

유방암 환자에서 예후 인자로서의 Thymidylate Synthase 발현의 의의

가톨릭대학교 의과대학 의정부성모병원 외과학교실, 이화여자대학교 의과대학 내과학교실¹

박종경 · 김정수 · 김기환 · 전해명 · 서영진
박우찬 · 오세정 · 정상설 · 김재성 · 임석아¹

= Abstract =

The Expression of Thymidylate Synthase in Breast Cancer

Jong Kyung Park, M.D., Jeong Soo Kim, M.D., Ki Hwan Kim, M.D.,
Hae Myung Jeon, M.D., Young Jin Suh, M.D., Woo Chan Park, M.D.,
Se Chung Oh, M.D., Sang Seol Jung, M.D., Jae Sung Kim, M.D.
and Seock Ah Im, M.D.*

Department of Surgery, Catholic University College of Medicine, Department of Medicine,
Ewha Womans University College of Medicine*, Seoul, Korea

Fluorouracil is well known as a standard chemotherapeutic drug in breast cancer and other cancers that is converted to flurodeoxyuridine monophosphate (FdUMP) and leads to the inhibition of thymidylate synthase (TS) in tumor tissues. The role of this enzyme is the catalysis of the methylation from deoxyuridine monophosphate (dUMP) to deoxythymidine monophosphate (dTTP), which is a very important process for DNA synthesis in tumor tissues. Increased level of TS protein correlates inversely with sensitivity and response to 5 FU in human cancer cell lines. Authors evaluated the TS expression level using the immunohistochemical staining and analysed their relationship with other prognostic factors and clinical outcome of breast cancer patients. The results were as follows; 1) TS level was not related histopathologic stage, involvement of axillary lymph nodes, estrogen receptor, progesterone receptor, recurrent type, primary tumor and recurrent tumors, disease free survival rate. 2) TS level was associated with c-erbB2 overexpression. 3) c-erbB2 overexpression was related with recurrence rate. 4) TS level appeared to be related with recurrence rate. So we conclude the TS level can be used as an independant prognostic predictor in breast cancer patients. (Journal of Korean Breast Cancer Society 1999;2:227~239)

Key Words: Breast cancer, Thymidylate synthase, c-erbB2 overexpression

서 론

연락처: 김정수, 480-130, 경기도 의정부시 금오동 65-1
의정부성모병원 외과
Tel: 0351-820-3048, Fax: 0351-847-2717

유방암은 서구에서 여성암 중 가장 빈도가 높은

식생활 및 생활양식이 서구화되면서 자궁암, 위암에 이어 세 번째로 높은 발생빈도를 보이고 있고 점차적으로 증가하는 추세이다. 유방암은 수술 후 재발양상이 다양하여 예후를 예측하기가 어렵다. 유방암의 수술 후 재발과 예후에 영향을 미치는 인자로서는 전통적으로 액와 림프절 전이 유무, 종양의 크기, 호르몬수용체 유무, 조직학적 등급 등이 알려져 있고 estrogen receptor/progesterone receptor (ER/PR) 유무는 유방암 환자의 치료를 결정하는 예후 인자로 보고되었고¹⁻³⁾ ER는 유방암 환자의 보조화학요법의 반응 정도를 예상하는 데 쓰일 뿐만 아니라⁴⁾ 재발 환자의 호르몬 요법의 시행을 결정하는 중요한 역할을 담당하며^{5,6)} PR 또한 estrogen에 의해 유도, 조절되는 단백질로서 유방암의 호르몬 치료의 반응을 예상하는 예후 인자로 알려져 왔다⁷⁾. 최근 c-erbB-2 (HER-2/neu), cathepsin D, p53, Ki-67 등의 생물학적 표지자들이 새로운 예후 인자로서 활발히 연구되고 있다. C-erbB-2 종양 유전자는 이미 많은 연구에서 유방암 환자의 액와 림프절 전이와 상관관계가 있다고 보고되었고⁸⁾ 유방암의 약 30%에서 과발현되며 이러한 경우 생존율을 낮추고 보조화학요법에 대한 저항성을 증가시키며 재발 및 전이위험을 증가시킨다고 보고되어 왔다⁹⁻¹²⁾. 이러한 예후 인자들은 수술 후 적극적인 치료를 요하는 불량한 예후를 보이는 환자를 선별하는데 유용하게 이용할 수 있으며 재발의 위험이 높은 고위험군 환자와 예후가 좋은 환자를 가려내어 불필요한 항암요법으로 발생하는 부작용을 줄이고 고위험군 환자에는 적극적인 항암요법을 시행하는 기준이 될 수 있다¹³⁾. Thymidylate synthase (TS)는 두경부, 위장관 및 유방에서 발생하는 고형종양의 치료에 임상적인 효과가 입증된 중요한 항암제인 fluorouracil (5-FU)의 표적효소로서^{14,15)} DNA 합성의 필수단계인 deoxyuridine monophosphate (dUMP)에서 deoxy-thymidine monophosphate (dTTP)로의 methylation을 촉매하는 것으로 알려져 있다^{16,17)}. 또한 종양세포 내 TS 효소치가 5-FU의 저항성과 연관이 있다고 보고되었고¹⁸⁾ 많은 연구 결과 TS의 고발현시 위암 및 대장, 직장암 환자에서 보조화학요법의 반응성을 감소시키고 생존율과 무병 기간에 영향을 준다고 보고

되었다^{19,20)}. 본 연구는 위암 및 대장, 직장암에서 항암 치료에 대한 저항성과 관련이 있으며 고발현시 생존율에 영향을 미치는 것으로 밝혀지고 있는 TS가 유방암 환자에서 수술 후 재발과 전이에 미치는 영향을 알아보고자 포르말린 고정, 파라핀 포매 조직을 이용한 면역조직화학염색방법으로 TS의 단백질 발현을 관찰하고 전통적 예후 인자로 알려진 c-erbB-2 종양유전자, 호르몬수용체(ER/PR) 및 임상조건과 비교하여 TS 발현이 유방암에서 예후 인자로서 의의가 있는지를 알아보기 위해 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

1993년 1월부터 1998년 12월까지 가톨릭대학교 의정부 성모병원에서 유방암으로 진단받고 수술받은 환자 중 조직의 고정 및 보관상태가 양호하며 최근까지 추적관찰이 가능한 39명을 대상으로 하였다. 대상환자의 연령 분포, 병기별 분류, 액와림프절 전이 갯수, 호르몬 수용체(ER/PR) 유무, 수술 후 치료 내용은 임상기록 및 병리조직 보고서를 분석하였다. 대상환자 전원이 수술 후 fluorouracil (5-FU)을 포함한 보조화학요법을 6개월 이상 경구 또는 정맥주사로 투여받았다.

