

단측성 염색체 소실에 근거한 유방암의 유전적 분류

가톨릭대학교 의과대학 미생물학교실, ¹외과학교실, ²내과학교실, ³병리학교실

조현아 · 유문간 · 최승혜¹ · 윤상섭¹ · 이 성¹ · 정상설¹ · 최상욱² · 서은주³

Genetic Classification of Breast Cancer based on Unilateral Chromosomal Loss

Hyun-A Cho, Mun-Gan Rhyu, Seung-Hye Choi¹, Sang-Seob Yun¹, Seong Lee¹, Sang-Seol Jung¹, Sang-Wook Choi², and Eun-Joo Seo³

Departments of Microbiology, ¹Surgery, ²Internal Medicine, ³Pathology, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Purpose: The extent of the loss of heterozygosity (LOH) has been used as the genetic parameter for the classification and staging of some solid tumors. Breast cancers such as ductal carcinoma in situ (DCIS), and invasive and metastatic lesions, are frequently observed to contain heterogeneous tumor foci. To delineate the relation between the LOH and the progression of breast cancers, three successive histological sites in a tumor lesion were analyzed for LOH events.

Methods: We tested 111 tumor site including DCIS, and invasive, and metastatic lymph nodes from 50 breast cancers for LOH using 5 microsatellite makers on 8 chromosomal arms (3p, 4p, 5q, 8p, 9p, 13q, 17p, & 18q).

Results: Twenty-four of 34 breast cancers showing intratumoral histological heterogeneity had common chromosomal losses in the heterogeneous tumor sites, as well as having divergent losses that were restricted to a part of tumor lesion (mean divergent loss, 2.32). The number and frequency of heterogeneous chromosomal losses were not significantly related with age, tumor size, and stage. Overall, at least one chromosomal loss was detected in 48 cases, and incidences of LOH in each chromosome were 27.1~63.3%. A large fraction (58%) of breast cancer patients had 2 to 4 chromosomal losses, and chromosome 8p was most frequently lost (63%).

When comparing the number of chromosomal losses in nine cases with all of three progressive lesions, the lost extent was greater in the DCIS (mean losses, 4.44) than in the invasive sites (mean losses, 3.1) and the metastatic lymph nodes (mean losses, 2.9). Moderate-level chromosomal losses involving 3-5 chromosomes were significantly related with lymph node metastasis ($p=0.006$) and the advanced tumor stage ($p<0.005$), whereas low-level losses involving 1~2 chromosomes and high-level losses involving 6~7 chromosomes were more common in DCIS and early-stage diseases.

Conclusion: The DCIS, invasive, and metastatic sites of a breast cancer patient contained common and divergent chromosomal losses. This indicates the concurrent expansion of different subclones was derived from a common ancestor clone, in which an optimal range of chromosomal losses, rather than high-level chromosomal losses, was more frequently associated with lymph node metastasis and the advanced tumor stages. (*Journal of Korean Breast Cancer Society* 2004;7:217-227)

Key Words: Breast cancer, Loss of heterozygosity

중심 단어: 유방암, 이형접합성소실

서론

유방암은 서양에서는 여성에게 발병하는 가장 흔한 악성 종양이며, 우리나라에서도 1990년대 여성에게 발생하는 악성 종양 중 위암과 자궁 경부암에 이어 세 번째로 높은 발생 빈도를 보이다가 사회 전반적인 생활 환경과 관습 및 질병 양상의 서구화와 더불어 점차 증가하여 2000 년대에 들어서는 가장 많이 발생하는 질병으로 보고되었다.

악성 종양은 복잡하고 다양한 세포의 유전적 변이에 의하여 발생 및 진행하는 것으로 여기에 관여하는 대표적인 유전인자를 크게 두 가지로 분류하여, 암유전자(oncogene)의 활성화와 암억제유전인자(tumor suppressor gene)의 불활성화에 의한 것으로 알려지고 있다.(1) 암의 세포유전학적 연구는 암의 발병 원인과 기전을 밝혀내고 암의 진행

책임저자 : 최승혜, 서울시 동대문구 전농동 620-56

☎ 130-709, 성바오로병원 외과학교실

Tel: 02-958-2135, 2454, 2437, Fax: 02-958-2136

E-mail: gsshchoi@catholic.ac.kr

접수일 : 2004년 9월 25일, 게재승인일 : 2004년 11월 5일

과정을 이해하여 다양한 임상 양상을 설명하고 효과적인 치료와 관리에 도움이 되고자 함이다.

유방암은 일반적으로 암종의 크기, 액와부 림프절 전이 및 원격전이 여부에 의한 임상병기에 따라서 치료하며 또한 예후를 평가하고 있지만 기대하지 않은 치료 결과를 보이는 경우도 많다. 또한 유방암은 약 90%가 침습성관암으로 비교적 일정한 조직 병리학적 형태로 표현되지만 실제 암조직의 구성과 임상적 양상은 매우 비균질적 (heterogeneous)이며 다양하다.(2) 이에 따라서 유방암의 예후를 좀더 명확하게 예측할 수 있는 예후 인자로 유방암을 분류하고 이에 따른 치료를 위하여 많은 연구자들이 노력하고 있다.

유방암에서도 c-myc, erb-B2 및 INT2와 같은 암유전자의 증폭(amplification)과 BRCA1, BRCA2 및 p53 등의 암억제 유전인자의 유전적 변이에 대한 세포유전학적 연구들이 이루어지고 있는데, 특히 암억제 유전자의 이형접합성소실 (Loss of Heterozygosity)은 원발성 유방암의 약 21-51%에서 발견되어 유방암에서 나타나는 가장 흔한 유전적 변이로 알려져 있다.(3) 유방암 뿐만 아니라 위 혹은 대장등의 타 장기에서도 암억제유전인자들이 위치하는 것으로 알려진 염색체 소실은 높은 빈도로 발견된다.(4,5) 염색체 소실은 거의 모든 고형암에서 가장 흔하게 나타나는 유전자 변형으로 위장관 암에서는 특정 유전자의 개별적인 소실보다는 전체 염색체의 소실 범위가 더욱 의미가 있음을 여러 연구들에서 보고하고 있다.(6-8) 염색체 소실범위는 암세포의 침습과 전이 정도 및 예후와 밀접한 관련성이 있으며 고위험 혹은 저위험 유전자형으로 유전자 병기 기준을 제시하기도 하였다. 암세포의 조직학적 분화도와 형태가 매우 이질적인 병변에서 상이한 염색체 소실이 발견되지만 한 병변내에 존재하는 염색체의 소실 정도는 같거나 유사하여 염색체 소실 범위는 다양한 암진행에 있어서 중심적 역할을 하는 것으로 보인다. 이런 연구내용을 근거로 볼 때 생검 조직에서도 전체 병변을 대변하는 염색체 소실 범위를 알 수 있으며 수술 전 유전자 진단도 가능하므로 임상적 유용성은 크다고 기대된다.

