

폐경된 유방암 환자에서 Tamoxifen 사용후 발생한 자궁근종에서 Estrogen Receptor Alpha, Beta, Progesterone Receptor 발현의 차이

연세대학교 의과대학 영동세브란스병원 산부인과학교실, 유방암센터¹, 진단병리학교실²
원형재·신종승·박기현·조동제·송찬호·이희대¹·홍순원²·이병석

= Abstract =

Analysis of the Expression of Estrogen Receptor α , β and Progesterone Receptor in Postmenopausal Women Treated with Tamoxifen

Hyung Jae Won, Jong Seung Shin, Ki Hyun Park, Dong Je Cho,
Chan Ho Song, Hye Dae Lee¹, Sun Won Hong², Byung Seok Lee.

Department of Obstetrics and Gynecology, Breast Cancer Center¹, Department of Diagnostic Pathology²,
Yong Dong Severance Hospital, Yonsei University, College of Medicine, Seoul, Korea

Tamoxifen, a nonsteroidal antiestrogen, is one of the most valuable treatment alternatives for breast cancer patients. But the long term effect of tamoxifen is still limited. Although tamoxifen acts primarily as an antiestrogen, it also appears to exert a estrogenic effect as well. This study was initiated to investigate the expression of estrogen receptor α , β and progesterone receptor in postmenopausal women treated with tamoxifen.

Total 21 women were included in this study. 8 postmenopausal breast cancer patients treated with tamoxifen, 6 premenopausal women including 3 secretory phase, 3 proliferative phase, and 7 postmenopausal women.

Formalin-fixed and paraffin embedded sections were stained for ER α , ER β and PR immunohistochemically with monoclonal antibodies.

The expression of ER α and PR did not depend on the phase.($p=0.445$, $p=0.133$) The expression of ER β in tamoxifen treated group was significantly decreased than in post menopause group.($p<0.05$)

Tamoxifen may cause the growth of myoma by down regulation of ER β and dose not blocks ER α binding effectively.

Key words : myoma, Tamoxifen, ER α , ER β , PR

자궁근종은 부인과 영역에서 발생하는 종양중 가장 흔한 종양으로 전체 여성의 10-20%에서 발생하는 것으로 알려져 있다.^{1,2} 이러한 자궁근종의 발생원인에 대해서는 아직 확실하게 밝혀진 바는 없으나 여성 호르몬인 에스트로겐과 프로게스테론이 자궁근종의 발생과 성장에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며^{3,4} 이런 여성 호르몬은 국소적으로 생산되는 성장인자들에 영향을 주어 그 효

과가 나타나는 것으로 알려져 있다.⁵

타목시펜은 비 스테로이드성 항 에스트로겐 제제로서 1960년대 영국에서 피임을 위한 목적으로 개발되었다. 이후 타목시펜이 쥐에서 mammary tumor를 억제한다는 것이 밝혀진 후 1970년대 이후 주로 유방암 치료에 이용되어 왔으며 종종 진행된 유방암이나 자궁내막암에서 보존적 치료제로 사용되어 왔다.⁶ 타목시펜과 같은 항 에스트로겐 제제의 세포증식 억제

효과는 에스트로겐 수용체와의 결합을 통해 이루어 진다는 여러 보고가 있으며 항 에스트로겐 제제를 에스트로겐 수용체 양성인 암에 사용하는 이론적 근거가 된다.⁷ 타목시펜은 강력한 항 에스트로겐 제제로 유방등과 같은 목표 조직의 에스트로겐 수용체에 에스트로겐과 경쟁적으로 결합하여 항 에스프로겐 효과를 나타낸다. 그러나 유방조직 이외의 여성 생식 기관에서 타목시펜은 에스트로겐 agonist로도 작용할 수 있다는 여러 보고가 있다. 특히 자궁에서 타목시펜의 사용으로 자궁내막 증식증이나 자궁내막암, 자궁내막 폴립등의 발생이 증가함을 보고하고 있으며⁸ 타목시펜의 사용 후 14.2%에서 자궁근종이 발생 하였음을 보고하기도 하였다.⁹

이러한 타목시펜의 파라독스한 기전으로 인해 타목시펜을 partial agonist-antagonist라고도 부른다.

이러한 타목시펜의 에스트로겐 수용체를 통한 기전에 대해서는 아직까지 명확히 밝혀진 바는 없으나 1996년 estrogen receptor α (이하 ER α)의 isoform인 estrogen receptor beta(이하 ER β)의 발견으로 인해 타목시펜의 에스트로겐 수용체를 통한 기전이 관심이 되고 있다.¹⁰

ER β 는 ER α 와 같이 네군데의 functional domain을 가지고 있으며 DNA binding domain(DBD)에서 ER α 와 96%의 동형성을 가지고 있으며 ligand binding domain(LBD)에서는 53%의 동형성을 가지고 있다.¹¹(fig.1) 이러한 ER α 와 ER β 의 분포 양상은 각 장기별로 다르며 특히 타목시펜 사용후 발생한 자궁근종에서 ER α 와 ER β 의 분포 양상에 대해서는 아직까지 많은 연구가 이루어 지지 않았다. 따라서 본 연구는 면역조직화학 염색법을 이용하여 타목시펜을 사용후 발생한 자궁근종에서 ER α , ER β 그리고 progesterone receptor(이하 PR)의 발현 양상을 조사해 보고 타목시펜의 사용이 자궁근종의 발생과 성장에 어떤 역할을 하는지 알아보고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

