

## 에스트로젠 수용체 양성 유방암 환자에서 Cyclin D1의 발현

인제대학교 상계백병원 외과학교실<sup>1</sup>, 진단병리과학교실<sup>2</sup>, 내과학교실<sup>3</sup>, 방사선종양학과학교실<sup>4</sup>

한세환<sup>1</sup> · 이명수<sup>1</sup> · 김홍주<sup>1</sup> · 김영덕<sup>1</sup> · 김홍용<sup>1</sup>  
박 경 미<sup>2</sup> · 유 영 진<sup>3</sup> · 김 성 록<sup>3</sup> · 서 현 숙<sup>4</sup>

= Abstract =

### Cyclin D1 Expression and Patient Outcome after Tamoxifen Therapy in Estrogen Receptor Positive Breast Cancer

Sehwan Han, M.D.,<sup>1</sup> Hong-Yong Kim, M.D.,<sup>1</sup> Myung-Soo Lee, M.D.,<sup>1</sup>  
Hong-Joo Kim, M.D.,<sup>1</sup> Young-Duck Kim, M.D.,<sup>1</sup> Kyeongmee Park, M.D.,<sup>2</sup>  
Young Jin Yuh, M.D.,<sup>3</sup> Sung Rok Kim, M.D.<sup>3</sup> and Hyun Suk Suh, M.D.<sup>4</sup>

*Departments of Surgery,<sup>1</sup> Pathology,<sup>2</sup> Internal Medicine,<sup>3</sup> and Radiation Oncology,<sup>4</sup>  
Inje University Sanggye Paik Hospital, Seoul, Korea*

**Background:** Cyclin D1 expression is closely related with ER in breast cancer. We conducted this study to evaluate whether therapeutic response to tamoxifen is varied with levels of cyclin D1 expression in ER positive breast cancer patients. **Materials and Methods:** Immunohistochemical assay for cyclin D1 protein was performed in 66 patients treated with tamoxifen for more than 2 years. Patient survival and correlation between cyclin D1 expression and biologic data of the patients were analyzed. **Results:** Cyclin D1 expression was detected in 46 (69.7%) and significantly reduced in poorly differentiated cancer ( $p=0.023$ ). Cyclin D1 expression was high in the tumors expressing Myc (15/15 vs. 31/51;  $p=0.002$ ), and was markedly increased in the tumors in which p27Kip1 expression was repressed (30/38, 78.9%). However, the difference was not statistically significant ( $p=0.051$ ). There was no significant relationship between cyclin D1 expression and S-phase. Patients with tumors expressing cyclinD1 showed better disease free survival and overall survival but the difference was not statistically significant. **Conclusions:** Cyclin D1 expression was associated with cell differentiation but not useful in discriminating high risk group with tamoxifen treatment. Cyclin D1 may have a role in process other than cell cycle regulator in ER positive breast cancer, such as differentiation signal. (*Journal of Korean Breast Cancer Society* 1999;2:221~226)

Key words: Differentiation, Myc, p27Kip1, Prognosis, Treatment

## 서 론

질이며 cyclin D1 유전자인 CCND1은 인체 유방암의 20% 내외에서 증폭이 확인되고 있다<sup>1)</sup>. 여러 연구자들이 유방암 환자의 예후 예측과 치료 방법을 선택하는 지표로 cyclin D1의 발현을 연구했으나 그 결과는 대상 환자들의 특성과 실험 방법에 따라 차이가 있으며<sup>2-4)</sup> CCND1 유전자의 증폭에 비하여 cyclin D1 단백질의 발현이 50% 내외로 빈번하다는 결과만이 공통적으로 보고되고 있다<sup>5)</sup>. 이 연구들의 공통적인 특징은 cyclin D1의 발현이 유방암조직의 에스트로겐수용체(ER)의 발현과 긴밀한 상관성을 지닌다는 것이며 이 연관성은 이후의 연구에서도 일관성 있게 검증되고 있다<sup>6-8)</sup>.