2. 면역조직화학 염색방법

근치적 수술 후 얻어진 포르말린 고정, 파라핀 포매 조직을 5 μ m 두께로 박절하여 xylene으로 10분간 3회 탈파라핀시키고 100%, 95%, 75%, 50% 에탄올에 순차적으로 처리한 후 증류수로 함수시켰다. 이 때 탈파라핀시키는 과정에서 발생할 수 있는 변화를 방지하고 고정액에 의해 약해진 항원성을 되살리기 위해 high temperature unmasking technique (10 mM citric acid buffer, pH 6.0)으로 autoclave에서 15분간 반응시켰고 효소활성을 억제하기 위해 0.3% 과산화수소로 10분간 처리한 후 phosphorylated buffered saline (PBS) 완충액과 증류수로 각각 5분간 세척하였다. 다음에 비특이적 염색을 억제하기 위해 bovine serum으로 20분간 반응시키고 TS와 c-erbB-2

유전자의 발현도를 보기 위해 각각의 단클론항체 (TS 106; Dr. Allegra CJ.로부터 받음, 1:150, National Cancer Institute, U.S.A.; Monoclonal anti c-erbB-2 antibody, 1:40, DAKO Carpinteria, CA.)를 일차항체로 사용하여 반응시킨 다음 4℃에서 하룻밤 동안 처리한 후 PBS로 세척하였다. 그후 Research Genetic사의 labelled streptavidin-biotin (LSAB) kit를 사용하여 avidin-biotin complex (ABC)법에 따라 biotin이 결합된 이차항체(anti rabbit IgG)를 30분간 반응시키고 PBS로 세척한 후 streptavidin 용액을 10분간 처리하고 나서 PBS로 세척하였다. 발색제로는 chromogen을 사용하여 10분간 반응시키고 Mayer's hematoxylin으로 7분간 대조염색한 후 물로 세척하고 나서 crystal mount로 탈수 봉입하였다. 항원에 대한 정확한 반응성을 평가하기 위해 일차항체를 제외하고 위의 염색과정을 단계적으로 시행한 조직을 음성 대조군으로 사용하였고 양성 대조군은 내부적으

로 TS의 경우 핵내에, c-erbB-2는 세포막에 분명하고 강하게 염색된 것을 선정하였다²¹⁾.

3. 면역조직화학 염색의 판독

염색된 조직의 판독은 2명의 저자와 1명의 임상병리 의사에 의해 광학현미경으로 관찰하여 시각적 강도에 따라 0, 1+, 2+, 3+로 구분하였다. TS는 Yeh 등²⁰⁾, Johnston 등²²⁾이 시행한 방법에 따라 전체 암세포에 염색이 전혀 안된 경우가 0, 전체 암세포 중 25% 미만으로 염색된 경우를 1+, 25-50%로 염색된 경우를 2+, 50% 초과한 경우를 3+로 하였고 c-erbB-2는 Bertheau 등²³⁾의 방법을 기준으로 전체 암세포에 염색이 전혀 안된 경우를 0, 전체 암세포 중 25% 미만으로 염색된 경우를 1+, 25-50% 염색된 경우를 2+, 50% 초과 염색된 경우를 3+로 하였다. TS 발현도는 염색의 시각적 강도가 0, 1+를 낮은 군으로 2+, 3+를 높은 군으로 구분하였고, c-erbB-2 발현도는 0,

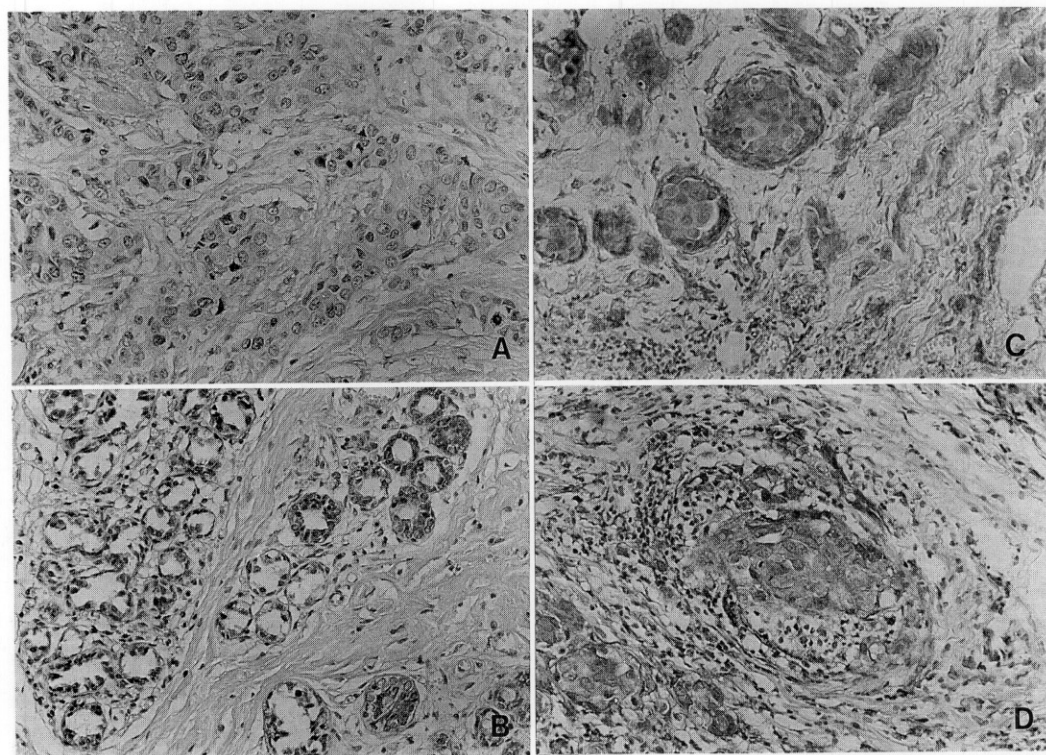


Fig. 1. Immunohistochemical staining of formalin-fixed, paraffin-embedded specimens of breast carcinomas using the TS 106 monoclonal antibody. Note the diffuse positivity present in the nucleus of the carcinoma cells. (A) intensity 0 ($\times 200$) (B) intensity 1+ ($\times 200$) (C) intensity 2+ ($\times 200$) (D) intensity 3+ ($\times 200$).

