

파제트병과 동반된 유방암에서 Anaphase Promoting Complex (APC)와 APC조절 단백질의 발현

박광화 · 이상엽¹ · 양우익² · 강엽³
이광길

연세대학교 원주의과대학 병리학교실
¹관동대학교 의과대학 병리학교실
²연세대학교 의과대학 병리학교실
³아주대학교 의과학 연구소

접 수 : 2004년 7월 23일
게재승인 : 2004년 9월 16일

책임저자 : 이 광 길
우 220-701 강원도 원주시 일산동 162
연세대학교 원주의과대학 병리학교실
전화: 033-741-1550
Fax: 033-731-6590
E-mail: lukebethel@hanmail.net

*본 논문은 연세대학교 원주의과대학 연구비(YUWCM 2001-1) 지원으로 이루어진 것임.

유방에 발생하는 파제트병은 비교적 드문 질병으로 전체 유방암의 0.5-4.3% 정도를 차지한다.¹ 파제트병은 유두 상피 내에 비교적 크고 투명한 세포질을 가진 특징적인 형태를 보이는 파제트 세포가 보이며, 흔히 유방에 관암종이 동반되는 것이 특징이다.²

파제트병의 발생 기전은 잘 알려져 있지 않지만, 표지향설(epidermotropic theory)과 제자리 악성세포 전환설(in-situ malignant transformation theory)의 두 가지 가설이 주로 받아들여지고 있다.³ 파제트 세포의 발생 기전을 명확하게 하는 것은 파제트병의 치료에 도움을 줄 것으로 생각된다. 예전에 주로 알려져 왔던 표지향설과는 달리 만일 파제트 세포의 발생이 유두 상피에서 발생된 것이라면, 대부분 파제트병 환자에게 시행되고 있는 유방절제술은 재고되어야 할 것이다. 그러나 파제트병의 희소성으로 인해 이 병의 암유전자 발현, 분자 표지자에

Expression of Anaphase Promoting Complex (APC) and APC Regulatory Proteins in Invasive Ductal Carcinoma Associated with Paget's Disease

Kwang Hwa Park, Sang Yeop Yi¹, Woo Ick Yang², Yup Kang³, and Kwang Gil Lee

Department of Pathology, Wonju College of Medicine, Yonsei University, Wonju; ¹Department of Pathology, College of Medicine, Kwandong University, Goyang; ²Department of Pathology, College of Medicine, Yonsei University, Seoul; ³Institute for Medical Science, Ajou University, Suwon, Korea

Background : Oncogene expression in Paget's disease of the breast is not well known. To characterize invasive ductal carcinoma associated with Paget's disease, we studied expression of anaphase promoting complex (APC) with its regulatory proteins. **Methods :** Immunohistochemical stainings were done with 10 cases of invasive ductal carcinoma associated with Paget's disease for APC, pituitary tumor transforming gene (PTTG), cyclin B1, p53, cyclin D1, and c-erbB-2. The expressions of these markers in Paget's disease were compared with those in the associated with carcinoma. **Results :** APC, PTTG, cyclin B1, and c-erbB-2 were positive in all of the cases with both Paget's disease and underlying carcinoma. p53 was expressed in Paget's disease of 6 cases (60%) and in carcinoma of 7 cases (70%). Cyclin D1 was positive in Paget's disease of 8 cases (80%) and in carcinoma of 9 cases (90%). **Conclusions :** Breast carcinomas with Paget's disease seem to be distinguished by the high expression of APC, cyclin B1, PTTG, c-erbB2, and cyclin D1 in contrast to breast cancers without Paget's disease. Furthermore, the similar expression patterns of APC and APC regulatory proteins in both Paget's disease and underlying breast cancer support the epidermotropic theory as its pathogenetic mechanism.

Key Words : Paget's disease-Breast Cancer-Anaphase Promoting Complex-Cyclin B1- PTTG

대한 연구나 발생 기전에 대한 연구는 많지 않은 실정이다.^{4,5}

Anaphase promoting complex (APC)는 ubiquitin ligase (E3)의 일종으로 세포 분열 시에 cyclin과 다른 세포분열을 조절하는 단백을 ubiquitin 매개 하에 분해시키는 작용을 한다.⁶ 최근의 연구에 의하면 암과 관련이 있는 cyclin B1과 PTTG 역시 APC에 의해 분해된다.^{7,8} 유방암에서 APC 발현의 감소는 나쁜 예후 인자와 관련이 있으며, 비배수체와도 관련이 있다.⁹ 림프절 전이가 없는 유방암에서 cyclin B1의 발현은 나쁜 예후를 나타내는 것으로 알려져 있고,¹⁰ PTTG mRNA의 발현이 림프절 침윤과 재발에 관여할 것으로 생각된다.¹¹ 그러나 파제트병과 그와 동반된 유방암에서 APC, cyclin B1, PTTG의 발현을 조사한 연구는 없었다.

