

유방의 침윤성 관암종에서
HCCR의 발현

연세대학교대학원
의 학 과
최 영

유방의 침윤성 관암종에서
HCCR의 발현

지도교수 박 광 화 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2006년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

최 영

최영의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2006년 12월 일

감사의 글

이 논문이 완성될 수 있도록 도와주신 여러 선생님들께 진심으로 감사를 드립니다. 부족한 제자에게 언제나 관심과 애정으로 가르침을 주신 박광화 교수님의 은혜에 머리 숙여 감사드립니다. 바쁘신 와중에서도 논문 심사를 맡아주시고 많은 조언과 배려를 아끼지 않으신 박경란 교수님과 김수기 교수님께 감사를 드립니다. 또한 통계학에서 어려움에 부딪혔을 때마다 아무리 바쁘셔도 어김없이 차근차근 가르쳐주신 이상엽 교수님께 감사드립니다.

그리고 한국 땅을 밟을 때부터 가족처럼 따뜻하게 대해주시고 병리전문지식뿐만 아니라 인생의 참뜻도 알려주신 정순희 교수님과 조미연 교수님, 또 자신의 일처럼 실험을 도와주신 유경종 선생님과 병리과 여러 선생님들께도 감사의 마음을 전합니다.

고향을 멀리 떠나 같이 공부하며 힘들고 지칠 때마다 도움을 주신 이경옥 선생님, 김홍련 선생님, 피룡천 선생님에게도 고마움을 전하면서 같이 보냈던 즐거운 시간을 마음속 깊이 간직합니다.

마지막으로 저를 낳아주시고 애지중지 키워주시고 항상 곁에서 지켜 주시고 아낌없는 사랑을 주신 사랑하는 부모님께 작지만 마음을 담은 선물로 드립니다.

저자 드림

차 례

그림 및 표 차례	ii
국문 요약	1
I. 서론	3
II. 연구 재료 및 방법	5
1. 대상환자	5
2. 연구방법	6
가. 병리조직학적 검색	6
나. 면역조직화학 염색 및 결과 판정	6
다. 유세포측정기를 이용한 세포주기 분석	7
라. 추적기간 및 통계학적 분석	8
III. 연구 결과	11
1. 임상소견과 생존율	11
2. 병리조직학적 소견	11
3. 면역조직화학염색 결과	11
4. 유세포 측정기에 의한 세포주기 분석결과	14
IV. 고찰	22
V. 결론	26
참고문헌	27
영문요약	30

그림 차례

그림 1. 침윤성 관암종의 조직병리학적 소견-----	9
그림 2. HCCR에 대한 면역조직화학 염색소견-----	10
그림 3. Ki-67과 HCCR의 염색 강도와 상관계-----	16
그림 4. HCCR의 염색 범위와 생존율 상관계-----	17
그림 5. HCCR의 염색 강도에 따른 생존율 곡선-----	18
그림 6. HCCR의 염색 범위와 생존율 곡선-----	19
그림 7. HCCR의 염색 강도와 염색 범위에 따른 생존율 곡선-----	20
그림 8. 병기 III 환자에서 HCCR의 염색 강도에 따른 생존율 곡선----	21

표 차례

표 1. HCCR 염색 강도에 따른 임상 및 병리학적 인자와 관련성-----	15
--	----

국 문 요 약

유방의 침윤성 관암종에서 HCCR의 발현

연구목적: 종양단백질 HCCR은 p53의 활성을 감소시키는 작용이 있는데 최근에 조기 간암과 유방암 환자의 혈청 내에서 현저히 증가되어 조기 간암과 유방암의 진단표지자로 사용할 수가 있다고 보고되었다. 그러나 HCCR의 발현이 유방암 환자에서 예후인자로 사용될 수 있는지에 대해서는 아직 연구된 바가 없었다. 이에 조기 유방암의 진단표지자인 HCCR이 유방암의 예후에 영향을 주는지 알아보하고자 본 연구를 시행하였다.

방법: 1996년 1월부터 2000년 5월까지 연세대학교 원주의과대학 원주 기독 병원에서 침윤성 관암종으로 진단받고 외과적 절제술을 시행한 103명 환자들을 대상으로 면역조직화학 염색을 시행하였다. ABC(Avidin-biotin complex)방법을 이용하여 파라핀 조직에서 HCCR, ER, PR과 Ki-67에 대한 면역조직화학 염색을 시행하였고 HCCR의 발현을 각각 생존율, 임상적 그리고 병리학적 예후인자들과 비교하였고 또한 DNA배수성 양상과도 유의성이 있는지를 확인하였다.

결과: 전체 103명 환자의 HCCR의 염색결과는 26.3%가 양성, 73.7%는 음성이었다. HCCR의 염색 강도와 병기, 핵 등급, 유사분열과 조직학적 등급, ER, PR, Ki-67과 DNA배수성 양상 사이에는 통계학적 유의성이 없었다($p>0.05$). HCCR 염색 강도 음성인 환자의 10년 생존율은 83.0%, 양성인 92.0%로 HCCR 염색 강도 양성인 환자의 10년 생존율이 우수하였

으나 통계학적 유의성은 없었다. 또한 병기별로 10년 생존율을 보았을 때 병기 I에서 HCCR 염색 강도 음성인 환자의 10년 생존율은 91.0%, 양성은 100%이고, 병기 II에서 음성은 89.0%, 양성은 95.0%, 병기 III에서 음성은 56.0%, 양성은 79.0%로 HCCR 염색 강도가 양성인 환자의 10년 생존율이 우수하였으나 통계학적 유의성은 없었다($p>0.05$). HCCR의 염색 범위가 넓을수록 생존기간이 긴 상관관계는 있었으나($p<0.05$), 10년 생존율에 있어서는 통계학적 유의성은 없었다($p>0.05$).

결론: 본 연구에서 HCCR의 발현이 음성인 환자에 비해 양성인 환자의 10년 생존율이 더 우수한 경향을 보였으나 통계학적 유의성은 없었다. 유방암의 예후인자로써 HCCR의 역할을 규명하기 위해서는 앞으로 더 많은 환자를 대상으로 장기간의 추적관찰을 통한 전향적 임상연구가 필요할 것으로 생각된다.