총 21명의 자궁근종으로 전 자궁적출술을 시행한 환자를 대상으로 하였다. 폐경된 유방암 환자에서 타목시펜 치료후 발생한 자궁근종 8예(TAM group)와 폐경후 여성에서 발생한 자궁근종 7예(POST group), 폐경전 증식기(SEC group)와 분비기(PRO group)에서 얻은 자궁근종 조직 각 3예에서 얻은 조직 절편을 사용하였다. 폐경된 유방암 환자의 평균 연령은 45.3 세(± 6.0 SD), 폐경전 여성중 분비기는 42.7세(± 9.2

SD), 증식기는 36.7세(± 4.6 SD)이었고 폐경후 여성은 57.7세(± 5.9 SD) 이었다. 타목시펜을 치료받은 기간은 평균 22.9개월(± 10.5 SD)이었다.

2. 연구방법

1) 조직처리

각 군에서 얻은 조직 절편은 10%의 포르말린 용액에서 3시간동안 고정 시킨 후 파라핀 포매를 거쳐 4mm두께의 절편을 만들어 hematoxylin 대조군 염색을 시행 하였다.

2) ER α , ER β , PR에 대한 면역 조직화학 염색

ER α 의 염색은 절편 조직을 Tris 완충용액과 3% 과산화 수소 용액에서 각각 10분, 30분간 처리 한 후 생쥐에서 추출된 단클론 1차 항체(Novocastra, Newcastle, UK, 1:50)를 사용하여 22°C에서 2시간 동안 반응 시킨 후 Tris 완충용액으로 다시 10분간 세척하였다. 다음 단계로 2차 항체를 30분간 반응시킨 후 Streptavidin-HRP 처리후 Nova red(VECTOR, Burlingame, CA, USA)를 사용하여 발색 과정을 거친후 hematoxylin으로 대조염색을 하였다.

ER β 의 염색은 생쥐에서 추출된 단클론 1차 항체(Novocastra, Newcastle, UK, 1:100)를 상온에서 15분간 반응시키고 다음 단계로 2차 항체를 15분간 반응시켰다. Streptavidin-Biotin complex와 amplification reagent, Streptavidin peroxidase를 각각 15분간 반응시킨 후 Nova red(VECTOR, Burlingame, CA, USA)를 사용하여 발색 과정을 거친후 hematoxylin으로 대조염색을 하였다. 각 단계 사이에 Tris 완충용액으로 세척을 하였다.

PR의 염색은 ER α 의 염색과정과 동일하며 생쥐에서 추출된 단클론 1차 항체(Novocastra, Newcastle, UK, 1:75)를 사용 하였다.

3) 염색반응 결과판정

염색 결과는 광학 현미경으로 400배로 확대 관찰한 후 path pacs ver 1.0을 사용하여 사진을 촬영 하였다. 촬영된 영상은 image analyser를 이용하여 ER α , ER β , PR에 대한 염색 정도를 상대적으로 판정 하였다.

최대의 염색 강도에 따라 0-3점 까지 점수를 주었고(0=음성, 1=약 양성, 2=중등도 양성, 3=강 양성). 전체 세포중 염색된 세포의 비율에 따라 0-4까지 점수를 주었다.(0=음성, 1=10%이하, 2=11-50%, 3=51-80%, 4=81-100%) ER α , ER β , PR에 대한 염색 정도의 총 결과는 두 점수를 곱하여 immuno reactive score(IRS)를 구하여 반 정량적으로 측정 하였다.

4) 통계처리

SPSS 11.0을 사용하여 Kruskall-wallis test, Mann-

Whitney U test를 사용 하였으며 p value 0.05 미만을 통계적으로 의미있는 것으로 간주 하였다.

결과

Fig3, 4, 5는 각 군의 ER α , ER β , PR의 면역 조직화학적 염색 양상을 나타낸 그림이다. 특히 ER β 에서 타목시펜 치료를 받은 군에서 다른 군에 비해 염색이 잘 되지 않는 것을 관찰 할 수 있었다.