유방암의 임상적, 유전자형 다양성을 상이한 개별 염색체 소실 또는 염색체 소실 범위로서 분석한 보고가 있으며 염색체 소실이 유방암 발생과 다양한 진행에 중요한 역할을 한다고 본다. 따라서 유방암을 형태학적 특성에 근거하여 지금까지 일반적으로 이용되던 조직 병리학적인 분류에서 예측하지 못했던 암의 진행과 치료 결과들을 설명할 수 있다고 기대한다. 그러나 이질적 병변으로 구성된 유방암이 전암성 병변으로부터 관상피내암에서 침습성관암으로 진행되는 과정에서의 염색체 소실 범위는 아직 알려진 바가 없으며 염색체 소실 범위와 암 병기의 관련성도 아직 명확하지 않다. 본 연구에서는 관상피내암, 침습성관암, 림프절전이를 보이는 한 환자로부터 이질적

병소를 구분하여 염색체 소실 범위를 조사하는 다병소 분석(multifocal analysis)을 통해서 염색체 소실과 유방암 진행 과정과의 관계를 밝히고자 한다. 위와 같은 목적으로 저자들은 유방암에서 빈번하게 염색체 소실을 보이거나 암억제유전인자가 위치한다고 알려진 염색체 3p, 4p, 5q, 8p, 9p, 13q 17p 및 18q 각각에서 5개의 단순반복염기서열 표지자를 이용하여 염색체 소실의 정도를 연구 분석하였다.

방 법

1) 연구대상

가톨릭 의과대학교 성바오로 병원에서 1996년 1월부터 2004년 1월까지 유방암으로 진단 받고 유방절제술을 시행 받았던 환자 중 50예를 연구대상으로 선택하였다. 모두 여자 환자였으며, 수술시 평균 연령은 50.8세(24~84세)였다. 50예의 환자를 American Joint Committee on Cancer (9)의 TNM staging에 따라서 분류하였으며, 암종의 크기와 림프절 전이에 따른 이형접합성소실의 관계를 비교하기 위해 암종의 크기와 전이된 림프절 수에 따라서 각각 다시 분류하였다(Table 1).

다병소 분석을 위해서 50예의 유방암 환자로부터 총 111개의 병소에서 조직을 채취하였는데, 각각은 관상피내암(DCIS) 22개, 침윤성관암 조직(IDC) 68개 및 전이된 림프절 21개(Lymph node metastases)였다. 특히, 10예의 환

Table 1. Clinicopathological characteristics of 50 cases of breast cancer

Characteristics	No. of cases
Total No. of cases (%)	50 (100)
Age (years)	
Mean±SD	50.8±13.8
Tumor size (cm)	
<2.0	4 (8.0)
2.0~4.9	38 (76.0)
≥5.0	8 (16.0)
Lymph node metastases	
0 (N0)	21 (42.0)
1~3 (N1)	13 (26.0)
4~9 (N2)	13 (26.0)
≥10 (N3)	3 (6.0)
TNM stage	
I	9 (18.0)
II	24 (48.0)
III	16 (32.0)
IV	1 (2.0)

자에서는 관상피내암, 침윤성관암, 전이된 림프절 모두에서 조직을 얻었다.

2) DNA추출 및 multiplex PCR을 이용한 DNA증폭

파라핀 블록에 고정된 조직을 5~7 μ m 두께로 절단하여 유리슬라이드에 고정한 후 정상 세포와 종양 세포를 구분하기 위하여 Hematoxylin & Eosin 염색을 하였다. 다병소 분석을 위해 동일한 환자의 암 조직 내에서 정상 조직 및 조직학적 또는 위치상 차이가 있는 다 병소 종양 조직(관상피내암, 침윤성관암, 전이된 액와 림프절)을 현미경 시야에서 단일 표본으로 구분하여 40배율의 입체 현미경 아

래에서 미세절제를 시행하였으며, 종양 조직은 전체 조직 중 65% 이상이 종양 세포임을 확인하였는데, 지금까지의 과정을 병리학 전문의로부터 검증 받았다. 미세절제한 단일 표본 조각은 Tween 20-Proteinase K lysis buffer에 용해하였다. 용해된 조직은 37°C에서 3시간, 50°C에서 9시간 방치한 후 95°C에서 5분간 Proteinase K를 비활성화 시켜준 후 PCR에 의한 DNA증폭에 사용하였다. PCR을 통한 주형 DNA의 증폭은 여러 표지자를 한번에 효율적으로 관찰할 수 있고, 온도 변화의 영향을 최소화할 수 있는 ‘다중법, 고온시작법’이 적용되었다. PCR에 이용된 표지자는 8개의 염색체완(3p, 4p, 5q, 8p, 9p, 13q, 17p, 및 18q)을 포