저자들은 최근 APC가 유방암의 발생에 관여한다는 점을 보

고한 바 있다.⁹ 이 연구의 목적은 파제트병과 동반된 유방암 세포에서 APC와 APC 조절 단백질 pituitary tumor transforming gene (PTTG), cyclin B1과 p53, cyclin D1, c-erbB-2의 발현을 알아 봄으로써 파제트병과 그와 동반된 유방암의 유전자 발현 특성을 조사하는 데에 있다.

재료와 방법

1993년 1월부터 2002년 12월까지 10년간 연세대학교 세브란스병원과 원주기독병원에서 파제트병과 유방암이 동반되어 외과적으로 유방 절제술을 시행 받은 10예의 검체를 대상으로 하였다. 파제트병과 동반된 유방암은 전 예가 조직학적으로 침습관 암종이었다.

일차 항체로 APC (Institute for Medical Science, Ajou University, Suwon, Korea), PTTG (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA), cyclin B1 (DAKO, Copenhagen, Denmark), cyclin D1 (Novocastra, Newcastle, UK), p53 (Novocastra, Newcastle, UK), c-erbB-2 (DAKO, Copenhagen, Denmark)를 사용하였다. 면역조직화학 염색은 LSAB kit (DAKO, Copenhagen, Denmark)를 사용하였다.

10% 중성 포르말린에 고정하여 파라핀에 포매한 조직을 5 μ m 두께로 박절하여 코팅 슬라이드에 부착시키고 50°C에서 2시간 동안 건조시켰다. 10분간 3회 크실렌에 두어 파라핀을 제거하고 단계적으로 에탄올에 처리한 다음 세척하였다. 항원성 회복을 위해 pH 6.0 구연산 완충액에 슬라이드를 담근 후 마이크로웨이브 오븐에서 15분간 전처리를 시행하였다. 0.3% 과산화수소 용액에서 20분간 처리한 후 트리스 완충액을 이용하여 세척한 다음 일차 항체를 도포하였다. 일차 항체는 각각 APC 1:50, PTTG 1:50, cyclin B1 1:200, cyclin D1 1:40, p53 1:50, c-erbB-2 1:250 배율로 희석하여 냉장고에서 하룻밤 동안 배양한 후 세척하고, 이차 항체에 20분간 배양한 후 세척하고, streptavidin peroxidase에 20분간 배양하였다. 3-amino-9-ethylcarbazole로 발색하고 헤마톡실린으로 대조 염색한 후 글리세롤로 봉합하였다.

PTTG와 cyclin B1은 핵과 세포질에 모두 발현되는 것을 양성으로 하였고, cyclin D1과 p53은 종양 세포의 핵에서 발현되는 것을 양성으로 하였다. C-erbB-2는 완전히 염색되지 않는 것을 음성으로, 10%의 종양 세포에서 약하게 발현되는 경우를 1+, 종양 세포 10% 이상에서 중등도로 발현되는 것을 2+, 그리고 강하게 발현되는 것을 3+로 하였다. APC는 염색 강도에 따라 0, 1, 2, 3점으로 점수화하고 염색된 종양 세포의 백분율에 따라 0%는 0점, 0-25%는 1점, 25-50%는 2점, 50% 이상은 3점으로 하였다. 염색 강도와 염색 범위를 합산한 점수가 3점 미만은 음성으로, 3점 이상은 양성으로 하였다.⁶

파제트병과 유방암에서 발현된 유전자에 대한 통계학적 유의

Table 1. Immunohistochemical results for 10 patients with Paget's disease and breast cancer

Molecular markers	Immunopositivity (n=10)		p value
	Paget's disease (%)	Breast cancer (%)	
APC	10 (100)	10 (100)	
Cyclin B1	10 (100)	10 (100)	
PTTG	10 (100)	10 (100)	
c-erbB-2	10 (100)	10 (100)	
Cyclin D1	8 (80)	9 (90)	0.6934
p53	6 (60)	7 (70)	0.0002

APC, anaphase promoting complex; PTTG, pituitary tumor transforming gene.