1+를 낮은 군으로 2+, 3+를 높은 군으로 구분하였다 (Fig. 1, 2).

4. 통계 처리

TS 발현과 임상소견 및 ER/PR, c-erbB-2의 관계를 SAS program을 이용하여 continuity adjustment chi-square test 및 Fisher's exact test로 검정하였고 유의수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

결 과

1. 대상 환자의 특성

본 실험에 조사된 환자는 39명으로 연령은 27세에서 75세 사이에 분포하였고 평균연령은 48세였다. 대상환자 전원이 수술 후에 5-FU를 포함한 보조화학요법을 시행받았다. 비재발군이 21예(53.8%), 재발군은 18예(46.2%)에서 발생하였고 각각의 평균연

령은 47세, 48세였다. 비재발군에서는 2기가 15예(71.4%), 재발군에서는 3기가 11예(61.1%)로 많았다. 액와림프절 전이 갯수는 0-4개, 5-9개, 10개 이상으로 구분하여 조사한 결과 비재발군에서는 0-4개가 15예(71.4%)로 많았고 재발군에서는 차이가 없었다. 유방보존술식을 시행한 7예 중 3예(42.9%)에서 재발하였고 변형유방근지 절제술을 시행한 32예 중 15예(46.9%)에서 재발하였다. 보조화학요법은 FAC (5-FU; adriamycin; cyclophosphamide)를 13예에서 시행하였고 그 중 8예(61.5%), CMF (cyclophosphamide; methotrexate; 5-FU)를 시행한 20예 중 9예(45.0%)에서 재발하였으며 5-FU만 복용한 예가 6예 중 1예(16.7%)에서 재발하였다(Table 1).

2. TS 발현과 액와림프절 전이 갯수 및 병기와의 관계

TS 발현도를 광학현미경으로 관찰하여 시각적 강

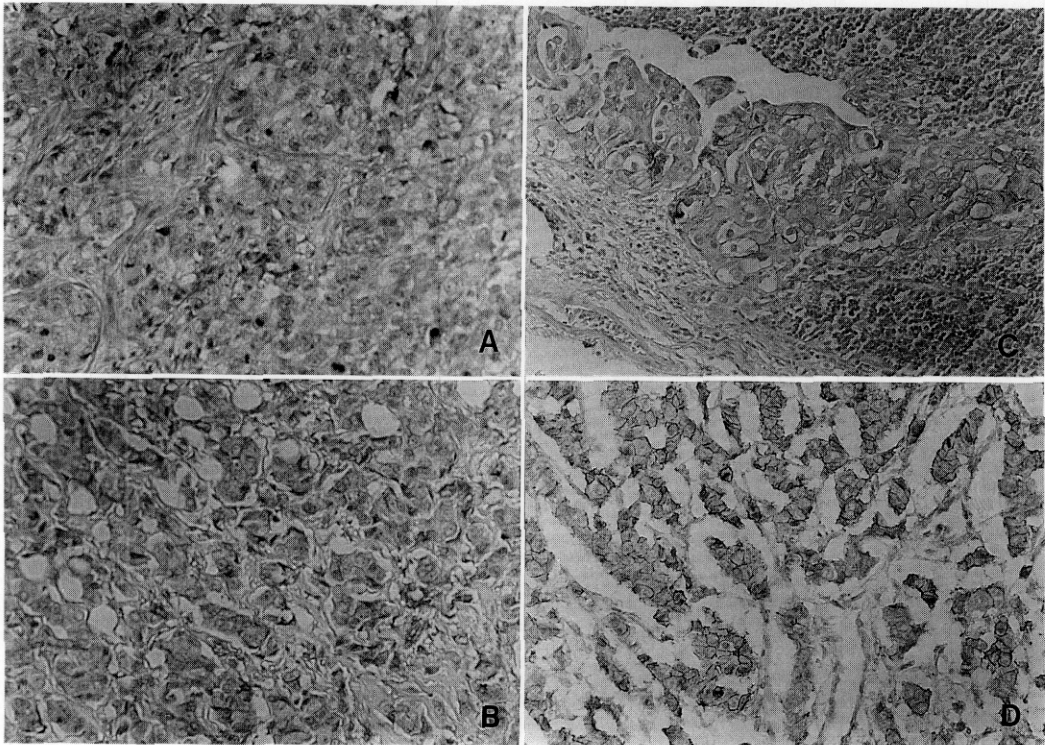


Fig. 2. Immunohistochemical staining of formalin-fixed, paraffin-embedded specimens of breast carcinomas using monoclonal c-erbB2 antibody. Note the positivity present in the membrane of the carcinoma cells. (A) intensity 0 ($\times 200$) (B) intensity 1+ ($\times 200$) (C) intensity 2+ ($\times 200$) (D) intensity 3+ ($\times 200$).

도에 따라 분류한 결과 강도가 0인 경우가 6예(15.4%), 1+인 경우가 11예(28.2%), 2+인 경우가 12예(30.8%), 3+인 경우가 10예(25.6%)였다. TS 발현도를 두 군으로 분류하면 TS 발현이 낮은 군이 17예(43.6%), 높은 군은 22예(56.4%)였다. 액와림프절 전이 갯수와 TS 발현과의 관계를 보면 TS 발현이 낮은 군에서 0-4개가 17예 중 11예(64.8%), 높은 군에서도 0-4개가 22예 중 11예(50.0%)로 액와림프절 전이 갯수가 적어도 TS 발현이 높았으나 액와림프절 전이 갯수와 TS 발현도는 큰 차이가 없었으며($P=0.621$) 병기별로는 TS 발현이 낮은 군에서 제1기가 17.6%로 TS 발현이 높은 군의 4.5%에 비하여 병기가 초기인 경우가 많았고 두 군 모두 제2기가 9예(53.0%), 11예(50.0%)로 많았으나 두 군간의 병기와 TS 발현도와는 통계적 유의성은 없었다($P=0.254$) (Table 2).

