

유방암 환자에서 CK-19에 대한
역전사 중합효소반응을 이용한
골수 미세전이의 진단

연세대학교 대학원
의 학 과
최 선 호

유방암 환자에서 CK-19에 대한
역전사 중합효소반응을 이용한
골수 미세전이의 진단

지도 이 희 대 교수

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2005 년 12 월 일

연세대학교 대학원
의 학 과
최 선 호

최선희의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2005 년 12 월 일

감사의 글

먼저 본 논문이 완성될 수 있도록 아낌없는 지도와 편달을 보내주신 이 희대 교수님께 진심으로 감사의 인사를 드립니다. 그리고, 심사를 맡아주신 정 우희 교수님, 조재용 교수님께도 심심한 감사를 드립니다. 또한, 논문의 틀이 갖춰질 수 있도록 지도와 자문에 성심껏 응하여 주신 정 준, 고 승상 선생님께도 깊은 감사를 드립니다. 더불어 더운 여름날 묵묵히 실험을 진행하면서 자료 정리에 많은 도움을 주신 진단병리학교실 홍 순원 교수님, 정 미선 선생님과 여러 선생님들께도 고마움을 전해드립니다.

항상 뒤에서 저를 든든히 지켜주시고 응원을 보내주시는 부모님과 저에게 무한한 힘과 용기를 제공해주는 사랑하는 아내와 소중한 두 아들, 승현, 승민에게 이 논문을 드립니다.

2005. 12.

저자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	6
1. 대상 환자	6
2. 골수 채취 및 유핵세포 분리 및 암세포 배양	6
3. RNA 추출 및 DNase 처리	6
4. cDNA 합성	7
5. Oligonucleotide primer	7
6. PCR 및 반응 생성물의 확인	8
7. 결과 분석	9
III. 결과	10
1. Nested RT-PCR을 이용한 골수에서의 cytokeratin-19 검출	11
2. 연구 대상 환자의 임상정보 및 Cytokeratin-19 발현과의 상관관계	13
IV. 고찰	17
V. 결론	20
참고문헌	21
영문요약	24

그림 차례

그림 1. Nested RT-PCR을 이용한 골수에서의 cytokeratin-19 검출	12
---	----

표 차례

표 1. 대상환자의 임상 정보	10
표 2. Cytokeratin-19 발현과 기존 예후인자와의 상관관계	13
표 3. Stage별 CK-19 발현과 기존 예후인자와의 상관관계	16

국문요약

유방암 환자에서 CK-19에 대한 역전사 중합효소반응을 이용한 골수 미세전이의 진단

배경:

유방암 환자에서 림프절 전이가 없음에도 불구하고 약 25-30% 정도에서 원격 전이에 의한 재발이 생기는 것으로 보고되고 있다. 뼈나 골수는 유방암에서 가장 흔하게 전이되는 곳이기 때문에 골수 미세전이검사는 병변 초기에 전이 유무를 알기에 유용한 검사라 할 수 있다. 하지만 아직 이 골수 미세전이의 임상적 의의에 대해서는 논란이 많으며 다른 예후인자와의 관계도 밝혀지지 않았다.

대상 및 방법:

영동세브란스병원에서 2005년 1월부터 10월까지 유방암으로 진단되어 수술받은 환자 63명을 대상으로 하였다. 수술 중 채취한 골수로부터 분리한 단핵세포에서 total RNA를 분리한 후, 골수미세전이의 표지인자로 널리 이용되고 있는 Cytokeratin-19(CK-19) mRNA를 검출하기 위해서 nested reverse transcriptase polymerase chain reaction (nested RT-PCR)을 수행하였다. 아울러 CK-19 발현 양상으로 판단한 골수미세전이 유무와 대상 환자들의 임상적 특징과의 상관성에 대해서도 살펴보았다.

결과:

총 63명의 원발성 유방암 환자를 대상으로 CK-19에 대한 RT-PCR(역전사 중합효소반응)을 실시하였으며 이중 24명(38%)의 환자에서 골수 미세전이가 관찰되었으며, 이중 유방암 1기 22명 중 11명, 2기 33명 중 11명, 3기에 해당하는 환자가 7명 중 2명이었다.

CK-19 발현과 기존 예후인자(조직학적 특성, 병기, 종양의 크기, 림프절 전이 유무, 성장인자 수용체 유무, 호르몬 수용체 유무 등)와의 상관관계에서는 stage II에서 c-erbB-2 발현 여부가 통계학적으로 의의가 있었다. 액와부 임파선 전이가 없는 36예 중 15예(41.7%)에서 CK-19 발현 양성 소견을 보였다.

결론:

원발성 유방암 환자 63명을 대상으로 수술 중 골수를 채취하여 CK-19에 대한 RT-PCR을 이용하여 유방암의 골수로의 미세전이를 발견하는 연구를 시행하였으며, 이 중 24명(38%)에서 미세전이가 관찰되었다. 유방암의 미세전이를 검사하기 위한 cytokeratin-19에 대한 RT-PCR법은 골수의 미세 암세포를 발견하는데 매우 유용한 검사방법임을 알 수 있었고, 암환자 치료계획 수립과 치료경과 관찰에 중요한 정보를 제공할 수 있을 것이다. 병기별 예후인자와 미세전이와의 상관관계에서는 stage II에서 c-erbB-2와 연관성이 있음을 알 수 있었으며, c-erbB-2와 같은 성장인자 수용체 유무와 미세전이와의 상관관계에 대한 보다 적극적인 규명 노력이 더 필요할 것이다. 또한 보다 많은 증례와 장기적인 추적관찰을 통해서 이 검사방법이 독립적인 예후 인자로서의 가치를 가질 수 있는가에 대해서는 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