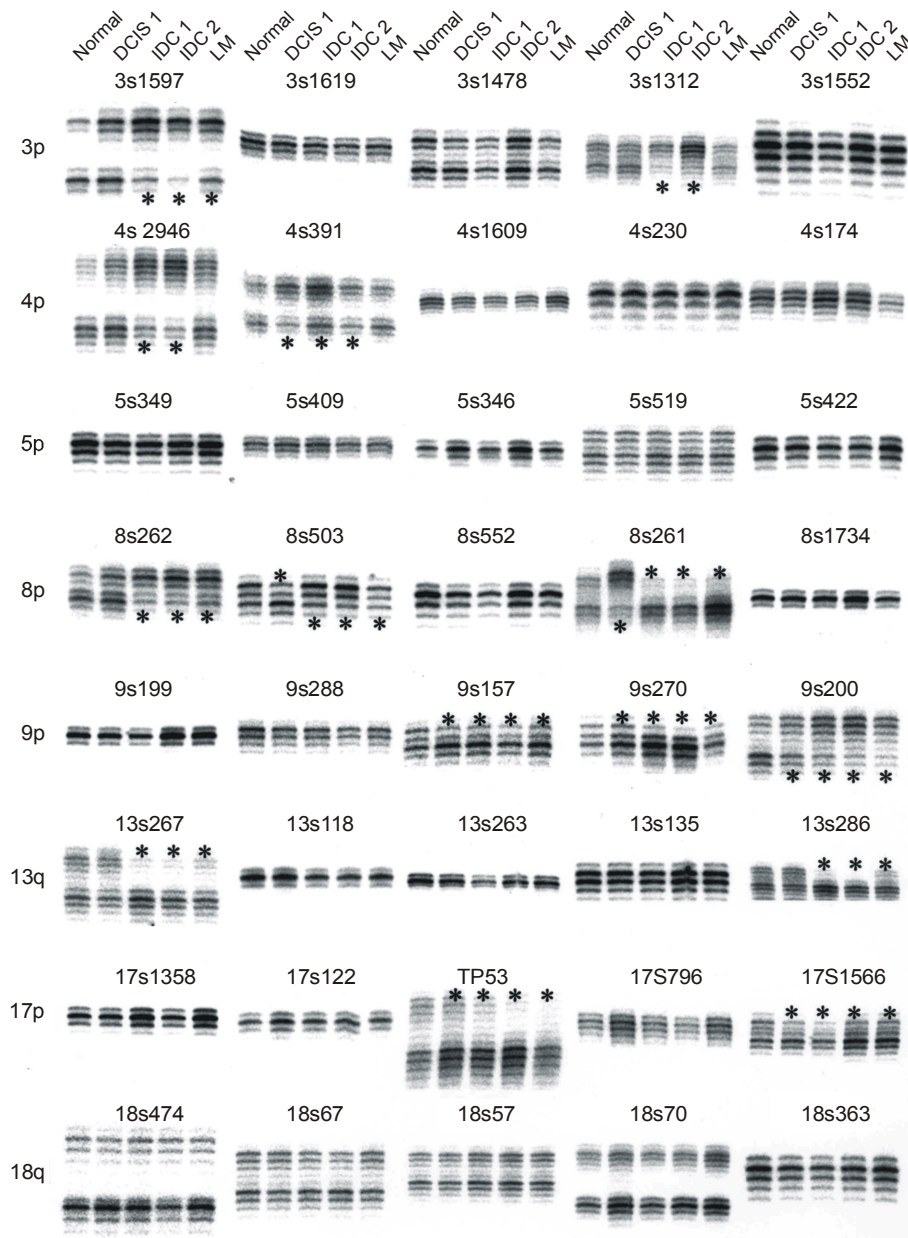


Fig. 1. Representative autoradiograph of case 34 examined by PCR-based microsatellite analysis. The loss of heterozygosity (LOH) is calculated by dividing the tumor allelic ratio by the normal allelic ratio. There are indicated by Normal (normal cell), DCIS1 (ductal carcinoma in situ), IDC1 (invasive ductal carcinoma), IDC2 (distinct focus of invasive ductal carcinoma), and LM (lymph node metastases). The asterisk indicates the LOH.

함하고 있으며, 한 염색체 당 5개의 표지자를 이루고 있다.(10-16) 반응온도가 같은 두 쌍의 표지자를 사용하는 multiplex PCR 과정으로 주형-표지자 혼합액을 가열 후 dNTP와 Taq DNA 중합효소를 첨가하며 증폭된 DNA는 ^{32}P -dCTP를 이용하여 방사능이 표지 되었다.

3) PCR 생성물의 확인 및 이형접합성소실 분석

PCR 생성물을 8 M urea를 포함하고 있는 polyacrylamide gel에서 1500 Volt로 3시간 전기 영동한 다음 radioluminograph scanner (BAS 2500, Fuji Photo Film Co. Ltd. Kana-kawa, Japan)를 이용하여 확인하였다(Fig. 1).

이형접합성소실의 분석은 정상 DNA의 이형 대립 유전자 띠(band)의 상호 비율에 대한 종양 DNA의 대립유전자 띠의 상대적 비율을 계산하여 이형접합성소실을 판정하였다. 이형접합성소실 양성을 보인 예들에서 종양 세포의 구성 비율이 70~80%, 80~90% 그리고 90% 이상 증가함에 따라 소실이 일어난 대립 유전자 띠의 강도는 감소하는 경향이 뚜렷하였다. 종양 세포의 비율이 낮은 경우에도 염색체 결손을 의미하는 띠 강도의 감소는 정상 대립 유전자 띠 강도와 비교할 때 상대비 환산값(cut off point) 0.65에서 가장 구분이 잘 되었다.(17) 이 환산값은 종양 세포의 구성 비율에 따라 이형접합성소실을 결정하는 최저 경계선으로 적용되었으며, 완전한 소실을 보인 대립 유전자 띠는 육안으로 식별이 가능했다.(12) 주어진 병변 내 모든 병소에서 공통된 염색체 소실을 갖는 것을 원발성 이형접합성소실(primary LOH)이라 하였으며, 반면에 상이한 염색체 소실을 갖는 것을 속발성 이형접합성소실(secondary LOH)이라 하였다(Fig. 2).

4) 통계적 분석

통계처리는 Windows용 SPSS 11.0 프로그램을 사용하였다. 임상 병리학적 변수와 단일 염색체간의 상관관계에

대한 통계적 유의성 검증은 Kruskal Wallis non-parametric test와 one-way ANOVA로 하였으며, 임상 병리학적 변수와 3개의 levels(수준)간의 분석은 one-way ANOVA와 χ^2 를 이용하였다. 통계적 유의성은 P값이 0.05 이하인 경우로 하였다.

결 과

1) 유방암에서의 유전적 이질성(genetic heterogeneity).

단일 유방암 내 여러 병소에서 염색체내 소실 정도를 알아보기 위해 이전에 연구된 암 관련 염색체 3p, 4p, 5q, 8p, 9p, 13q, 17p 및 18q에서 각각 5개씩 전체 40개의 단순 반복염기서열 표지자를 이용하여 분석하였다.

총 50예의 111개 병소에서 실험결과 MSI(microsatellite instability)는 발견되지 않았으며, 총 888개의 염색체를 검사하여 506개의 염색체에서 대립유전자소실이 관찰 되었다. 이중 399개(79%)에서는 2개 이상의 대립유전자소실을 보인 경우로 constitutional loss에 해당하며, 나머지 107개(21%)에서는 단일 대립유전자소실을 보이는 interstitial loss였다. 본 실험에서는 2개 이상의 대립유전자소실이 있는 constitutional loss를 유의한 유전체 용량(genomic dosage) 감소를 보이는 염색체 소실로 정의하였다(Table 2).

50예 중 34예에서 두 개 이상의 병소를 포함한 다 병소 분석이 이루어졌다. 이중 10예(5, 7, 12, 16, 20, 33, 36, 45, 2K 그리고 7K)는 다병소에서 동일한 대립유전자소실을 보여 즉 병소간에 소실된 염색체 번호와 숫자가 일치하는 암종내 동질성(intratumoral homogeneity)을 나타냈다. 나머지 24예에서는 다른 병소간에 염색체 소실이 차이가 있어 암종 내 이질성(intratumoral heterogeneity)을 보였다. 24예 중 8예는 다른 염색체에서 염색체 소실이 발견되었으나 소실된 염색체 숫자가 동일하였고, 나머지 16예에서는 소실이 서로 다른 염색체에서 일어났으며 또한 그 숫자도

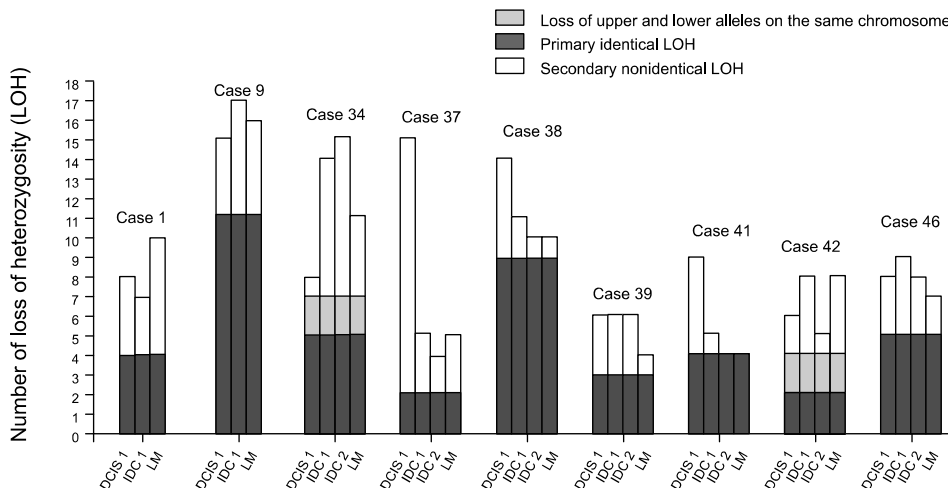


Fig. 2. Schematic diagram of the primary and secondary loss of heterozygosity (LOH) detected in nine cases with a breast cancer. Ductal carcinoma in situ (DCIS1), invasive ductal carcinoma (IDC1), distinct focus of invasive ductal carcinoma (IDC2), and lymph node metastases (LM) components in each case are compared for the number and clonality of the LOH.

