

면역조직화학적 검색과 FISH를 이용한 유방암 조직내 HER2 검색의 표준화 경험

인제대학교 상계백병원 ¹병리학교실, ²외과학교실

박 경 미¹ · 한 세 환²

A Single Institute's Experience of Standardization for the HER2 Status by Fluorescence in situ Hybridization and Immunohistochemistry on a Primary Breast Cancer Tissue Microarray

Kyeongmee Park¹ and Sehwan Han²

Departments of ¹Pathology and ²Surgery, Inje University Sanggye Paik Hospital, Seoul, Korea

Purpose: Most tests developed for the determination of the HER2 status still require validation, although identification of the HER2 status is important for predicting the response to specific systemic therapy in breast cancer. Fluorescence in situ hybridization (FISH) and immunohistochemistry (IHC) were performed for the HER2 expression on the tissue microarray (TMA) from primary breast cancers to validate the feasibility of IHC for HER2 assay.

Methods: A TMA was constructed from 134~231 primary breast cancers. FISH and IHC were repeated more than twice, and the results were analyzed. Three kinds of primary antibody for IHC were used and compared.

Results: The HER2 was amplified by FISH in 24~28% of breast cancer with a concordance between multiple assays of 92~100% ($\kappa=0.994-0.965$), while the HER2 was overexpressed in 21~27% by IHC. The HER2 was amplified in 70~100% of the IHC 3+ cases, but was observed in only 45~78% and 5~12% of the IHC 2+ and IHC 0~1+ cases, respectively. The results from the IHC, using 3 different primary antibodies to HER2, were in good agreement each other at 88~92% ($\kappa=0.902-0.799$).

Conclusion: The results of the FISH appeared to be more reproducible than those of the IHC in the current study. The results of the IHC were not different from each

other according to primary antibody used. However, a considerable proportions of the IHC positive cases were not confirmed by the FISH. This report indicates a need to improve the laboratory quality control measures when using the IHC for the HER2 assay, including the periodic testing for the concordance with FISH. (*Journal of Korean Breast Cancer Society* 2004;7:27-31)

Key Words: Breast cancer, Fluorescence in situ hybridization, HER2, Immunohistochemistry, Tissue microarray, Standardization

중심 단어: 유방암, 형광제자리부합화, 면역조직화학염색

서 론

암치료 약제는 현재까지 경험에 바탕을 두고 선택되어 왔으나 분자생물학의 발달은 특정 치료 목표를 설정하여 가장 효과적이고 부작용이 적은 치료제의 사용을 가능하게 하고 있다. 암유전자인 HER2는 유방암의 발생에 관여할 뿐 아니라 특정 치료 약제에 대한 반응을 예측하는 데에도 이용되고 있다. 최근에는 HER2의 extracellular domain에 대한 단클론항체인 trastuzumab이 개발되어 유방암 치료에 효과를 보임으로써 유방암 환자에서 HER2 검색은 필수적인 과정이 되었다.(1) 그러나 HER2를 검색하는 여러 방법들은 같은 방법들 간에도 결과가 일치하지 않고 시행하는 기관에 따라서도 편차가 큰 결과를 보여 HER2 검색법의 표준화는 아직 이루어지고 있지 않은 실정이다.(2) 인체 암에서 HER2 단백질의 과발현은 HER2 유전자의 증폭에 의한 것이 대부분이며 유방암에서 HER2 유전자의 증폭이나 단백질의 과발현은 20~30%에서 관찰된다. HER2를 검색하는 방법은 HER2 DNA의 증폭을 검색하거나 mRNA, 혹은 HER2 단백질의 과발현을 검색하는 방법들이 있는데 임상적으로는 면역조직화학검색과 fluorescence in situ hybridization (FISH)이 가장 많이 이용되고 있다. 면역조직화학적 검색을 이용한 HER2 단백질 검색은 신속하고 경제적이며

책임저자 : 박경미, 서울시 노원구 상계 7동 761-1
 ☎ 139-707, 상계백병원 병리과
 Tel: 02-950-1263, Fax: 02-950-1266
 E-mail: kmpark@sanggyeEpaik.ac.kr
 접수일 : 2004년 1월 6일, 게재승인일 : 2004년 2월 23일

보편성을 가진 반면 semiquantitative scale로 판독되므로 판독의사에 따라서 주관적인 판독을 초래하는 단점이 있다.