핵심되는 말 : 골수미세전이, Cytokeratin-19, Nested RT-PCR

유방암 환자에서 CK-19에 대한 역전사 중합효소반응을 이용한 골수 미세전이의 진단

< 지도 교수 이희대 >

연세대학교 대학원 의학과

최 선 호

I. 서론

유방암 환자에서 림프절 전이가 없음에도 불구하고 약 25-30% 정도에서 원격 전이에 의한 재발이 생기는 것으로 보고되고 있으며 림프절 전이가 있는 경우에는 60% 까지도 보고되고 있다^{1,2}. 이렇게 림프절 전이가 없는 조기 유방암에서도 재발율이 높은 이유는 진단 당시 시행했던 검사들에서 발견되지 않았던 미세전이 (Micrometastasis)가 존재했다가 추후에 계속 자라서 추적 관찰 중 발견되는 경우가 흔하기 때문이라고 하겠다. 유방암을 진단하고 치료 하는데 있어 현재까지 많은 노력과 발전이 있어 왔으나 기존의 진단 방법과 병기 결정 방법에서 누락되는 이러한 미세전이는 암으로 인한 사망률을 크게 줄이지 못하는 주요 요인이 되고 있다. 원격 전이를 줄이고 환자의 생존율을 높이기 위하여 항암 화학요법과 호르몬 조절

요법이 사용되고 있으나 지금까지 알려진 예후인자는 미세전이 유무를 예측할 수 없어서 대상 선택에 어려움이 있다. 현재까지 알려진 예후인자에는 원발 종양의 크기, 림프절 전이의 유무, 조직 병리학적 종양 분화도, 호르몬 수용체 상태, 나이 등이 알려져 있으며 치료의 방침을 결정하는데 있어서도 유용하게 이용되고 있지만 이러한 요소들이 원격전이 형태의 재발의 위험도를 평가하는데 있어서 정확한 지표 제시하기에 불충분하다는 것이 여러 연구에서 밝혀진 바 있다.

뼈나 골수는 유방암에서 가장 흔하게 전이되는 곳이다³. 또한 뼈의 전이는 골수에 안착한 암세포가 뼈로 침투하는 것이기 때문에 골수미세전이 유무를 알아보는 검사는 병변 초기에 전이 여부를 알 수 있는 매우 유용한 검사라 할 수 있다. 골수 미세전이세포를 찾는 방법에는 RT-PCR, 면역형광염색법, 면역조직화학염색법, ELISA를 이용한 분석방법 등이 개발되었다. 이런 방법을 통해 유방암에서 골수미세전이가 가지는 의의에 대한 연구가 여러 기관에서 진행되었다. 대체로 진단 시 림프절전이가 있는 환자들에서 골수미세전이는 조기 원격전이와 관련이 있다는 보고들이 많았던 반면⁴⁻⁹, 진단 시 림프절전이가 없었던 환자들에서는 상반된 보고들이 있었다^{5,6,9-11}. 국내에서도 몇몇 기관에서 보고를 하였으나, 대상 환자 수가 적거나 장기간 추적관찰이 되지 않았다¹²⁻¹⁴. 따라서 유방암 환자에서 골수미세전이에 대한 의의를 평가하기 위해서는 충분한 환자를 대상으로 장기간 추적 관찰한 연구가 필요하다 하겠다.

본 연구는 장기적으로 임상에서 골수미세전이의 유무에 따라 수술 후 추가 치료 계획을 수립하는데 있어 중요한 자료로 이용하고자 수행하게 되었다. 감시림프절에서도 미세전이가 종종 발견되고, AJCC 병기분류에서도 최근 6판에서는 림프절에 미세전이가 있는 경우를 N1m로 분류는 하지만 그 의의는 논란의 대상이다. 따라서 본

연구는 유방암으로 수술받은 환자의 골수에서 암세포에 특이적인 표지인자로 널리 사용되고 있는 cytokeratin-19를 RT-PCR을 이용하여 미세전이 빈도를 알아보고, 그 결과와 기존의 예후 인자들을 비교하여 골수미세전이가 독립적인 예후인자가 되는지를 알아보려고 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 대상 환자

2005년 1월부터 2005년 10월까지 연세대학교 의과대학 영동세브란스병원에서 유방암으로 진단받고 수술받은 63명의 환자를 대상으로 하였다.

2. 골수 채취 및 유핵세포 분리 및 암세포 배양

유방절제술을 마친 후 전신 마취된 상태에서 후장골능에서 골수를 채취하였으며, 약 5 ml의 골수를 항응고제 EDTA가 첨가된 tube로 옮겨 잘 섞어 주었다. 골수 채취 후 즉시 동량의 PBS를 넣어 희석하였고, 동량의 Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences)에 띄운 후 1,500 rpm에서 35분간 원심분리 하였다. Ficoll과 혈청 사이의 경계면에 형성된 유핵 세포층을 따로 분리한 후, 30 ml의 PBS로 2회에 걸쳐 세척하고 세포분획만을 취하여 -80°C 에서 보관하였다. 유방암 세포주인 MCF-7은 CK-19 검출을 위한 양성 대조군으로 사용되었으며, 10% FBS (Cansera)를 포함한 RPMI 1640 배지(Gibco BRL)에서 배양하였다.

3. RNA 추출 및 DNase 처리

분리한 유핵세포에 TRIzol (Invitrogen)을 첨가하여 total RNA를 추출하였으며, 추출한 RNA는 0.5 ~ 1.0 ug/ul의 최종 농도가 되도록 DEPC-water에 녹였다. DNA-free system (Ambion)을 이용하여 잔존하고 있는 genomic DNA를 제거하고 RNA만을 정제하였다.