유방암세포주를 이용한 실험에서 cyclin D1의 발현은 에스트로겐을 투여하여 유도할 수 있고<sup>9)</sup> 이때 cyclin D1은 ER과 결합하는 현상을 보이는데 이때 타목시펜을 투여하면 ER의 활성화를 막을 수 있는 것으로 보고되고 있다<sup>10)</sup>. 유방암 환자에서 ER의 발현은 호르몬 치료에 대한 반응을 기대할 수 있는 지표이지만 ER 양성인 모든 환자에서 호르몬 치료가 같은 효과를 보이지는 않는다. 호르몬치료에 대한 다양한 반응은 유방암 세포들의 생물학적 이질성(heterogeneity)으로 설명되고 있는데, cyclin D1의 발현이 ER의 조절을 받는다면 유방암 조직에서 cyclin D1의 발현을 분석하여 유방암조직 안의 ER의 활성도를 정확히 예측할 수 있을 것으로 추정할 수 있다.

본 연구는 cyclin D1의 발현이 유방암세포에서 ER의 활성화에 관여한다는 가설을 바탕으로 타목시펜치료를 받은 폐경후 유방암 환자들을 대상으로 재발 및 생존율을 조사하였다. 또한 cyclin D1의 발현과 여러 조직학적 특징들간의 상관관계를 분석하여 ER 양성인 유방암환자에서 cyclin D1 발현의 임상적 의미를 알아보고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상 환자

원발성 유방암으로 인제대학교 상계백병원 외과에서 근치적 유방절제술을 받은 환자 66예를 대상으로 하였고 환자들은 모두 적출된 유방암 조직에서

ER 양성을 보였다. 대상 환자들의 평균 연령은 54세였고 연령 분포는 47-79세였다. 환자들은 근치적 수술 후 모두 타목시펜을 하루에 20 mg씩 2년 이상 복용하였고 항암제 치료를 받은 환자들은 대상에 포함시키지 않았다.

유방암 조직에서 ER의 발현은 dextran coated charcoal assay (DCCA)를 이용하여 분석하였고 ER의 역가가 3 fmol/mg 이상일 때 ER 양성으로 판정하였다. 대상 암환자들의 병기는 1병기가 16예(24.2%), 2a 병기가 28예(42.4%), 2b 병기가 16예(24.2%), 3a 병기가 6예(9.2%)의 분포를 보였다.

### 2. Flow cytometry

절제된 암세포의 파라핀 포매 조직을 이용하였고 flow cytometry 분석 결과가 없는 환자들 역시 대상에서 제외되었다. 헤마톡실린 염색으로 암세포가 포함되어 있는 것이 확인된 후 원심분리를 한 뒤 걸러진 세포들은 다시 250  $\mu$ l의 완충용액(10 mM Citrate, pH 7.5, 20 mM NaCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>)에서 다시 resuspension과정을 거쳤다. 10  $\mu$ l/ml의 트립신과 트립신 억제제, DNase-free RNase를 첨가한 후 걸러진 세포들은 실온에서 30분간 방치되었다. flow cytometry를 분석하기 전에 DNA염색은 500  $\mu$ l의 propidium iodide 용액(PI; Molecular Probes, Eugene, OR)을 이용하였고 암실에서 시행되었다. DNA의 형광분석은 FACScan (Beckton-Dickinson, Bedford, MA)을 이용하였고 자료분석은 Phoenix Flow System Multicycle AV software를 이용하였다.

### 3. 면역화학적 검색

검색에 충분한 암조직을 포함한 파라핀블록을 이용하였고 절단 블록에서 flow cytometry를 시행한 것과 같은 연속된 블록을 이용하였다. cyclin D1의 발현은 anti-cyclin D1 monoclonal antibody: NCL-CYCLIN D1-GM (1:50 dilution) for cyclinD1 protein (Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle upon Tyne, UK)을 이용하여 이미 본 연구자들이 기술했던 방법과<sup>11)</sup> 동일하게 avidin-biotin complex (ABC) immunoperoxidase 방법으로 검색하였다. ABC 염색 후 hematoxylin 대조 염색을 마치고 환자의 임상 정보

없이 판독하였다. 암조직이 포함된 연속적으로 채취된 세 장의 슬라이드에서 cyclin D1이 핵에 강하게 염색된 세포들을 10개의 고배율(x400)시야에서 관찰하여 5% 이상의 세포들 핵에서 발현된 경우를 양성으로 판독하였다.

