

유방암에서 Epstein-Barr Virus 발현의 임상적 의의

가톨릭대학교 의과대학 의정부성모병원 외과학교실

김태형 · 이준현 · 서학준 · 김기환 · 김지일 · 안창혁
박우찬 · 송병주 · 오세정 · 정상설 · 임근우 · 김정수

Clinical Significance of Epstein-Barr Virus Expression in Breast Cancer

Tae Hyoung Kim, Jun Hyun Lee, Hak Jun Seo, Ki Hawn Kim, Ji Il Kim, Chang Hyuck An, Woo Chan Park, Byung Joo Song, Se Jeong Oh, Sang Seol Jung, Keun Woo Lim, and Jeong Soo Kim

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

Purpose: Epstein-Barr Virus (EBV) is well understood as an oncogenic virus in human tumors. Its association with breast cancers has been reported but is still in controversy. So we have examined the expression of EBV in breast cancers and evaluated the relationship between the well-known prognostic factors of breast cancer and EBV expression.

Methods: A retrospective study was conducted with patients who had been re-evaluated to confirm the diagnosis based on immunohistochemical analysis with EBNA-2 expression, between January 1991 and December 2002. The cases were assigned to the positive lesion that displayed 10% or more of immunoreactive cells.

Results: The expressions of EBNA-2(Ebstein Barr virus nuclear antigen - 2) were noted in 26 (21.1%) out of 123 cases of breast cancer patients and 4 (20%) out of 20 cases in a control group of benign tumors. The expression of EBV in breast cancers and that of a control group were not different significantly. But, the correlation between the expression of EBNA-2 and ER status was noted statistically significant (P=0.040).

Conclusion: Judging from the results of our study, EBV infection detected in breast cancer seems to be latent and

the association of EBV to breast cancer is less likely related. (*Journal of Korean Breast Cancer Society* 2004;7:161-165)

Key Words: Epstein-Barr Virus (EBV), EBNA-2, Breast cancer

중심 단어: 엡스타인-바 바이러스, 엡스타인-바 바이러스 핵 항원-2, 유방암

서론

유방암은 우리나라에서 증가추세를 보이는 암으로서 발생에 관련된 여러 인자가 조사되고 있다. 이 중 유방암 발생에서 호르몬 효과와 유전적인 배경이 유방암 발생에 있어서 주요한 역할을 할 것으로 추정되고 있다. 최근 유방암의 발생에서 Epstein-Barr Virus (EBV)의 관련 가능성이 1995년 Labrecque 등에 의해 처음 보고되었고,(1) 이후 EBV의 유방암 발생에 있어서의 연관성 유무가 다양하게 보고되고 있으나 지역적 인종적 요인의 영향으로 명확하지 않다. Epstein-Barr Virus (EBV)는 herpes virus 종이며, 성인의 90% 이상에서 무증상 감염된 광범위한 병원소이다. EBV는 Burkitt 임파종, Hodgkin 질환, 인후암,(2) 위암(3)등 다양한 악성 종양과 연관이 있는 것으로 알려져 있으며 이외에도 여러 종양의 발생과 연관성 유무에 관한 많은 보고가 있었다.(2,3)

최근 유방암과 EBV 사이의 연관성을 조사하는 연구들은 상호 상반된 결론을 보이고 있다. 몇몇 연구들은 EBV 계놈의 분자학적인 증거를 갖는 유방암이 20~50% 정도라고 보고하고 있으며,(3,4) 반면 또 다른 연구들은 EBV와 유방암의 발생 사이의 연관성에 대한 어떠한 분자학적 또는 면역조직학적인 증거도 없다고 보고하고 있다.(5)

저자들은 우리나라 여성 유방암에서 EBV의 발현 빈도와 유방암에 있어서 예후 인자들, 즉 ER, PR, HER2/neu와의 연관성을 알아보고 이에 따른 임상적 의의를 알아보고자 하였다.