Lambda 25 분광계 (Perkin Elmer)를 이용하여 분리한 RNA의 농도와 순도를 측정하였고, beta-Actin에 대한 RT-PCR을 통해서 최적의 cDNA가 합성되었음을 간접적으로 확인하였다. 분리한 RNA는 -80C에서 보관하였다.

4. cDNA 합성

총 2 ug의 RNA를 template로 사용하여 cDNA를 합성하였으며, Superscript II First Strand Synthesis System (Invitrogen)을 이용하여 역전사를 시행하였다. 총 반응 용액은 20ul로 구성하였으며, RNA 2 ug, random primer (2.5 ng/ul), dNTP (각 0.5 M), Superscript II reverse transcriptase (100 units), first strand buffer, dithiothreitol (10 mM)를 넣어 25℃에서 5분, 42℃에서 90분, 70℃에서 10분간을 각각 반응시켰다.

5. Oligonucleotide primer

네 가지의 oligonucleotide primer는 cytokeratin-19 cDNA에 상보적으로 결합하는 primer로 external primer set인 CK19_E_S 5'-AAGCTAACCATGCAGAACCTCAACGACCGC-3' (external sense), CK19_E_AS 5'-TTATTGGCAGGTCAGGAGAAGAGCC-3' (external antisense)는 RT-PCR에 사용되어 1069개 염기쌍의 산물을 합성하게 되며, inner primer set인 CK19_I_S 5'-TCCCGCGACTACA-CTACTACACGACC-3' (internal sense), CK19_I_AS 5'-CGCGAC-TTGATGTCCATGAGCCGCTGGTAC-3' (internal antisense)는 nested PCR에 사용되어 최종적으로 745개 염기쌍의 PCR 산물을 합성하였다. Beta-actin에 상보적으로 결합하는 primer set는 Actin_S 5'-CTTCTTGGGCATGGAGTCCTG-3' (sense), Actin_AS

5'-CATCCTGTCGGCAATGCCAGG-3' (antisense)가 사용되어 154 개 염기쌍의 PCR 산물을 합성하였다. 모든 primer는 (주)바이오니아에서 합성한 것을 이용하였다.

6. PCR 및 반응 생성물의 확인

PCR은 Taq DNA Polymerase System (SolGent, Korea)을 이용하여 시행하였으며, 전체 반응액 20ul는 1ul의 cDNA, 2ul의 10X buffer, 4ul의 5X Band Doctor, 0.5 ul의 10mM dNTP mix, 0.5 ul의 10pmol primer (sense 및 antisense), 0.5U Taq polymerase로 구성하였다. Cytokeratin-19의 경우, Thermal Cyclor (MJ Research)를 이용하여 denaturation (94℃, 1분), annealing 및 extension (58℃, 2.5분)의 PCR cycle을 40회 반복한 후 마지막 extension은 72℃에서 10분간 유지시켜서 RT-PCR을 수행하였다. 그리고 이 시료 1ul를 취하여 위와 동일한 조건으로 반응액을 구성한 후 denaturation (94℃, 1분), annealing 및 extension (64℃, 1.5분)의 PCR cycle을 35회 반복한 후 마지막 extension은 72℃에서 10분간 유지시켜서 nested RT-PCR을 수행하였다. 단, 양성 대조군으로 사용된 MCF-7의 경우, 첫 번째 PCR 반응 결과물 중 1ul를 증류수를 이용하여 1:10,000으로 희석하고, 이 중 1ul를 두 번째 PCR의 template로 사용하였다. Beta-actin의 경우, 5X Band Doctor 용액을 제외한 나머지 성분을 동일하게 구성한 후 denaturation (94℃, 30초), annealing (60℃, 30초), extension (72℃, 1분)의 PCR cycle을 30회 반복한 후 마지막 extension은 72℃에서 5분간 유지시켜서 RT-PCR을 수행하였다. 모든 PCR 반응에서 template가 들어가지 않은 반응액을 음성 대조군으로 사용하였다. 반응 결과물은 1.5% agarose (CK-19 검출) 혹은 2% agarose (beta-actin 검출)에 ethidium bromide (EtBr)가 혼합된 gel에서 각각 18ul와 15ul를 loading하여 전기영동으로 분리한 후 UV

illuminator 하에서 밴드를 확인하였다.

7. 결과 분석

유방암조직에서 종양의 크기, 림프절 전이 유무, 조직학적 분화도, 핵분화도, 에스트로겐, 프로게스테론 수용체 상태 등과 RT-PCR 결과로 판단한 글수미세전이 유무와의 상관관계를 분석하였다. 통계처리는 SPSS software를 사용하였다. 미세전이와 각 인자간 분율의 유의한 차이를 알아보기 위하여 Chi-square test로 검정하였고, p 값이 0.05 이하인 경우에 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판단하였다.