HER2 단백질의 과발현이 대부분 DNA 증폭에 의해 일어나므로 조직의 처리나 보관 과정에서 가장 안정적인 HER2 DNA의 증폭을 검색하는 방법도 이용되는데 FISH가 가장 정확한 방법으로 알려져 있다. 그러나 FISH는 형광현미경이 필요하며 DNA probe의 가격이 비싼 단점이 있다. FISH는 HER2 유전자의 증폭을 분석하므로 면역조직화학검색에 비하여 상대적으로 더 객관적이고 정확한 정량적 분석법이다. 면역조직화학검색의 경우 National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP)와 Breast Intergroup Trial N9831의 결과도 검색 기관에 따라서 오차가 큰 것으로 보고되고 있다.(3,4) 이러한 면역조직화학검색의 낮은 재현율은 United Kingdom National External Quality Assessment Scheme for Immunohistochemistry (UK NEQAC-ICC)의 분석 결과에 따르면 유방암의 이질성이나 검색 과정의 차이보다는 판독의사에 따른 판독의 주관성에 기인하는 것으로 밝혀져 있다.(5) 전이성 유방암을 대상으로 한 임상시험의 결과들은 FISH 검색이 trastuzumab 치료의 반응을 더 정확히 예측할 수 있다는 것을 보여주며 HER2 유전자의 증폭 없이 단백질의 과발현만 보이는 유방암은 trastuzumab의 효과가 떨어지는 것으로 나타나고 있다.(6,7) 치료 약제의 반응을 정확히 예측하는 것은 치료 효과를 극대화하고 불필요한 치료를 줄이는 것이며 HER2를 유방암 치료의 예측 인자로 사용하기 위해서는 검색 방법의 표준화가 trastuzumab의 임상 이용에 앞서 시급한 과제라고 하겠다. 본 연구는 경제적이고 보편성을 가진 면역조직화학적 검색의 결과가 FISH 결과와 어느 정도 일치하는지 분석하고 현실적으로 면역조직화학적 검색만으로 정확한 HER2 검색이 가능한가를 확인하기 위하여 시행되었다.

방 법

한 증례의 유방암 파라핀 블록당 3군데에서 조직을 채취하여 tissue microarray (TMA) 블록을 제작한 후 3개의 연속 절편 슬라이드를 얻어 2회 이상에 걸쳐 HER2 FISH 검색과 면역조직화학검색을 시행하여 결과를 비교하였다. 각 TMA에는 134~261예의 유방암 조직이 포함되었다. FISH 검색은 PathVysion™ HER2 DNA probe (Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA)를 사용하였고 면역조직화학적 검색을 위한 항체로는 HercepTest® (Dako, Carpinteria, CA, USA), Rabbit anti-c-erbB2 (Zymed, South San Francisco, CA, USA), Mouse anti-c-erbB2 (Zymed)를 이용하였다. 동일한 실험 조건에서 동시에 FISH와 면역조직화학적 검색을 시행하여 그 결과들을 비교 분석하였다.

1) Tissue microarray (TMA) 제작

통상적인 방법으로 순수 파라핀 블록을 만들어 수여 블록으로 준비하고 유방암 조직이 들어 있는 공급 파라핀 블록 중 3군데에서 조직을 얻어 준비된 수여 블록에 조직을 옮겨 심었다. 이 때 피부 조직생검 시 사용하는 2 mm 직경의 바늘을 이용하였다.(8)

2) Fluorescence in situ hybridization (FISH)

통상적인 방법으로 시행하였으며(9) 간략하게 다음과 같다. 두께 4µm의 슬라이드를 56°C로 24시간 두었다가 탈파라핀한 후 80°C의 전처리 용액(Vysis)에 30분간 처리하였고 37°C의 단백분해 효소 용액(Vysis)에 10분간 처리하였다. 포르말린에 10분 동안 고정된 후 72°C의 변성 용액(Vysis)에 5분간 적용한 후 탈수하였다. 20µl의 PathVysion™ LSI HER2/CEP probe (Vysis)를 적용시킨 후 커버 슬립으로 덮고 37°C로 14~18시간 유지하였다. 72°C의 후부합화 세척 완충액(Vysis)에 2분간 적용하여 커버 슬립을 제거하고 20µl의 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Vysis)로 염색하였다.

현미경의 1,000배 시야에서 암세포의 핵을 선택하여 CEP 녹색 신호와 HER2 오렌지 신호의 수를 관찰하여 HER2 오렌지 신호가 CEP 녹색 신호의 2배 이상인 경우를 HER2 유전자의 증폭으로 간주하였다.