책임저자 : 김정수, 경기도 의정부시 금오동
☎ 480-130, 의정부성모병원 외과
Tel: 031-820-3048, Fax: 031-847-2717
E-mail: drbreast@catholic.ac.kr

접수일 : 2004년 6월 1일, 게재승인일 : 2004년 8월 31일

방 법

1) 대상

1994년 1월부터 2002년 12월까지 가톨릭대학교 의정부 성모병원에서 유방 중양으로 수술한 환자 중 조직 병리 검사에서 유방암으로 확진된 환자에서 조직의 고정 및 보관 상태가 양호한 환자 123명(19~84세, 평균연령 49.5세)을 대상으로 면역조직화학검사를 이용하여 EBV 감염의 지표인 EBNA (Ebstein-Barr virus nuclear antigen)-2의 암조직내에서의 발현 유무를 검토하였고, 대조군으로 유방 섬유선종 20예에서의 EBNA-2 발현 유무를 조사하였다. 대상 환자들은 EBV 발현 유무에 따라 각각 재발유무와 ER, PR, HER2/neu 와의 발현 유무에 따라 통계 분석하였다.

2) 면역조직화학 염색 방법

수술 후 얻어진 포르말린 고정 파라핀 포매 조직을 4µm 두께로 박절한 후 건조용 오븐에 넣어 90분간 55~59°C로 처치하고 xylene과 100%, 85%, 70%, 50% 알코올을 사용하여 탈파라핀 과정을 시행하였다. 10 mM citrate buffer pH 6.0에 넣어 micro wave를 이용하여 15분간 끓인 후 충분히 식힌 후 H₂O₂를 이용하여 peroxydase을 봉쇄시켰다. 1차 항체는 EBNA2 (1 : 35) (Dako)를 이용하였으며, 실온에서 2시간 반응시켰다. 2차 항체와 streptavidine peroxydase는 HistoStain-Plus Kit (Zymed, San Francisco, CA)을 이용하여 각 10분씩 실온에서 반응시켰다. 발색시약으로는 DAB를 이용하였고 Hematoxylin으로 대조염색한 후 cana-balsam으로 봉입하였다.

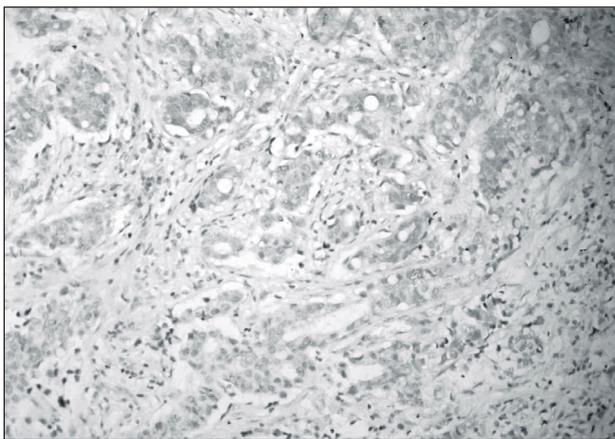


Fig. 1. The immunohistochemical staining shows intense brownish granular cytosomal staining in breast cancer tissue (×400).

3) 면역조직화학 염색의 판독

면역조직화학 염색이 시행된 표본을 광학 현미경(×400)으로 관찰한 표본 중에서 3군데 이상을 관찰하여 세포군의 10% 이상 염색된 것을 EBNA-2 양성으로 하여 판독하였다(Fig. 1, 2).

4) 통계 분석

EBV의 발현에서 악성과 양성군 사이의 위험성을 Odds ratio를 구하여 검정하였고 Cox's proportional hazard regression model을 이용한 다변량 분석을 시행하여 EBV 발현과 임상적 인자와 재발, HER2/neu, ER, PR과의 상관 관계를 분석하였으며 유의 수준은 P<0.05로 하였다.

결 과

1) 임상 결과

총 123명의 환자에서 발생 연령층은 31세에서 84세까지로 다양하였으며 중양 연령은 57.5세였고, 환자들의 병기는 1기에서 4기까지 다양한 분포를 보였으며 1기 35명(28.5%), 2기 61명(49.6%), 3기 24명(19.5%), 4기 3명(2.4%)을 나타내었다. 유방암군에서 EBNA-2 양성 반응을 보인

Table 1. Significance of EBV expression on breast tumor

	EBV positive	Odds ratio
Breast cancer (n=123)	26 (21.2%)	1.07
Fibroadenoma (n=20)	4 (20.0%)	

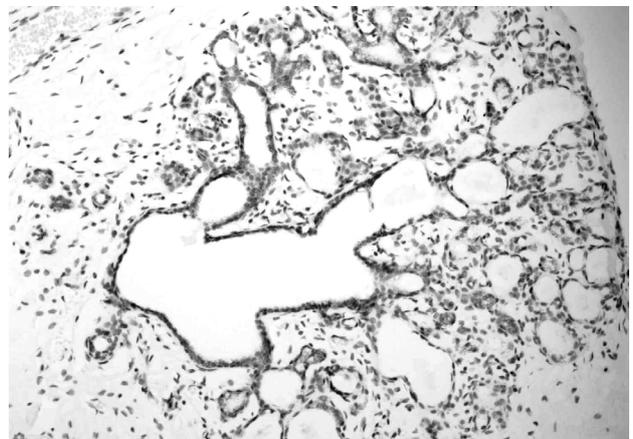


Fig. 2. The immunohistochemical staining shows dark brownish staining in breast benign tissue (×200).