성은 Spearman 상관 계수를 통해 알아보았으며, $p < 0.05$ 인 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

APC는 10예 모두 파제트병과 유방암에서 양성이었다. Cyclin B1과 PTTG 역시 10예의 파제트병과 유방암에서 모두 양성을 보였으며, c-erbB-2 역시 10예 모두 양성 반응을 보여 파제트 세포와 유방암 세포는 서로 100%의 일치율을 보였다. p53은 파제트병의 6예에서 양성(6/10)이었고 유방암은 7예에서 양성(7/10)이었으며 파제트병과 유방암 모두에서 양성인 예가 많아 유의한 상관관계가 있었다($p = 0.0002$, 상관계수 = 0.9129). Cyclin D1은 파제트병의 8예에서 양성(8/10)이었고 유방암의 9예에서 양성(9/10)이었으나 두 병변에서 모두 양성인 예가 적어 파제트병과 유방암 사이에 유의한 관계는 없었다($p = 0.6934$, 상관계수 = 0.1431)(Table 1).

APC는 분열하는 피부 기저 세포의 핵과 소수의 림프구의 핵에서 약하게 발현되었으나, 파제트 세포의 핵과 유방암 세포의 핵에서 더 강하고 뚜렷하게 양성으로 발현되었다. Cyclin B1은 소수의 피부 기저 세포의 세포질에서는 약하게 발현되었고, 파제트병과 유방암에서는 소수의 세포에서 핵과 세포질에 염색이 되었는데, 특히 세포 분열기에 있는 세포에서는 대부분 양성으로 발현되었다. PTTG는 피부 기저 세포에서도 발현되었고, 파제트 세포와 유방암 세포에서 핵과 세포질에 강하게 발현되었다. 특히 세포질에서는 과립상으로 염색되었다. C-erbB-2는 파제트 세포와 유방암 세포에서만 발현되었고, 전 예 모두 주로 세포막에 3+ 정도로 강하게 발현되었으며 일부는 세포질에도 발현되었다. Cyclin D1과 p53은 모두 파제트 세포와 유방암 세포의 핵에서 발현되었다(Fig. 1).