3) 면역조직화학염색

(1) HercepTest (Dako): 제조 회사(Dako)에서 권하는 방법으로 시행하였으며(9) 간략하게 다음과 같다. 두께 4µm의 슬라이드를 탈파라핀한 후 95~99°C의 전처리 용액(Dako)에 40분간 처리한 후 세척 완충액으로 세척한 후 과산화 효소 차단제(Dako)를 5분간 적용하였다. 200µl의 일차 항체를 30분간 적용시킨 후 200µl의 visualization agent (Dako)를 30분간 적용하였다. 200µl의 diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)를 10분간 적용한 후 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색하였다.

(2) Rabbit anti-c-erbB2 (Zymed, South San Francisco, CA, USA), Mouse anti-c-erbB2 (Zymed): 포르말린에 고정된 후 제작된 파라핀 블록으로부터 두께 4µm의 슬라이드를 얻어 탈파라핀한 후 3% 과산화수소수로 20분간 처리하였다. 완충 세척액으로 수세한 후 1:50으로 희석한 일차 항체를 적용하고 60분간 반응시켰다. Biotin과 결합된 이차 항체(labeled streptavidin biotin kit, Dako)를 10분간 적용시키고 DAB로 발색한 후 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색하였다.

(3) 면역조직화학 염색 판독: 유방암 세포의 세포막에 염색되는 정도에 따라 점수를 주었다. 음성 반응을 나타내거나 10% 미만의 암세포에서 약하게 염색이 되는 경우

를 0점, 암세포의 10% 이상에서 염색은 되었으나 세포막의 일부가 약하게 염색이 되는 경우를 1점, 암세포의 10% 이상에서 세포막의 전체가 중등도로 염색된 경우를 2점, 암세포의 10% 이상에서 세포막의 전체가 강하게 염색된 경우를 3점으로 판독하였으며 그 중 2점과 3점을 양성으로 간주하였다.

4) 자료 분석

면역조직화학적 검색의 결과와 FISH 결과의 상관성 분석은 chi-square법으로 검정하였고 두 검사법 간의 일치도는 Spearman's correlation coefficient를 이용하여 kappa 값을 계산하였다. Kappa 값이 0.75 이상인 경우는 높은 일치도를 나타내며 kappa 값이 0.4~0.75인 경우는 유의한 일치도를 보이는 것으로 판단하였다.

결 과

FISH 검색으로 HER2 유전자의 증폭은 24~28%의 빈도로 관찰되었고 동일한 TMA의 FISH 결과의 일치도는 92~100% (kappa=0.994-0.965)로 검색 결과의 일치도가 매우 높음을 확인하였다(Table 1). 면역조직화학적 검색으로 HER2 단백질의 과발현은 21~27%에서 관찰되었다. 면역조직화학적 검색 결과가 3점인 예들을 FISH의 결과와 비교 분석했을 때 HER2 유전자의 증폭과 단백질의 과발현은 70~100%에서 일치하였다. 면역조직화학적 검색 결과 2점인 예들을 FISH의 결과와 비교 분석했을 때 HER2 유전자 증폭과 단백질의 과발현은 45~100%의 일치도를 보였다. 면역조직화학적 검색으로 HER2 단백질의 과발현을 보이지 않은 예들(1점, 0점)에서도 HER2 유전자의 증폭을 보인 예들이 5~17%에서 확인되었다(Table 2).

두 개의 TMA를 이용하여 3가지 다른 일차 항체를 이용하

여 면역조직화학적 검색을 시행하고 그 결과를 비교 분석하였다. 사용된 일차 항체에 따라서 결과는 조금씩 차이를 보였으며 HER2 과발현 빈도는 23~27%였고(Table 3) 각 항체

Table 2. Concordance between FISH and IHC

	FISH	
	No amplification	Amplification
IHC 0~1+		
TMA 1 (n=134)	95	15 (13.6%)
	84	18 (17.6%)
TMA 2 (n=188)	131	20 (13.2%)
	125	23 (15.5%)
TMA 3 (n=261)	165	16 (8.8%)
	180	10 (5.2%)
IHC 2+		
TMA 1 (n=134)	4	6 (60.0%)
	12	10 (45.5%)
TMA 2 (n=188)	0	10 (100.0%)
	10	9 (47.4%)
TMA 3 (n=261)	21	48 (69.6%)
	15	54 (78.2%)
IHC 3+		
TMA 1 (n=134)	3	11 (78.6%)
	0	8 (100.0%)
TMA 2 (n=188)	4	17 (81.0%)
	8	19 (70.4%)
TMA 3 (n=261)	3	44 (93.6%)
	0	47 (100.0%)

FISH = fluorescence in situ hybridization; IHC = immunohistochemistry; TMA = tissue microarray.