핵심되는 말 : HCCR, 유방암, 예후, 면역조직화학 염색

유방의 침윤성 관암종에서 HCCR의 발현

<지도교수 박광화>

연세대학교 대학원 의학과

최 영

I. 서 론

유방암은 여성에서 흔히 발생하는 암종으로 2002년 한국중앙암등록 사업결과에 따르면 여성 원발암의 16.8%로 여성에서 가장 많이 발생하는 암이지만 조기 진단, 수술이나 방사선 치료로 44.2%정도의 10년 생존율을 보이고 있다^{1,2}. 유방암에서 침윤성 관암종이 대부분을 차지하는데 지금까지 알려진 기존의 예후인자로는 병기, 림프절 전이 여부, 종양의 크기, 조직학적 악성도, 환자의 나이가 있다³. 최근 유방암 환자의 치료방침과 관련된, 또한 예후를 예측하기 위한 분자생물학적인자들에 대한 연구가 많이 시도되고 있다. 현재까지 에스트로겐 수용체(ER), 프로게스테론 수용체(PR), HER-2/neu, p53, bcl-2, cyclin D1등에 관하여 연구되었는데³ 그중 ER, PR과 HER-2외에 다른 인자들은 예후와 관련이 있는지에 대해 아직 논란이 많다. 암유전자나 다른 예후인자를 밝혀내는 것은 유방암종의 발생 기전을 규명하고 예후판정과 치료방침 결정에 많은 도움을 줄 수 있을 뿐만 아니라 암 발생의 예방이나 조기발견 등에도 기여할 수 있을 것으로

생각 된다.

최근에 자궁경부암에서 발견된 HCCR은 유방과 뇌, 심장, 폐, 간 등의 거의 모든 기관에서 발현되는 종양단백질로서 암을 억제하는 단백질인 'p53'의 활성을 크게 감소시키는 작용을 한다⁴. HCCR은 HCCR-1과 HCCR-2가 있는데 HCCR-2는 HCCR-1에 비해 하나의 엑손이 적고 종양단백질 활성이 HCCR-1에 비해 강하다⁵. HCCR이 간암, 자궁경부암, 백혈병, 림프종 등에서 과다발현을 하는 것으로 알려져 있고 유방암 환자의 혈청 내에서 HCCR-1의 수치는 정상 환자에 비해서 2.3배 정도 증가되어있다⁶. 그리하여 HCCR이 환자의 혈청을 이용하여 유방암을 진단하는데 유용한 진단 표지인자라고 알려져 있다^{4,6}.

이에 본 연구에서는 유방암의 대표적 유형인 침윤성 관암중 병기 I, II, III기 환자에서 HCCR이 예후인자로 사용될 수 있는지 알아보고자 면역조직화학 염색을 시행하여 HCCR의 발현과 생존율 사이의 관련성을 연구하여 보았다. 또한 ER, PR, Ki-67 표지지수, DNA 배수성 양상과 HCCR의 염색 강도 간의 관련성이 있는지 알아보았다.

II. 재료 및 방법

1. 대상환자

1996년 1월부터 2000년 5월까지 연세대학교 원주의과대학 원주기독병원에서 침윤성 관암종으로 진단받은 후 외과적으로 수술을 시행하고, 조직의 고정 및 보관 상태가 양호하며 환자의 임상 기록지와 병리 진단지를 검토하여 환자의 연령, 성별, 종양의 위치, 병기를 조사하고 AJCC 기준⁷에 따라 병기를 다시 분류하여, 병기가 I, II, III 인 103예를 대상으로 하였다. 85예는 유방절제술(mastectomy)을 시행하였는데 그중 10예(11.8%)는 근치 유방절제술(radical mastectomy), 73예(85.9%)는 변형근치유방절제술(modified radical mastectomy), 2예(2.4%)는 단순유방절제술(simple mastectomy)을 시행하였다. 수술 후 화학요법만 시행된 환자는 53명(62.4%)이었는데 CMF(cytosan, MTX, 5-FU)를 시행한 환자는 21명(24.7%), FA(5-FU, adriamycin)는 1명(1.2%), FAC(5-FU, adriamycin, cyclophosphamide)는 20명(23.5%), FAC와 Taxol를 겸하여 치료한 환자는 8명(9.4%), Taxol치료는 2명(2.4%)이었다. 수술 후 방사선 치료와 화학요법을 모두 시행한 환자는 14명(16.4%)이었다. 18예는 유방보존술을 시행하였는데 그중 2예(11.1%)는 국소절제술(excision), 16예(88.9%)는 종괴절제술(lumpectomy)을 시행하였다. 이들 중 수술 후 화학요법만 시행한 환자는 7명(38.9%)인데 그중 FA는 1명(5.6%), CMF는 3명(16.7%), FAC는 3명(16.7%)이었다. 방사선 치료만 시행한 환자는 3명(16.7%)이었고, 방사선 치료와 화학요법을 모두 시행한 환자는 3명(16.7%)이었다. 대부분의 환자들은 치료 후 2년까지는 정기적으로 3개월마다, 그리고 이후에는 6개월 간격으로 검진을 받도록 권유하여 추적 관찰하였다. 환자의 나이는 24세에서 77세로 중앙값은 46세였다.

2. 연구방법

가. 병리조직학적 검색

파라핀 포매 조직을 5 μ m 두께로 박절하고 헤마톡실린-에오신으로 염색된 슬라이드를 광학현미경으로 검색하여 병리진단을 확인하고, 그중 가장 적합한 슬라이드를 선택하여 Bloom등에 의한 조직학적 등급을 기준으로 하여 관형성 정도, 핵 등급과 유사분열수를 검토하였으며, 이를 통합한 조직학적 등급을 판정하였다⁸(그림 1).

나. 면역조직화학 염색 및 결과판정

HCCR에 대한 일차항체(카톨릭대학교 김진우 교수 제공)를 1:50으로 희석하여 사용하였고, Ki-67에 대한 일차항체는 rabbit anti-human Ki-67 (DAKO, Copenhagen, Denmark)을 1:50으로 희석하여 사용하였다. 일차항체로서 ER과 PR 단일 클론항체(Novo castra, Newcastle, U. K.)를 ER은 1:50으로 PR은 1:100으로 희석하여 사용하였다. 면역조직화학 염색은 포르말린에 고정된 파라핀 포매 조직을 5 μ m로 박절하여 코팅 슬라이드에 부착시키고 50℃에서 2시간 건조시켰다. 자일렌으로 10분간 3회에 걸쳐 파라핀을 제거하고 단계적으로 알코올에 차례대로 함수과정을 거친 후 증류수를 사용하여 세척하였다. 항원성 노출을 위해 pH6.0의 구연산 완충액에 슬라이드를 담근 후 마이크로웨이브 오븐에서 15분간 전처치를 시행하였다. 이어서 과산화수소용액에서 20분간 처치 후 트리스 완충액을 사용하여 3회에 걸쳐 세척하였다. 이후 일차항체를 도포하여 냉장고에서 하룻밤 동안 배양 세척 후, 바이오틴이 결합된 이차항체에 20분 배양과 세척, streptavidin peroxidase에 20분간 배양하였다. 세척과정을 거친 후 3-amino-9ethylcarbazole(AEC)로 발색하고, 헤마톡실린으로 대조 염색한

다음 클리세물로 봉합하였다.