Table 2. Associations of patients' age to EBV status (Pearson chi-square: P=0.586)

Sum		Number	Mean age
Age	EBV (-)	92	49.7
	EBV (+)	31	51.0

Table 3. Associations of disease stage to EBV status (Pearson chi-square: P=0.189)

Stage	Stage I Count	Sum		Total
		EBV (-)	EBV (+)	
	24	11	35	
	% within			
	SUM	26.1%	35.5%	28.5%
Stage II	Count	49	11	60
	% within			
	SUM	53.3%	35.5%	48.8%
Stage III	Count	16	9	25
	% within			
	SUM	17.4%	29.0%	20.3%
Stage IV	Count	3		3
	% within			
	SUM	3.3%		2.4%
Total	Count	92	31	123
	% within			
	SUM	100.0%	100.0%	100.0%

환자는 26예(21.1%)였고, 양성종양군에서 EBNA-2 양성 반응을 보인 환자는 4예(20%)로 Odds ratio는 1.07을 보여 유방암과 양성종양의 대조군 사이의 EBV 감염으로 인한 유방암 발생에 관한 EBV의 위험성에는 통계적 차이를 보이지 않았다(Table 1).

2) 예후 인자들의 다변량 분석

Cox's proportional hazard regression model을 사용하여 환자의 연령, 병기, 재발, HER 2/neu, ER, PR을 변수로 다변량 분석을 시행한 결과 임상적 인자와 재발과의 연관성은 없었으며, HER 2/neu, PR과 EBV발현과의 통계학적인 상관관계는 보이지 않았다. 단지 EBV감염에서 ER 발현과의 연관성이 통계학적으로 유의하였다(Odds ratio, 0.040) (Table 2~4).

Table 4. The relationship of prognostic factors to EBV status

	EBV positive	EBV negative	P-value
Recurr	1 (3.8%)	16 (16.5%)	0.097
No recurr	25 (96.2%)	81 (83.5%)	
HER 2/neu (+)	4 (28.6%)	15 (23.8%)	0.709
HER 2/neu (-)	10 (71.4%)	48 (76.2%)	
ER (+)	7 (26.9%)	48 (49.5%)	
ER (-)	19 (73.1%)	49 (50.5%)	0.040
PR (+)	9 (34.6%)	46 (47.9%)	0.227
PR (-)	17 (65.4%)	50 (52.1%)	

고 찰

EBV는 널리 산재한 인간 herpes virus의 한 종류로서 전염성 단핵세포증을 유발한다. 이는 Bukitt's 임파종, Hodgkin's 임파종, 면역억제환자에서 B-cell 임파종 그리고 인후두암과 같은 다양한 악성종양들과 연관이 있다고 보고된 바 있다.(2,3) 또한 위암, 면역억제환자에서 평활근육종, T-cell 임파종, 침샘, 폐 그리고 흉수에서 림프상피종과 같은 종양들과 연관이 있는 것으로 알려져 있으며 유방종양에 있어서도 EBV의 발견이 여러 연구 결과에서 보고되었다.(2,9-13)

유방암은 여성에 있어서 가장 흔한 악성종양이며 암으로 인한 사망의 주요 원인으로 알려져 있고,(3,5) 우리나라에서도 최근 증가 추세를 보이고 있다. 유방암의 병인론은 아직 잘 밝혀져 있지는 않지만 유전적이고 호르몬적인 요소가 질환의 발전에 있어 중요한 역할을 하고 있을 것으로 믿어진다. 최근 몇몇 연구자들은 유방암의 발전에 있어서 EBV의 역할에 의문을 제기하고 있고 이는 아래의 몇몇 고찰에 근거하고 있다.