Table 1. Quality control of FISH for HER2

	FISH	
	No amplification	Amplification
TMA 1 (n=134)	101	32
	102	32
TMA 2 (n=188)	140	45
	142	46
	140	46
TMA 3 (n=261)	188	73
	186	73

Kappa = 0.994~0.965; Frequency = 24~28%; FISH = fluorescence in situ hybridization; TMA = tissue microarray.

Table 3. IHC results by different primary antibody

Primary antibody	IHC score			Total
	0~1	2	3	
HercepTest	145	19	21	185
Pab	151	10	27	188
Mab	148	19	21	188
HercepTest	110	10	14	134
Pab	102	22	8	132
Mab	108	16	10	134

Kappa = 0.902-0.798; expression frequency = 23~27%; IHC = immunohistochemistry; Pab = polyclonal antibody (rabbit anti-c-erbB2); Mab = monoclonal antibody (mouse anti-c-erbB2).

간의 일치도는 비교적 높았다(κ value: 0.902~0.798).

고 찰

종양표지자를 임상에 이용하는 목적은 예후 판정의 정확성을 높이고 특정 치료법에 대한 효과를 정확히 예측하기 위한 것이다. HER2의 경우 trastuzumab 치료 효과의 예측에 이용하기 위한 것이 주 목적이라고 할 수 있으며 HER2의 과발현을 보이는 경우 anthracycline 계열의 치료 효과가 좋다는 임상시험 결과도 보고되고 있다.(10,11) 또한 HER2 과발현을 보이는 경우 tamoxifen에 대한 내성을 보이고 aromatase 억제제의 효과가 상대적으로 높다는 연구 결과들도 보고되고 있다.(12-14) 최근에는 taxane 계열의 항암제 효과와 HER2 발현과의 상관성을 분석한 자료들도 발표되고 있다.(15) 결국 정확한 HER2 검사는 적절한 대상 환자들에게 유방암 치료 약제를 가장 효과적으로 사용하기 위해 필수적인 과정이 되고 있다. 현재 HER2 검색의 가장 정확한 표준법은 FISH를 이용하여 유전자 증폭을 확인하는 것이다. 그러나 FISH는 사용하는 probe의 가격이 비싸고 특수한 형광현미경이 있어야만 검색이 가능한 단점이 있다. 반면에 면역조직화학검사는 검색법 자체가 보편적으로 사용되고 있으며 특수 장비 없이 대부분 병원에서 시행이 가능한 장점을 가지고 있다. 본 연구의 결과 같은 기관에서 같은 방법으로 검색해도 면역조직화학검사의 경우 그 결과가 완전히 일치하지 않는 것을 확인할 수 있었다. 반면 FISH는 반복 검색으로 그 결과가 거의 일치함을 알 수 있었다. Trastuzumab의 치료 효과와의 관계를 연구한 보고들도 대부분 HER2 유전자의 증폭 검색이 더 정확한 치료 효과 판정에 도움이 된다는 것을 보고하고 있으며 HER2 유전자 검색은 FISH가 아닌 chromogenic in situ hybridization을 이용한 결과도 FISH 검색과 거의 일치하는 것을 본 연구자는 확인한 바 있다.(6-8,15) 이러한 결과들은 아직 HER2 검색에서 면역조직화학검사의 표준화가 이루어지지 않았다는 것을 시사한다고 할 수 있다. 본 연구자의 기관에서는 이러한 표준화 과정의 경험을 토대로 현재 모든 유방암 환자의 HER2 검색에 FISH를 이용하고 있으며 면역조직화학검사는 별도로 병행하여 계속 정도 관리를 하고 있다. 외국의 문헌 보고를 참고하여 국내의 대부분 기관에서 면역조직화학검사로 강양성(3점)을 보이는 경우 FISH로 확인하는 과정을 거치지 않고 있으나 본 연구의 결과 각 기관 간의 긴밀한 교류로 표준화 과정을 거치지 않은 현재에는 면역조직화학검사로 강양성을 보인 경우에도 반드시 FISH를 이용하여 확인하는 과정이 필요한 것으로 판단된다. 저자의 이러한 주장은 NSABP와 Breast Intergroup Trial N9831의 연구 결과로 뒷받침된다.(3,4) 면역조직화학검사의 신뢰도가 확립되지 않은 현 시점에서는 모든 유방암 환자의 HER2 증폭

여부를 FISH로 확인하는 것이 면역조직화학검사의 표준화가 이루어질 때까지는 부적절한 대상 환자에게 불필요한 치료를 시행하는 것보다 오히려 경제적인 방법이 될 수 있다는 것이 본 연구자의 생각이다.