Ⅲ. 결과

표 1. Demographic data of Patients

		No. of patients	%
Patients enrolled		63	100
Age (years)	Average	47.9 (28-67)	
Histologic type	DCIS	1	1.6
	IDC	60	95.2
	ILC	2	3.2
Stage (AJCC 6th ed.)	0	1	1.6
	I	22	34.9
	IIA	25	39.7
	IIB	8	12.7
	IIIA	7	11.1
	IIIB	0	0.0
	IIIC	0	0.0
Tumor size	≤ 1cm	6	9.5
	>1cm, ≤ 2cm	27	42.9
	>2cm, ≤ 3cm	26	41.3
	>3cm, ≤ 5cm	2	3.2
	>5cm	2	3.2
Lymph nodes (LN)	N0	36	57.1
	N1	20	31.7
	N2	7	11.1
ER	Negative	33	52.4
	Positive	30	47.6
PR	Negative	33	52.4
	Positive	30	47.6
p53	Negative	43	68.3
	Positive	20	31.7
C-erbB-2	Negative	50	79.4
	Positive	13	20.6
Ki-67	≤ 5%	42	66.7
	> 5%, ≤ 10%	15	23.8
	> 10%	6	9.5

주) DCIS=ductal carcinoma in situ,
 IDC=invasive ductal carcinoma
 ILC=invasive lobular carcinoma

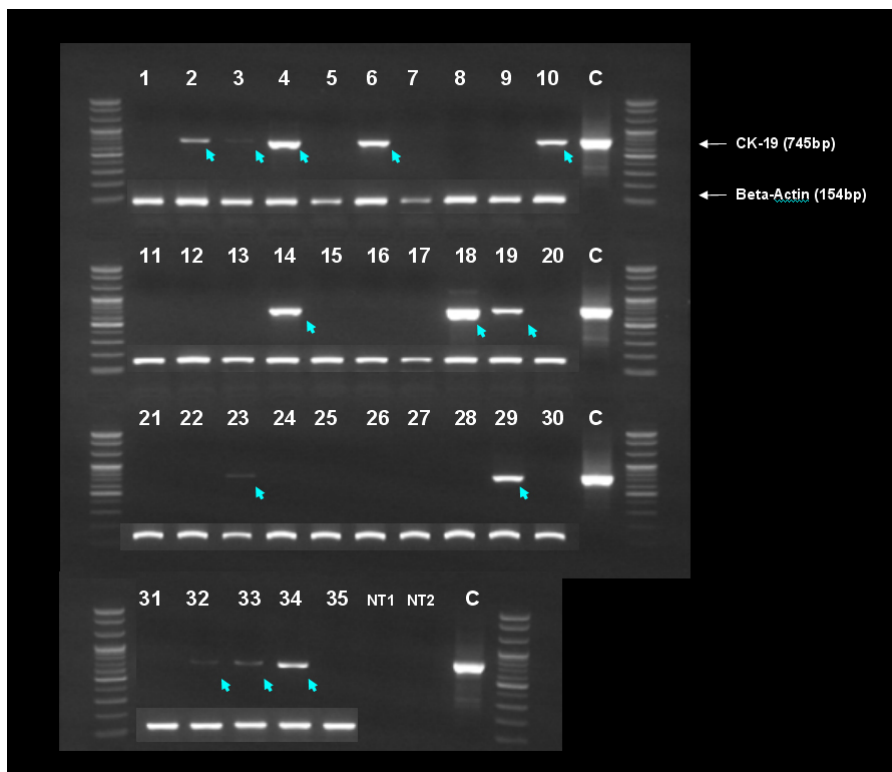
1. Nested RT-PCR을 이용한 골수에서의 cytokeratin-19 검출

C' 는 Positive Control로 cytokeratin-19를 발현하는 것으로 알려진 유방암 세포주 MCF-7을 사용하여 환자 샘플과 동일한 방법으로 nested RT-PCR을 수행하되 과도한 발현으로 인한 PCR 반응의 saturation을 막기 위해서 2차 PCR을 수행하기 전에 1차 반응물을 1:10,000으로 희석한 후 1ul를 2차 PCR에서 template로 사용하여 얻은 최종 반응물을 15ul씩 loading 한 것이다. 'NT1' 은 각 PCR 반응의 오염여부를 판단하기 위한 negative control로 nested RT-PCR 과정 중 1차 PCR에서 cDNA template를 넣지 않고 PCR 반응을 수행한 후 얻은 1차 반응물 중 1ul를 2차 PCR에서 template를 대신하여 넣고 PCR을 수행한 후 얻은 최종 반응물을 환자 샘플과 동일하게 18ul씩 loading한 것이다. 'NT2' 는 NT1과 달리 2차 PCR 반응의 오염여부를 판단하기 위한 negative control로 2차 PCR에서 template를 대신하여 1ul의 증류수를 넣고 PCR을 수행한 후 얻은 최종 반응물을 환자 샘플과 동일하게 18ul씩 loading한 것이다.

Beta-Actin의 결과는 최적의 cDNA가 합성되었음을 간접적으로 확인하기 위해 실시하였으며, 위의 결과는 cDNA 합성과정에서 정상적으로 수행되었으며 각 샘플간의 cDNA template 양이 차이가 없음을 보여주고 있다. beta-Actin의 RT-PCR 경우 독립적으로 수행된 실험이나 용이한 결과 비교를 위하여 CK-19의 결과에 추가 편집하여 결과를 정리하였다. CK-19의 결과는 샘플마다 intensity에서 다양한 양상을 보이고 있으나, gel image 상에서 PCR 밴드가 보이는 것은 모두 CK-19이 발현된 것으로 판단하였으며, 반복 실험하여 결과를 재차 확인하였다.

총 63명의 환자 샘플 중 nested RT-PCR 결과 CK-19에 대한 밴드가 나타나 골수미세전이가 일어난 것으로 판단되는 환자는 24명 (38.1%)으로 나타났다.(그림 1, 표 2)

그림 1. Nested RT-PCR을 이용한 골수에서 cytokeratin-19 검출



2. 연구 대상 환자의 임상정보 및 Cytokeratin-19 발현과의 상관관계

2005년 1월부터 2005년 10월까지 연세대학교 의과대학 영동세브란스병원에서 유방암으로 진단받고 수술을 시행한 63명의 환자를 대상으로 임상 특징(나이, 조직학적 분류, 병기, 종양의 크기, 임파선 침범여부, 호르몬 수용체 유무 등)을 알아보았다.(표 1.)