3. ER/PR과 TS 발현 및 재발율과의 관계

TS 발현은 ER 음성보다 양성일 때, PR 양성보다 음성일 때 다소 높았으나 통계적 유의성은 없었다($P=0.250$)($P=0.953$). TS 발현이 낮은 군 17예에서 ER+/PR+는 2예(11.8%), ER+/PR-는 4예(23.5%), ER-/PR+는 6예(35.1%), ER-/PR-는 5예(29.4%)였고 TS 발현이 높은 군 22예에서 ER+/PR+는 7예(31.8%), ER+/PR-는 6예(27.3%), ER-/PR+는 2예(9.1%), ER-/PR-는 7예(31.8%)로 두 군간에 큰 차이는 없었다(Table 3). ER+/PR+ 9예 중 3예(33.3%), ER+/PR- 10예 중 8예(80.0%)에서 재발되었고 ER-/PR+ 8예 중 3예(37.5%), ER-/PR- 12예 중 4예(33.3%)에서 재발이 나타나 재발율에 큰 차이가 없었고 유방암 환자에서 호르몬 요법이 40-45% 정도 실패한다는 보고와 유사하였다(Table 4)^{24,25}.

Table 1. Characteristic of Breast Cancer Patients

	Nonrecurrence (%)	Recurrence
No. of patients	21	18
Median age (range)	47 (28-75)	48 (27-61)
Stage		
I	3 (14.3)	1 (5.6)
II	15 (71.4)	5 (27.7)
III	3 (14.3)	11 (61.1)
IV	0	1 (5.6)
No. of lymph node metastasis		
0-4	15 (71.4)	7 (38.9)
5-9	2 (9.5)	5 (27.8)
≥10	4 (19.1)	6 (33.3)
Operation		
BCS *	4 (57.1)	3 (42.9)
MRM [†]	17 (53.1)	15 (46.9)
Chemotherapy		
FAC [‡]	5 (38.5)	8 (61.5)
CMF [§]	11 (55.0)	9 (45.0)
5-FU	5 (83.3)	1 (16.7)

* breast conserving surgery.

[†] modified radical mastectomy.

[‡] 5-FU; adriamycin; cyclophosphamide.

[§] cyclophosphamide; methotrexate; 5-FU.

Table 2. Correlation between Clinical Variables and TS Staining Grade of Breast Cancer Patients

	Low TS expression	High TS expression	P value
No. of patients	17	22	-
Median age, years (range)	47.1 (28-70)	48.8 (27-75)	-
No. of lymph node metastasis			0.621
0-4	11 (64.8)	11 (50.0)	
5-9	3 (17.6)	4 (18.2)	
≥10	3 (17.6)	7 (31.8)	
Stage			0.254
I	3 (17.6)	1 (4.5)	
II	9 (53.0)	11 (50.0)	
III	4 (23.6)	10 (45.5)	
IV	1 (5.8)	0	

Table 3. Correlation between TS Level and ER/PR of Breast Cancer Patients

	Low TS	High TS	P value
Estrogen receptor			0.250
Negative	11 (64.7)	9 (40.9)	
Positive	6 (35.3)	13 (59.1)	
Progesterone receptor			0.953
Negative	9 (52.9)	13 (59.1)	
Positive	8 (47.1)	9 (40.9)	

Table 4. Correlation between ER/PR and Recurrence rate of Breast Cancer Patients

	Recurrent cases/No. of patients	Recurrent rate (%)
ER+/PR+	3/9	33.3
ER+/PR-	8/10	80.0
ER-/PR+	3/8	37.5
ER-/PR-	4/12	33.3

4. C-erbB-2 종양유전자와 TS 발현 및 재발율과의 관계

C-erbB-2 발현 양성일 때 22예 중 12예(54.5%)에서 재발하여 c-erbB-2 발현 음성보다 재발율이 높게 나타났다(Table 5). TS 발현이 낮은 군 17예에서 c-erbB-2 양성 8예(47.1%)였고 높은 군 22예 중 c-erbB-2 양성 14예(63.6%)로 c-erbB-2 양성일 때 TS 발현이 높았으나 통계적 유의성은 없었다($P=$

0.478)(Table 6).

5. TS 발현과 일차 유방암 및 재발과의 관계

대상 환자 39예 중 18예에서 재발하였다. 그 중 10예가 전신전이였고 8예가 국소재발이었다. 전신전이 환자는 폐, 골, 뇌, 간에 전이가 방사선학적으로 진단되었으나 전이된 부위의 조직을 얻지 못하여 면역조직화학 염색을 시행하지 않았다. 전신전이 10예 중 일차 유방암의 TS 발현도가 낮은 군이 3예

Table 5. Correlation between C-erbB-2 Oncogene and Recurrence Rate of Breast Cancer Patients

	Recurrent cases/No. of patients	Recurrent rate (%)
C-erbB-2 expression		
Positive	12/22	54.5
Negative	6/17	35.3

Table 6. Correlation between TS Level and c-erbB-2 Oncogene of Breast Cancer Patients

	Low TS (%)	High TS (%)	P value
C-erbB-2 expression			0.478
Negative	9 (52.9)	8 (36.4)	
Positive	8 (47.1)	14 (63.6)	

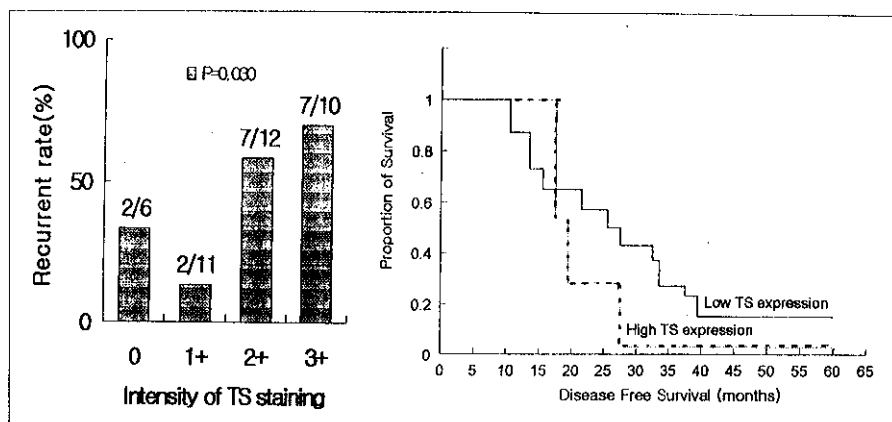


Fig. 3. Correlation between TS level and disease-free survival of breast cancer patients.