Table 2. The results of multifocal microsatellite analysis on breast cancer (n=50)

	Chromosomes							No. of chromosoaml loss					Tumor stage						
	3p	4p	5q	8p	9p	13q	17p	18q	DCIS1	DCIS2	IDC1	IDC2	LN	I	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IV
33											7	7				●			
43									7		7	7					●		
12											7	7			●				
14											7				●				
5									7		7				●				
9									5		6		6				●		
34									3		6	6	4			●			
7									6		6				●				
15											5	5			●				
11									5		5		6			●			
51									6		5	5						●	
4											5		5					●	
49											5	5	3					●	
16											4		4				●		
29											4	4	4			●			
47											3	2	4			●			
46									3		4	3	3				●		
1									3		3		3				●		
36											3	3	3				●		
38									4		3	3	3				●		
45											3	3	3						●
32											1	2	3		●				
23									4							●			
42									3		2	2	4				●		
8											2		3				●		
17											2		3			●			
20											2		2			●			
37									5		2	2	2			●			
10									2		2				●				
27											2				●				
21									1	2	2			●					
24									4		1	2		●					
39									3		3	3	3					●	
41									4		1	1	1				●		
25											1	1		●					
1K											3					●			
2K											3	3					●		
3K											1			●					
4K											5				●				
5K											4					●			
7K											4	4				●			
8K											1			●					
9K											3				●				

Table 2. Continued

	Chromosomes								No. of chromosoaml loss					Tumor stage					
	3p	4p	5q	8p	9p	13q	17p	18q	DCIS1	DCIS2	IDC1	IDC2	LN	I	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IV
12K	■	■	■	□	□	□	□	■			4				●				
13K	■	■	■	■	■	■	■	■			6			●					
14K	■	■	□	□	□	■	□	■			3				●				
16K	■	■	■	■	■	□	□	□			5						●		
24K	■	□	□	□	□	□	□	■	1					●					
27K	□	□	□	□	□	□	□	□	0					●					
28K	□	□	□	□	□	□	□	□	0					●					
(%)	50	43.8	35.4	63.3	32	59.6	58.3	27.1	42	2	92	44	42	18	24	24	24	8	2

■ = constitutional chromosomal loss; ■ = interstitial chromosomal loss; □ = negative for LOH; ■ = loss of upper allele; ■ = loss of lower allele; □ = noninformative for LOH(loss of heterozygosity); DCIS1 = ductal carcinoma in situ; DCIS2 = distinct focus of DCIS1; IDC1 = invasive ductal carcinoma; IDC2 = distinct focus of IDC1; LN = lymph node metastase.

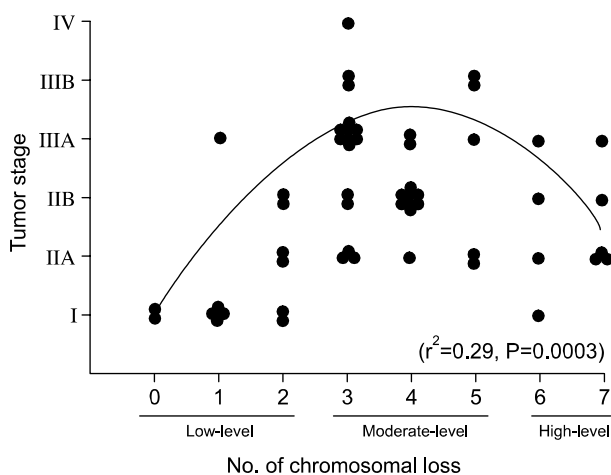


Fig. 3. Relationship between the tumor stage and the number of chromosomal losses or three-levels (low-level, moderate-level, high-level) in the breast cancer (n=50).

일치하지 않았다. 병소간에 염색체의 소실 수의 차이는 평균 약 2개로(Table 3), 암종 내 이질성을 보이는 24에도 염색체 소실의 정도가 같거나(8예) 비슷하였다(16예). 그리고 암종 내 이형접합성소실의 동질성과 이질성을 임상 병기, 암종의 크기 및 염색체 소실 정도에 따라서 비교 분석하였는데 의미 있는 연관 관계가 없었다(Table 3). 흥미롭게도, 암종 내 이질성을 보이는 4예(예 10, 34, 42, 그리고 43)에서 동일 염색체 내의 상이한 대립유전자가 병소간에 상호 소실되었다. 이들 호혜적(reciprocal) 염색체 소실은 암 진행에 따른 순차적 소실이라기보다는 암 발생 초기 동시에 분지되는 염색체 소실 과정을 의미한다.

단일 암종 내 서로 다른 병소간의 다른 이형접합성소실

을 보인 예에서 클론성(clonality)을 분석하기 위해서 소실된 염색체 종류와 숫자를 비교하였다(Fig. 2). 관상피내암, 침습성 관암 및 전이된 림프절 모두에서 조직을 채취하여 실험한 10예 중 9예에서 병소간에 이질적인 염색체 소실을 보였는데 동일한 염색체 소실도 반드시 공유하였다. 상이한 염색체 소실의 숫자를 비교하면 침습성관암(평균; 3.1)과 전이된 림프절(평균; 2.9)보다 관상피내암(평균; 4.4) 병소에서 가장 많았다(Fig. 2). 이와 같은 결과에서 3개 병소가 모두 동일한 염색체 소실을 공유하는 것으로 보아 동일한 기원에서 발생했다고 해석되며 추가적으로 상이한 염색체 소실에서 관상피내암이 오히려 더 많은 염색체 소실을 보였기 때문에 관상피내암-침습성관암-전이림프절의 진행순서는 반드시 성립되지 않았다. 호혜적 염색체 소실처럼 암 발생초기에 결정된 염색체 소실의 숫자에 따라 가장 악성적 범위에 속하는 염색체 소실을 갖는 암클론이 악성 진행을 계속하고 악성적 범위를 벗어나는 염색체 소실의 암클론은 침습성 또는 전이성 진행을 하지 못하는 결과로 해석되었다.

