

유방 종양에서 *RHEB*, *HDAC1*, *ROS1*,
WEE1 유전자 발현과
예후 인자와 상관성

연세대학교 대학원
의 학 과
엄 민 섭

유방 종양에서 *RHEB*, *HDAC1*, *ROS1*,
WEE1 유전자 발현과
예후 인자와 상관성

지도교수 박 광 화

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2008 년 12 월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

엄 민 섭

엄민섭의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2008년 12월 일

감사의 글

본 논문의 시작부터 맺기까지 언제나 관심과 지도 편달로 가르침을 주신 박광화 교수님께 진심으로 감사 드립니다. 부족한 논문을 심사하시고 자상하게 다듬어 주신 고상백 교수님, 박경란 교수님, 이종인 교수님, 예병일 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 또한 본 논문을 준비하는 동안 또한 전공의 시절부터 지금까지 항상 관심을 가지고 지켜봐 주신 정순희 교수님과 조미연 교수님께 감사 드립니다. 특히 실험 과정에서 많은 노력을 아끼지 않으신 김중섭 선생님, 유경중 선생님, 강태영 선생님 그리고 이미정 선생님께 감사 드리며 통계처리를 도와 주신 석기태 선생님께 감사 드립니다. 본 연구에 전념 할 수 있도록 이해와 협조를 해 주신 병리과 의국, 사무실과 조직방 모든 선생님들께도 감사 드립니다. 마지막으로 저를 낳아 주시고 이 자리까지 오게 해주신 부모님과 장인, 장모님, 큰형, 작은형 내외 그리고 항상 저의 뒷바라지에 여념이 없는 사랑하는 아내 현주에게 이 부족한 논문을 바칩니다.

저 자 씀

차 례

그림 및 표 차례	iv
국문요약	v
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 대상 환자	4
2. 면역조직화학 염색	4
가. 조직 마이크로어레이 블록 제작	4
나. 염색 방법	5
다. 판독 방법	6
3. 중합효소 연쇄 반응	6
4. 웨스턴 블롯 분석	8
5. 통계 분석	9
III. 결과	10
1. 임상 및 병리학적 소견	10
2. 면역조직화학 염색 결과	10
가. RHEB	10
나. ROS1	11
다. HDAC1	11
라. WEE1	12
마. 침윤성 관암종의 면역조직화학 염색 결과와 예후 인자와의 상관관계	15
3. Real-time PCR 결과	16

가. 신선 조직에 대한 PCR 결과	16
나. 포르말린 고정 파라핀 포매 조직에 대한 PCR 결과	17
4. 웨스턴 블롯 면역염색 결과	18
IV. 고찰	20
V. 결론	27
참고 문헌	28
영문요약	34

그림 차례

Figure 1. Immunohistochemical findings	13
Figure 2. Western blot analysis	19

표 차례

Table 1. The primers and probes of <i>RHEB</i> , <i>ROS1</i> , <i>HDAC1</i> , and <i>WEE1</i>	8
Table 2. The results of immunohistochemical stain in the epithelial cells of breast neoplasm	14
Table 3. The results of immunohistochemical stain in the stromal cells of breast neoplasm	14
Table 4. Relationship between RHEB expression, histologic grade, and tubule formation	16
Table 5. Relationship between ROS1 expression, histologic grade, and mitotic count	16
Table 6. Relationship between HDAC1 expression, mitotic count, and estrogen receptor expression	16
Table 7. The result of real-time PCR analysis between fibroadenoma, phyllodes tumor and invasive ductal carcinoma	18

국문요약

유방 종양에서 *RHEB*, *HDAC1*, *ROS1*, *WEE1* 유전자 발현과 예후 인자와 상관성

유방의 섬유선종을 대상으로 마이크로어레이 방법을 이용한 저자의 이전 연구에서 *RHEB*, *ROS1*, *HDAC1*, *WEE1* 등의 유전자가 정상 유방 조직에 비해서 발현이 증가되고 침윤성 관암종에서 정량적으로 *RHEB* 발현이 감소된 것을 보고한 바 있다. 본 연구의 목적은 유방의 양성 종양인 섬유선종, 중간 단계인 엽상 종양 그리고 악성 종양인 침윤성 관암종에서 *RHEB*, *ROS1*, *HDAC1*, *WEE1* 유전자 발현에 대하여 다양한 분자병리학적 방법을 이용하여 발현 양상을 비교하고 침윤성 관암종에서 이들 유전자 발현이 유방암의 예후 인자로서 가치가 있는지 비교해 보고자 하였다.