#### 4. 자료 분석

면역화학적 검색의 결과를 환자의 임상 자료 및 조직학적 자료들과 cyclin D1의 발현 여부에 따라서 비교 분석하였다. flow cytometry로 분석한 S-phase를 cyclin D1발현에 따라 분석하여 세포성장의 조절 인자로서 cyclin D1의 역할을 알아보았다. 임상 자료와 cyclin D1발현간의 상관 관계는 통계 프로그램인 SPSS를 이용하여 chi-square 방법으로 분석하였다.

### 결 과

ER 양성 유방암 66예 중 cyclin D1의 발현은 46

예(69.7%)에서 관찰되었다. 암의 크기가 2 cm 이하인 유방암 18예 중에서 cyclin D1은 13예(72.2%)에서 관찰되었고 2 cm 이상의 유방암에서는 68.8% (33/48)의 발현율을 보여서 암의 크기에 따른 cyclin D1의 발현 변화는 관찰할 수 없었다. 거드랑이 림프절 전이 여부에 따른 cyclin D1의 발현 변화도 분석하였으나 림프절 전이에 따른 cyclin D1의 발현에는 차이가 없었다(Table 1).

암의 분화도에 따른 cyclin D1 발현 양상을 분석한 결과 분화도가 좋은 유방암에서 cyclin D1의 발현은 70% 이상에서 관찰되는 반면 핵분화도가 나쁜 미분화암에서 cyclin D1의 발현은 16예 중 7예(43.7%)에서만 관찰되어 핵분화도와 cyclin D1 발현간에 유의한 상관 관계를 확인할 수 있었다( $p=0.023$ ).

유방암의 ploidy에 따른 cyclin D1의 변화도 diploid 암이나 non-diploid 암에서 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 S-phase와 cyclin D1의 상관 관계

Table 1. Correlation between Cyclin D1 Expression and Clinical/biological Parameters

	Cyclin D1 expression (%)		Total (%)	p-value (%)
	<5% (%)	≥5% (%)		
Progesterone receptor				0.394
Negative	7 (35.0)	13 (65.0)	20	
Positive	13 (28.3)	33 (71.7)	46	
Nuclear grade				0.023
I	5 (38.5)	19 (61.5)	24	
II	6 (24.0)	19 (76.0)	25	
III	9 (56.3)	7 (43.8)	16	
Tumor size				0.518
<2 cm	5 (27.8)	13 (72.2)	18	
≥2 cm	15 (31.3)	33 (68.8)	48	
Lymph node metastasis				0.409
0	8 (25.0)	24 (75.0)	32	
1-3	5 (35.7)	9 (64.3)	14	
>3	7 (35.0)	13 (65.0)	20	
Ploidy				0.385
diploid	11 (34.4)	21 (65.6)	32	
non-diploid	8 (27.6)	21 (72.4)	29	
S-phase				0.579
<10%	8 (30.8)	18 (69.2)	26	
≥10%	12 (30.0)	28 (70.0)	40	

분석에서도 비슷한 양상을 보였다. S-phase가 10% 이하인 유방암 26예 중 18예(69.2%)에서 cyclin D1의 발현이 관찰되었고 S-phase가 10% 이상인 유방암 40예 중 28예(70%)에서 cyclin D1의 발현이 관찰되어 cyclin D1의 발현과 S-phase 간에는 유의한 상관관계를 확인할 수 없었다.