2) 이형접합성소실에 따른 유전적 분류

총 50예 중 2예에서 염색체 소실이 없었으며, 나머지 48예에서는 적어도 한 개 이상의 염색체에서 소실이 있었고 8개의 염색체 모두에서 염색체 소실을 보이는 예는 없었다(Table 2 & Table 4). 2개에서 4개의 염색체에서 이형접합성소실을 보인 예가 전체의 58%를 차지하고 있으며, 나머지 42%는 1개 혹은 5-7개의 염색체에서 이형접합성소실을 보였다(Table 4). 단일 염색체 별 소실 정도를 분석해보면 8p (31 of 49, 63.3%), 13q (28 of 47, 59.6%), 17p (28 of 48, 58.3%) 및 3p (25 of 50 %, 50%) 염색체 안에서 염

Table 3. Clonality of chromosomal losses detected by the multifocal analysis 34 breast cancers

	Homogeneous losses	Heterogeneous losses	Different chromosomal losses	P value
No. of cases	10	24	54/24 <2.25>	
Age (years)				0.382
≤50	5	9	22/9 <2.63>	
>50	5	15	32/15 <2.14>	
Tumor size				0.231
<2	0	1	3/1 <3.00>	
2~4.9	7	20	42/20 <2.10>	
≥5	3	3	6/3 <2.00>	
Tumor stage				0.165
I	0	3	7/3 <2.33>	
II	6	9	25/9 <2.78>	
III	3	12	32/12 <2.67>	
IV	1	0	0 <0>	
Level				0.169
Low-level	1	6	17/6 <2.83>	
Moderate-level	5	15	37/15 <2.47>	
High-level	4	3	2/3 <0.67>	

Table 4. Frequencies and extents of chromosomal loss on eight chromosomal arms in 50 breast cancers

Single chromosome	No. of patients (%)	No. of chromosomal arms containing LOH*									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	
		2 (4.0)	5 (10.0)	6 (12.0)	14 (28.0)	9 (18.0)	5 (10.0)	4 (8.0)	5 (10.0)	0 (0.0)	
3p loss	25 (50)	0	1 (20)	0 (0)	5 (35.7)	6 (66.7)	5 (100)	4 (100)	4 (80)	0	
4p loss	21 (43.8)	0	0 (0)	0 (0)	3 (21.4)	5 (55.6)	4 (80)	4 (100)	5 (100)	0	
5q loss	17 (35.4)	0	1 (20)	0 (0)	3 (21.4)	3 (33.3)	3 (60)	2 (50)	5 (100)	0	
8p loss	31 (63.3)	0	1 (20)	3 (50)	8 (57.1)	6 (66.7)	4 (80)	4 (100)	5 (100)	0	
9p loss	16 (32)	0	0 (0)	2 (33.3)	2 (14.3)	2 (22.2)	3 (60)	2 (50)	5 (100)	0	
13q loss	28 (59.6)	0	1 (20)	2 (33.3)	8 (57.1)	7 (77.8)	1 (20)	4 (100)	5 (100)	0	
17p loss	28 (58.3)	0	1 (20)	3 (50)	7 (50.0)	6 (66.7)	4 (80)	2 (50)	5 (100)	0	
18q loss	13 (27.1)	0	0 (0)	2 (33.3)	6 (42.3)	1 (11.1)	1 (20)	2 (50)	1 (20)	0	

*LOH = loss of heterozygosity.

색체 소실이 빈번하게 관찰되었고, 그 중에서도 8p (63.8%)에서 가장 높은 빈도로 관찰되었으며 18q (13 of 48, 27.1%)에서 염색체 소실이 가장 적게 발견되었다(Table 4).

유방암에서 단일 염색체 소실(single chromosomal loss)과 종합적인 염색체 소실(concerted chromosomal loss)의 임상 병리학적 특징을 각각 살펴보았다. 우선, 각각의 단일 염색체소실 중에는 비교적 젊은 연령과 5q소실($P<0.05$), TNM 병기와 8p 및 17p소실($P<0.05$)이 의미 있게 연관이 있었으나, 암종의 크기, 액와 림프절 전이 여부는 관련이

없었다(Table 5). 이와 같이 단일 염색체 소실은 암의 진행에 유의한 관련이 없음을 알 수 있었다.

염색체 소실의 숫자와 병리학적 암 병기와의 관계를 함수적 회기 분석법으로 조사한 결과 통계적으로 유의한 상관관계를 보였다($r^2=0.29$, $P=0.0003$) (Fig. 3). 이와 같은 함수적 상관관계에 따라 대립유전자소실을 보이는 염색체의 숫자가 2개 또는 그 이하인 경우를 저등도(low-level), 3개에서 5개는 중등도(moderate-level), 6개 이상은 고등도(high-level)로 분류하여, 임상 병리학적 변수와의 관련성을 살펴보았다(Table 6). 중등도 염색체 소실을 갖는 경우에

Table 5. Relationships between clinical and pathological variables and single chromosomal loss in breast cancer

	Total	3p	4p	5q	8p	9p	13q	17p	18q
No. of patients	50	25	21	17	31	16	28	28	13
Age (yr)									
Mean±SD	50.8±13.8	48.5±12.9	49.6±15.5	45.7±12.1	53.0±14.7	54.3±16.4	52.3±14.7	49.3±13.5	56.5±17.6
P value		0.231	0.612	0.047	0.133	0.289	0.413	0.378	0.167
Tumor size (cm)									
<2.0	4 (8.0)	1 (4.0)	2 (9.5)	2 (11.8)	2 (6.5)	1 (6.3)	2 (7.1)	2 (7.1)	0 (0)
2.0~4.9	38 (76.0)	18 (72.0)	14 (66.7)	13 (76.5)	25 (80.6)	13 (81.3)	21 (75.0)	23 (82.1)	12 (92.3)
≥5.0	8 (16.0)	6 (24.0)	5 (23.8)	2 (11.8)	4 (12.9)	2 (12.5)	5 (17.9)	3 (11.7)	1 (7.7)
P value		0.218	0.394	0.694	0.623	0.840	0.905	0.483	0.256
Lymph node metastases									
Yes	29 (58)	13 (52.0)	12 (57.1)	7 (41.2)	19 (61.3)	10 (62.5)	18 (64.3)	18 (64.3)	8 (61.5)
No	21 (42)	12 (48.0)	9 (42.9)	10 (58.8)	12 (38.7)	6 (37.5)	10 (35.7)	10 (35.7)	5 (38.5)
P value		0.573	0.891	0.134	0.341	0.529	0.187	0.187	0.643
TNM stage									
I	9 (18.0)	2 (8.0)	1 (4.8)	2 (11.8)	2 (6.5)	2 (12.5)	3 (11.7)	1 (3.6)	1 (7.7)
II	24 (48.0)	13 (52.0)	11 (52.4)	11 (64.7)	19 (61.3)	8 (50.0)	15 (53.6)	16 (57.1)	8 (61.5)
III	16 (32.0)	10 (40.0)	8 (38.1)	4 (23.5)	10 (32.3)	5 (31.3)	9 (32.1)	11 (39.3)	4 (30.8)
IV	1 (2.0)	0 (0)	1 (4.8)	0 (0)	0 (0)	1 (6.3)	1 (3.6)	0 (0)	0 (0)
P value		0.183	0.147	0.379	0.015	0.477	0.390	0.014	0.567