1998년부터 2007년까지 연세대학교 원주의과대학 원주기독병원에서 외과적으로 절제되어 병리학적으로 진단된 섬유선종 102 예, 엽상 종양 25 예, 침윤성 관암종 120 예의 포르말린 고정 파라핀 포매 조직을 대상으로 하였다. 이중 섬유선종 14 예, 침윤성 관암종 46 예에서 신선 조직을 이용할 수 있었다. 조직 마이크로어레이 블록을 제작하여 면역조직화학 염색을 시행하였고 신선 조직과 포르말린 고정 조직을 이용하여 real-time PCR 과 웨스턴 블롯 면역 염색을 시행하였다.

면역조직화학 염색, real-time PCR, 웨스턴 블롯 면역 염색 결과, *RHEB*, *ROS1*, *HDAC1*, *WEE1* 발현율은 전반적으로 섬유선종에서 가장 높았고 엽상 종양, 침윤성 관암종 순으로 유의 있게 감소하였다. 섬유선종과 엽상 종양에서

기질 세포뿐만 아니라 상피 세포에서도 이들 유전자 발현이 증가되어 있었다. 또한 엽상 종양에서는 섬유선종에 비해 기질 세포의 발현율이 증가되어 있었다. 침윤성 관암종에서 *RHEB* 발현 증가는 조직학적 등급 증가 및 관 형성 정도 점수 증가와 상관성이 있었고 *ROS1* 발현 증가는 조직학적 등급 감소 및 유사분열 지수 감소와 상관성이 있었으며 *HDAC1* 발현 증가는 유사분열 지수 감소 및 에스트로젠 수용체 발현 증가와 상관성이 있었다.

따라서 *RHEB*, *ROS1*, *HDAC1*, *WEE1* 발현이 유방의 악성 종양뿐만 아니라 양성 유방 종양의 발생과도 연관되어 있었고 또한 이들 유전자 발현 감소 또는 소실이 유방 종양의 진행과 연관되어 있을 것으로 생각된다. 기질 세포 종양으로 알려져 있는 섬유선종과 엽상 종양의 발생에 있어서 상피 세포도 종양의 발생과 연관되어 있다는 새로운 가설을 제시할 수 있다고 생각되며 엽상 종양에서는 기질 세포가 종양의 발생에 좀 더 기여할 것으로 추정된다. 또한 *RHEB* 발현이 유방암의 나쁜 예후 인자, *ROS1* 및 *HDAC1* 발현은 유방암의 좋은 예후 인자로서 의의가 있을 것으로 생각된다.

핵심되는 말: 유방 종양, 섬유선종, 엽상 종양, 침윤성 관암종, *RHEB*, *ROS1*, *HDAC1*, *WEE1*, 예후 인자

유방 종양에서 *RHEB*, *HDAC1*, *ROS1*, *WEE1* 유전자 발현과

예후 인자와 상관성

〈지도교수 박 광 화〉

연세대학교 대학원 의학과

엄 민 섭

I. 서 론

섬유선종 (fibroadenoma)은 여성의 유방에서 가장 흔한 양성 종양이다.¹ 일반적으로 유방을 비롯한 인체 장기의 악성 종양에서 발견되는 유전자 연구는 수없이 보고되어 왔지만, 현재까지 유방의 섬유선종에서 특이하게 발현하는 유전자에 대한 연구는 거의 없었다.^{2, 3} 최근 한번의 실험으로 수많은 유전자 발현을 확인할 수 있는 마이크로어레이 (microarray) 방법이 소개되면서 다양한 생물학적 영역에서 유전자 단계의 연구가 시행되고 있다.^{4, 5} 저자의 이전 연구인 섬유선종에 대한 마이크로어레이 방법을 이용한 연구에서 *RHEB*, *HDAC1*, *ROS1*, *TNFRSF10A*, *WASP2*, *TYRP1*, *WEE1* 유전자가 정상 유방 조직에 비해 두배 이상 증가되어 발현되는 것을 보고하였다. 또한, 유방의 악성 종양인 침윤성 관암종 (invasive ductal carcinoma)에서 상대적으로 *RHEB* 발현이 감소된 것을

실시간 중합효소 연쇄 반응 (real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)을 통해 확인하였다.³