표 2. Cytokeratin-19 발현과 기존 예후인자와의 상관관계

		Total	CK-19		<i>p-value</i>
			Negative	Positive	
Histologic type	DCIS	1	1 (100.0)	0 (0.0)	0.407
	IDC	60	38 (63.3)	22 (36.7)	
Stage	ILC	2	0 (0.0)	2 (100.0)	0.586
	0	1	1 (100.0)	0 (0.0)	
	I	22	11 (50.0)	11 (50.0)	
	IIA	25	16 (64.0)	9 (36.0)	
	IIB	8	6 (75.0)	2 (25.0)	
	IIIA	7	5 (71.4)	2 (28.6)	
	IIIB	0	0 (0.0)	0 (0.0)	
	IIIC	0	0 (0.0)	0 (0.0)	
Size	≤ 1cm	6	4 (66.7)	2 (33.3)	0.260
	>1cm, ≤ 2cm	27	13 (48.1)	14 (51.9)	
	>2cm, ≤ 3cm	26	18 (69.2)	8 (30.8)	
	>3cm, ≤ 4cm	2	2 (100.0)	0 (0.0)	
	>4cm	2	2 (100.0)	0 (0.0)	
Axillary node	(-)	36	21 (58.3)	15 (41.7)	0.500
	(+)	27	18 (66.7)	9 (33.3)	
ER	(-)	33	23 (69.7)	10 (30.3)	0.182
	(+)	30	16 (53.3)	14 (46.7)	
PR	(-)	33	21 (63.6)	12 (36.4)	0.767
	(+)	30	18 (60.0)	12 (40.0)	
p53	(-)	43	25 (58.1)	18 (41.9)	0.367
	(+)	20	14 (70.0)	6 (30.0)	
c-erbB-2	(-)	50	33 (66.0)	17 (34.0)	0.189
	(+)	13	6 (46.2)	7 (53.8)	
Ki-67	≤ 5%	42	26 (61.9)	16 (38.1)	0.978
	> 5%	21	13 (61.9)	8 (38.1)	

Numbers in parenthesis is percentage.

1) 대상 환자의 임상적 특징

대상 환자 63명의 평균 나이는 47.9세(28-67)였으며, AJCC 병기 분류에 따라 0기 1예, 1기 22예, 2기 33예, 3기 7예로 나뉘어졌다. 조직학적 분류로는 침윤성 관암종이 60예(95.2%)로 대부분을 차지하였으며 원발 종양의 크기는 T1이 33예, T2가 28예, T3가 2예로 나왔으며, 림프절 전이가 없는 경우는 36예(57.1%)였다. 면역조직학적 검사에서 에스트로겐 수용체(ER) 음성인 경우는 대상 환자 63명 중 33명(52.4%), 양성인 경우는 30명(47.6%)이었으며 프로게스테론 수용체(PR)는 음성인 경우 33명(52.4%), 양성인 경우가 30명(47.6%)이었다. (표 1.)

2) 종양의 병기와 RT-PCR 결과와의 비교

병기 분류법에 따른 골수미세전이의 양성률은 0기에서는 CK-19 발현이 관찰되지 않았고, 1기에서는 22예 중 11예(50.0%), 2기에서는 33예 중 11예(33.3%), 3기에서는 7예 중 2예(28.6%)에서 양성을 보여 병기와 양성률과의 유의한 차이는 없었다. 종양의 크기가 2cm 이하인 경우는 33예 중 16예(48.5%), 2-5cm인 경우가 28예 중 8예(28.6%)에서 골수미세전이 양성 소견을 보였으며, 5cm 이상인 2예의 경우는 음성 소견을 보였다. 종양의 크기에 따른 통계학적인 유의성은 없었다. 면역조직학적 검사에서 에스트로겐 수용체 음성인 경우는 33명 중 10명(30.3%), 양성인 경우는 30명 중 14명(46.7%)에서 골수미세전이 양성 소견을 보였으며, 프로게스테론 수용체에 대해서는 음성인 경우 33명 중 12명(36.4%), 양성인 경우 30명 중 12명(40.0%)에서 양성 소견을 보였으며 통계학적 의의는 없었다. 액외부 림프절 전이가 없는 36예 중 15예(41.7%)에서 골수전이

양성 소견을 보였으며, 액와부 림프절 전이가 있었던 경우는 27예 중 9예(33.3%)에서 골수전이 양성 반응을 보여 액와부 림프절 전이 유무와 골수미세전이 양성률은 통계학적 차이가 없었다. 이런 결과로 볼 때 골수 미세전이는 일반적인 예후인자로 알려진 종양의 크기나 림프절 전이와는 무관하게 일어날 수 있음을 알 수 있었다. (표 2.)

3) 각 병기별 CK-19 발현과 기존 예후인자와의 상관관계

각 병기별로 나누어 기존에 알려진 예후인자(림프절 전이 유무, 호르몬 수용체 유무, p-53, c-erbB-2, Ki-67)와 CK-19의 발현과의 상관관계에 대해서 보다 세밀하게 조사 분석하였으며, 0기는 조사대상에서 제외하였다. Stage II에서 c-erbB-2 발현 양상이 통계학적으로 의미가 있는 것으로 나타났다. (표 3.)