ER, PR, Ki-67에 대한 면역조직화학 염색결과의 양성판정은 세포핵에 염색되는 것을 원칙으로 하였다. ER과 PR은 염색되지 않았을 경우에는 음성, 염색되었을 경우에는 양성으로 판정하였고, Ki-67의 표지지수는 면역조직화학 염색이 가장 강하게 된 부위를 선택하여 광학현미경 400배의 고배율 시야에서 1,000개 이상의 종양세포를 관찰, 이중 염색된 세포의 평균개수에 대한 천분율로 정하였다.

HCCR에 대한 양성판정은 종양세포의 세포질에 염색되는 것을 기준으로 하여, 크게 염색 강도(intensity)와 염색 범위(distribution)로 나누어 분석하였다. 염색 강도는 염색 되지 않은 경우 0점, 그리고 염색 강도가 약 한 경우 1점, 중등도 이상일 경우 2점으로 점수화한 다음 0점과 1점을 HCCR 염색 강도 음성으로 2점을 HCCR 염색 강도 양성으로 하여 예후와 비교하여 보았다(그림 2). 염색 범위는 가장 강하게 염색된 부위를 다섯 곳 이상 선택하였고, 400배의 고배율 시야에서 400개 이상의 종양세포를 세어 염색된 종양 세포의 평균치를 구한 다음, 백분율에 따라 0%는 0점, 25% 미만은 1점, 25% ~50% 2점, 그리고 50%이상은 3점으로 각각 점수화하여 생존율을 비교하여 보았다. 이렇게 나온 점수를 합산한 총점을 계산하여 HCCR 음성군(0~4점)과 HCCR 양성군(5점)으로 나누어서 생존율을 비교하여 보았다. 또한 HCCR의 염색 강도와 ER, PR, Ki-67과 통계학적 유의성이 있는지를 비교하여 보았다.

다. 유세포측정기를 이용한 세포주기 분석

연구대상 103예의 파라핀 포매 조직으로부터 5 μ m 두께의 절편을 2-3개 얻은 다음, 자일렌, 100%알코올, 95%알코올로 각각 30분씩 2회, 80%알코올, 70%알코올, 50%알코올로 각각 30분씩 1회 부란시킨 후 하룻밤 냉장

보관하였다. 페트리 접시에 조직을 놓고 인산완충액을 적당량 가하며 메스로 잘게 자른 다음 혼합하여 원침하였다. 이후 0.5% 펩신을 분주하여 혼합한 후 수조기에 30분간 배양시켰다. 펩신의 작용을 정지시킨 후 원침하여 침전물에 인산완충액을 가하고 잠시 실온에 방치하였다. 나일론망으로 2회 여과하고 $1-2 \times 10^6/\text{mL}$ 로 세포수를 조정 한 후 500 μL 를 취하였다. Cycle TEST PLUS DNA reagent kit(Becton Dickinson, Ontario, Canada)를 이용하여 반응시킨 다음, 유세포측정기(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 DNA 배수성 양상, 합성기 분획, G2M기 백분율과 증식지수를 분석하였다.

라. 추적기간 및 통계학적 분석

추적관찰 기간은 3개월에서 127개월로 중앙값은 84개월이었다. 통계분석은 dBSTAT 프로그램(버전 4.1, DBSTAT Co., Chunchon, Gangwon, Korea)을 이용하였으며, p 값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의하다고 판정하였다. 생존율의 계산은 Kaplan-Meier법을 이용하여 구하고, 두 집단의 생존곡선이 서로 교차하지 않을 때는 log-rank 검정법을, 생존곡선이 교차할 때는 generalized Wilcoxon 또는 generalized Kruskal-Wallis 검정법을 시행하여 생존율을 비교하였다. HCCR의 발현과 기존 예후인자와의 관계를 알아보기 위하여, HCCR의 염색 강도와 ER, PR, DNA 배수성 양상은 t-검정법, χ^2 검정법을, 임상병기, 조직학적 등급, 핵 등급, 유사분열수는 분산분석, χ^2 검정법을 시행하고, 생존기간, Ki-67과는 피어슨 상관분석을 시행하였다.

그림 1. 침윤성 관암종의 조직병리학적 소견. Bloom등에 의한 조직학적 등급을 기준으로 분화가 좋은 것은 1등급으로 (A) 분화가 나쁜 것은 3등급으로 (B) 분류하였다.

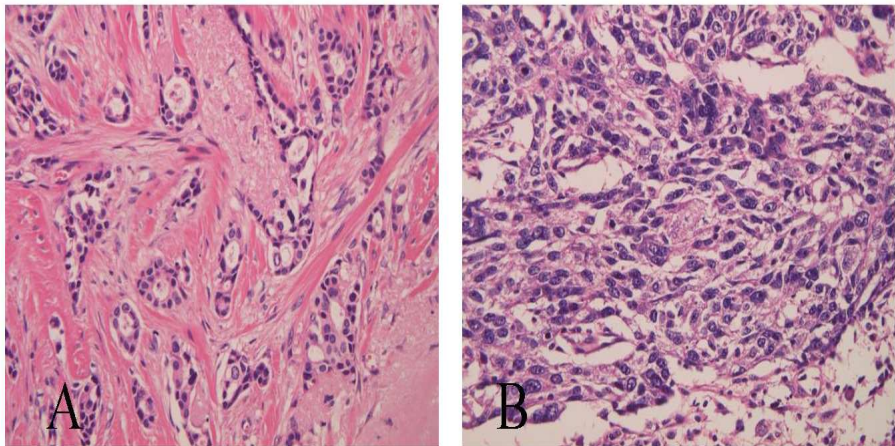
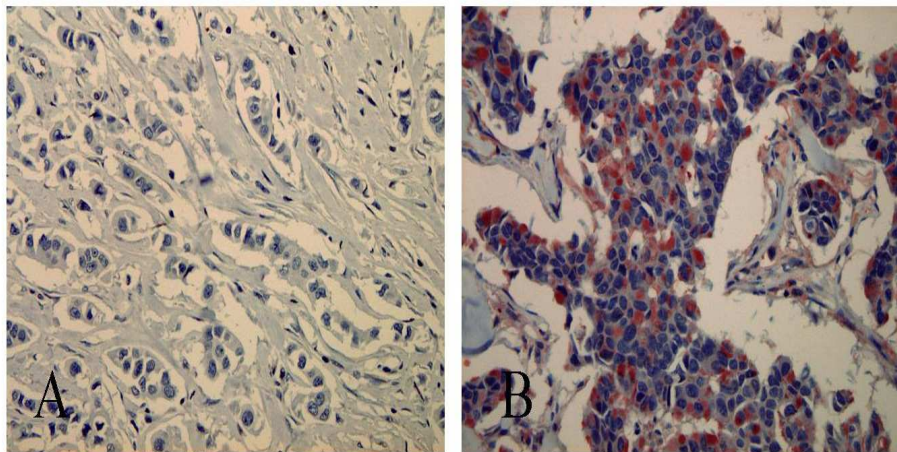


그림 2. HCCR에 대한 면역조직화학 염색소견. HCCR 염색 강도에 따라 전혀 염색이 되지 않았을 경우는 0점, 약하게 염색 되었을 때 1점으로 (A), 중간 정도나 강하게 염색 되었을 때 2점으로 (B) 분류하였다(x400).