*RHEB*는 성인의 정상 뇌 피질뿐만 아니라 인체의 다양한 장기에서 발현되며, 특히 인간의 유전 질환인 결절성 경화증 (tuberous sclerosis) 발생과 연관되어 있고 세포의 성장과 세포 주기의 조절에 중요한 역할을 한다고 알려지면서 관심이 높아지고 있다.⁶⁻⁸ *RHEB*는 유전 질환뿐만 아니라 인간의 다양한 종양에서도 활성화되는 것으로 알려지고 있다.⁹⁻¹¹

*ROS1*은 종양유전자 (oncogene)로 알려져 있으며 전형적인 티로신 키나제 (tyrosine kinase)의 염기 서열을 가지는 막통과 단백질 (transmembrane protein)을 형성하며 인간의 정상 뇌의 아교 세포를 비롯한 뇌 조직에서는 발현되지 않고 악성 종양인 아교모세포종 (glioblastoma) 세포 주에서 발현되는 것이 처음으로 보고되었다.¹² 동물 실험에서 신장과 장관의 상피 세포, 드물게 폐, 고환, 흉선 등에서 발현이 보고되었다.¹³ 뇌의 악성 종양 뿐만 아니라, 뇌수막의 양성 종양인 뇌수막종의 약 55%에서도 *ROS1* 발현이 증명되었고, 이는 종양의 진행 과정의 초기 단계에 영향을 미치는 것으로 추정되었다.¹⁴

대부분의 유방 암종은 알파 에스트로젠 수용체 (estrogen receptor- α)를 발현하고 이는 유방 암종의 진단, 치료, 예후에 중요하지만, 진단 당시 약 1/3 이상의 유방 암종에서 알파 에스트로젠 수용체 발현이 소실되어 있다.^{15, 16} 이는 histone deacetylation (HDAC)과 DNA 메틸화 (methylation)에 의한 염색질 비활성화 (chromatin inactivation)에 의해서라고 알려져 있다. *HDAC1*은 알파 에스트로젠 수용체 발현과 기능에 연관되어 있고, 유방 종양의 진행과 환자의 예후에 매우 중요한 요소로 생각되고 있다.^{17, 18}

세포 주기에서 유사분열기로 진입하기 위해서는 CDC2가 cyclin B와 결합을

해야 하는데 CDC2에 인산화가 일어나게 되면 CDC2 활성이 억제된다. 결과적으로 세포 주기가 G2기에 정지되고, 이러한 과정은 세포가 DNA 손상 받은 후에도 일어난다. 인간에서 *WEE1*은 CDC2의 tyrosine-15 잔기를 인산화시켜 CDC2의 기능을 억제하게 된다.¹⁹ 특히 대장 암종 및 비소세포 폐암종에서 *WEE1* 발현이 감소되어 있는 것이 알려져 있고 *WEE1*이 종양의 발생과정에 연관되어 있으며 동시에 강력한 종양억제 유전자로 작용한다고 보고되어 있다.^{20, 21} 만약 정상적인 *WEE1* 유전자의 손상이 발생하면 종양세포의 증식을 증가시킬 수 있을 것으로 생각된다.¹⁹

현재까지 유방 종양에서 이들 유전자의 발현에 대한 연구는 거의 없었다. 특히 다른 암종에서와 같이 악성 유방 종양에 대한 연구는 일부 보고되고 있지만, 양성 유방 종양에서 이들 유전자 발현과 종양과의 관계에 대한 연구는 없었다.^{3, 18, 22} 이에 본 연구는 다양한 분자병리학적 방법을 이용하여 단백질 및 유전자 단계에서 유방 종양의 *RHEB*, *ROS1*, *HDAC1*, *WEE1* 유전자 발현 양상을 비교하고자 하였다. 섬유선종과 엽상 종양 (phyllodes tumor)에서 상피 세포와 기질 세포로 구분하여 발현 양상을 비교하고 이들 유전자의 발현과 종양 발생과의 관계를 비교 분석하고자 하였으며, 침윤성 관암종에서 일반적으로 알려져 있는 예후 인자와 이들 유전자의 발현을 비교함으로써 침윤성 관암종에서 이들 유전자의 발현이 예후 인자로서 가치가 있는지를 비교하고자 하였다.¹