표 3. Stage별 CK-19 발현과 기존 예후인자와의 상관관계

			CK-19		Total	P-value
			(-)	(+)		
Stage I (N=22)	ER	(-)	8 (66.7)	4 (33.3)	12	0.087
		(+)	3 (30.0)	7 (70.0)	10	
	PR	(-)	3 (37.5)	5 (62.5)	8	0.875
		(+)	8 (57.1)	6 (42.9)	14	
	p53	(-)	7 (43.7)	9 (56.3)	16	0.338
		(+)	4 (66.7)	2 (33.3)	6	
	c-erbB-2	(-)	10 (52.6)	9 (47.4)	19	0.534
		(+)	1 (33.3)	2 (66.7)	3	
Ki-67	≤ 5%	6 (37.5)	10 (62.5)	16	0.178	
	> 5%	4 (66.7)	2 (33.3)	6		
Stage II (N=33)	Axillary nodes	(-)	10 (71.4)	4 (28.6)	14	0.618
		(+)	12 (63.2)	7 (36.8)	19	
	ER	(-)	11 (73.3)	4 (26.7)	15	0.458
		(+)	11 (61.1)	7 (38.9)	18	
	PR	(-)	14 (70.0)	6 (30.0)	20	0.614
		(+)	8 (61.5)	5 (38.5)	13	
	p53	(-)	15 (65.2)	8 (34.8)	23	0.780
		(+)	7 (70.0)	3 (30.0)	10	
	c-erbB-2	(-)	19 (76.0)	6 (24.0)	25	0.044
		(+)	3 (37.5)	5 (62.5)	8	
	Ki-67	≤ 5%	14 (73.7)	5 (26.3)	19	0.319
		> 5%	8 (57.1)	6 (42.9)	14	
Stage III (N=7)	Axillary nodes	(-)	0 (0)	0 (0)	0	-
		(+)	5 (71.4)	2 (28.6)	7	
	ER	(-)	3 (60.0)	2 (40.0)	5	0.290
		(+)	2 (100.0)	0 (0.0)	2	
	PR	(-)	3 (75.0)	1 (25.0)	4	0.809
		(+)	2 (66.7)	1 (33.3)	3	
	p53	(-)	3 (75.0)	1 (25.0)	4	0.809
		(+)	2 (66.7)	1 (33.3)	3	
	c-erbB-2	(-)	4 (66.7)	2 (33.3)	6	0.495
		(+)	1 (100.0)	0 (0.0)	1	
	Ki-67	≤ 5%	3 (75.0)	1 (25.0)	4	0.273
		> 5%	2 (66.7)	1 (33.3)	3	

Numbers in parenthesis is percentage.

IV. 고찰

역전사 중합 효소 반응법을 이용한 방법은 미세전이를 발견하는 가장 예민한 방법이며 $10^6 \sim 10^7$ 개의 골수세포 중에서 한 개의 암세포를 발견할 수 있는 것으로 알려져 있다⁶. 면역화학염색법 (Immunohisto-chemical staining)을 이용한 연구는 오랜 역사를 가지고 있으며 많은 연구가 이를 기반으로 해서 진행되어 왔으나 초기의 연구에 사용되었던 항체들은 정상 골수 세포의 세포막에도 반응을 보여 10% 가까운 위양성율을 보이므로 특이도가 낮다는 단점이 있으며 이후 사용된 cytokeratin family (CK-8, CK-18, CK-19, CK-20) 등을 통해 향상되기는 했으나 항체의 다양성과 정상 골수 세포와의 교차 반응, 판독상의 문제 등으로 인해 만족할 만한 민감도와 특이도를 보여주지 못하는 것이 사실이다^{7,8}. 다른 암들과 마찬가지로 유방암 환자에 있어서 기존의 병기 결정 방법이나 일반적인 진단 방법에서 누락되는 수술 당시의 미세 원격전이의 존재는 암으로 인한 사망의 주된 원인이 되고 있다. 따라서 이러한 혈행성 미세 원격전이를 조기에 진단할 수 있다면 좀더 정확한 병기와 예후를 결정할 수 있으며 그에 따른 보조적 치료선택에 있어서 중요한 지표가 될 수 있을 것이다. RT-PCR 방법은 면역조직화학염색법 (Immunohistochemical staining)에 비하여 빠르고 좀더 쉽게 자동화 할 수 있으며 표준화가 가능한 특성이 있어 좀더 일상적인 검사방법으로 적용하기에 용이하며 이론적으로 더욱 민감하다는 장점이 있다¹⁰. 본 연구에서 골수 전이의 표지자로 사용한 것은 Cytokeratin 19로서 상피세포에서만 발견되는 것으로 골수세포에서는 정상적으로 발견되지 않는다. 이러한 cytokeratin에는 8, 18, 19, 20 등이 있으며 이중 cytokeratin 8, 18은 위양성이 많은 것으로 알려져 있고 CK-19는 유방암에서 높