Table 6. Relationships between clinical and pathological variables and three levels determined by LOH in breast cancer

Characteristics	Low-level	Moderate-level	High-level	P value
Total No. of cases (%)	13 (26.0)	28 (56.0)	9 (18.0)	
Age (years)				
Mean±SD	50.5±11.8	50.0±13.7	53.8±17.8	0.783
Tumor size (cm)				
Mean±SD	2.7±1.7	3.8±1.7	3±1.3	0.121
<2.0	2 (15.4)	1 (3.6)	1 (11.1)	0.685
2.0~4.9	9 (69.2)	23 (82.1)	6 (66.7)	
≥5.0	2 (15.4)	4 (14.3)	2 (22.2)	
Lymph node				0.006
Yes	3 (23.1)	21 (75)	4 (44.4)	
No	10 (76.9)	7 (25)	5 (55.6)	
TNM stage			<0.005	
I	8 (61.5)	0 (0)	1 (11.1)	
II	4 (30.8)	14 (50.0)	6 (66.7)	
III	1 (7.7)	13 (46.4)	2 (22.2)	
IV	0 (0)	1 (3.6)	0 (0)	

림프절 전이($P=0.006$), 2기와 3기의 임상 병기($P<0.05$)와 관련이 있었으며, 저등도와 고등도 염색체 소실을 갖는 경우는 림프절 전이와 관련이 적었고 1기와 2기와 관련이 있었다. 특히, 고등도 염색체 소실보다는 저등도 염색체

소실에서 1기와 관련이 있음이 관찰되었다($P<0.05$, Table 6).

결과적으로, 염색체 소실의 범위가 액와 림프절 전이 및 TNM 병기와 의미 있는 관련이 있지만($P<0.05$), 환자

의 발병 나이, 병변의 크기와는 연관이 없었다.

고 찰

다양한 생물학적 고유 기능을 갖는 정상 세포들이 암세포로 전환되어 임상적으로 발견될 수 있는 악성 종양으로 발전되기 위해서는 복잡하고 다양한 과정을 거쳐게 되는데, 이러한 악성화 진화 과정에는 단일 염색체 변이가 아닌 순차적이고 많은 유전자들의 변이에 의한다. 여기에 관여하는 유전자 변이는 암 유전자의 증폭에 의한 활성화와 암억제유전자의 변이에 의한 암 억제기능 소실에 의한 것으로 분자생물학적 연구들을 통해서 밝혀졌다.(1) 이형접합성소실은 종양의 원인이 되는 결함이 있는 유전자의 나머지 대립유전자에 변이가 일어나서 주변의 유전표지자가 소실되어 나타나는 것으로 이 부위에 암억제유전자가 존재함을 의미한다. 분자생물학의 발전과 더불어 유방암의 발암 기전을 밝혀내기 위한 세포 유전학적인 연구들도 이루어지고 있는데 특히 가족력이 있는 유방암에서 유전성과 관련된 유전자를 찾고자 하는 노력으로 BRCA1과 BRCA2를 발견하였다. 가족력이 있는 유전성 유방암은 전체 유방암의 약 5~10%를 차지하며, 젊은 나이에 발병하며 양측성일 경우가 많고 난소암, 자궁내막암 및 대장암 등의 다른 종양을 동반하는 경우가 많다.(18) BRCA1은 17q21, BRCA2는 13q12-13에 각각 위치하며 이들 유전자의 변이는 전체 유방암의 약 5~10%, 유전성 유방암에서는 65%까지 나타난다.(19) 이형접합성소실은 유방암에서 볼 수 있는 가장 흔한 유전자 변이로 염색체수에 따라서 차이가 있지만 대개 20~60%의 소실을 보이는 것으로 보고되고 있는데, 저자들의 결과가 27.1~63.3%로 비슷하게 나타났다(Table 4). 저자들이 실험에서 이용한 염색체는 지금까지 연구되어 보고된 암억제유전자가 위치하는 염색체들로 각각의 염색체에서 5개의 단순반복 염기서열 표지자를 실험하였고 2개 이상의 소실을 보인 경우를 본질적인 소실로 염색체의 일정 부분 이상이 소실되었을 경우에 의미 있는 유전자 변이로 고려하였다. 본 실험에서는 8번 염색체가 가장 많은 유방암에서 소실을 보였는데 이는 Lindblom 등(20)의 연구와 같은 결과를 보여주었다. 13번 염색체에는 BRCA2, 17번 염색체는 BRCA1, p53, NF1, nm23 (전이억제유전인자)등이 위치하여 유방암에서는 관심 있는 염색체로 저자들의 결과에서도 각각 59.6%와 58.3%로 높은 소실을 보여주었다. 하지만 각각의 염색체에 따른 이형접합성소실과 암종의 크기, 림프절 전이등의 임상적 변수들과는 연관이 없어서(Table 5) 암이 일정 염색체의 변이보다는 소실된 전체 유전인자의 양과 관계가 있음을 추측할 수 있다.