1. ER α 의 발현

폐경전 여성중 분비기에서 ER α 의 IRS는 4.66(\pm 1.15SD)이었고 증식기에는 3.66(\pm 0.57SD)으로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다.(P=0.400) 타목시펜을 사용한 군과 폐경후 여성에서의 IRS는 각각 6.62(\pm 3.29SD)와 6.57(\pm 3.30SD)로 차이를 보이지 않았다.(P=0.952) (fig. 2)

2. ER β 의 발현

ER β 의 발현은 각 군에 따라 통계적으로 유의하게

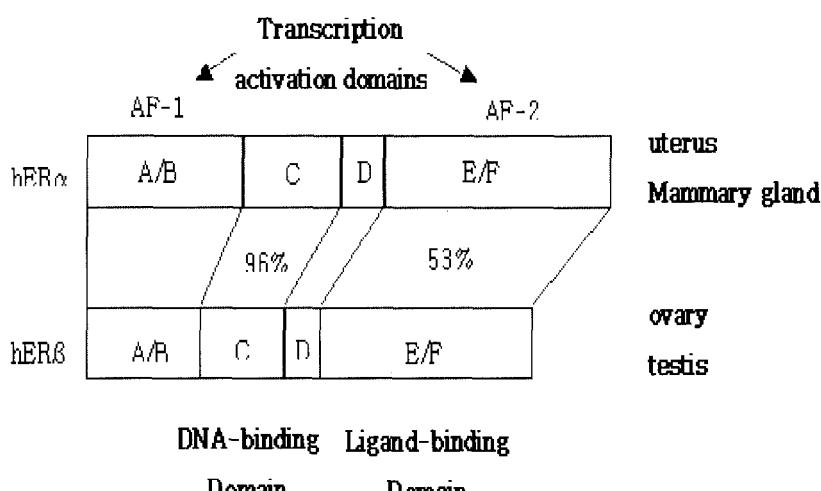


Fig. 1 Structural comparison of ER α and ER β

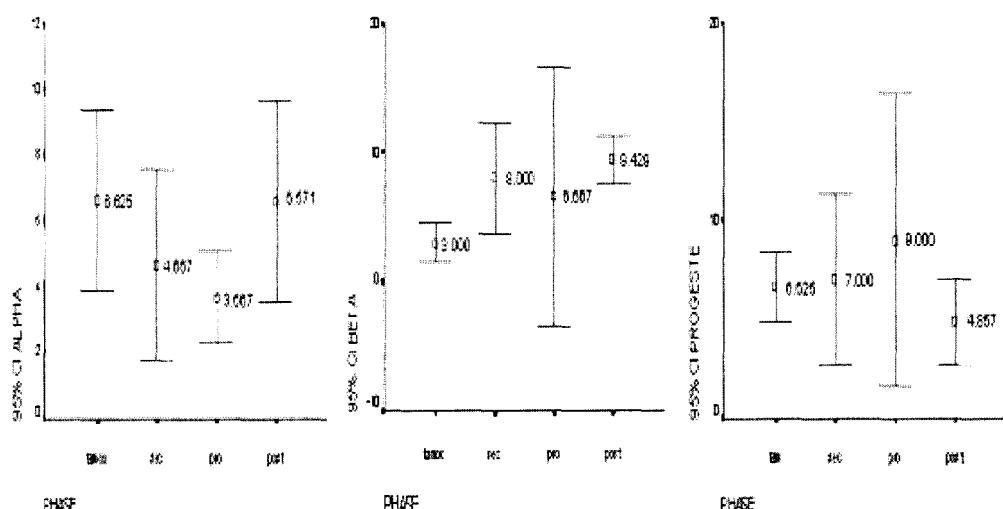


Fig. 2 Mean immuno reactive score of ER α , ER β and PR in uterine myoma cells

차이가 있었다.($P=0.005$) 특히 타목시펜을 사용한 군의 IRS는 $3.0(\pm 1.85\text{SD})$ 이었고 폐경후 여성에서의 IRS는 $9.42(\pm 2.07\text{SD})$ 로 타목시펜을 사용한 군에서 ER β 의 발현이 폐경후 여성에서보다 통계적으로 유의하게 낮음을 알 수 있었다.($P=0.001$)(fig. 2) 이는 아마도 타목시펜 투여시 자궁근종에서 ER(의 발현을 억제 시키고 타목시펜이 주로 ER α 를 통해 agonistic action으로 자궁근종의 발생과 성장에 영향을 미친다고 생각 할 수 있다.

3. PR의 발현

PR의 발현은 각 군에 따라 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 않았으나($P=0.133$) 타목시펜을 사용한 군에서 IRS는 $6.625(\pm 2.13\text{SD})$ 로 폐경 후 여성에서의 IRS $4.857(\pm 2.34\text{SD})$ 보다 증가하는 양상을 보였다.($P=0.133$)(fig. 2) 이는 통계적으로 유의하지는 않으나 타목시펜의 사용으로 PR의 발현을 유도한 결과라고 생각 할 수 있다.

고찰

항 에스트로겐으로 주로 작용하는 타목시펜이 여성 생식기관에서 에스트로겐 효과를 가진다는 보고가 있어 왔으며 특히 자궁과 난소의 병리학적 변화를 유발 할 수 있다는 보고가 최근 증가하고 있다.