고 찰

이 연구에서 우리는 파제트병과 동반된 유방암에서 APC와

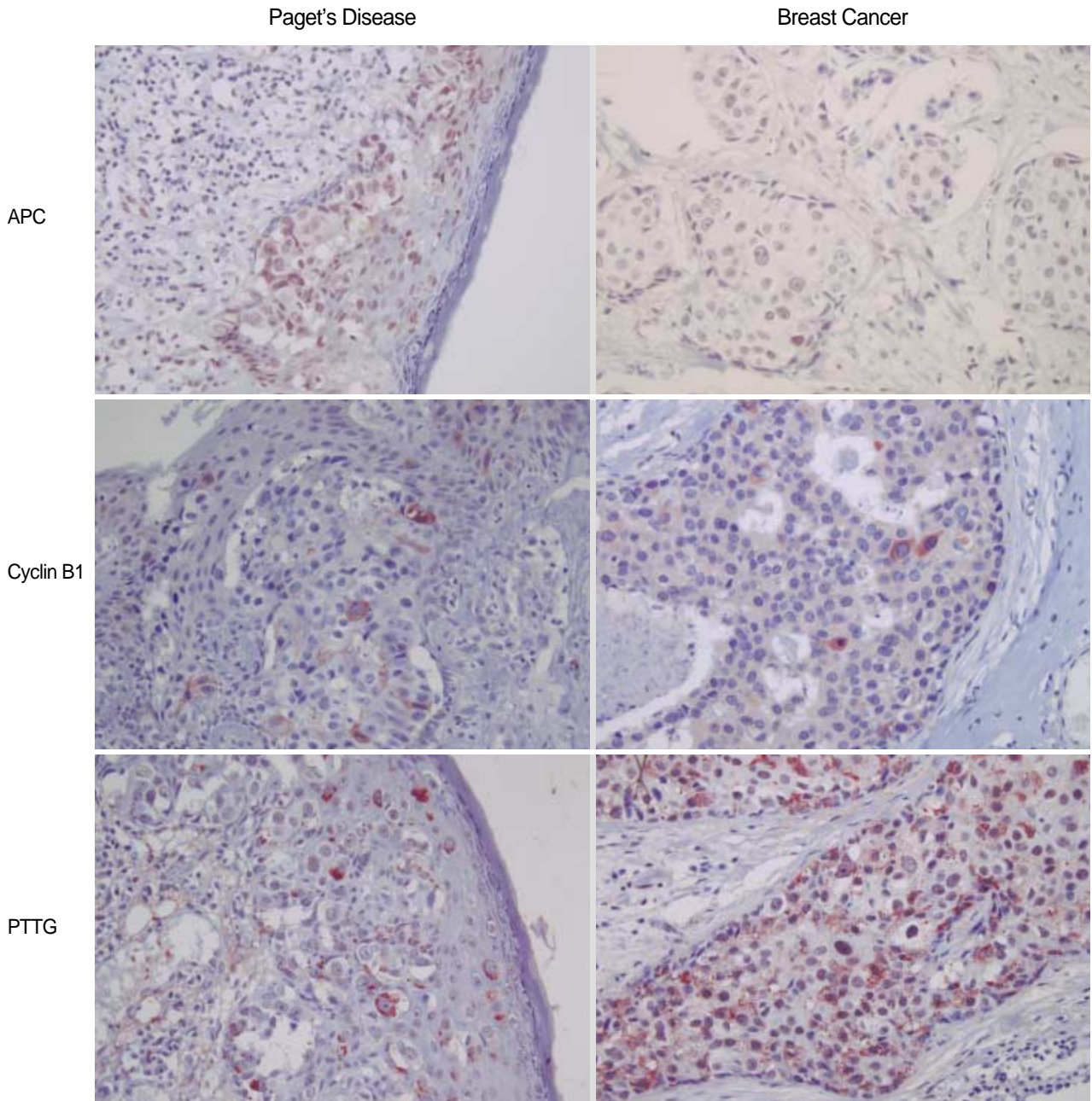


Fig. 1. Immunohistochemical staining results for anaphase promoting complex (APC), cyclin B1, pituitary tumor transforming gene (PTTG), c-erbB-2, cyclin D1 and p53 in Paget's disease and associated breast carcinoma. APC, cyclin D1, and p53 are expressed in tumor cell nuclei. Cyclin B1 and PTTG are expressed in both nucleus and cytoplasm. C-erbB-2 is intensely expressed in membrane and cytoplasm. (Fig. 1 continued at next page)

APC에 의해 조절되는 cyclin B1과 PTTG 발현을 면역조직화학 염색으로 확인하였다. 파제트 세포와 동반된 유방암 세포에서 APC, cyclin B1, PTTG, c-erbB-2는 모두 양성으로 염색되어 이 유전자들의 발현에서 두 세포는 서로 완전히 일치하는 양상을 보였다. 또한 p53 발현 양상 역시 통계적으로 유의하게 일치하는 결과를 얻었다. 파제트병의 발생 기전에 대한 최근의 한 연구에 의하면, 파제트 세포와 유방암 세포에서 HER2, HER3,

HER4가 과발현되며 피부의 상피 세포에서는 heregulin-alpha가 분비된다고 하였다. 이는 HER2의 수용체에 결합하여 이로 인해 유방암 세포의 운동성이 증가하여 유두 상피로 이동하게 되는 것이라고 설명하고 있다.¹² 본 연구에서도 파제트 세포와 동반된 유방암 세포 전 예에서 c-erbB-2가 과발현되었다. C-erbB-2의 과발현은 Fu 등⁴의 연구와 우리의 연구가 일치하는 결과였다. 이러한 점과 이 연구에서 시도된 APC, cyclin B1,