(30.0%), 높은 군이 7예(70.0%)로 TS 발현도가 높을 때 전신전이가 많았다(Table 7). 국소재발 환자는 쇄골 상부와 편측 유방에 전이된 경우로 면역조직화학 염색 결과 TS 발현이 높은 군이 일차 유방암에서 7예(87.5%), 국소재발에서 6예(75.0%)였고 TS 발현이 낮은 군이 일차 유방암에서 1예(12.5%), 국소재발에서 2예(25.0%)로 TS 발현이 높을수록 국소재발이 많았으나 통계적 유의성은 없었다($P=1.000$)(Table 8).

6. TS 발현과 무병생존율과의 관계

TS 발현이 예후에 미치는 영향을 보기 위해 TS 발현이 낮은 군과 높은 군간의 무병생존율을 비교하였다. 무병생존율은 99년 4월을 관찰시점으로 하여 수술 후 그 기간까지 재발이 일어나지 않은 환자를

Table 7. Correlation between TS Level of Primary Breast Cancer and Systemic Relapse of Breast Cancer Patients.

Systemic metastasis	Low TS	High TS
Bone (n=5)	2	3
Lung (n=3)	1	2
Liver (n=1)	0	1
brain (n=1)	0	1

무병생존자로 간주하였다. TS 발현이 낮은 군 17예 중 13예에서 재발이 없었고 무병생존율은 76.5%였다. 높은 군은 22예 중 8예에서 재발이 없었고, 무병생존율은 36.4%로 낮은 군에서의 무병생존율이 월등하게 높았으나 두 군간의 통계적 유의성은 없었다

($P=0.220$). 그 이유는 표본 수가 적었기 때문이 아닌
가 생각된다(Table 9). TS 발현이 높을수록 조기재발
을 일으키는 지를 조사한 결과 TS 발현도가 재발시
기와는 큰 관계가 없는 것으로 나타났다(Fig. 3,
Table 10).

7. TS 발현과 재발율과의 관계

대상 환자 39예 중 재발된 경우는 총 18예였다.
TS 발현정도가 0일때 6예 중 2예(33.3%), 1+일때 11
예 중 2예(13.2%), 2+일때 12예 중 7예(58.3%), 3+일
때 10예 중 7예(70.0%)가 재발하여 TS 발현이 낮은

군과 높은 군간의 재발율과의 상관관계가 $P=0.030$
으로 유의한 것으로 나타났다. 단 TS 발현정도가 0
일 때가 1+일 때보다 재발율이 높게 나온 것은 표본
수가 적기 때문인 것으로 생각된다(Table 11).

8. 보조항암 치료와 재발율과의 관계

대상 환자 39명이 수술 후 보조항암 치료를 시행
받았다. CMF 제제를 사용한 경우는 20예 중 9예
(45.0%)에서 재발이 나타났고 그 중 TS 발현이 낮은
군이 10예 중 1예(10.0%), 높은 군이 10예 중 8예
(80.0%)였다. CAF 제제는 13예 중 8예(61.5%)에서

Table 8. Correlation between TS Level and Primary Breast Cancer and Local Recurrence of Breast Cancer Patients

	Primary cancer (n=8)	Local recurrence (n=8)	P value
Low TS	1 (12.5%)	2 (25.0%)	P value 1.000
High TS	7 (87.5%)	6 (75.0%)	

Table 9. Correlation between TS Level and Disease-free Survival of Breast Cancer Patients

	Low TS	High TS	P value
Non-recurrence/No. of patients	13/17	8/22	0.220
Disease-free survival (%)	76.5	36.4	

Table 10. Correlation between TS Level and Disease-free Interval of Recurrent Breast Cancer Patients

	Low TS (n=4)	High TS (n=14)
Disease-free interval (months)		
6-12	1	4
13-24	1	1
25-36	2	5
37-48	0	2
49-60	0	2

Table 11. Correlation between TS Level and Recurrence Rate of Breast Cancer Patients

	Low TS		High TS		P value
	0	1+	2+	3+	
Recurrent case/No. of Pts.	2/6	2/11	7/12	7/10	0.030
Recurrent rate (%)	33.3	13.2	58.3	70.6	

Table 12. Correlation between Adjuvant Chemotherapy and Recurrence Rate of Breast Cancer Patients according to TS Level

	Low TS expression	High TS expression
5-FU (n=6)	0*/2 (0 %)+	1/4 (25)
CMF (n=20)	1/10 (10.0%)	8/10 (80.0)
CAF (n=13)	3/5 (60.0%)	5/8 (62.5)

* number of recurrent cases.

† recurrence rate.

재발이 나타났고 TS 발현이 낮은 군이 5예 중 3예 (60.0%), 높은 군이 8예 중 5예(62.5%)였다. 5-FU만 복용한 경우 재발이 1예였고 보조항암 치료제의 종류에 관계없이 TS 발현이 높은 군에서 낮은 군보다 재발율이 높았다(Table 12).