중심 추적기간 46개월(35-75개월)의 추적 조사 결과, 대상 환자 66명 중 21명(31.8%)이 재발한 것으로 확인되었고 이 중 16명(24.2%)의 환자가 사망한 것으로 확인되었다. 무병 생존 분석 결과, cyclin D1의 발현을 보인 환자군이 재발이 적은 양상을 보였지만 통계적 유의성은 없었다( $p=0.154$  by log-rank test). cyclin D1의 발현을 보인 46명의 환자 중 14명

(30.4%)의 환자들이 재발한 반면에 cyclin D1의 발현을 보이지 않은 20명의 환자들 중 7명(35%)의 환자들이 재발한 것으로 확인되었다(Fig. 1A). 환자들의 생존율 분석에서도 cyclin D1의 발현을 보이지 않은 20명 중 5명(25%)이 사망한 반면, cyclin D1의 발현을 보인 환자들 중에서는 11명(23.9%)이 사망하여 cyclin D1의 발현에 따른 환자의 생존율에는 차이가 없는 것으로 나타났다(Fig. 1B).

## 고 찰

유방암 세포주에서 cyclin D1의 발현은 에스트로겐에 의한 G1-S phase의 이행에 선행하여 나타나는

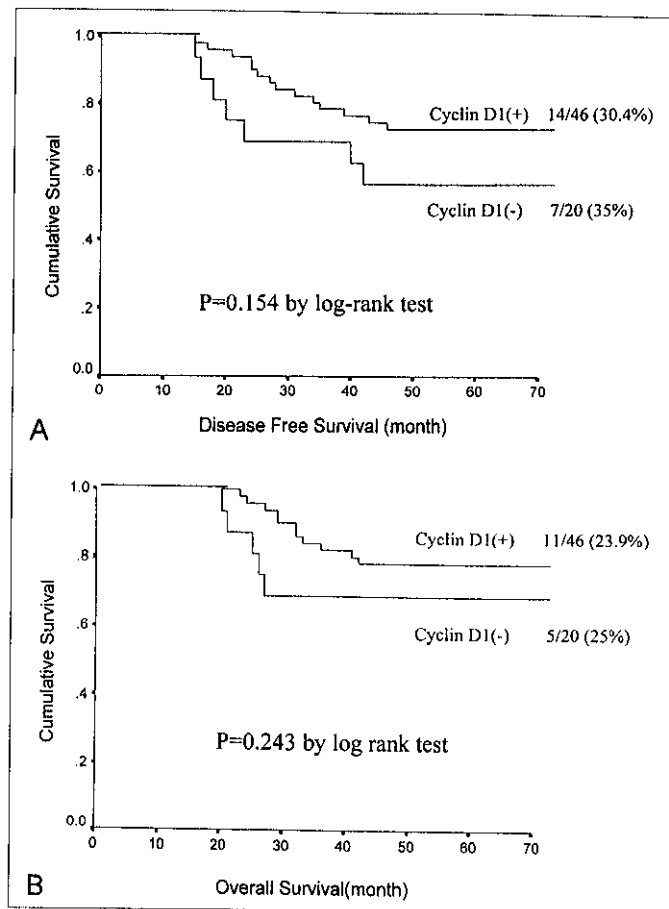


Fig. 1. (A) Disease free survival of the patients according to cyclin D1 expression (B) Overall survival of the patients according to cyclin D1 expression.

것으로 밝혀져 있다<sup>12)</sup>. 여러 가지 유방암 세포주를 이용한 연구 결과들도 ER 양성 유방암세포들이 cyclin D1을 발현하는 것으로 보고한 바가 있다<sup>13-17)</sup>. 유방암세포에서 cyclin D1의 발현이 ER과 연관되어 있다면 실제 인체 유방암에서도 타목시펜 치료에 대한 반응이 cyclin D1의 발현 여부에 따라서 달라질 것으로 생각되었다. 본 연구의 결과는 ER 양성 유방암 환자에서 cyclin D1의 발현에 따른 무병 생존율이나 전체 생존율이 차이가 나지 않는 것으로 밝혀졌다. 이러한 연구 결과는 cyclin D1의 발현을 나타내는 전이성 유방암 환자들이 타목시펜의 치료에 좋은 효과를 보인다는 Barnes 등의 보고<sup>5)</sup>와는 차이를 보였다. 호르몬치료에 대한 다양한 반응은 CCND1이나 ER 유전자 이외의 다른 유전자 변화에 의해서도 유발될 수 있다고 생각된다. Collecchi 등<sup>18)</sup>이 보고한 바와 같이 유방암에서 cyclin D1의 발현은 겨드랑이 림프절 전이 여부에 따라서도 변화하는 양상을 보인다. 이러한 결과들은 cyclin D1의 발현이 유방암이 진행됨에 따라서 같은 유방암 세포에서도 다양하게 변화할 수 있다는 것을 보여주는 증거로 추정된다.