은 특이성을 나타내고 혈액 및 골수에서 민감도가 높아 미세전이의 표지자로 널리 연구되어 왔다. 유방암 세포의 원격 전이를 세포 수준에서 발견하기 위한 노력은 Dearnaley 등이 1981년 처음 임상적으로 골수 전이의 증거가 없는 환자에서 epithelial membrane antigen (EMA)를 이용하여 골수에서 미세전이를 증명하였다¹³. 이들은 골수 미세전이가 24예 중 10예에서 있었으며 이들은 다른 환자들에 비하여 보다 조기에 재발되는 것으로 보고하였다. RT-PCR 법은 특정세포들에서만 발현되는 단백질을 찾는 방법으로 단백질의 전사에 필요한 mRNA를 DNA로 바꾸어 이를 증폭하는 방법으로 이 방법을 이용한 유방암의 미세전이의 검출은 Shoenfeld 등이 액와 림프절에서의 림프절전이의 검사를 위해 처음 사용하였으며, Kruger가 처음으로 골수에서 검사한 결과를 보고하였는데 24예의 유방암 환자의 골수 중 14예(58%)에서 양성을 보고하였다¹⁵. 본 연구에서는 골수에서의 CK-19(cytokeratin-19) 검출율이 38.1%를 보였는데 골수는 혈행내 존재하는 암세포가 농축되어 걸러지는 역할을 하기 때문에 일반적으로 말초 혈액에 비해 검출율이 높게 나타나는 것으로 알려져 있으며 특히 유방암에 있어서 골 전이가 많은 이유이기도 한 것으로 알려져 있다¹⁶. 유방암 세포는 그 표면에 세포증식과 분화를 조절하는 다양한 성장인자수용체를 가지고 있다. c-erbB-2는 type I growth factor receptor family 중의 하나로 여기에는 epidermal growth receptor와 erbB-3와 erbB-4 등이 포함되는데 유방암에서 흔히 과발현을 보이며 종양세포의 증식을 변화시킨다¹⁷. c-erbB-2 발암유전자는 epidermal growth factor receptor와 구조적으로 매우 유사한 glycoprotein을 encode하는데 이는 tyrosine kinase oncogene family의 일종이다¹⁸. Becker 등은 골수에서 CK-19에 발현을 보인 원발성 유방암 환자를 대상으로 c-erbB-2 발현유무를 연구하였는데 원발암에서는 발현되지 않았지만 골수세포에서는 양성을 보인 환자가 12.6%였다고

보고하였다¹⁹. 따라서 c-erbB-2 발현과 관련된 보다 적극적인 규명 노력이 필요할 것으로 사료된다. 액와부 림프절 전이 유무와 골수 미세전이세포 양성률의 예후 인자로서의 효용성을 비교한 Diel 등의 연구에서는 골수 미세전이세포가 양성인 경우에는 액와부 림프절 전이가 있는 경우 불량한 예후를 보였으나 골수 미세전이 음성인 경우에는 액와부 림프절 전이 유무가 예후와는 유의할 만한 상관관계가 없다고 하였다. 따라서 암의 크기가 작고 액와부 림프절 전이가 없는 경우, 골수 미세전이세포의 유무는 예후인자로서의 중요한 정보를 주며 항암제의 사용 기준이 될 수 있다고 보고하였다⁵. 국내 환자를 대상으로 한 연구에서 살펴보면 저자들은 CK-19의 검출을 통한 골수 미세전이와 병리조직학적 유형, 종양의 크기, 핵 등급, 림프절 전이 상태, 호르몬 수용체 발현 유무 모두 유의한 상관관계가 없는 것으로 보고하였다²⁰. 또한 Schoenfeld 등은 78명의 유방암 환자의 혈액과 골수를 채취하여 면역형광염색법과 RT-PCR법으로 동시에 검사하여 미세전이와 종양의 크기, 림프절 전이 여부, 맥관 침범 여부, 호르몬 수용체 유무 등과는 상관성이 없다고 결론을 내렸다¹⁶. 반면 Mansi 등은 350예의 유방암 환자의 미세전이와 종양의 크기, 맥관 침범 여부, 림프절 전이 유무 등의 상관관계를 조사하여 통계학적으로 유의한 상관성을 발견하였다⁷. 따라서 골수 미세전이와 일반적인 예후인자로 알려진 요인들과의 상관관계에 대한 논란은 아직도 많은 상태이며 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결론

원발성 유방암 환자 63명을 대상으로 하여 유방암 환자의 골수 천자를 통해 채취한 골수에서 CK-19에 대한 RT-PCR을 시행하여 미세전이 세포를 발견하는 연구를 실시하였다. 그 결과 24명 (38%)에서 cytokeratin-19 양성 반응을 보여 골수미세전이를 확인하였으며, 이 미세전이와 기존에 알려진 예후인자와의 상관관계를 조사하였는데, stage II에서 골수 미세전이와 c-erbB-2 발현이 통계학적으로 유의있는 연관성을 보였다. 그러나, 다른 병기에서는 연관성이 관찰되지 않았으며 따라서 보다 적극적인 규명 노력이 필요할 것으로 사료된다. 호르몬 수용체 유무와 골수미세전이와의 상관관계에서는 통계학적인 유의성은 찾을 수 없었으나, 호르몬 수용체 양성인 경우 골수미세전이 양성률이 더 높음을 알 수 있었다. 또한 액와부 림프절 전이가 없는 36예 중 15예(41.7%)에서 CK-19 양성 소견을 보였는데, 이런 결과로 볼 때 골수 미세전이는 일반적인 예후인자로 알려진 종양의 크기나 림프절 전이와는 무관하게 일어날 수 있음을 알 수 있었다. 그리고, 그 15예 중 에스트로겐 수용체(ER) 양성 소견을 보인 경우가 12예(80%)나 관찰되어 이러한 환자들은 adjuvant chemotherapy 등 보다 적극적인 치료가 요구된다고 사료된다. 본 연구는 대상 환자 수가 적고 관찰기간이 짧아 미세 전이와 기존의 예후 인자와의 상관성을 평가하기에는 미흡한 것으로 사료되며 더욱 많은 환자를 대상으로 장기간 추적 관찰이 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group: Polychemotherapy for early breast cancer: An overview of the randomised trials. *Lancet* 1998;352:930-942.
2. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group: Tamoxifen for early breast cancer: An overview of the randomised trials. *Lancet* 1998;351:1451-1467.
3. Balasko CB: Anatomy and pathways of skeletal metastases. In: Weiss L, Gilberg HA(eds) *Bone Metastasis*. Hall, Boston, 1981,pp49-63.
4. Cote RJ, Rosen PP, Lesser ML, et al: Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases. *J Clin Oncol* 1991;9:1749-1756.
5. Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, et al: Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: Prognostic value in comparison with nodal status. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1652-1658.
6. Braun S, Pantel K, Muller P, et al: Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med* 2000;342:525-533.
7. Mansi JL, Berger U, Easton D, et al: Micrometastases in bone marrow in patients with primary breast cancer: Evaluation as an early predictor of bone metastases. *BMJ* 1987;295:1093-1096.
8. Harbeck N, Untch M, Pache L, et al: Tumour cell detection in the bone marrow of breast cancer patients at primary therapy: Results of a 3-year median follow-up. *Br J Cancer* 1994;69:566-571.
9. Gebauer G, Fehm T, Merkle E, et al: Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: Clinical outcome during long-term follow-up. *J Clin Oncol* 2001;19:3669-3674.