특히 자궁에서 자궁내막 폴립, 자궁내막증식증, 자궁내막암 등이 타목시펜으로 치료받은 환자에서 증가된다는 보고가 있다.⁸ 그러나 타목시펜의 사용으로 자궁근종의 발생과 성장에 영향을 줄 수 있는지에 대해서는 아직까지 많은 보고가 있지는 않다. Lahti 등은 타목시펜을 사용한 환자에서 자궁근종이 더욱 빈번하게 발견 됨을 보고하였으나 타목시펜을 사용한 환자들에서 이미 자궁근종이 존재하고 있었는지에 대한 과거력을 알 수 없으므로 자궁근종의 발생과 성장이 타목시펜의 사용 때문이라고 단정 지을 수는 없다고 말하고 있다.⁹ 그러나 자궁근종도 에스토로겐이나 프로게스테론 같은 여성 호르몬의 영향을 받으므로 자궁에서 에스트로겐 효과를 가질 수 있는 타목시펜의 사용으로 자궁근종의 발생과 성장에 영향을 줄 수 있을 것이다. 본 연구에서도 타목시펜의 사용으로 인해 자궁 근종에서 ER α , ER β , PR의 발현 양상이 변화 함을 관찰 할 수 있었고 특히 타목시펜을 사용한 군에서 ER β 의 발현이 현저하게 감소함을 알 수 있었다.

타목시펜과 같은 ER ligand들은 ER과 결합하여 ER에서 heat shock protein(HSP) 복합체를 해리 시키고 ER이 dimerization되면서 estrogen receptor element(ERE)에 결합하게 되고 AF-1과 AF-2에 의해 gene transcription이 일어나게 된다. 이것이 ERE pathway이다. 타목시펜은 ER이 ERE와 결합은 하게 하지만 AF-2의 작용을 억제 함으로서 에스트로겐 길항 작용을 하는 것으로 알려져 있다.^{12, 13}

타목시펜과 같은 항 에스트로겐 제제가 자궁에서 어떻게 에스트로겐 효과를 나타내는지에 대해서는 아직 명확하게 밝혀진 바는 없다. 최근에 ER중 AF-1이 특정 세포에서 강한 활성을 가지는 것이 발견 되었고 타목시펜이 이런 AF-1 활성이 강한 세포에서 agonist로 작용 할 것이라 생각 했으나 endometrium이나 cervix같이 AF-1의 활성이 약한 세포에서도 타목시펜이 강력한 에스트로겐 효과를 가진다는 것이 보고 되었다.^{14, 15, 16} 따라서 최근들어 타목시펜과 같은 ER ligand들이 ER을 통해 agonist로 작용 할 수 있는 다른 경로 즉, AP-1 pathway가 대두 되었다.^{17, 18} Lee 등은 2002년에 자궁근종에서 타목시펜 수용체를 통한 기전의 연구에서 AP-1 pathway를 매개하는 단백질인 c-fos유전자의 발현이 타목시펜을 사용한 후 발생한 자궁근종에서 의미있게 높게 발견 됨을 보고 하였다.¹⁹ 따라서 자궁근종에서 타목시펜이 기존의 ERE pathway를 통한 에스트로겐 효과보다는 ER α 와 결합한 후 AP-1 pathway를 경유하여 에스트로겐 효과를 나타내는 것이 더욱 중요하다고 볼 수 있으며 자궁근종의 발생에 영향을 준다고 생각 할 수 있다.

1996년 ER α 의 isoform인 ER β 의 발견으로 ER β 를 통한 타목시펜의 작용이 관심이 되고 있다. ER β 의 작용기전에 대해서는 아직까지 잘 알려져 있지는 않으나 DNA의 결합이나 ligand의 결합 양상은 ER α 와 유사한 것으로 알려져 있다.²⁰ ER β 는 ligand independent한 방식으로 표적 세포의 promotor gene에 결합하거나 불 활성화된 ER β 가 ER 와 dimer를 이루어 ER α 를 통한 기전을 억제 하는것으로 알려져 있다.²¹

본 연구에서 타목시펜을 사용한 군에서 ER β 의 발현이 의미있게 감소함을 알 수 있었고 ER β 의 감소로 인하여 ER β 가 ER α 의 작용을 상쇄 시키는 힘이 없어지게 됨으로서 타목시펜을 사용한 군에서 자궁근종의 발생과 성장에 영향을 주었을 것으로 생각된다.

또한 타목시펜은 프로게스테론 수용체의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있으며²² 본 연구에서도 통계적으로 유의 하지는 않으나 타목시펜을 사용한 군에서 PR의 발현이 증가하는 양상을 보이는 것으로