II. 재료 및 방법

1. 대상 환자

환자는 1998년부터 2007년까지 연세대학교 원주의과대학 원주기독병원에서 외과적으로 절제되고 병리학적으로 진단된 유방의 섬유선종 102예, 엽상 종양 25예, 침윤성 관암종 120예를 대상으로 하였다. 모든 예에서 포르말린으로 고정된 파라핀 포매 조직을 이용하였고, 섬유선종 14예, 침윤성 관암종 46예에서는 신선 조직을 이용할 수 있었다. 모든 예의 헤마톡실린-에오신 염색 슬라이드와 병리 진단지를 검토하여 병리학적 진단을 재확인하였다. 또한 유방암의 예후 인자인 조직학적 등급, 관 형성 정도, 핵 등급, 유사분열 정도, 에스트로젠 수용체 발현, 프로게스테론 수용체 발현, HER2 단백질 발현에 대한 결과를 재검토하였다. 조직학적 등급은 관 형성 정도, 핵 등급, 유사분열 정도를 각각 1~3점으로 점수를 매긴 후, 모두 더해져 최종 1~3등급으로 구분하였다.²³

2. 면역조직화학 염색 (immunohistochemical stains)

가. 조직 마이크로어레이 (tissue microarray, TMA) 블록 제작

포르말린으로 고정한 파라핀 포매 조직을 이용하였으며 섬유선종 102예, 엽상종양 25예, 침윤성 관암종 120예를 대상으로 하였다. 헤마톡실린-에오신 염색 슬라이드를 이용하여 먼저 대표적인 종양 부위를 확인하였다. 확인된 종양 부위를 파라핀 블록에서 같은 부위를 표시하였다. 괴사, 출혈, 인공물 (artifact)이 관찰된 부위는 제외하였다. 선택된 종양 부위를 5mm 팁 펀치 (tip-punch) (Quick-ray, Korea)를 이용하여 채취하였고 20개의 구멍을 가지는 조직

마이크로어레이 몰드 (Quick-ray, Korea)에 장착한 후 파라핀에 재포매 하였다.²⁴ TMA 블록을 4 μ m 두께로 절편을 만들고, 종양 부위가 적당히 선택되었는지 헤마톡실린-에오신 염색을 이용하여 확인하였다.

나. 염색 방법

TMA 블록을 5 μ m 두께로 절편을 만들어 실란 (silane)-코팅 유리 슬라이드에 부착하였다. 50 $^{\circ}$ C 드라이 오븐에서 2시간, 자일렌으로 탈파라핀화한 후, 다단계 에탄올로 함수시킨 다음, 흐르는 물에 수세하고 증류수에 담갔다. 항원성 회복을 위해 PT module (Lab Vision, CA, US)을 이용하였으며 99 $^{\circ}$ C에서 15분간 가열 후 안정을 위하여 65 $^{\circ}$ C까지 20~25분 정도 냉각하고 그 후 흐르는 물에 5분간 세척하였다. 증류수에 담근 후 마킹펜을 이용하여 조직을 표시하였다. 내인성 과산화효소 활성을 제거하기 위해 Hydrogen Peroxide Block (Thermo Fisher Scientific, CA, US)으로 10분간 전처리 하였다. TBST (Tris buffered saline plus Tween 20) (Scy Tek Laboratories, UT, US) 완충액에 수세하였다. Ultra V Block (Thermo Fisher Scientific, CA, US)에 5분간 처리한 후 1차 항체를 도포하고 2시간 동안 반응시켰다. 사용된 1차 항체로 RHEB (GeneWay, CA, US), HDAC1 (Thermo Scientific, CA, US), ROS1 (Santa Cruz, CA, US), WEE1 (Santa Cruz, CA, US)을 각각 1:200, 1:500, 1:50, 1:25의 비율로 희석하여 사용하였다. TBST 완충액에 수세한 후 Primary Antibody Enhancer (Thermo Fisher Scientific, CA, US)에 20분간 처리하였고 다시 TSBT 완충액에 수세하였다. HRP polymer 2차 항체 (Thermo Fisher Scientific, CA, US)를 30분간 처리한 후, TSBT 완충액에 수세하였다. 3-amino-9-ethylcarazole (AEC) (Lab Vision, CA, US)을 이용하여 5~10분 동안 발색하였다. 증류수로 수세하고 메이어 헤마톡실린 (Mayor hematoxylin)으로

배경 염색하고 증류수에 담근 후, Immu-Mount (Thermo Fisher Scientific, CA, US)를 이용하여 봉입하였다.