유전적 변이는 initiation, transformation 및 progression의 일련의 과정을 통해 진행되어 조직학적으로 정상 세포에

서 전암성 병변인 과다증식 병변을 거쳐 암세포로 전환되며 암이 진행되면서 전이되는 것으로 알려지고 있다. 하지만 모든 증식성 병변이 암으로 진행되는 것은 아니며 반드시 증식성 병변을 거친 후 암으로 진행되는 것이 아님을 여러 연구 결과에서 알 수 있다. 대장암의 경우는 전암성 병변으로 adenomatous polyp이 특이적인 유전적 변형으로 인하여 암으로 진행되는 것(21,22)으로 알려져 있으며 유방암에서도 관상피내암이 침습성 유방암으로 진행되는 것으로 이를 증명하고자 관상피내암과 침습성 유방암이 공존하는 종양에서 8p, 11q, 13q, 16q, 17p 및 17q 등 알려진 암억제유전자가 위치하는 염색체에서 이형접합성소실을 연구하여,(23,24) 침습성 유방암의 유전적 변형이 관상피내암에서부터 기원함을 밝혀내었다. 유방암은 조직학적으로 증식성 병변, 관상피내암 및 침습성관암 조직을 모두 포함하고 있는 매우 비균질적인 형태를 나타낸다. 유방의 정상 조직은 서로 다른 클론을 갖는 조직들로 이루어져 있는데 결국 유전적으로는 다르지만 조직학적으로 비슷한 형태를 보이는 조직들로 구성되어 있어서 유방암이 조직학적으로 비균질적인 양상을 보이며(25), 종말관 단위, 유관증식, 관내유두종, 관내상피암 및 침습성 유방암이 각각 단일 클론에서 발생하는 것으로 보고하기도 하였다.(26) 이는 유방암에서 암 조직 주변의 정상 유방 조직에서도 이형접합성소실을 관찰할 수 있으며 일부 유방암에서 증식성 병변이 없는 경우가 있는 것으로도 증명된다.(27) 하지만 암종이 단일 클론에서 발생하여 일련의 유전적 변이 과정을 거쳐서 진행되는 것인지 혹은 여러 클론에서 기원하여 각각 진행됨으로써 다양하고 비균질적인 조직학적 구성과 병소간의 유전적 변이의 차이를 보이는 것인지에 대한 논란과 연구는 계속되고 있다. 관상피내암이 침습성 유방암으로 진행되며 이 진화 과정은 유전적 변이의 다양성에 의한다는 것이 밝혀져 있으며(3,28-30), 저자들의 실험에서뿐만 아니라 많은 연구들에서 관상피내암이 침습성 유방암으로 진행할 것이라는 가정을 증명하기 위하여 같은 유방암 환자의 서로 다른 병소 간에서 즉 관상피내암, 침습성관암 병변 및 전이된 림프절에서 각각 이형접합성소실을 실험하였는데(31-33) 병소간에 이형접합성소실의 차이가 있었으며, 관상피내암에서 더 많은 유전적 변이에 의하여 침습성관암으로 진행함으로써 이형접합성소실의 양도 더 많을 것이라는 예상과는 다르게 관상피내암에서 더 많은 이형접합성소실을 보이는 것으로 보고되었다.(31,33) 저자들의 실험에서도 다병소 분석을 시행했던 34예 중 24예에서 병소간에 이형접합성소실이 차이가 있었으며, 특히 세 병소에서 모두 이형접합성소실을 실험했던 10예 중 9예에서 병소간 이질성을 보였는데 각각의 예에서 일차적으로 염색체수와 위치가 동일하게 소실이 있는 부분을 공유하며 추가적으로 각각 다른 소실을 보이며, 특히 4예에서는 관상피내암 병변에

서 더 많은 소실을 보임으로써(Fig. 2), 지금까지 보고된 다른 연구들과 일치하였다. 또한 관상피내암만 있는 경우와 침습성관암과 공존하는 관상피내암에서 각각의 관상피내암 병변에서의 이형접합성소실은 순수 관상피내암 병변에서 더 많은 소실을 보인 보고도 있었다.(33) 위와 같은 결과로 유방암은 단일 클론에서 기원하여 매우 다양하게 유전적 변형을 거치면서 진행되는데 이를 위해서는 적정 범위의 염색체 소실이 필요하며 그 이상의 변이가 일어난 경우는 오히려 더 이상 암성 진행이 이루어지지 않고 관상피내암으로 머무르는 것으로 추측된다.

유방암은 암의 크기, 림프절 전이여부 및 타 장기로의 원발성 전이에 의한 임상기에 따라서 예후를 결정하며 치료하는데 예측하지 못한 치료 결과와 재발을 보이는 경우가 있어서 좀더 명확한 예후 인자를 찾고자 많은 노력을 하고 있다. 이형접합성소실을 다른 예후인자들과 비교한 보고에서는 암의 크기와 소실 정도가 연관이 있으며 고등도의 소실을 보인 경우에 높은 증식성 병변과 유사분열지수를 나타내며(30), 림프절 전이가 많고 분화도가 낮을수록, 크고 침습적인 암일수록 소실량이 많아서 임상기와 더불어 유방암을 예측할 수 있는 인자로서 이용될 것으로 보고하였다.(34,35) 그러나 전체 염색체 소실에 대한 광범위한 연구에서는 염색체의 소실 범위는 유방암 병기와 관련성이 낮다고 보고하여 유방암 진행과 염색체 소실 범위의 관련성은 연구자마다 차이가 있다. 유방암 병변의 이질성과 염색체 종류에 따른 소실 빈도의 차이를 고려할 때 검사하는 병소의 숫자나 종류, 사용하는 염색체 표지자의 숫자나 종류의 일정한 기준에 따른 실험이 유방암 염색체 소실 검사에서 필요하다고 본다. 저자들의 다병소 실험에서는 이형접합성소실 양의 범위에 따라서 분류하여 다른 임상적 변수들과 비교하였는데 중등도의 소실이 있는 경우 의미 있게 림프절 전이가 많았고 임상 2기와 3기에 포함되었으며, 저등도 혹은 고등도의 소실에서는 림프절 전이가 적고 1기 혹은 2기에 해당하는 경우가 많았다. 이상의 결과는 적정범위의 염색체 소실이 유방암의 진행에 중요하다는 추측을 뒷받침하는 것으로 생각된다. 따라서 암진행은 염색체 소실 범위와 밀접한 관련성이 있으며 위장관 암종과는(6-8) 다른 양상을 보이는 이유는 암이 발생하는 기관에 따라 악성을 보이는 적정 염색체 소실 범위가 상이한 것으로 해석된다.

염색체 소실 범위와 암진행의 밀접한 관계는 주로 암억제유전자의 기능적 불활성으로 인식되고 있다. 이와 함께 염색체 소실은 유전체의 양적 감소를 동반하며 유전체의 양적 감소가 미치는 영향은 각 개체의 유전체양을 엄격하게 유지하려는 유전체양 보상기전을 작동시킬 것으로 예상된다. 따라서 염색체 소실은 양적감소를 보상하기 위하여 핵산메틸화에 변화를 유도하므로 염색체 소실이 핵산메틸화를 통하여 다양한 암 진행을 주도한다는 가설을 검

증해야 한다고 본다.

결 론

유방암은 조직학적으로 혹은 임상적으로 이질적인 다양한 형태를 보이는 암으로 이질적인 병변은 동일한 염색체 소실을 반드시 공유하면서 병변내 특정위치에 제한적으로 존재하는 상이한 염색체 소실을 수반하였다. 침습성관암이나 임파절 전이는 중등도의 염색체 소실을 보였으며 관상피내암은 이보다 적거나 많은 염색체 소실을 보였다. 한편 중등도 염색체 소실은 림프절전이와 진행성 암 병기와 관련이 있었으나, 저등도 또는 고등도 염색체소실은 조기 병기에서 빈번하게 발견되었다. 따라서 유방암은 암발생 초기에 다양한 염색체 소실을 동반하며 적정범위의 염색체소실에 의해서 암 침습과 전이가 주도되는 것으로 보이며, 보다 적절한 염색체 소실 범위를 밝혀내어 유방암 환자의 치료와 예후에 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Devilee P, Cornelisse CJ. Somatic genetic changes in human breast cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1994;1198: 113-30.
- 2) Wolman SR, Heppner GH. Genetic heterogeneity in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:469-70.
- 3) Chen LC, Kurisu W, Ljung BM, Goldman ES, Moore D, Smith HS. Heterogeneity for allelic loss in human breast cancer. *J Nat Cancer Inst* 1992;84:506-10.
- 4) Rhyu MG. Genetic events underlying morphological complexity of gastric carcinoma. *J Korean med Sci* 1998;13:339-49.
- 5) Martin L, Assem M, Piard F. Are there several types of colorectal carcinoma? Correlations with genetic data. *Eur J Cancer Prev* 1999;8(Suppl 1):S13-S20.
- 6) Kim KM, Kwon MS, Hong SJ, Min KO, Seo EJ, Lee KY, et al. Genetic classification of intestinal-type and diffuse-type gastric cancer based on chromosomal and microsatellite instability. *Virchows Arch* 2003;443:491-500.
- 7) Choi SW, Choi JR, Chung YJ, Kim KM, Rhyu MG. Prognostic implications of microsatellite genotypes in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2002;89:378-83.
- 8) Choi SW, Lee KJ, Bae YA, Min KO, Kwon MS, Kim KM, et al. Genetic classification of colorectal cancer based on chromosomal loss and microsatellite instability predicts survival. *Clin Cancer Res* 2002;8:2311-22.
- 9) American Joint Committee on Cancer. Breast. In: *AJCC cancer staging manual*, 6th ed Springer; 2002. p.228.
- 10) Choi SW, Lee KJ, Bae YA, Min KO, Kwon MS, Rhyu MG, et al. Genetic classification of colorectal cancer based on chromosomal loss and microsatellite instability predicts