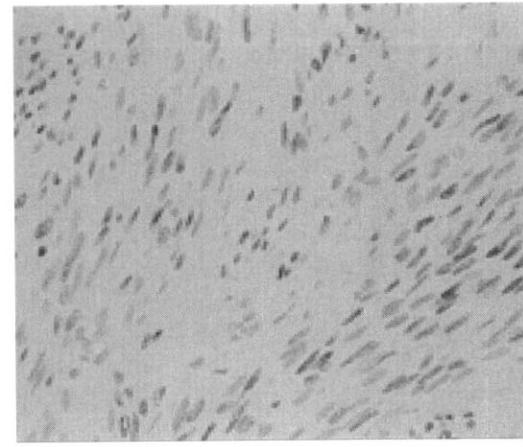
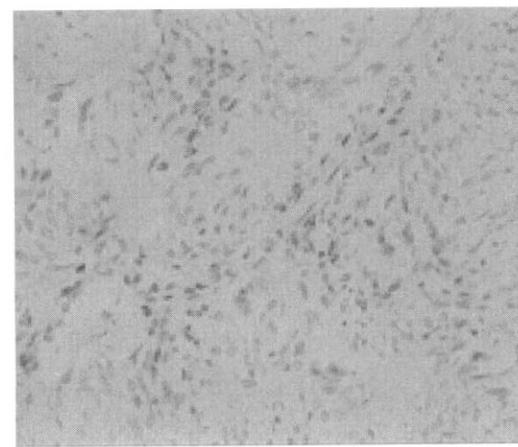
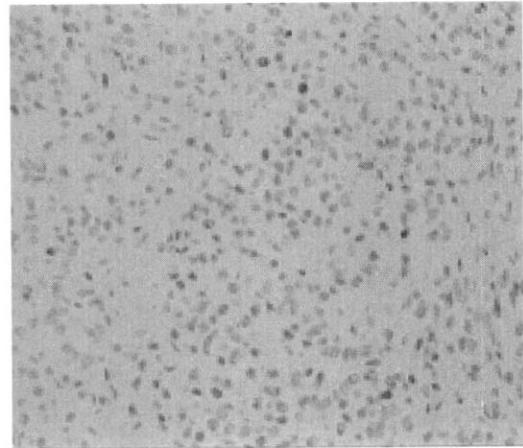
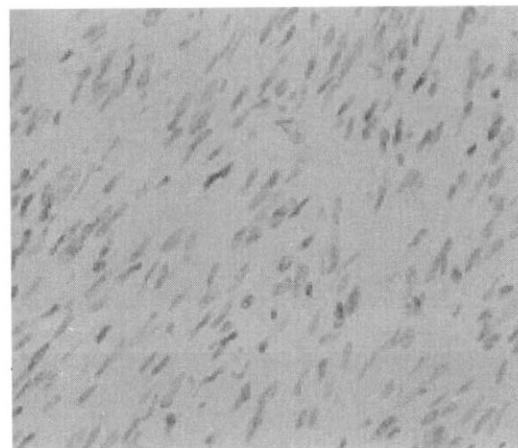
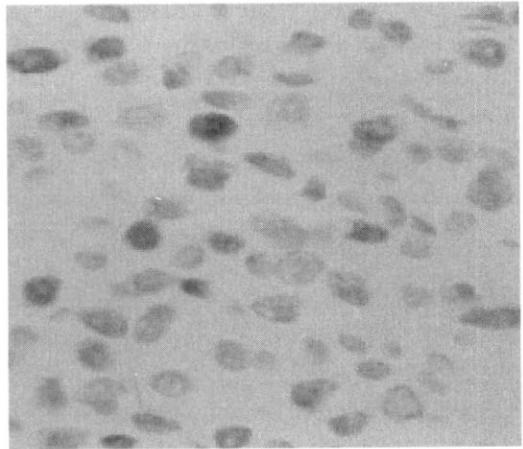
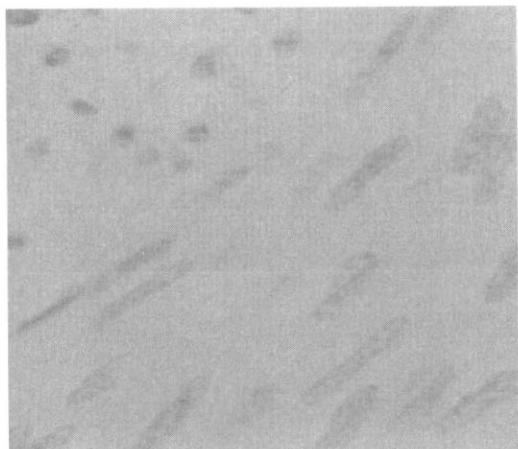


Fig 3. Expression of ER α in uterine myoma cells in paraffin section ($\times 400$)
(NC:negative control, PC:positive control)