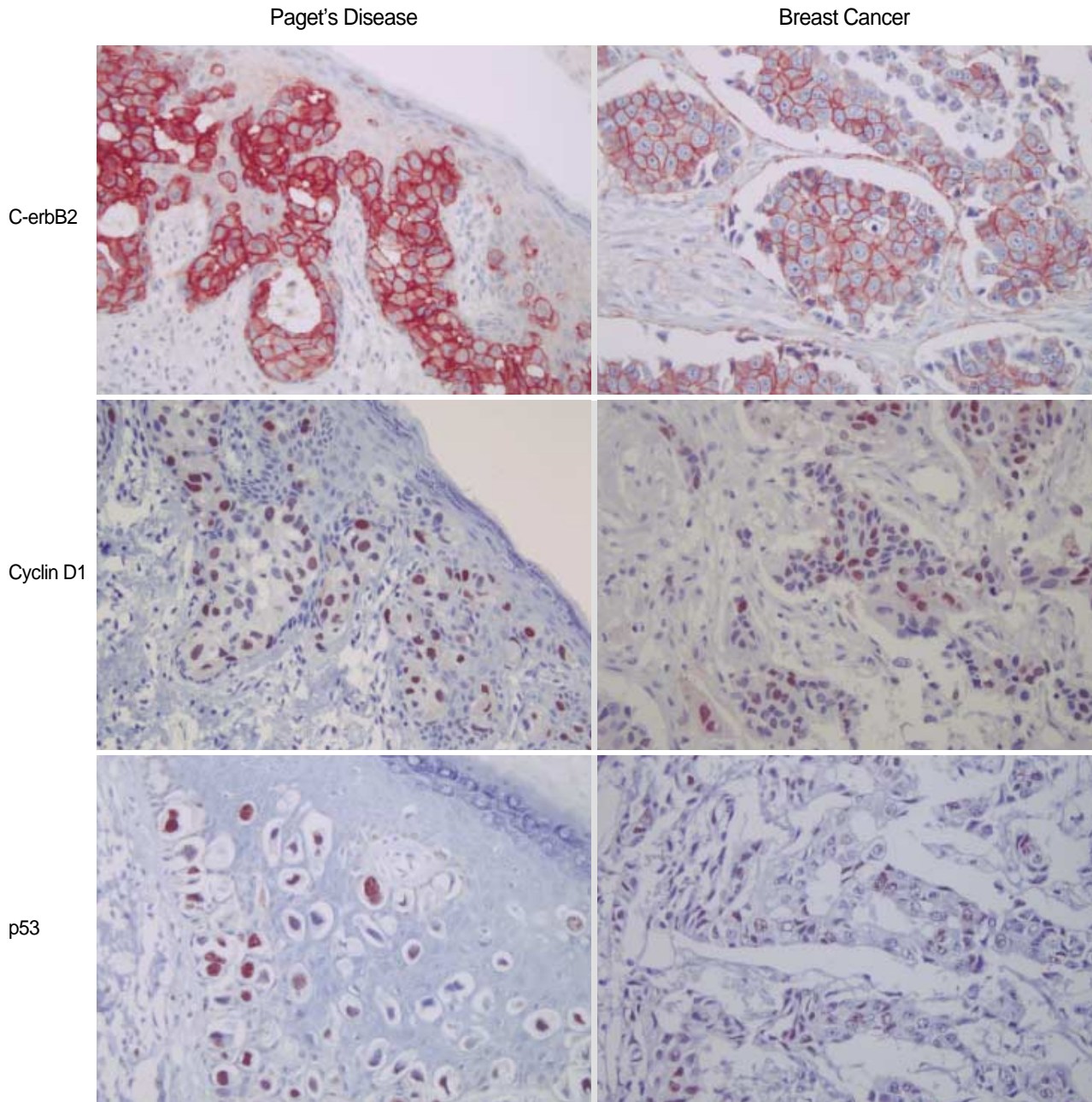


Fig. 1. (Continued from the previous page) Immunohistochemical staining results for anaphase promoting complex (APC), cyclin B1, pituitary tumor transforming gene (PTTG), c-erbB-2, cyclin D1 and p53 in Paget's disease and associated breast carcinoma. APC, cyclin D1, and p53 are expressed in tumor cell nuclei. Cyclin B1 and PTTG are expressed in both nucleus and cytoplasm. C-erbB-2 is intensely expressed in membrane and cytoplasm.

PTTG, p53의 발현 양상이 파제트 세포와 동반된 유방암 세포에서 서로 일치하는 소견은, 파제트병이 표지항체에 의해 발생한다는 사실을 잘 설명해 주고 있는 것이다.