고 찰

TS는 deoxyuridine monophosphate에서 deoxythymidine monophosphate로의 methylation 과정을 촉매하는 세포 내의 DNA합성 과정에서 필수적인 역할을 담당하고 유방암의 치료에 널리 이용되고 있는 중요한 항암제인 fluoropyrimidines의 표적효소로 알려져 왔다^{14,26,27}. 종양세포에서 fluorouracil (5-FU)는 5-fluorodeoxyuridine monophosphate로 전환되어 folate cofactor인 5, 10-methylenetetrahydrofolate의 존재하에서 TS와 단단한 공유결합체를 형성한다고 밝혀졌다^{14,26}. 종양에 대한 저항성과 연관된 TS의 임상적 중요성은 TS-specific gene의 acute induction, stable amplification과 관련되어 있다고 보고되어 왔다²⁸⁻³². 임상 및 임상 전단계 연구에서 TS 단백질의 증가된 발현이 5-FU에 대한 저항성과 연관이 있다고 보고되었다^{33,34}. Fluoropyrimidine을 포함한 항암치료의 반응을 결정하는 TS의 역할을 규명하고자 대장암환자의 종양세포로부터 TS 효소를 측정하는 연구가 시행되어 왔다. 그러나 전통적으로 enzymatic biochemical assay를 사용하여 TS를 측정하였으나 인간의 종양조직 표본에 적용될 때 민감도가 낮았다. 최근 TS 단백질과 TS 유전자 발현을 측정하는 민감도가 높은 방법이 개발되어 왔고 더욱이 TS 단

클론항체의 출현으로 포르말린 고정, 파라핀 포매 조직절편을 사용한 면역조직화학 염색방법에 의해 TS 효소치를 잘 반영하면서도 TS 측정이 간편하게 되었다³⁵. 많은 연구 결과 암 조직 내 TS 발현 증가가 5-FU에 대한 저항성이나 생존기간과 연관이 있다고 하였는데 Johnston 등¹⁹은 대장, 직장암 및 위암 환자에서 TS의 고발현시 5-FU에 대한 반응률이 감소한다고 보고하였고 Lenz 등³⁶은 대장암, 위암 환자에서 TS mRNA치를 측정한 결과 TS 발현이 높은 군에서 통계적으로 유의하게 생존기간이 짧다고 보고하였다. 본 연구에서는 유방암 환자의 TS 발현과 기존의 예후 인자로 알려진 액외립프질 전이 갯수, 종양의 병기, ER/PR 유무, c-erbB-2 종양 유전자 발현 유무와의 상관관계를 조사, 분석한 결과 TS 발현이 기존의 예후 인자들과 상관관계가 없는 것으로 나타났다. Pestalozzi 등²¹도 유방암 환자에서 TS 발현도가 기존에 알려진 예후 인자와 연관없이 독립적으로 무병생존율과 전체 생존율에 영향을 미친다고 보고하였다. 본 연구에서는 유방암 환자에서 무병생존율이 TS 발현도가 낮은 군에서 76.5%, 높은 군에서 36.4%로 낮은 군에서 큰 차이로 높았으나 통계적 유의성은 없었다($P=0.220$). 그 이유는 아마도 표본수가 다소 적었기 때문인 것으로 생각된다. 또한 본 연구에서는 TS 발현과 유방암의 재발과의 관계를 조사하였는데 TS 발현이 높은 군에서 통계적으로 유의하게 재발율이 높은 것으로 나타났다($P=0.030$). TS가 유방암의 재발에 영향을 미치는 이유는 아마도 TS가 5-FU의 표적효소로서 5-FU를 포함한 항암 치료제에 대한 저항성을 증가시키고 DNA 합성의 필수적인 단계에 작용하여 암세포의 분열과 증식에

관여하기 때문으로 생각된다. 다른 연구에서도 세포 증식 과정 중 S기 동안 비분열세포보다 급속히 분열, 증식하는 세포에서 최대 TS 활성도가 20배 정도 높다고 보고되었고^{37,38)} G1기 말기에서 S기 초기로의 세포증식 과정에서 TS 효소 활성도가 급속히 증가한다는 사실도 보고되었으며³⁹⁾ 또한 S기에서 암 세포 증식과 TS 효소치의 증가가 관련이 있다고 발표되었다⁴⁰⁾. 이러한 연구결과와 같이 TS 발현이 암 세포의 증식에 작용하여 암의 재발에 영향을 미치는 역할을 한다고 생각된다. Yeh 등²⁰⁾은 위암 환자에서 수술 후 5-FU를 포함한 보조화학치료를 시행한 결과 TS 발현이 낮은 군에서 항암제에 대한 반응률이 높았다고 하였고 Yamchika 등⁴¹⁾에 의하면 5-FU 항암치료를 받은 대장암, 직장암 환자에서 10년 생존율이 TS 발현이 높은 군은 77.8%, 낮은 군은 89.4%였고 시행하지 않은 경우 각각 42.9%, 85.7%로 통계적으로 유의하게 보조화학치료를 받은 환자에서 생존율이 높게 나타났다. 또한 Pestalozzi 등²¹⁾도 액와 림프절에 전이가 있는 유방암 환자에서 TS 발현이 높은 군에 수술 후 6개월간의 CMF 제제로 보조화학요법을 시행한 결과 무병생존율과 전체생존율이 현저하게 증가되었다고 보고하였다. 본 연구에서는 5-FU를 포함하는 보조화학요법을 시행하였는데 TS 발현이 높은 군에서 낮은 군보다 재발율이 높은 것으로 나타났다. 따라서 TS 효소치가 높은 유방암 환자의 경우 적극적인 보조화학요법을 시행하면 재발율을 낮추고 생존기간을 증가시킬 수 있을 것으로 기대된다. 이러한 연구결과 TS 효소치가 유방암 환자에서 5-FU를 포함한 보조화학요법의 반응률에 영향을 미치고 암세포의 분열과 증식에 작용하여 암의 재발 및 생존율에 영향을 미치는 하나의 독립된 예후 인자로서 가치가 있다고 생각되며 유방암 환자의 조직 내 TS 효소치를 검사한다면 환자의 치료계획을 수립하고 예후를 예측하는데 중요한 역할을 할 것으로 기대된다. 본 연구를 기초로 향후 더욱 많은 유방암 환자를 대상으로 오랜 기간 추적관찰을 시행하여 암의 재발 및 생존율과 TS 발현과의 상관관계를 규명함으로써 보조항암요법의 치료성적을 개선하고 재발율을 낮추어 환자 치료에 도움이 되고자 한다.