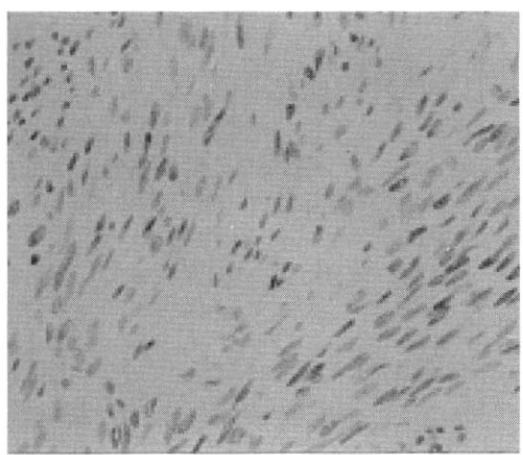
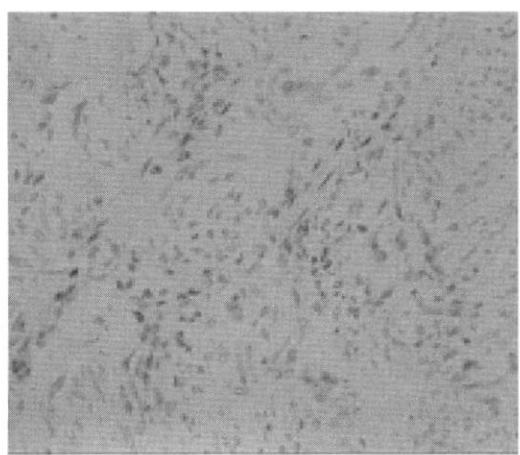
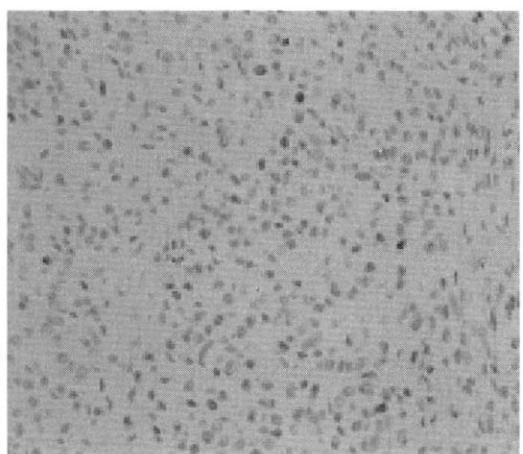
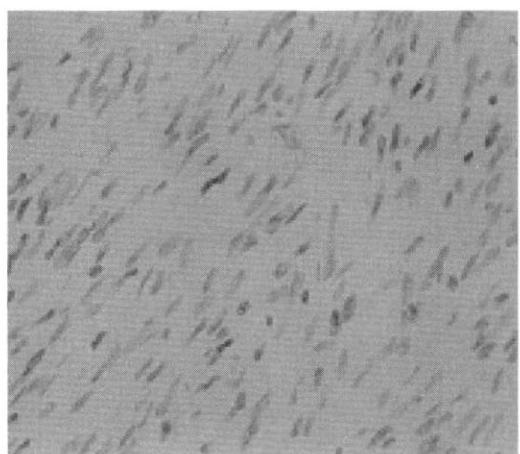
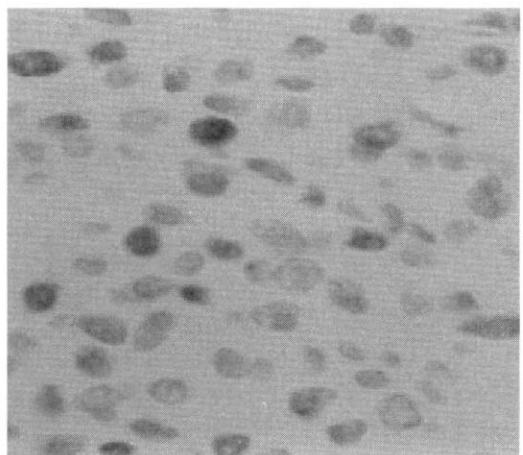
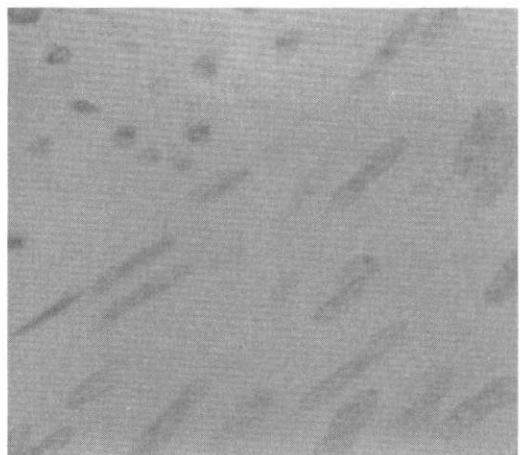


Fig 4. Expression of ER β in uterine myoma cells in paraffin section ($\times 400$)
(NC:negative control, PC:positive control)

체경된 유방암 환자에서 Tamoxifen 사용후 발생한 자궁근종에서 estrogen receptor alpha, beta, progesterone receptor 밀현의 차이