III. 결 과

1. 임상소견과 생존율

총 103예 환자의 진단 당시 연령은 24세부터 77세였으며 평균 연령은 47세였다. 연령별로는 20대가 5예, 30대가 19예, 40대가 40예, 50대가 22예, 60대가 15예, 70-80대가 2예로 40대가 가장 많았다. 림프절 전이가 있는 경우가 45예(43.7%)였고 전이가 없는 경우는 58예(56.3%)였다. AJCC 기준에 따른 병기 I은 19예(18.4%), 병기 IIA와 IIB는 60예(58.3%), 그리고 병기 IIIA와 IIIB는 24예(23.3%)로 병기 II인 경우가 가장 많았다. 전체 대상 환자의 5년 생존율은 91.07%이고 10년 생존율은 87.81%이었다.

2. 병리학적 소견

총 103예는 모두 침윤성 관암중 이었고, 조직학적 등급에서 핵 등급은 I등급이 4예(3.9%), 2등급이 84예(81.6%), 그리고 3등급이 15예(14.5%)로 2등급이 가장 많았다. 유사분열수는 열 군데의 고배율 시야 당 10개 미만인 경우가 47예(45.6%), 10개 이상 20개 미만인 경우가 39예(37.9%), 그리고 20개 이상인 경우가 17예(16.5%)로 10개 미만인 경우가 가장 많았다. 이들과 관형성 정도를 합친 조직학적 등급은 I등급이 31예(30.1%) (그림 1.A), II등급이 53예(51.5%), 그리고 III등급인 경우가 19예(18.4%) (그림 1.B)로 II등급이 가장 많았다.

3. 면역조직화학염색 결과

HCCR의 염색 강도가 음성인 경우는 76예(73.7%)이고 양성인 경우는 27예(26.3%)이었다. AJCC 기준에 따라 병기 I인 경우 음성은 13예(68.4%), 양성은 6예(31.6%), 병기 II인 경우 45예(75.0%), 15예(25.0%), 그리고 병기

III인 경우에는 18예(75.0%)과 6예(25.0%)로 병기가 진행 될수록 염색강도가 낮아지는 양상을 보였으나 통계학적 유의성은 없었다($p>0.05$). 림프절 전이는 pN0인 경우 염색 강도 음성은 33예(71.4%), 양성은 13예(28.6%), pN1인 경우 음성은 40예(75.5%), 양성은 13예(24.5%), pN2인 경우 HCCR 음성은 3예(75.0%), 1예(25.0%)였다. 핵 등급이 1인 경우 HCCR 음성은 4예(80.0%) 양성은 1예(20.0%), 핵 등급 2인 경우 61예(73.5%)와 22예(26.5%), 그리고 핵 등급 3인 경우 11예(73.3%)와 4예(26.7%)로 HCCR의 염색 강도와 핵 등급 사이에는 통계학적 유의성은 없었다($p>0.05$). 유사분열수가 열군데 고배율 시야 당 10개 미만일 때 염색 강도가 음성인 경우가 34예(72.3%), 양성은 13예(27.7%), 10-19개일 때 29예(74.4%)와 10예(25.6%), 그리고 20개 이상 일 때 13예(76.5%)와 4예(23.5%)로 HCCR의 염색 강도와 유사분열사이에는 통계학적으로 유의한 차이가 없었다($p>0.05$). 조직학적 등급에 따른 HCCR의 염색 강도는 I등급인 경우 음성은 21예(67.7%), 양성은 10예(32.3%), II등급인 경우 41예(77.4%)와 12예(22.6%), 그리고 III등급인 경우 음성은 14예(73.7%)와 양성은 5예(26.3%)로 HCCR의 염색 강도와 조직학적 등급 사이에는 통계학적으로 유의성이 없었다($p>0.05$). ER에 양성인 종양에서 HCCR 염색 강도 음성인 경우는 31예(73.8%), 양성은 11예(26.2%), ER에 음성인 종양에서 HCCR 염색 강도 음성인 경우는 25예(52.9%)와 12예(25.0%)로 HCCR의 염색 강도와 ER사이에는 통계학적 유의성은 없었다($p>0.05$). 마찬가지로 PR에서 양성인 종양에서 HCCR 염색 강도 음성인 경우는 39예(78.0%), 양성은 11예(22.0%)이고 PR에 음성인 종양에서 HCCR 염색 강도 음성은 28예(75.7%)와 양성은 9예(24.3%)이지만 HCCR의 염색 강도와 PR사이에는 유의성이 없었다($p>0.05$)(표 1). Ki-67에 대한 염색은 표지 지수 천분율의 평균값은 252.434로 피어슨 상관분석을 하였을 때 HCCR의 염색 강도와 상관관계가

없었다($p>0.05$)(그림 3).

총 103예 환자의 생존기간과 HCCR의 염색 범위의 회귀분석을 실시하여 보았을 때 염색 범위가 넓을수록 생존율이 길었다($p<0.05$)(그림 4).

HCCR의 염색 강도를 음성(0점과 1점)과 양성(2점)으로 나눈 다음 생존율을 비교하였을 때는 통계학적 유의성이 없었고($p>0.05$)(그림 5), 또한 염색 범위를 0점(0%), 1점(<25%), 2점(25~50%), 3점(>50%)으로 나누어 생존율을 비교하였을 때도 마찬가지로 통계학적 유의성이 없었다($p>0.05$)(그림 6). 그리고 HCCR의 염색 강도는 음성(0점과 1점)과 양성(2점)으로 분류하고 염색 범위는 0점, 1점, 2점, 3점으로 나눈 다음 합산하여 점수가 0~4점은 음성군으로 5점은 양성군으로 정의하고 생존율과 비교해 본 결과 HCCR의 발현은 생존율과 상관관계가 없었다($p>0.05$)(그림 7). 림프절의 전이에 따라 10년 생존율을 산출했는데 pN0에서 환자는 사망한 예가 없었고, pN1인 예에서 HCCR 염색 강도가 음성인 환자의 10년 생존율은 80.0%, HCCR 염색 강도가 양성인 환자의 10년 생존율은 94.0%, pN2에서 HCCR 염색 강도가 음성인 환자의 10년 생존율은 82.0%, HCCR 염색 강도가 양성인 환자의 10년 생존율은 83.0%이다. 또한 병기에 따른 10년 생존율을 보면 병기 I에서 HCCR 염색 강도가 음성인 환자의 10년 생존율은 91.0%, 양성인 100%이고, 병기 II에서 HCCR 염색 강도 음성인 환자의 10년 생존율은 89.0%, 양성인 95.0%, 병기 III에서 염색 강도 음성인 환자의 10년 생존율은 56.0%, 양성인 79.0%로 통계학적 유의성은 없었으나 각 병기별로 HCCR의 염색 강도가 양성인 환자는 음성인 환자에 비해 10년 생존율이 더 우수하였다. 병기 III인 환자에서 HCCR의 염색 강도와 생존율과의 상관관계를 비교하였을 때 생존율에 있어서 차이가 없었다($p>0.05$)(그림 8).