10. Funke I, Schraut W: Meta-analyses of studies on bone marrow micrometastases: An independent prognostic impact remains to be substantiated. *J Clin Oncol* 1998;16:557-566
11. Mansi JL, Gogas H, Bliss JM, et al: Outcome of primary breast cancer patients with micrometastases: A long-term follow-up study. *Lancet* 1999;354:197-202.
12. Chung SH, Yoon JH, Jegal YJ: Study of bone marrow micrometastases in breast cancer patient. *J Kor Cancer Asso* 1998;30(6):1147-1155.
13. Kang SH, Lee SJ, Kim SW, et al: The significance of bone marrow micrometastasis(BMM) in breast carcinoma. *J Korean Cancer Asso* 2000;32(1):76-85.
14. Jung YS, Cha JW, Park HB, et al: Influence of bone marrow micrometastasis in recurrence and survival of breast cancer. *J Korean Surg Soc* 2002;63(5):384-389.
15. Kruger W, Krzizanowski C, Holweg M, et al: Reverse transcriptase/polymerase chain reaction detection of cytokeratin-19 mRNA in bone marrow and blood of breast cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996;122:679.
16. Schonfeld A, Kruger KH, Gomm J, Sinnott HD, Gazet JC, Sacks N, et al. : The detection of micrometastases in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer using immunohistochemistry and reverse transcriptase polymerase chain reaction for keratin 19. *Eur J Cancer* 1997;33:854-61.
17. Prigent SA, Lemoine NR : The type I(EGFR-related) family of growth factor receptors and their ligands. *Prog Growth Factor Res* 1992;4:1-24.
18. Yamamoto T, Ikawa S, Akiyama T, Semba K, et al : Similarity of protein encoded by the human c-erbB-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* 1986;319:230-234.

19. Becker S, Becker-Pergola G, Fehm T, Wallwiener D, et al : Her2 expression on disseminated tumor cells from bone marrow of breast cancer patients. *J Anticancer Res* 2005;25: 2171-2175.
20. Lee MH, Suh WS, Cheon HJ, Jo KS, Shin EJ, Park KK, et al. : Determination of sensitivity of RT-PCR for cytokeratin 19 and detection of micrometastasis from bone marrow of breast cancer patients. *J Kor Surg Soc* 2000; 58:34-43.

Abstract

The detection of bone marrow micrometastasis using RT-PCR for CK-19 in patients with breast cancer

Choi Sun Ho

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Lee Hy-De)

BACKGROUNDS:

This study is designed to evaluate the significance of bone marrow micrometastasis in breast cancer and to investigate the factors which are related with bone marrow micrometastasis.

Approximately 25-30% of node negative breast cancer patients experience systemic relapse. The reason why the systemic relapse is so high in node negative breast cancer is that micrometastasis was present at the time of diagnosis even though it was not found in all kinds of examinations. Bone marrow is frequent site of metastasis from breast cancer. So, bone marrow biopsy is very useful method to detect metastasis at the early stage of disease, especially in the case of micrometastasis.

However, the significance of bone marrow micrometastasis is still controversial. We studied the CK-19 expression in the bone marrow using RT-PCR of 63 breast cancer patients and compared it with patient's tumor size, lymph node status, histologic grading, ER/PR status and other known prognostic factors.

METHODS:

Bone marrow aspirations were taken immediate after the surgery from 63 breast cancer patients in Yongdong Severance Hospital from January 2005 to October 2005. Micrometastasis in bone marrow was detected by nested reverse transcription polymerase chain reaction (nested RT-PCR) using cytokeratin-19 specific primer sets. Then these results were compared with patient's tumor size, lymph node status, histologic grading, ER/PR status and other known prognostic factors.

RESULTS:

Bone marrow micrometastasis was detected by RT-PCR for cytokeratin-19 mRNA in 24 cases(38.1%) in 63 breast cancer patients. There were statistically significant correlation found between c-erbB-2 expression status and CK-19 expression in stage II. Bone marrow micrometastasis was also detected in 15 cases(41.7%) in 36 node-negative breast cancer patients.

CONCLUSIONS:

The RT-PCR for cytokeratin-19 is a sensitive, specific, and rapid method for detecting micrometastatic carcinoma cells in the bone marrow of patients with breast cancer. There were some correlation between bone marrow micrometastasis and c-erbB-2 expression status. But, for the standardization and quality control of the RT-PCR method, more patients accrual are required for accurate conclusions.

Key Words : Micrometastasis, Cytokeratin-19, Breast cancer,
Nested RT-PCR