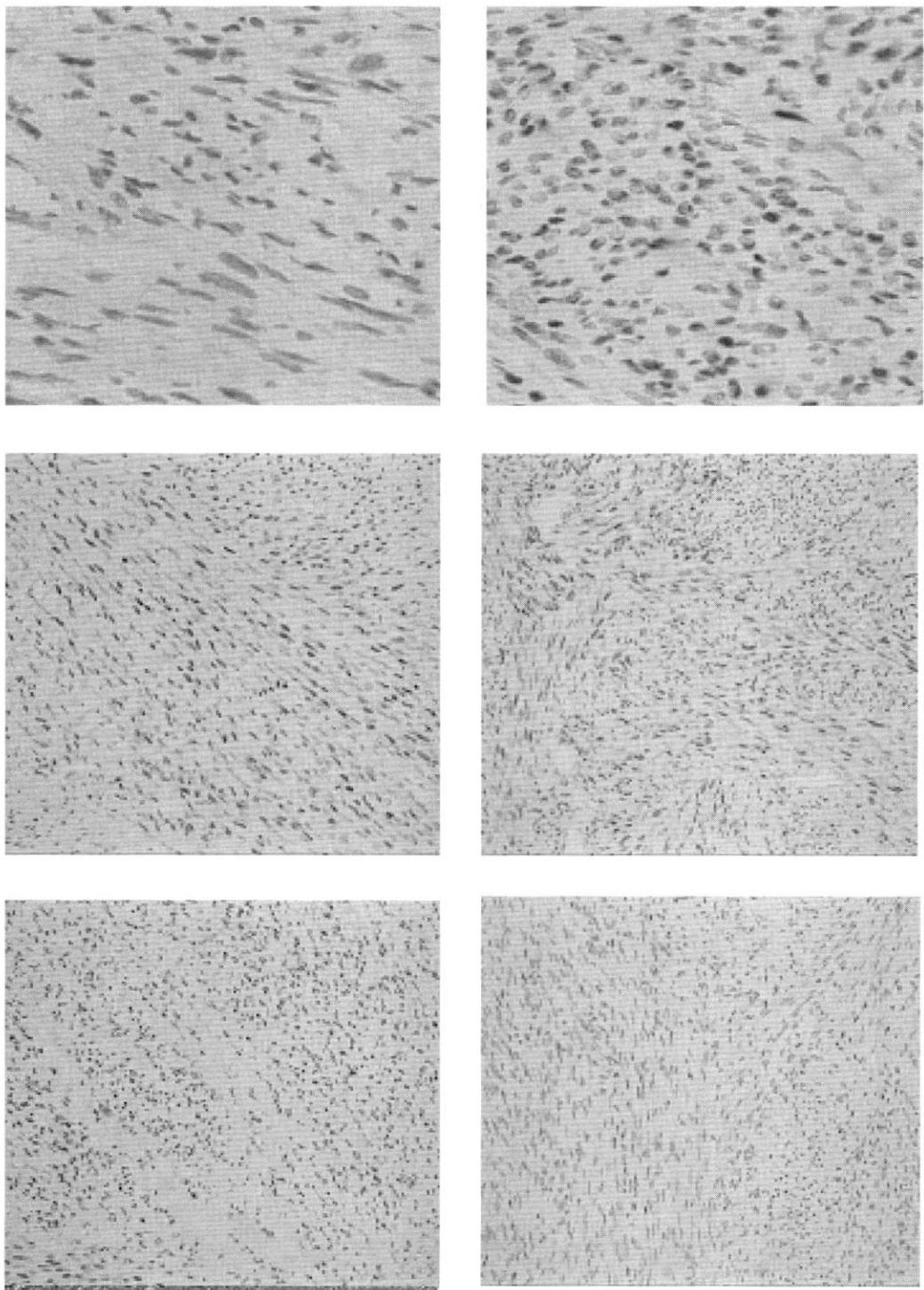


Fig 5. Expression of PR in uterine myoma cells in paraffin section ($\times 400$)
(NC:negative control, PC:positive control)

보아 이런 PR발현의 증가 또한 자궁근종의 발생과 성장에 영향을 줄 수 있을것으로 생각 된다.

결 론

본 연구는 타목시펜을 사용한 폐경후 유방암 환자에서 발생한 자궁 근종에서 ER α , ER β , PR의 발현을 폐경후 여성과 폐경전 여성에서 발생한 자궁근종에서의 발현 양상과 비교 해 보았으며 타목시펜을 사용한 군에서 ER β 의 발현이 유의하게 감소함을 알 수 있었고 PR의 발현은 통계적으로 유의하지는 않으나 증가하는 경향이 있음을 알 수 있었다. 이는 타목시펜의 사용으로 ER β 의 down regulation이 일어나고 이로인해 ER β 의 ER α 에 대한 길항 작용이 감소하여 자궁근종의 발생과 성장에 영향을 주는 것으로 생각 된다. 또한 타목시펜이 PR의 발현을 유도하여 자궁근종의 성장에 영향을 줄 수 있었을 것이다.