4. 유세포측정기에 의한 세포주기 분석결과

총 91예에서 DNA배수성 양상이 이배수인 경우 HCCR 염색 강도의 음성율은 76.5%(13/17), 양성율은 23.5%(4/17), 비배수형인 경우 HCCR 염색 강도의 음성율은 72.2%(52/72), 양성율은 27.8%(20/72)인데 HCCR의 염색 강도와 비교하여 보았을 때 통계학적으로 서로 유의성이 없었다 ($p>0.05$)(표 1).

표 1. HCCR 염색 강도에 따른 임상 및 병리학적 인자와 관련성.

		HCCR 염색 강도			
		환자수	음 성(%)	양 성(%)	
병기	I	19	13(68.4)	6(31.6)	NS
	II	60	45(75.0)	15(25.0)	
	III	24	18(75.0)	6(25.0)	
핵 등급	1	5	4(80.0)	1(20.0)	NS
	2	83	61(73.5)	22(26.5)	
	3	15	11(73.3)	4(26.7)	
유사분열수 (/10HPF)	<10	47	34(72.3)	13(27.7)	NS
	10-19	39	29(74.4)	10(25.6)	
	>20	17	13(76.5)	4(23.5)	
조직학적 등급	1	31	21(67.7)	10(32.3)	NS
	2	53	41(77.4)	12(22.6)	
	3	19	14(73.7)	5(26.3)	
ER	양성	49	38(77.6)	11(22.4)	NS
	음성	48	36(75.0)	12(25.0)	
PR	양성	50	39(78.0)	11(22.0)	NS
	음성	37	28(75.7)	9(24.3)	
DNA 배수량상	이배수	17	13(76.5)	4(23.5)	NS
	비배수	72	52(72.2)	20(27.8)	

NS: Not significant($p>0.05$)

그림 3. Ki-67과 HCCR의 염색 강도와의 상관관계. Ki-67지수와 HCCR의 염색 강도와는 서로 상관관계가 없었다($p>0.05$)($r=-0.0489$).

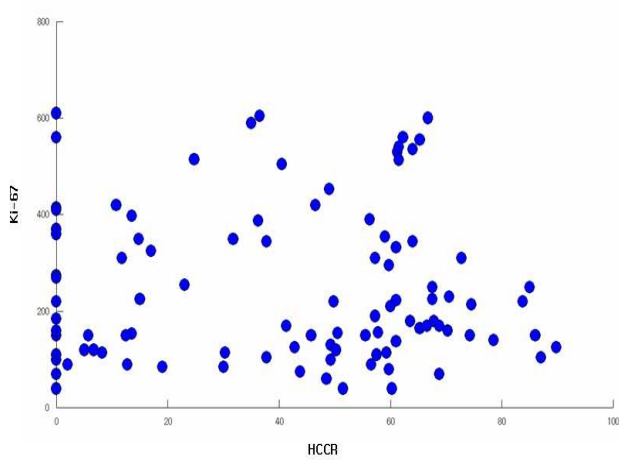


그림 4. HCCR의 염색 범위와 생존율 상관관계. HCCR 염색 범위에 따른 생존기간을 피어슨 단분량 분석을 시행한 결과 서로 상관관계가 있었다 ($p<0.05$)($r=0.3634$).

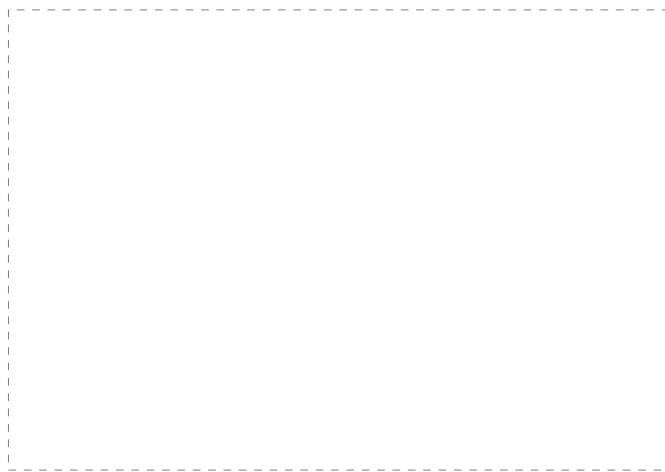
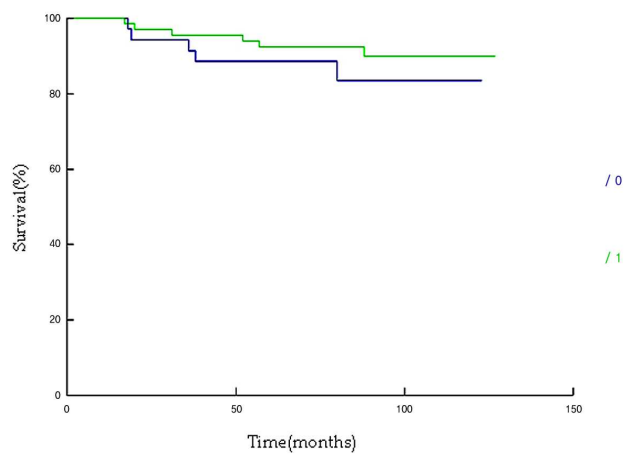


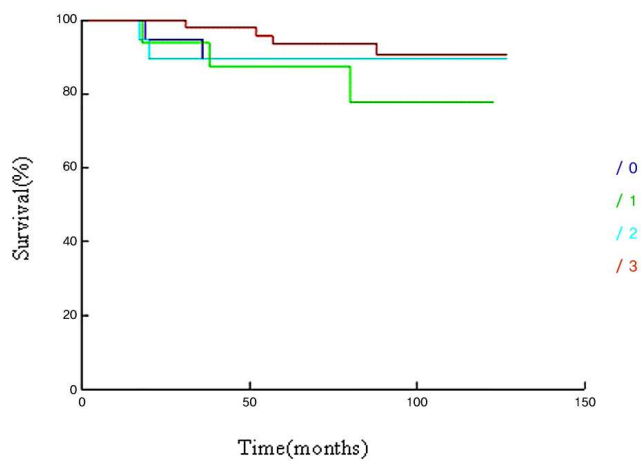
그림 5. HCCR의 염색 강도에 따른 생존율 곡선. HCCR의 발현에 따른 생존율(Kaplan-Meier방법)을 비교해 보았을 때 HCCR의 염색 강도는 예후와 관련이 없었다($p>0.05$).