다. 판독 방법

면역조직화학 염색 결과 판독은 광학 현미경에서 종양 세포의 핵 또는 세포질에 갈색으로 염색된 경우를 양성으로 판독하였다. 섬유선종 및 엽상 종양은 상피 세포와 기질 세포를 구분하여 판독하였고 침윤성 관암종은 상피 세포만 판독하였다. 크게 염색 강도 (intensity)와 염색된 세포 분포 (distribution)로 구분하여 판독하였다. 염색 강도는 염색되지 않은 경우 0 점, 염색 강도가 약한 경우 1 점, 중등도인 경우 2 점 그리고 강한 경우 3 점으로 구분하였다. 염색된 세포 분포는 염색된 종양 세포의 백분율에 따라 0%는 0 점, 25% 미만은 1 점, 25% 이상 50% 미만은 2 점, 그리고 50% 이상은 3 점으로 구분하였다. 염색 강도 점수와 염색된 세포 분포 점수를 더해서 염색 점수 (score)를 구했다. 염색 점수가 0 점부터 2 점까지는 음성으로 판독하였고 3 점에서 6 점까지는 양성으로 최종 판독하였다.²⁵

3. 중합효소 연쇄 반응 (polymerase chain reaction, PCR)

신선 조직과 포르말린 고정 파라핀 포매 조직으로 구분하여 시행하였다. 신선 조직은 섬유선종 14예, 침윤성 관암종 46예를 대상으로 시행하였다. 포르말린 고정 파라핀 포매 조직은 섬유선종, 엽상 종양, 침윤성 관암종 각각 15예를 대상으로 시행하였다. 조직을 0.5cm 크기로 잘라서 PBS (phosphate-buffered saline)로 2번 씻어 내고 RNA RNeasy Mini kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 RNA를 분리한 후, spectrophotometry (Bio-Rad, CA, US)로 260nm과 280nm에서 RNA 농도를 측정하였다. 분리한 RNA에서 Quantitect Reverse

Transcription kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 1 μ g 이하의 RNA를 7x gDNA Wipeout buffer 2 μ l와 혼합하여 42 $^{\circ}$ C에서 2분간 보관한 후 Quantiscript Reverse Transcriptase 1 μ l, 5x Quantiscript RT Buffer 4 μ l, RT primer Mix 1 μ l을 첨가하여 42 $^{\circ}$ C에서 30분, 95 $^{\circ}$ C에서 3분 동안 반응시켰다. 이와 같이 합성한 cDNA를 PCR 주형 (template)으로 사용하였다.

PCR 반응 혼합물은 cDNA 400ng, 2x QuantiTect Probe PCR master mix (Qiagen, Germany) 5 μ l, 시발체 (primer) 10 pmol, 탐식자 (probe) 30 pmol을 혼합하였다. PCR은 RotorGene Real-Time Q-PCR system (Corbett, Australia)으로 시행하였다. PCR 조건은 HotStarTaq polymerase activation step으로 95 $^{\circ}$ C 15분 반응시킨 후, denaturation 94 $^{\circ}$ C 15초, annealing 60 $^{\circ}$ C 1분, extension 72 $^{\circ}$ C, 30초 총 50회 반복하였다. β -actin을 대조군으로 하여 mRNA양을 상대적으로 계산한 상대 농도 (relative concentration)를 구하여 결과를 비교하는데 이용하였다. 사용된 시발체와 탐식자의 염기 서열은 다음과 같다 (표 1).

Table 1. The primers and probes of *RHEB*, *ROS1*, *HDAC1*, and *WEE1*.

Gene		Name	Sequence
β -actin	Primer	beta-A-F	TGAGCGCGGCTACAGCTT
		beta-A-R	TCCTTAATGTCACGCACGATTT
	Probe	β -actin	TET-ACCACCACGGCCGAGCGG-TAMRA
<i>RHEB</i>	Primer	RHEB-F	GCCAATTTGTGGACTCCTACG
		RHEB-R	TGGAGTATGTCTAGAGAAAGA
	Probe	RHEB-p	FAM-TCAACTTGTAGACACAGCCGGGCAAGAT-TAMRA
<i>ROS</i>	Primer	ROS-F	ATGGGCTCCTGTATTGGTTG
		ROS-R	CATCAGTGCATTCTGGGAAA
	Probe	ROS-p	FAM-TTCGGGGACAGAGCACTGGG-TAMRA
<i>HDAC1</i>	Primer	HDAC1-F	CCAGTATTCGATGGCCTGTT
		HDAC1-R	GACTTCTTTGCATGGTGCAG
	Probe	HDAC1-p	FAM-CTGTGAATTGGGCTGGGGGC-TAMRA
<i>WEE1</i>	Primer	WEE1-F	TTTAAGTGTGTGAAGAGGCT
		WEE1-R	AACTACATGAGAATGCTGTC
	Probe	WEE1-p	FAM-TTGGCGGGCTCTGTTGATGAG-TAMRA