첫째, 유두상암으로 알려진 유방암의 아형은 우세한 림프세포 침윤을 갖는 림프상피종과 같은 특징을 보이며, 다른 장기(특히 전장으로부터 기원하는)에서 발생하는 림프상피종과 같은 악성 종양이 흔히 EBV에 양성인 점, 둘째, 최근 EBV에 감염된 모체에서 모유 속으로 EBV가 분리되어 확인되는 점, 셋째, EBV와 연관된 림프종이 유방에서 발생하고 있다는 점이다.(14)

유방암에서 EBV의 연관 가능성은 1995년 Labrecque 등(1)에 의해 보고된 후 유방암 발생에서 EBV의 연관성 유무에 관해서 많은 보고가 있었다. EBV는 대부분의 성인에서 잠재 감염되어있는 것으로 알려져 있으며, 잠재 감염 시 지표인 EBNA, EBER (Epstein-Barr virus encoding RNA), LMP (Latent membrane protein) 등으로 확인할 수 있다. 중

양 조직에서 EBV의 존재 유무는 연쇄중합반응(PCR), In situ hybridization, 면역조직화학검사 등으로 발견할 수 있다.(1,4,5) 본 조사에서는 면역조직화학검사를 이용하여 조직에서의 EBNA-2 발현으로 EBV의 종양 세포 내에서의 존재 유무를 확인하였다. EBV 존재유무의 확인에서 저자들에 따라 다양한 방법이 시행되었고 각각의 검사에 대한 신뢰성이 논의 중이다. Labrecque 등(1)은 영국 유방암 환자에서 DNA PCR 방법으로 EBER-1, EBER-2를 확인하여 EBV의 관련성을 제기하였고, Luqmani 등(4)도 PCR을 이용하여 영국 유방암 환자에서 EBV의 발현을 보고하였다. Bonnet 등(5)은 DNA PCR을 이용하여 프랑스 유방암 환자에서 EBER-2, LMP-2 발현을 확인하고, PCR로 EBV 발현이 확인된 검체에 대한 면역조직화학검사를 시행하여 EBV의 존재를 확인하였다. Fina 등(15)은 유방암에서 EBV의 지역적 분포에 따른 감염률의 빈도를 조사하였으나 지역에 따른 감염 빈도에는 차이가 없었고, EBV 양성인 유방암에서 EBV 유전체의 양이 EBV감염률이 높은 지역에서 높은 것으로 보고하였다. 반대로 Dadmanesh 등(16)은 임파상피성 유방암에서 EBV와의 연관성을 조사하였으나 EBV의 감염이 확인되지 않았고, Chu 등(17)도 EBV와 연관성이 있는 인후암의 발생이 높은 대만에서 유방암환자를 대상으로 in situ hybridization을 이용한 EBER, 면역조직화학검사를 이용한 EBNA-2, LMP-1 발현을 조사하였으나 EBV의 감염 증거가 없는 것으로 보고하였다. Deshpande 등(18)도 EBERs, EBNA1, LMP1, LMP2A 같은 다양한 EBV 염색체 산물을 확인하여 유방암에서의 EBV발현 유무를 조사하였으나 확인되지 않았고, Herrmann과 Niedobit (19)은 유방암에서 EBV의 연관성이 없다고 보고하였다. 저자들의 경우 유방암과 양성 섬유선종에서의 발현 빈도에서 통계적인 차이가 없는 것으로 나타났고 유방암발생에서 EBV의 연관성이 낮을 것으로 의심되나 앞으로 더 민감한 EBV검사법의 개발과 많은 조사가 필요할 것으로 생각된다.

유방암에서 다양한 예후 인자들과 EBV발현과의 상관 분석에서 Bonnet 등(5)은 EBV에 양성을 보인 군이 음성을 보인 군에 비하여 호르몬 수용체의 발현이 낮았다고 보고하였다. 저자들의 경우에서도 ER 발현 음성인 경우가 EBV 발현과 연관성이 있는 것으로 나타났다. ER 수용체의 발현에 있어서 EBV의 연관성은 예후를 예측하는 지표로 유효성의 의미를 지닐 수도 있을 것이다. 유방암에서 EBV 감염의 유방암 발생에서의 역할과 예후 인자와의 관련성은 논란 중이며 저자들의 예에서는 HER/neu와 같은 예후인자들과 EBV 감염과의 연관성은 확인되지 못하였으나 EBV 감염과 유방암과의 연관성 유무에 관한 많은 보고에서 보듯이 EBV감염을 확인하는 검사 방법 중 보다 객관적이고 특이적인 검사법의 개발을 통한 보다 많은 조사가 필요할 것으로 생각된다.