유방암에서 PR의 발현은 ER의 조절을 받는 것으로 생각되지만 본 연구의 결과, PR의 발현과 cyclin D1의 발현간에 어떤 상관성을 보이지는 않았다. 이 결과는 cyclin D1의 발현이 단순히 ER에 의해서만 조절되지는 않는다는 것을 보여주는 간접적인 결과로 해석할 수도 있겠다. 결국 인체 유방암에서 타목시펜의 치료 효과는 매우 복잡한 기전을 가지고 있을 수 있으며 ER이나 cyclin D1만으로는 그 효과를 정확히 예측하기 어려운 것으로 보인다. 단순한 세포 배양 시스템에서의 유방암 세포의 생물학적 반응이 실제 암세포가 다양한 성장인자들의 영향을 받는 인체내의 복잡한 환경에서는 다른 양상으로 나타날 수도 있기 때문이다.

배양 세포주를 이용한 실험 결과와 다른 양상은 S-phase와 cyclin D1 발현간의 상관성 분석에서도 비슷한 소견을 보였다. cyclin D1은 cell-cycle의 진행에 필수적인 요소이며 배양 세포에서 cyclin D1을 발현시키면 G1-phase의 감축과 함께 세포 성장이 촉진된다<sup>19,21)</sup>. 그러나 본 연구의 결과, cyclin D1의 발

현에 따른 S-phase의 변화는 뚜렷하지 않았고, 이러한 소견은 인체 유방암에서 시행된 다른 연구들의 결과에서도 보고된 바가 있다<sup>7,18)</sup>.

인체 유방암에서 cyclin D1의 발현은 분화암에서 뚜렷이 관찰되는 것으로 보고되고 있다<sup>6-8)</sup>. 본 연구에서도 cyclin D1의 발현은 분화도가 좋은 암에서 뚜렷이 높았고 미분화암에서는 cyclin D1의 발현이 현저히 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 결론적으로 ER 양성 유방암에서 cyclin D1의 발현은 세포 분화와 관련되어 있었으나 타목시펜 치료에 대한 y과를 cyclin D1의 발현에 따라 예측하기는 어려운 것으로 판단된다.

## 참 고 문 헌

- 1) Barnes DM: Cyclin D1 in mammary carcinoma. *J Pathol* 181:267-269, 1997
- 2) Zuckerberg L, Yang W, Gadd M, Thor A, Koerner F, Schmidt E, Arnold A: Cyclin D1 (PRAD1) protein expression in breast cancer: approximately one third of infiltrating mammary carcinomas show overexpression of the cyclin D1 oncogene. *Mod Pathol* 8:560-567, 1995
- 3) Michalides R, Hageman P, van Tinteren H, Houben L, Wientjens E, Klompaker R, Peterse J: A clinicopathological study on overexpression of cyclin D1 and of p53 in a series of 248 patients with operable breast cancer. *Br J Cancer* 73:728-734, 1996
- 4) Barbareschi M, Pelosio P, Caffo O, Buttitta F, Pellegrini S, Barbazza R, Dalla Palma P, Bevilacqua G, Marchetti A: Cyclin D1-gene amplification and expression in breast carcinoma: Relation with clinicopathologic characteristics and with retinoblastoma gene product, p53 and p21waf immunohistochemical expression. *Int J Cancer* 74:171-174, 1997
- 5) Barnes DM, Gillett CE: Cyclin D1 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 52:1-15, 1998
- 6) Simpson JF, Quan DE, OMalley F, Odom-Maryon T, Clarke PE: Amplification of CCND1 and ex-