*0; HCCR 염색 강도 음성(0점, 1점)

1; HCCR 염색 강도 양성(2점)

그림 6. HCCR의 염색 범위와 생존율 곡선. HCCR 발현에 따른 생존율 (Kaplan-Meier방법)을 비교해 보았을 때 HCCR의 염색 범위는 예후와 관련이 없었다($p>0.05$).



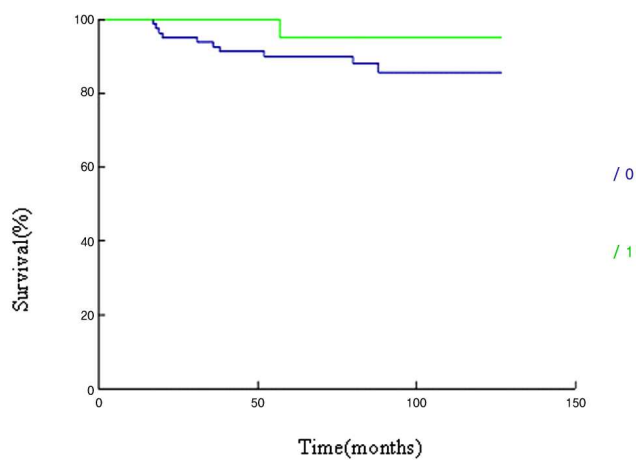
*0; 0%

1; <25%

2; 25~50%

3; >50%

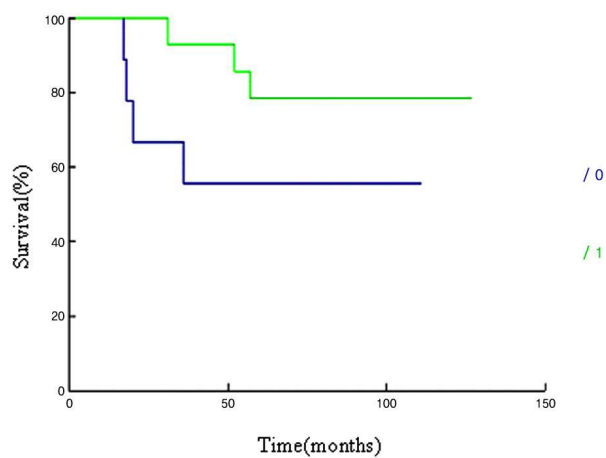
그림 7. HCCR의 염색 강도와 염색 범위에 따른 생존율 곡선. HCCR 염색 강도와 염색 범위를 합산한 다음 0~4점은 HCCR 음성군으로 5점은 HCCR 양성군으로 나누어 생존율(Kaplan-Meier법)을 비교해 보았을 때 통계학적 유의성이 없었다($p>0.05$).



*0; HCCR 음성군

1; HCCR 양성군

그림 8. 병기 III 환자에서 HCCR의 염색 강도에 따른 생존율 곡선. 생존율 (Kaplan-Meier법)을 비교해 보았을 때 집단들 간에 유의한 차이가 없었다 ($p>0.05$).



*0; HCCR 염색 강도 음성

1; HCCR 염색 강도 양성

IV. 고 찰

현재 유방암의 발생, 진행과 치료방침에 관련된 유전자에 대해 다양한 연구가 진행되고 있으며 이들을 유방암의 진단 표지인자, 예후인자, 치료방침으로 사용하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 침윤성 관암종은 유방암에서 70%-80%정도를 차지하며³ 다른 암종과 마찬가지로 세포의 돌연변이 된 유전자의 축적에 의해 발생되는데⁹ 종양의 진행에 따라, 종양과 관련된 유전자의 더 많은 변이가 발생하여, 암세포의 분화가 나빠지며 주변 조직으로 침윤되고 원격장기로 전이한다. 지금까지 유방암의 예후인자로 알려진 여성 호르몬(ER과 PR)이 양성일 때 환자는 좋은 예후를 보이고 치료에도 좋은 반응을 보인다. 최근 연구된 종양단백질 HER-2는 유방암의 예후인자로써 과발현이 있는 환자들에서 HER-2 발현이 없는 환자에 비해 예후가 나쁜 것으로 보고되었다³.

그 외에 현재까지 밝혀진 유방암 발생과 연관되는 유전자들로는 Cathepsin D(CD), p53, cyclin D1, DNA 배수성 양상 등이 있는데^{3,10} CD는 일종의 단백질 분해효소로써 암의 침윤과 전이에 연관되는데 CD의 증가는 나쁜 예후와 연관이 있으나 그중 림프절 전이가 없는 군에서는 예후와 연관이 없다고 하였다¹¹. 그러나 면역조직화학 염색을 이용하여 연구한 결과에서는 CD발현이 유방암의 예후와 연관이 없었다¹¹. p53은 대표적인 종양억제 유전자로 20~50%의 유방암에서 돌연변이 혹은 불활성화 되어있는데 p53이 유방암에서 예후와 연관이 있는지는 아직 논란이 있다^{12,13,14}. 또한 Cyclin D1은 세포주기 조절인자로 약 40~50%의 유방암에서 과발현되지만 예후와는 어떠한 연관이 있는지는 아직 논란이 많다¹⁵. 유방암에서 DNA 배수성 양상에 대하여서는 다양한 연구 결과가 보고되었는데, 대개 이배수체나 이배수체에 가까운 경우에 비배수체에 비하여 ER의 양성율이

높아서, 치료에 대한 반응이 좋거나 조직학적 등급이 낮아서 예후가 좋은 것으로 알려져 있으나⁶ 일부 연구에서는 DNA 배수성 양상과 예후사이에는 통계학적 의의가 없다고 하였다¹². 이상의 유전자들의 비정상적인 발현이 유방암 종양발생에 관여한다는 보고가 있으나, 조직학적 유형 및 예후와의 유의성에 대해서는 연구자들마다 의견의 차이가 있다.

최근에 자궁경부암에서 발견된 HCCR은 다양한 종류의 세포에서 다양하게 발현한다. 정상 유방조직, 난소조직, 결장조직, 간조직과 양성 유방질환(섬유선종), 폐의 편평세포암종, 위암에서 HCCR은 발현되지 않거나 매우 미미하게 발현되며 반면에 백혈병, 림프종, 유방암, 신장암, 난소암, 위암, 결장암과 자궁경부암 조직에서 높게 발현 된다⁶.