- survival. *Clin Cancer Res* 2002;8:2311-22.
- 11) Hyun JS, Jo BK, Park CJ, Yi JY, Lee JY, Rhyu MG. Loss of heterozygosity and PCR artifacts in a microsatellite analysis of psoriasis and colorectal cancer. *J Korean Med Sci* 2002;17:641-7.
- 12) Kim KM, Kwon MS, Hong SJ, Min KO, Choi SW, Rhyu MG, et al. Genetic classification of intestinal-type and diffuse-type gastric cancers based on chromosomal loss and microsatellite instability. *Virchows Arch* 2003;443:491-500.
- 13) Kim KM, Kim MJ, Cho BK, Choi SW, Rhyu MG. Genetic evidence for the multi-step progression of mixed glandular-neuroendocrine gastric carcinomas. *Virchows Arch* 2002;440: 85-93.
- 14) Kwon MS, Hong SJ, Cho HA, Ahn GH, Lee SS, Rhyu MG, et al. Extensive and divergent chromosomal losses in squamous and spindle-cell components of esophageal sarcomatoid carcinoma. *Virchows Arch* 2003;443:635-42.
- 15) Sasatomi E, Finkelstein SD, Woods JD, Bakker A, Swalsky PA, Luketich JD, et al. Comparison of accumulated allele loss between primary tumor and lymph node metastasis in stage II non-small cell lung carcinoma: Implications for the timing of lymph node metastasis and prognostic value. *Cancer Res* 2002;62:2681-89.
- 16) Shen CY, Yu JC, Lo YL, Kuo CH, Yue CT, Jou YS, et al. Genome-wide search for loss of heterozygosity using laser capture microdissected tissue of breast carcinoma: an implication for mutator phenotype and breast cancer pathogenesis. *Cancer Res* 2000;60:3884-92.
- 17) Choi YD, Choi SW, Jeon EJ, Jeong JJ, Min KO, Rhyu MG, et al. Classification of microsatellite alterations detected in endoscopic biopsy specimens of gastric cancers. *J Korean Gastric Cancer Assoc* 2004;4:109-20.
- 18) Claus EB, Schildkraut JM, Thompson WD, Risch NJ. The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer. *Cancer* 1996;77:2318-24.
- 19) Berry DA, Parmigiani G, Sauchez J, Schildkraut J, Winer E. Probability of carrying a mutation of breast-ovarian cancer gene BRCA1 based on family history. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:227-38.
- 20) Lindblom A, Skoog L, Rotstein S, Werelius B, Larsson C, Nordenskjold M. Loss of heterozygosity in familial breast carcinoma. *Cancer Res* 1993;53:4356-61.
- 21) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton S R. Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319:525-32.
- 22) Fearon ER, Vogelstein BA. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.
- 23) Zhuang Z, Merino MJ, Chuaqui R, Liotta LA, Emmert-buck MR. Identical allelic loss on chromosome 11q13 in microdissected in situ and invasive breast cancer. *Cancer Res* 1995;55:467-71.
- 24) Radford DM, Phillips NJ, Fair KL, Ritter JH, Holt M, Donis-Keller H. Allelic loss and the progression of breast cancer. *Cancer Res* 1995;55:5180-3.
- 25) Tsai YC, Nichols PW, Zlotnikov G, Jones PA, Smith HS. Contiguous patches of normal human mammary epithelium derived from a single stem cell: implication for breast carcinogenesis. *Cancer Res* 1996;56:402-4.
- 26) Diallo R, Schaefer KL, Poremba C, Shivazi N, Willmann V, Buerger H, et al. Monoclonality in normal epithelium, hyperplastic and neoplastic lesions on the breast. *J Pathol* 2001; 193:27-32.
- 27) Deng G, Lu Y, Zlotnikov G, Thor AD, Smith HS. Loss of heterozygosity in normal tissue adjacent to breast carcinoma. *Science* 1996;274:2057-9.
- 28) Fujii H, Marsh C, Cairns P, Sidransky D, Gabrielson E. Genetic divergence in the clonal evolution of breast cancer. *Cancer Res* 1996;56:1493-7.
- 29) Shen CY, Yu JC, Lo YL, Kuo CH, Yue CT, Jou YS, et al. Genome-wide search for loss of heterozygosity using laser capture microdissected tissue of breast carcinoma: an implication for mutator phenotype and breast pathogenesis. *Cancer Res* 2000;60:3884-92.
- 30) Kerangueven F, Noguchi T, Coulier F, Allione F, Wargniez V, Simony-Lafontaine J, et al. Genome-wide search for loss of heterozygosity shows extensive genetic diversity of human breast carcinomas. *Cancer Res* 1997;57:5469-74.
- 31) Marsh KL, Varley JM. Loss of heterozygosity at chromosome 9p in ductal carcinoma in situ and invasive carcinoma of the breast. *Br J Cancer* 1998;77:1439-47.
- 32) Lichy JH, Dalbague F, Zavar M, Washington C, Tsai MM, Sheng ZM, et al. Genetic heterogeneity in ductal carcinoma of the breast. *Lab Invest* 2000;80:291-301.
- 33) Farabegoli F, Champeme MH, Bieche I, Santini D, Ceccarelli C, Derenzini M, et al. Genetic pathways in the evolution of breast ductal carcinoma in situ. *J Pathol* 2002;196:280-6.
- 34) Harada Y, Katagiri T, Ito I, Akiyama F, Sakamoto G, Kasumi P, et al. Genetic studies of 457 breast cancers. Clinicopathologic parameters compared with genetic alterations. *Cancer* 1994;74:2281-6.
- 35) Watatani M, Inui H, Nagayama K, Imanishi Y, Nishimura K, Hashimoto Y, et al. Identification of high-risk breast cancer patients from genetic changes of their tumors. *Surg Today* 2000;30:516-22.