- pression of its protein product, cyclin D1, in ductal carcinoma in situ of the breast. *Am J Pathol* 151:161-168, 1997
- 7) Gillett C, Smith P, Gregory W, Richards M, Millis R, Peters G, Barnes D: Cyclin D1 and prognosis in human breast cancer. *Int J Cancer* 69:92-99, 1996
- 8) van Diest P, Michalides RJAM, Jannink I, van der Valk P, Meijer CJLM, Baak JPA: Cyclin D1 expression in invasive breast cancer. *Am J Pathol* 150:705-711, 1997
- 9) Zwijsen R, Wientjens E, Klompaker R, van der Sman J, Bernards R, Michalides R: CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. *Cell* 88:405-415, 1997
- 10) Neuman E, Ladha M, Lin N, Upton T, Miller S, Renzo JD, Pestell R, Hinds P, Dowdy S, Brown M, Ewen M: Cyclin D1 stimulation of estrogen receptor transcriptional activity independent of cdk4. *Mol Cell Biol* 17:5338-5347, 1997
- 11) Han S, Yun IJ, Noh DY, Choe KJ, Song SY, Chi JG: Abnormal expression of four novel molecular markers represents a highly aggressive phenotype in breast cancer. Immunohistochemical assay of p27, nm23, erbB-2, and cathepsin D protein. *J Surg Oncol* 65:22-27, 1997
- 12) Prall OW, Rogan EM, Musgrove EA, Watts CK, Sutherland RL: C-Myc or cyclin D1 mimics estrogen effects on cyclin E-Cdk2 activation and cell cycle reentry. *Mol Cell Biol* 18:4499-4508, 1998
- 13) Zwijsen RM, Klompaker R, Wientjens EB, Kristel PM, van der Burg B, Michalides RJ: Cyclin D1 triggers autonomous growth of breast cancer cells by governing cell cycle exit. *Mol Cell Biol* 16:2554-2560, 1996
- 14) Bartkova J, Lukas J, Muller H, Lutzhoft D, Strauss M, Bartek J: Cyclin D1 protein expression and function in human breast cancer. *Int J Cancer* 57:353-361, 1994
- 15) Lukas J, Pagano M, Staskova Z, Draetta G, Bartek J: Cyclin D1 protein oscillates and is essential for cell cycle progression in human tumour cell lines. *Oncogene* 9:707-718, 1994
- 16) Lukas J, Bartkova J, Bartek J: Convergence of mitogenic signalling cascades from diverse classes of receptors at the cyclin D-cyclin-dependent kinase-pRb-controlled G1 checkpoint. *Mol Cell Biol* 16:6917-6925, 1996
- 17) Han EK-H, Sgambato A, Jiang W, Zhang Y-J, Santella R, Doki Y, Cacace A, Schieren I, Weinstein IB: Stable overexpression of cyclin D1 in a human mammary epithelial cell line prolongs the S-phase and inhibits growth. *Oncogene* 10:953-961, 1995
- 18) Collecchi P, Passoni A, Rocchetta M, Gnesi E, Baldini E, Bevilacqua G: Cyclin-D1 expression in node-positive (N+) and node-negative (N-) infiltrating human mammary carcinomas. *Int J Cancer* 84:139-144, 1999
- 19) Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G: Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Develop* 7:812-821, 1993
- 20) Hartwell LH, Kastan MB: Cell cycle control and cancer. *Science* 266:1821-1823, 1994
- 21) Jiang W, Kahn SM, Zhou P, Zhang YJ, Cacace AM, Infante AM, Doi S, Santella RM, Weinstein IB: Overexpression of cyclin D1 in rat fibroblasts causes abnormalities in growth control, cell-cycle progression and gene expression. *Oncogene* 8:3447-3457, 1993