일부 종양에서 HCCR 발현이 알려지면서, 종양세포의 침윤 및 전이와의 유의성에 관한 연구와 종양에서 HCCR의 발현 기전을 밝히려는 연구가 진행되고 있다^{4,5,6,17}. 지금까지 연구된 HCCR의 발현과 임상예후를 살펴보면 HCCR은 처음으로 자궁경부암에서 발견되었으나 자궁경부암 환자의 혈청 내에서는 증가되지 않는다⁴. 그러나 HCCR은 조기 간암 환자의 혈청 내에서 78.2%의 민감성으로 발현되고 있는데 AFP보다 높은 민감성을 갖고 있어 조기 간암에서 진단 표지인자로 사용할 수 있다⁵. 또한 조기 유방암 환자의 혈청에서 HCCR은 정상에 비해 2~3배로 현저히 증가되어 특이성이 90.0%에 달하므로 유방암의 진단표지인자로 사용할 수 있다⁶. HCCR 유전자이전 마우스와 vector alone 세포에서 p53의 발현을 비교하여 보았는데 HCCR 유전자이전 마우스에서 p53의 발현이 현저히 증가되었다⁴. p53발현 증가에는 두가지 원인이 있을 수가 있는데 p53의 돌연변이 또는 단백질의 반감기의 증가가 있다. 실험한 결과 HCCR 유전자이전 마우스에서 p53의 돌연변이는 없었고, p53의 반감기가 정상의 20분~1시간에서 4시간 이상으로 증가하였다. 반감기가 증가된 p53은 세포내에서 축적되면서

세포주기, 복구, 유전자의 안정성, 세포자멸사 등에 대한 작용을 제대로 발휘하지 못하여 종양을 일으키는 원인의 하나가 된다⁴. 또한 HCCR은 직접적으로 세포주기를 조절하는 p21, MDM2의 양을 감소하여 세포주기 또는 세포자멸사에 영향을 줌으로써 종양의 발생에 기여한다고 생각된다⁴. Ho등은 현미해부(microdissection)하는 방법을 이용하여 비침윤성 관내암 종에 관해 연구한 결과 높은 등급(high grade)의 비침윤성 관내암종 일수록 p53기능 소실의 변화가 컸다¹⁸. 그리하여 p53의 변이는 조기 유방암의 발생과 발전에 있어서 매우 밀접한 관련이 있을 것이라고 하였다¹⁸. 이를 통해 유방암의 초기에 HCCR이 중요한 작용을 할 수 있다고 생각된다.

이상의 연구에서 보면 HCCR도 종양의 발생과 발전에 밀접한 연관이 있을 것으로 추정되지만 아직까지 HCCR이 종양의 예후와 관련이 있는지를 규명한 연구는 없었다.

Kim등의 연구에서 100여명의 환자들의 혈청을 이용하여 혈청 내에서 HCCR의 양을 측정한 다음 각각 환자들의 나이, 림프절 전이, 원격 전이, 림프관 침윤, 혈관 침윤, 조직학적 등급, 병기와의 유의성에 대해 분석한 결과 HCCR의 발현과 각 인자들 간의 통계학적 유의성은 없었다. 본 연구에서는 면역조직화학 염색방법을 응용하여 103명 환자의 조직절편에서 HCCR의 발현이 핵 등급, 유사분열수, 증식지수 Ki-67, DNA 배수 양상 등 임상병리학적 예후인자들과는 관련성이 있는지를 확인하여 보았는데 통계학적 유의성이 없었다. 또한 HCCR 염색 강도와 염색 범위를 예후와 비교하여 본 결과 HCCR의 염색 범위가 클수록 생존율이 긴 상관관계($r=0.3634$)를 보였고, 비록 통계학적 유의성은 없으나 HCCR 염색 강도 음성에 비해 양성 10년 생존율은 더 우수한 경향을 보였다⁶. 이는 조기 유방암에서 HCCR은 혈액내로 분비되며 유방암이 진행함에 따라 HCCR은 증가되지 않고 중기 또는 말기 암에서 HCCR이 활성화되어 있는 기간이

짧은데 그 원인이 있을 것으로 추정된다^{6,17}. 유방암에서 HCCR이 독립된 예후인자로 이용할 수 있는지를 규명하기 위해서는 보다 더 많은 환자를 대상으로 한 전향적 임상연구가 필요할 것으로 생각된다..

Kim등의 연구에 의하면 HCCR 유전자이전 마우스(transgenic mice)의 mammary fat pad에서만 p53이 증가되었고 종양이 발생하였다. 이에 대한 명확한 기전은 아직 밝혀져 있지 않았지만 아마도 HCCR이 여성 호르몬과 연관되어 암발생에 관여할 것이라고 추정하였다¹⁸. 그러나 현재까지 HCCR의 발현과 ER, PR의 유의성에 관한 연구는 없고 본 연구에서 HCCR의 발현과 유방암의 예후인자인 여성 호르몬(ER, PR)과 연관이 있는지를 유방암 조직에서 검사하여 보았는데 모두 통계학적 유의성이 없었다. 또한 Kim등은 HCCR은 선택적으로 ER+/PR+/mutant p53/high HER-2인 세포계(cell line)에서만 발현된다고 하였으나^{4,6} 본 연구에서는 ER+/PR+인 조직에서 HCCR의 발현이 있을 뿐 아니라 ER-/PR-인 조직에서도 HCCR의 발현이 있었다. 이번 조직절편에서 얻은 실험결과는 Kim등이 혈청 내에서 얻은 결과와 다른 결과를 얻었는데 이에 대해서는 추후 더 연구가 필요하다고 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서는 외과적 절제수술이 시행되고 조직병리학적 검색이 확진된 병기 I, II, III의 침윤성 관암중 환자 103예를 대상으로 하여 유방암에서 HCCR의 발현과 생존율을 분석하여 HCCR의 발현이 예후예측인자로서 어떠한 가치가 있는가 알아보고자 하였고 HCCR의 발현과 예후인자들인 병기, 핵 등급, 유사분열수, 조직학적 등급, ER, PR, Ki-67, DNA 배수성 양상과의 상관관계를 분석하고자 HCCR에 대한 면역조직화학 염색을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. HCCR의 염색 범위가 넓을수록 환자의 생존율이 긴 상관관계가 존재한다($p < 0.05$).
2. HCCR의 염색 강도, 염색 범위와 예후를 비교하였을 때 모두 통계학적 유의성이 없었고($p > 0.05$), HCCR의 염색 강도와 염색 범위를 합산하여 생존율과 비교해 본 결과 역시 유의성이 없었다($p > 0.05$).
3. 병기 III 환자에서 예후와 HCCR 염색 강도를 비교하였을 때 집단간의 생존율 차이가 없었다($p > 0.05$).
4. HCCR의 염색 강도는 유방암의 예후인자인 병기, 핵 등급, 유사분열수, 조직학적 등급, ER, PR, Ki-67, DNA 배수성 양상과 관련성이 없었다($p > 0.05$).