결 론

상기의 결과에서 나타난 바와 같이 유방암과 EBV의 발현과의 연관성은 아직 명확하게 밝혀지지 않고 있다. 그러나 유방암에서 EBV 발현과 에스트로젠 수용체 발현과의 연관성이 있음을 나타내 주고 있듯이 유방암에서 EBV의 발현과 이에 따른 다른 예후인자들과의 연관성은 앞으로 더 많은 조사를 통해 밝혀지리라 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Labrecque LG, Barnes DM, Fentiman IS, Griffin BE. Epstein-Barr virus in epithelial cell tumors: a breast cancer study. *Cancer Res* 1995;55:39-45.
- 2) Rickinson AB, Kieff E. Epstein-Barr virus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. p.2397-446.
- 3) Imai S, Koizumi S, Sugiura M, Tokunaga M, Uemura Y, Yamamoto N, et al. Gastric carcinoma: monoclonal epithelial malignant cells expressing Epstein-Barr virus latent infection protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:9131-5.
- 4) Luqmani YA, Shousha S. Presence of Epstein-Barr virus in breast carcinoma. *Int J Oncol* 1995;6:899-903.
- 5) Bonnet M, Guinebretiere JM, Kremmer E, Grunewald V, Benhamou E, Contesso G, et al. Detection of Epstein-Barr virus in invasive breast cancers. *Journal of the National Cancer Institute* 1999;91:1376-81.
- 6) Niedobitek G, Hansmann ML, Herbst H, Young LS, Dienemann D, Hartmann CA, et al. Epstein-Barr virus and carcinomas: undifferentiated carcinomas but not squamous cell carcinomas of the nasopharynx are regularly associated with the virus. *J pathol* 1991;165:17-24.
- 7) Lespangnard L, Cochaux P, Larsimont D, Degeyter M, Velu T, Heimann R. Absence of Epstein-Barr virus in medullary carcinoma of the breast as demonstrated by immunophenotyping, in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol* 1995;103:449-52.
- 8) Dadmanesh F, Peterse JL, Sapino A, Fonelli A, Eusebi V. Lymphoepithelioma-like carcinoma of the breast: lack of evidence of Epstein-Barr virus infection. *Histopathology* 2001;38:54-61.
- 9) Brocksmith D, Angel CA, Pringle JH, Lauder I. Epstein-Barr viral DNA in Hodgkin's disease: amplification and detection using the polymerase chain reaction. *J Pathol* 1991;165: 11-5.
- 10) Chen CL, Wen WN, Chen JY, Hsu MM, Hsu HC. Detection of Epstein-Barr virus genome in nasopharyngeal carcinoma by in situ DNA hybridization. *Intervirology* 1993;36:91-8.
- 11) Takada K. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *Mol Pathol* 2000;53:255-61.

-
- 12) Sugawara Y, Mizugaki Y, Uchida T, Torii T, Imai S, Makuuchi M, et al. Detection of Epstein-Barr virus in hepatocellular carcinoma tissue. *Virology* 1999;256:196-202.
- 13) Grinstein S, Preciado MV, Chabay PA, Warren WH, Matett ED, Gould VE. Demonstration of Epstein-Barr virus in carcinomas of various sites. *Cancer Res* 2002;62:4876-8.
- 14) Luqmani YA, Shousha S. Presence of Epstein-Barr virus in breast carcinoma. *Int J Oncol* 1995;6:899-903.
- 15) Fina F, Romain LH, Palmari J, Ayed FB, Bonnier P, Sphyratos F, et al. Frequency and genome load of Epstein-Barr virus in 509 breast cancers from different geographical areas. *Br Cancer* 2001;84:783-90.
- 16) Dadmanesh F, Peterse IL, Fonelli A, Eusebi V. Lymphoepithelioma-like carcinoma of the breast: lack of evidence of Epstein-Barr infection. *Histopathology* 2001;38:54-61.
- 17) Chu JS, Chen CC, Chang KJ. In situ detection of Epstein-Barr virus in breast cancer. *Cancer Letters* 1998;124:53-7.
- 18) Deshpande CG, Badve S, Kidwai N, Longnecker R. Lack of Expression of the Epstein-Barr virus gene products, EBEBs, EBNA1, LMP1 and LMP2A, in breast cancer cells. *Laboratory Investigation* 2002;82:1193-9.
- 19) Herrmann K, Niedobitek G. Lack of evidence for an association of Epstein-Barr virus infection with breast carcinoma. *Breast Cancer Res* 2003;5:13-7.
-