이전의 다른 연구에서 파제트병이 동반되지 않은 유방암의 경우 APC의 발현이 68%인데 비해, 파제트병과 동반된 유방암과 파제트병에서는 100%였다.⁹ Cyclin B1의 경우 파제트병과 동반되지 않은 유방암에서는 cyclin B1 발현이 양성인 경우가 47%,

56%로 알려져 있다.^{10,13} 그러나 이 연구에서는 파제트병과 동반된 유방암 세포 전 예에서 cyclin B1이 과발현되어 있었다. C-erbB-2 역시 파제트병이 동반되지 않은 유방암에서는 20-30% 정도로 발현된다.^{4,14} 이는 파제트병과 그와 동반된 유방암에서 100% 발현되는 점과는 대조적이다. Cyclin D1은 파제트병과 동반되지 않은 유방암의 15-30% 정도에서 발현되는 것으로 알려져 있다.^{15,16} 그러나 파제트병과 동반된 유방암의 경우 파제트

병과 유방암에서 각각 80%, 90%로 cyclin D1이 양성으로 발현되어 파제트병이 동반되지 않은 유방암과는 대조적인 결과로 생각된다. 이러한 점은 파제트병과 동반된 유방암과 파제트병에서 cyclin D1이 100% 발현되는 것을 보고한 Fu 등의 연구에서도 확인된다.⁴ 이러한 점들을 종합해서 볼 때 파제트병과 동반된 유방암은 파제트병이 병발하지 않은 유방암과는 분자 표지자 발현 양상이 다르며, 임상적 특성 또한 다를 가능성이 많다고 생각된다. 파제트병과 동반된 유방암에서 주로 나쁜 예후를 보이는 표지자의 발현이 많은 점으로 보아 예후 역시 나쁜 가능성이 많다고 추정된다. 그러나 보다 정확한 임상적 의미를 알기 위해서는 더 많은 증례에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Chaudary MA, Millis RR, Lane EB, *et al.* Paget disease of the nipple: A ten year review including clinical, pathological, and immunohistochemical findings. *Breast Cancer Res Treat* 1986; 8: 139-46.
2. Juan Rosai. *Surgical Pathology*. 9th ed. New York: Mosby, 2004; 1813-5.
3. Sakorafas GH, Blanchard K, Sarr MG, Farley DR. Paget's disease of the breast. *Cancer Treat Rev* 2001; 27: 9-18.
4. Fu W, Loboeki CA, Silberberg BK, Chelladurai M, Young SC. Molecular markers in Paget disease of the breast. *J Surg Oncol* 2001; 77: 171-8.
5. Kuan SF, Montag AG, Hart J, Krausz T, Recant W. Differential expression of mucin genes in mammary and extramammary Paget's disease. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 1469-77.
6. Peters J-M. The anaphase-promoting complex: Proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell* 2002; 9: 931-43.
7. Zur A, Brandeis M. Securin degradation is mediated by fzy and fzr, and is required for complete chromatid separation but not for cytokinesis. *EMBO J* 2001; 20: 792-801.
8. Herbert M, Levasseur M, Homer H, Yallop K, Murdoch A, McDougall A. Homologue disjunction in mouse oocytes requires proteolysis of securin and cyclin B1. *Nature Cell Biol* 2003; 5: 1023-5.
9. Eom M, Park KH, Lee KG, Yi SY, Kang Y, Jung SH. Relationship between expression of anaphase-promoting complex and prognostic factors in invasive ductal carcinoma of breast. *Korean J Pathol* 2003; 37: 19-25.
10. Rudolph P, Kuhling H, Alm P, *et al.* Differential prognostic impact of the cyclins E and B in premenopausal and postmenopausal women with lymph node-negative breast cancer. *Int J Cancer* 2003; 105: 674-80.
11. Solbach C, Roller M, Fellbaum C, Nicoletti M, Kaufmann M. PTTG mRNA expression in primary breast cancer: a prognostic marker for lymph node invasion and tumor recurrence. *Breast* 2004; 13: 80-1.
12. Schelfhout VR, Coene ED, Delaey B, Thys S, Page DL, De Potter CR. Pathogenesis of Paget's disease: epidermal heregulin-alpha, motility factor, and the HER receptor family. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 622-8.
13. Kuhling H, Alm P, Olsson H, *et al.* Expression of cyclin E, A, and B, and prognosis in lymph node-negative breast cancer. *J Pathol* 2003; 199: 424-31.
14. de Potter CR. The neu-oncogene: More than a prognostic indicator? *Hum Pathol* 1994; 25: 1264-8.
15. Zukerberg LR, Yang WI, Gadd M, *et al.* Cyclin D1 (PRAD1) protein expression in breast cancer: Approximately one-third of infiltrating mammary carcinomas show overexpression of the cyclin D1 oncogene. *Mod Pathol* 1995; 8: 560-7.
16. Barnes DM, Gillett CE. Cyclin D1 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 52: 1-15.