양질의 치료를 경제적으로 제공하기 위해서는 전국 의료기관의 전문가들 간의 긴밀한 교류와 정보 교환으로 HER2 검색의 표준화된 방법을 하루 빨리 확립하여 환자들에게 불필요한 경제적 부담을 줄이고 최선의 치료를 제공하는 것이 시급하다고 생각하는 바이다.

결 론

반복 검색을 시행한 결과 면역조직화학검사에 비하여 FISH 검색이 상대적으로 높은 일치도를 보였다. 면역조직화학검사의 경우 사용 항체에 따른 결과의 차이는 없었으나 HER2 단백질 발현을 보인 경우에도 FISH 검색에서 HER2 유전자의 증폭이 확인되지 않는 경우가 상당수 있음을 확인할 수 있었다. 본 연구의 결과를 고려할 때 면역조직화학검사의 신뢰도가 확립되지 않은 현 시점에서는 모든 유방암 환자의 HER2 증폭 여부를 FISH로 확인하는 것이 면역조직화학검사의 표준화가 이루어질 때까지는 HER2 검색의 정도 관리를 위하여 필수적이라고 판단된다.

REFERENCES

- 1) Bast RC Jr, Ravdin P, Hayes DF, Bates S, Fritsche H Jr, Jessup JM, et al. American Society of Clinical Oncology Tumor Markers Expert Panel. 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2001;19:1865-78.
- 2) Press MF, Slamon DJ, Flom KJ, Park J, Zhou JY, Bernstein L. Evaluation of HER-2/neu gene amplification and overexpression: comparison of frequently used assay methods in a molecularly characterized cohort of breast cancer specimens. *J Clin Oncol* 2002;20:3095-105.
- 3) Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, Romond E, Hiller W, Park K, et al. Real-world performance of HER2 testing: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:852-4.
- 4) Roche PC, Suman VJ, Jenkins RB, Davidson NE, Martino S, Kaufman PA, et al. Concordance between local and central laboratory HER2 testing in the breast intergroup trial N9831. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:855-7.
- 5) Rhodes A, Jasani B, Anderson E, Dodson AR, Balaton AJ. Evaluation of HER-2/neu immunohistochemical assay sensitivity and scoring on formalin-fixed and paraffin-processed cell lines and breast tumors: a comparative study involving results from laboratories in 21 countries. *Am J Clin Pathol* 2002;118:

- 408-17.
- 6) Esteva FJ, Valero V, Booser D, Guerra LT, Murray JL, Pusztai L, et al. Phase II study of weekly docetaxel and trastuzumab for patients with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:1800-8.
 - 7) Leonard DS, Hill AD, Kelly L, Dijkstra B, McDermott E, O'Higgins NJ. Anti-human epidermal growth factor receptor 2 monoclonal antibody therapy for breast cancer. *Br J Surg* 2002;89:262-71.
 - 8) Park K, Kim J, Lim S, Han S, Lee JY. Comparing fluorescence in situ hybridization and chromogenic in situ hybridization methods to determine the HER2/neu status in primary breast carcinoma using tissue microarray. *Mod Pathol* 2003;16: 937-43.
 - 9) Park K, Kim J, Lim S. Comparing fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry to determine the HER2/neu status in breast carcinoma. *Korean J Pathol* 2002;36:243-8
 - 10) Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, Yothers G, Park C, Wickerham DL, et al. HER2 and choice of adjuvant chemotherapy for invasive breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-15. *J Natl Cancer Inst* 2000;92: 1991-8.
 - 11) Park K, Kim J, Lim S, Han S. Topoisomerase II- α (topoII) and HER2 amplification in breast cancers and response to preoperative doxorubicin chemotherapy. *Eur J Cancer* 2003; 39:631-4.
 - 12) Elledge RM, Green S, Ciocca D, Pugh R, Allred DC, Clark GM, et al. HER-2 expression and response to tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer: a Southwest Oncology Group study. *Clin Cancer Res* 1998;4:7-12.
 - 13) Dowsett M. Overexpression of HER-2 as a resistance mechanism to hormonal therapy for breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2001;8:191-5.
 - 14) De Placido S, De Laurentiis M, Carlomagno C, Gallo C, Perrone F, Pepe S, et al. Twenty-year results of the Naples GUN randomized trial: predictive factors of adjuvant tamoxifen efficacy in early breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9: 1039-46.
 - 15) Seidman AD, Fornier MN, Esteva FJ, Tan L, Kaptain S, Bach A, et al. Weekly trastuzumab and paclitaxel therapy for metastatic breast cancer with analysis of efficacy by HER2 immunophenotype and gene amplification. *J Clin Oncol* 2001; 19:2587-95.
-