결론

1993년 1월부터 1998년 12월까지 가톨릭대학교 의정부성모병원에서 유방암으로 진단받고 수술적 치료를 시행받은 환자 중 조직의 고정 및 보관상태가 양호하며 최근까지 추적관찰이 양호한 가능한 39명을 대상으로 유방암 조직 내 5-FU의 표적효소인 thymidylate synthase (TS)의 발현도가 유방암 환자의 재발 및 예후에 미치는 영향을 조사하여 독립적인 예후 인자로서 의의가 있는지를 알아보고자 임상과 병리조직 소견 및 기존의 예후 인자로 밝혀진 ER/PR, c-erbB-2 종양 유전자와의 상관관계를 비교, 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) TS 발현도는 강도가 0인 경우가 6예(15.4%), 1+가 11예(28.2%), 2+가 12예(30.8%), 3+가 10예(25.6%)였고 TS 발현도를 두 군으로 분류하면 발현이 낮은 군이 17예(43.6%), 높은 군이 22예(56.4%)였다. c-erbB-2의 발현도는 강도가 0인 경우가 1예(2.6%), 1+가 16예(41.0%), 2+가 11예(28.2%), 3+가 11예(28.2%)였고 c-erbB-2의 발현도를 두 군으로 분류하면 발현이 음성인 군이 17예(43.6%), 양성인 군이 22예(56.4%)였다.

2) TS 발현도와 액와림프절 전이 갯수와의 관계를 분석한 결과 TS 발현이 낮은 군 17예 중 액와림프절 전이 갯수가 0-4개인 경우가 11예(64.8%), 5-9개인 경우가 3예(17.6%), 10개 이상인 경우가 3예(17.6%)였고 TS 발현이 높은 군 22예 중 0-4개는 11예(50.0%), 5-9개는 4예(18.2%), 10개 이상은 7예(31.8%)였다. 액와림프절 전이 갯수와 두 군간의 통계적 유의성은 없었다($p=0.621$).

3) TS 발현도와 병기와의 관계에서 TS 발현이 낮은 군 17예 중 1기가 3예(17.6%), 2기가 9예(53.0%), 3기가 4예(23.6%), 4기가 1예(5.8%)였고 TS 발현이 높은 군 22예 중 1기가 1예(4.5%), 2기가 11예(50.0%), 3기가 10예(45.5%), 4기가 0예로 2기와 3기가 95%이상을 차지하였으나 TS 발현도와 병기간에 통계적 유의성은 없었다($p=0.254$). 4) TS 발현도와 ER/PR 유무를 분석한 결과 TS 발현이 낮은 군에서 ER은 음성군이 11예(64.7%), PR도 음성군이 9예

(52.9%)로 많았고 TS 발현이 높은 군에서 ER은 양성군이 13예(59.1%), PR은 음성군이 13예(59.1%)로 많았다. TS 발현도와 ER/PR간의 통계적 유의성은 없었다($p=0.250/p=0.953$).

5) TS 발현도와 c-erbB-2 발현과의 분석결과는 TS 발현이 낮은 군에서 c-erbB-2 발현 음성이 9예(52.9%)로 많았고 TS 발현이 높은 군에서는 c-erbB-2 발현 양성인 14예(63.6%)로 많았다. c-erbB-2 발현과 두 군간의 통계적 유의성은 없었다($p=0.478$).

6) TS 발현도와 재발 환자에서 일차 유방암과 국소재발과의 상관관계는 일차유방암과 국소재발 8예에서 각각 TS 발현이 높은 군이 7예(87.5%), 6예(75.0%)로 많았고 통계적 유의성은 없었다($p=1.000$). 전신전이 10예 중 TS 발현이 높은 군이 7예(70.0%)로 TS 발현도가 높을수록 전신전이가 많았다.

7) TS 발현도와 무병생존율과의 관계를 보면 TS 발현이 낮은 군에서 무병생존율이 76.5%, 높은 군에서 36.4%로 낮은 군에서의 무병생존율이 월등히 높았으나 통계적 유의성은 없었다($p=0.220$).

8) TS 발현도와 유방암의 재발율과의 관계를 보면 TS 발현이 낮은 군에서 재발이 일어난 경우가 4예(23.5%), 높은 군에서 재발이 일어난 경우는 14예(63.6%)로 재발율과 두 군간의 통계적 유의성이 의의가 있게 나타났다($p=0.030$).

결론적으로 본 연구에서 유방암 내 TS의 발현정도가 기존에 알려진 예후 인자와는 별도로 암의 재발을 예측할 수 있는 독립적인 예후 인자로서의 역할을 규명할 수 있었는데 향후 더 많은 수의 환자를 대상으로 전향적 연구를 시행하여 유방암 환자의 전신보조항암화학요법의 치료성적을 개선시키고 재발 및 생존율의 예측인자로서의 TS의 역할을 더 확실하게 밝혀야 하겠다.

참 고 문 헌

- 1) Jensen EV: Hormone dependency of human breast cancer. *Cancer* 46:2759-2761, 1980
- 2) Osborne CK, Yochmowitz MG, Knight WA, McGuire WL: The value of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. *Cancer* 46:2884-2888, 1980
- 3) Wittliff JL: Steroid-hormone receptors in breast cancer. *Cancer* 53:630-643, 1984
- 4) Hawkins RA, Roberts MM, Forrest APM: Oestrogen receptors and breast cancer: current status. *Br J Surg* 67:153-169, 1980
- 5) Henry JA, Angus B, Horne CHW: Oestrogen receptor and oestrogen regulated proteins in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treatment: a review*. *Keio J Med* 38:241, 1989
- 6) Rayter Z: Steroid receptors in breast cancer. *Br J Surg* 78:528-535, 1991
- 7) Clark GM, McGuire WL: The clinical usefulness of oestrogen-receptor and other markers of hormone dependence. *Proc R Soc Edinburgh* 95B:145-150, 1989
- 8) Yokota J, Yamamoto T, Toyoshima K: Amplification of c-erbB-2 oncogene in human adenocarcinoma in vivo. *Lancet* I:765, 1986
- 9) Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al: Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235:177-182, 1987
- 10) Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al: Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244:707-712, 1989
- 11) Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, et al: Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. *J Clin Oncol* 10:1049-1056, 1992
- 12) Tan M, Yao J, Yu D: Overexpression of the c-erbB-2 gene enhanced intrinsic metastatic potential in human breast cancer cells without increasing their transformation abilities. *Cancer Res* 57:1199-1205, 1997
- 13) Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Hellman S: Disease of the breast. Lippincott-Ravin, Philadelphia 461, 1996
- 14) Pinedo HM, Peters GF: Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. *J Clin Oncology* 6:1653-1664, 1988
- 15) Heidelberger C, Danenberg PV, Moran RG: Fluorinated pyrimidines and their nucleosides. *Adv*