결론적으로 유방암 환자를 대상으로 면역조직화학적 염색법으로 HCCR 염색 강도와 염색 범위를 분석한 결과, 유방암조직에서 HCCR의 발현은 유방암의 예후인자와 관련이 없었고 직접적으로 예후와도 관련은 없었다. 유방암의 예후인자로서 HCCR의 역할을 규명하기 위하여 앞으로 더 많은 환자를 대상으로 장기간의 추적관찰을 통한 전향적 임상연구가 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Ministry of Health and Republic of Korea. Annual Report of the Central Cancer Registry in the Republic of Korea (2002.1 - 2002.12.) Joongang-dong, Gwacheon-si Gyeonggi-do: Ministry of Health and Welfare; 2003.
2. Paul PR. Rosen's breast pathology. 2th. Philadelphia, Lippincott Williams and wilkins Publishers.2001. p.325-356.
3. Rosai J. Rosai and Ackerman's surgical pathology. 9th ed Piladelphia Elsevier's Health Sciences Publishers, 2004. p.1824-1827.
4. Ko J, Lee YH, Hwang SY, Lee YS, Shin SM, Hwang JH, et al. Identification and differential expression of novel human cervical cancer oncogene HCCR-2 in human cancers and its involvement in p53 stabilization. Oncogene 2003;24:4679-4689.
5. Yoon SK, Lim NK, Ha SA, Park YG, Choi JY, Chung KW, et al. The human cervical cancer oncogene protein is a biomarker for human hepatocellular carcinoma. Cancer Res 2004;64:5434-5441.
6. Jung SS, Park HS, Lee IJ, Namkoong H, Shin SM, Cho GW, et al. The HCCR oncoprotein as a biomarker for human breast cancer. Clin Cancer Res 2005;11:7700-7707.
7. American Joint Committee. Breast IN: AJCC cancer staging manual. 6th ed. Chicago:Lippincott-Raven Publishers,2002. p.223-234.
8. Bloom HJG, Richardson WW. Histologic grading and prognosis in breast

- cancer. *Br J Cancer* 1957;11:359-377.
9. Baselga J, Norton L. Focus on breast cancer. *Cancer cell* 2002;1:319-322.
 10. Duffy MJ. Clinical uses of tumor markers: a critical review. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2001;38:225-262.
 11. Westley BR, May FEB. Cathepsin D and breast cancer. *Eur J Cancer* 1996;32:15-24.
 12. Mirza AN, Mirza NQ, Vlastos G, and Singletary ES. Prognostic factors in node-negative breast cancer. *Ann surg.* 2002;235:10-26.
 13. Miller LD, Smeds J, George J, Vega VB, Vergara L, Ploner A, et al. An expression signature for p53 status in human breast cancer predicts mutation status, transcriptional effects, and patient survival. *Natl Acad Sci U S A.* 2005;38:1350-1355.
 14. Gao RJ, Bao HZ, Yang Q, Cong Q, Song JN, Wang L. The presence of serum anti-p53 antibodies from patients with invasive ductal carcinoma of breast: correlation to other clinical and biological parameters. *Breast Cancer Res Treat.* 2005;2:111-115.
 15. Han S, Park K, Bae BN, Kim KH, Kim HJ, Kim YD, et al. Prognostic implication of cyclin E expression and its relationship with cyclin D1 and p27Kip1 expression on tissue microarrays of node negative breast cancer. *J Surg Oncol* 2003;83:241-247.
 16. Moureau-Zabotto L, Bouchet C, Cesari D, Uzan S, Lefranc JP, Antoine M, et al. Combined flow cytometry determination of S-phase fraction and DNA ploidy is an independent prognostic factor in node-negative invasive

- breast carcinoma: analysis of a series of 271 patients with stage I and II breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2005;91:61-71.
17. Ko J, Shin SM, Oh YM, Lee YS, Ryoo ZY, Lee YH, et al. Transgenic mouse model for breast cancer: induction of breast cancer in novel oncogene HCCR-2 transgenic mice. *Oncogene* 2004;23:1950-1953
18. Borresen-Dale AL. TP53 and breast cancer. *Hum Mutat.* 2003;21:292-300.

Abstract

Expression of HCCR in invasive ductal carcinoma of breast

Ying Cui

*Department of pathology
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Kwang Hwa Park)

Purpose: Oncoprotein HCCR is a down-regulator of p53 activity. Because level of HCCR significantly increases in early hepatocellular carcinoma and breast cancer, It is recently reported that HCCR can be used as a diagnostic marker for these cancers. However, there have been no studies about the possibility of using HCCR expression as a prognostic factor in breast cancer patients. Therefore, this research focuses on HCCR, a diagnostic marker for early breast cancer, and its effect in prognosis of breast cancer.

Methods: We collected and evaluated 103 cases of surgically removed invasive ductal carcinoma from January, 1996 to May, 2000 at Wonju Christian Hospital of Yonsei University, Wonju College of medicine. Using avidin-biotin complex method, stored paraffin tissue samples were stained immunohistochemically for HCCR, ER, PR, and Ki-67. We analyzed survival rate according to the intensity and distribution of HCCR expression. Also we compared the HCCR expression to clinical and pathological prognostic factors for any correlation. Moreover, flow cytometric DNA analysis factors were

compared to the HCCR expression.

Results: From 103 cases studied, about 26.3% were found to be positive for HCCR. The expression of HCCR showed no statistically significant correlation to stage, nuclear grade, number of mitosis, histologic grade, estrogen receptor, Progesterone receptor, DNA ploidy pattern, and Ki-67 index. Ten year survival rate of a group of patients, who revealed negative HCCR expression, was 83.0% and 93.0% for a group of patients, who revealed positive HCCR expression. Although the group with positive expression had a better survival rate, there was no statistically significant difference between them. Ten year survival rates for each stage showed following results; in stage I, 91.0% ten year survival rate in HCCR negative group, and 100% in positive group; in stage II, 89.0% in negative group, and 95.0% in positive group; finally, in stage III, 56.0% in negative group, and 79.0% in positive group. Although the result suggested that the positive HCCR group had a better survival rate than the negative group did, there was no significant correlation between stages and intensity. Although patients with wider distribution of staining had a longer survival period, yet this proved not to be significant for prognosis.

Conclusion: This study showed that the positive group had a better survival rate than the negative group did, despite of no significant differences between the two groups. To determine the role of HCCR as a prognostic marker for breast cancers, it is necessary to practice further clinical studies, including more patients with long-term follow-up data.

Key word : HCCR, breast carcinoma, prognosis, immunohistochemistry