※※※ 참고문헌 ※※※

1. Butran VC Jr, Reiter RC. Uterine leiomyomata: etiology, symptomatology and management. *Fertil Steril* 1981;36:433-45.
2. Ross PK, Pike MC, Vessey MP, Bull D, Yeates D, Casagrande JT. Risk factors for uterine fibroids: Reduced risk associated with oral contraceptives. *Br Med J* 1986;293:359-63.
3. Lumsden MA, Weeest CP, Baird PT. Goserelin therapy before surgery for fibroids. *Lancet* 1987;1:36-7.
4. Wilson EA, Yang F, Rees ED. Estradiol and progesterone binding in uterine leiomyomata and in normal uterine tissue. *Obstet Gynecol* 1980; 55: 20-4.
5. Fisher DA, Lakshmanan J. Metabolism and effects of epidermal growth factor and their related growth factors in mammals. *Endocr Rev* 1990; 11: 418-42.
6. Leslie B, Dennis D, James R, Stephen MS, Jonathan L, Erin MM. Tamoxifen therapy for breast cancer and endometrial cancer risk. *J natl cancer Inst* 1999; 91: 1654-62.
7. Coesy E, Borgna JL, Rochefort H. Tamoxifen and metabolites in MCF7 cells: correlation between binding to estrogen receptor and inhibition of cell growth. *Cancer Res* 1982; 42: 317-23.
8. Neven P, Vergote I. Controversies regarding tamoxifen and uterine carcinoma. *Curr opin Obstet Gynecol* 1998; 10: 9-14.
9. Lahti E, Blanco G, Kauppila A, Apaja-Sarkkinen M, Taskinen PJ, Laatikainen T. Endometrial changes in postmenopausal breast cancer patients receiving tamoxifen. *Obstet Gynecol* 1993; 81: 660-4.
10. Zhang W, Sandra A, Guojun C, Evan RS, Margaret W, Jan-Ake G. Update on estrogen signaling. *FEBS Lett* 2003; 546: 17-24.
11. Masami M, Satoshi I. Estrogen receptors: How do they control reproductive and non reproductive functions? *Biochem Biophys Res Comm* 2000; 270: 1-10.
12. Arbuckle ND, Dauvois S, Parker MG. Effect of antiestrogens on the DNA binding activity of estrogen receptors in vitro. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 3839-44.
13. Webster NJ, Green S, Jin JR, Chambon P. The hormone binding domains of the estrogen and glucocorticoid receptors contain an inducible transcription activation function. *Cell* 1988; 54: 199-207.
14. Berry M, Metzger D, Chambon P. Role of two activating domains of the estrogen receptor in the cell type and promoter context dependent agonistic activity of the anti estrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J* 1990; 9: 2811-18.
15. Albert JL, Sundstrom SA, Lytle CR. Estrogen regulation of placental alkaline phosphatase gene expression in human endometrial adenocarcinoma cell line. *Cancer Res* 1990; 50:3306-10.
16. Jamil A, Croxtall JD, White JO. The effect of antiestrogens on cell growth and progesterone receptor concentration in human endometrial cancer cells. *J Mol Endocrinol* 1991; 6: 215-21.
17. Umayahara Y, Kawamori R, Watada H, Imano E, Iwama N, Morishima T, et al. Estrogen regulation of the insulin like growth factor 1 gene transcription involves an AP-1 enhancer. *J Biol Chem* 1994; 269: 16433-42.
18. Lee BS, Cha DH, Jung KA, Lee HD, Park KH, Cho DJ, et al. The action mechanism of tamoxifen via estrogen receptor on uterine leiomyoma. *Kor J Fertil Steril* 2002;29:337-43.
19. Philips A, Chalbos D, Rochefort H. Estradiol increases and anti estrogen antagonize the growth factor induced activator protein-1 activity in MCF7 breast cancer cells without affecting c-fos and c-jun synthesis. *J Biol Chem* 1993; 268: 14103-8.
20. Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER(α): identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 1996; 392: 49-53.
21. Julie MM, Donald PM. The estrogen receptor (-isoform of the human estrogen receptor modulates ER(α) transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 1999;

140:5566-78.
22. Martin JE, Elisabeth GE, Pax HB, Klaske A, Ate GJ.

Tamoxifen treatment and gynecologic side effects: A review. Obstet Gynecol 2001; 97: 855-66.

= 국문초록 =

목적: 본 연구는 한국 폐경여성에서 암발생 추이를 고찰하여 보고 전체 폐경여성에서 호르몬 보충요법이 시행되었다고 가정시 암발생의 관점에서 손익을 추정하고자 하였다.

연구방법: 한국 여성의 평균 폐경연령은 49.7임으로 50세 이상 여성은 잠정적으로 폐경여성으로 추정하였다. 폐경 여성의 사망 원인은 통계청 인구 분석과의 2002년 사망통계를 이용하였으며 폐경여성의 암발생은 보건복지부산하 중앙암등록본부의 2002년 한국 중앙암등록사업 연례 보고서에 근거하여 산출하였다. 호르몬 사용시 위험도는 WHI 연구의 에스트로겐-프로게스테론 병합투여시 상대적 위험도를 이용하여 추정하여 보았다.

결과: 한국 폐경여성에서 가장 높은 사망원인은 암으로서 19.4%를 차지하였고, 만 명당 34명의 빈도를 보였다. 뇌 혈관질환과 심장질환이 다음으로 다빈도의 사망원인을 차지하였다.

여성전체에서는 유방암의 발생이 가장 높은 빈도를 보였으나 50세 이후 잠정적 폐경여성에서는 직장암의 발생이 오히려 빈번하여 호르몬 사용시 암발생의 관점에서는 손해보다 유익성이 보다 클것으로 추정되었다.

결론: 폐경후 호르몬 사용시 그 손익은 역학적 상황이 다른 경우에서는 기존의 WHI 연구결과와는 다른 결과가 초래된다.

●중심단어: 한국 폐경여성, 호르몬 요법, 암발생, 손익