- Enzymol Relat Areas Mol Biol 54:57-119, 1989
- 16) Heidelberger C: Fluorinated pyrimidines and their nucleotides. In: Sartorelli AC, Johns DG: handbook of experimental pharmacology. New York: Springer Verlag 38:193-231, 1975
- 17) Santi DV, McHenry CS, Sommer H: Mechanism of interaction of thymidylate synthase with 5-fluorodeoxyuridylate. Biochemistry 13:471-481, 1974
- 18) Spears CP, Antranik AH, Moran RG, Heidelberger C, Corbett TH: In vivo kinetics of thymidylate synthase inhibition in 5-fluorouracil sensitive and resistant murine colon adenocarcinomas. Cancer Res 42:450-456, 1982
- 19) Johnston PG, Lenz HJ, Leichman CG, Danenberg KD, Allegra CJ, Danenberg PV, Leichman L: thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors. Cancer Res 55:1407-1412, 1995
- 20) Yeh KH, Shun CT, Chen CL, Lin JT, Lee WJ, Lee PH, Chen YC, Cheng AL: High expression of thymidylate synthase is associated with the drug resistance of gastric carcinoma to high dose 5-fluorouracil-based systemic chemotherapy. Cancer 82:1626-1631, 1998
- 21) Pestalozzi BC, Peterson HF, Gelber RD, Goldhirsch A, et al: Prognostic importance of thymidylate synthase expression in early breast cancer. J Clin Oncol 15:1923-1931, 1997
- 22) Johnston PG, Fisher ER, Rockette HE, Fisher B, Wolmark N, Drake JC: The role of thymidylate synthase expression in prognosis and outcome of adjuvant chemotherapy in patients with rectal cancer. J Clin Oncol 12:2640-2647, 1994
- 23) Bertheau P, Steinberg SM, Merino MJ: C-erbB-2, p53, and nm23 gene product expression in breast cancer in young women. Human Pathology 29:323-329, 1998
- 24) Anderson J, Bentzen SM, Poulsen HS: Relationship between radioligand binding assay, immunoenzyme assay and immunohistochemical assay for estrogen receptors in human breast cancer and association with tumor differentiation. Eur J Cancer Clin Oncol, 24:377-384, 1988
- 25) Anderson J, Poulsen HS: Immunohistochemical estrogen receptor determination in paraffin-embedded tissue-prediction of response to hormonal treatment in advanced breast cancer. Cancer 64: 1901-1908, 1989
- 26) Grem JL: Fluorinated pyrimidines. In: Chabner BA, Collins JM (eds). Cancer Chemotherapy, Principles and practice. Philadelphia PA Lippincott 180-224, 1990
- 27) Danenberg PV: Thymidylate synthase. A target enzyme in cancer chemotherapy. Biochem Biophys Acta 473:73-92, 1977
- 28) Washtien WL: Increased levels of thymidylate synthase in cells exposed to 5-fluorouracil. Mol Pharmacol 25:171-177, 1984
- 29) Berger SH, Chung-Her J, Johnson LF, Berger FG, et al: Thymidylate synthase overproduction and gene amplification in fluorodeoxyuridine-resistant human cells. Mol Pharmacol 28:461-467, 1987
- 30) Clark JL, Berger SL, mittelman A, Berger FG: Thymidylate synthase gene amplification in a colon tumor resistant to fluoropyrimidine chemotherapy. Cancer Treat Rep 71:261-265, 1987
- 31) Johnston PG, Drake JC, Trepel J, et al: Immunological quantitation of thymidylate synthase using the monoclonal antibody TS106 in 5-fluorouracil-sensitive and -resistant human cancer cell lines. Cancer Res 52:4306-4312, 1992
- 32) Swain SM, Lippman ME, Egan EF, et al: 5-Fluorouracil and high-dose leucovorin in previously treated patients with metastatic breast cancer. J Clin Oncol 7:890-899, 1989
- 33) Chu E, Zinn S, Boarman D, Allegra CJ: The interaction of γ interferon and 5-fluorouracil in the H630 human colon carcinoma cell line. Cancer Res 50:5834-5840, 1990
- 34) Chu E, Keller DM, Johnston PG, et al: Regulation of thymidylate synthase in human colon cancer cells treated with 5-fluorouracil and interferon-gamma. Mol Pharmacol 43:527-533, 1993

- 35) Johnston PG, Liang CM, Henry S, Chabner BA, Allegra CJ: Production and characterization of monoclonal antibodies that localize human thymidylate synthase in the cytoplasm of human cells and tissue. *Cancer Res* 51:6668-6676, 1991
- 36) Lenz HJ, Leichman CG, Danenberg KD, Danenberg PV, Groshen S, Cohen H, et al: thymidylate synthase mRNA level in adenocarcinoma of the stomach: a predictor for primary tumor response and overall survival. *J Clin Oncol* 14:176-182, 1996
- 37) Conrad AH, Ruddle FH: Regulation of thymidylate synthase activity in cultured mammalian cells. *J Cell Sci* 10:471-486, 1972
- 38) Johnson LF: Expression of dehydrofolate reductase and thymidylate synthase in mammalian cells. In: Stein GS, Stein JL: Recombinant DNA and cell proliferation. New York: Academic Press 25-47, 1984
- 39) Jenh CH, Rao LG, Johnson LF: Regulation of thymidylate synthase enzyme synthesis in 5-fluorodeoxyuridine resistant mouse fibroblasts during the transition from the resting to growing state. *J Cell Physiol* 122:149-154, 1985
- 40) Pestalozzi BC, McGinn CJ, Kinsella TJ, Drake JC, et al: Increased thymidylate synthase protein levels are principally associated with proliferation but not cell cycle phase in asynchronous human cancer cells. *Brit J of Cancer* 71:1151-1157, 1995
- 41) Yamachika T, Nakanishi H, Inada K, Kato T, et al: A new prognostic factor for colorectal carcinoma, thymidylate synthase, and its therapeutic significance. *Cancer* 82:70-77, 1998