goedegebuur PS, Smith R, Linehan DC, Yoshino I, Eberlein TJ: Breast and ovarian cancer-specific cytotoxic T lymphocytes recognize the same HER-2/neu-derived peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:432-6, 1995
- 6) Nistico P, Mottolese M, Mammi C, Benevolo M, Del Bello D, Rubiu O, Gentile FP, Botti C, Ventura I, Natali PG: Low frequency of erbB-2 proto-oncogene overexpression in human leukocyte antigen A2 positive breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 89:319-21, 1997
- 7) Kim SJ, Nisperos B, Mickelson E, Choi IH, Dahlberg S, Kim JD, Gilblett ER, Hansen JA: The

- HLA system in the Korean population. Human Immunol 17:259-272, 1986
- 8) Cerottini JC, von Flidner V, Boon T: Recognition of tumor-associated antigens by T lymphocytes: from basic concepts to new approaches. Ann Oncol, 3:11-6, 1992
- 9) Houghton AN: Cancer antigens: Immune recognition of self and altered self. J Exp Med 180:1-4, 1994
- 10) Sensi M, Traversari C, Radrizzani M, Salvi S, Maccalli C, Mortarini R, et al: Cytotoxic T-lymphocyte clones from different patients display limited T-cell receptor variable region gene usage in HLA A2 restricted recognition of the melanoma antigen Melana/MART-1. Proc Natl Acad Sci USA 92:5674-8, 1995
- 11) Pupa SM, Menard S, Andreola S, Colnaghi MI: Antibody response against the *c-erbB2* oncoprotein in breast carcinoma patients. Cancer Res 53:5864-6, 1993
- 12) Rivoltini L, Barracchini KC, Viggiano V, Kawakami Y, Smith A, Mixon A, Restifo NP, Topalian SL, Simonis TB, Rosenberg SA: Quantitative correlation between HLA class I allele expression and recognition of melanoma cells by antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. Cancer Res 55:3149-57, 1995
- 13) Tzahar E, Waterman H, Chen X, Levkowitz G, Karunagaran D, Lavi S, et al: A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. Mol Cell Biol 16: 5276-87, 1996
-