4. 웨스턴 블롯 (Western blot) 분석

각각 8예의 섬유선종 및 침윤성 관암종 신선 조직을 대상으로 시행하였다. 신선 조직을 PBS로 2번 수세 후, 얼음에 놓은 상태로 homogenizer (Pro Science, UK)를 사용하여 15~20초 동안 조직을 갈아, SDS (sodium dodecyl sulphate) 완충액 (50mM dithiothreitol (DTT), 2%w/v SDS 및 62.5mM Tris-HCl (pH6.8, 25°C), 10% glycerol, 0.01%w/v bromophenol blue)를 더하여 95°C에서 10분간 가열한 후 4°C에서 10분간 처리하여 단백질을 분리하였다. 10,000rpm으로 30초 정도 원심 분리하여 상층액을 분리한 후, SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 겔을 이동 완충액 (25mM Tris-HCl, pH 8.3, 1.4% glycine,

20% methanol)에 10분간 평형 시킨 후, 겔과 마찬가지로 완충 용액에 평형 시켜 놓은 immobilon-P membrane (Millipore, MA, US)에 단백질을 100V에서 1시간 이동시켰다. Ponceau S (Ponceau S 0.2g, trichloroacetic acid 3g, sulfosalicylic acid 3g) (Sigma-Aldrich, Germany)를 사용하여 단백질이 막에서 잘 이동되었는지 확인한 후, 차단 용액 (TBST에 1% bovine serum albumin 첨가)에 담가 단백질이 결합하지 않은 부분을 차단하였다. 차단한 막을 TBST로 수세한 후, TBST에 희석한 1차 항체 RHEB (GeneWay, CA, US), HDAC1 (Thermo Scientific, CA, US), ROS1 (Santa Cruz, CA, US), WEE1 (Santa Cruz, CA, US), β -actin (Cell signaling, PA, US)과 3~5시간 동안 실온에서 반응시켰다. 그 후 막을 Anti-Rabbit Ig G (HRP) 2차 항체 (Novus Biologicals, CO, US)와 함께 실온에서 2~3시간 동안 반응시켰다. ECL 검출 방법 (Amersham, NJ, US)을 이용하여 반응을 검출하였다.

5. 통계 분석

프로그램은 SPSS 13.0 (SPSS Inc., IL, US)을 사용하였으며 χ^2 검정을 이용하여 각각 유방 종양에서 RHEB, ROS1, HDAC1, WEE1 발현을 상피 세포와 기질 세포를 구분하여 비교하였고 면역조직화학 염색 결과와 일반적인 유방암의 예후 인자와 비교하였다. 분산 분석 및 독립 t-검정을 이용하여 각각 유방 종양의 상피 세포에서 RHEB, ROS1, HDAC1, WEE1의 염색 점수의 평균값을 비교하였고 섬유선종과 엽상 종양의 기질 세포에 대한 염색 점수의 평균값을 비교하였으며 각각 유방 종양에서 *RHEB*, *ROS1*, *HDAC1*, *WEE1* 발현 정도를 real-time PCR 결과인 상대 농도의 평균값을 이용하여 비교하였다. 모든 결과는 p-값이 0.05미만인 경우 통계학적으로 의의가 있다고 판단하였다.

III. 결 과

1. 임상 및 병리학적 소견

모든 환자는 여성이었고 환자 나이의 중앙값은 섬유선종 38세, 엽상 종양 43세, 침윤성 관암중에서 49세로 악성으로 진행할수록 나이가 증가하였다. 섬유선종은 모두 102예로 뚜렷한 상피 성분과 기질 성분으로 구분되는 전형적인 예였고, 종양 주변에 정상 유방 조직 또는 섬유낭성 병변이 동반된 예도 있었다. 엽상 종양은 모두 25예로 그 중 5예는 악성으로 진단된 예가 포함되었다. 침윤성 관암중은 모두 120예였고, 종양 세포는 뚜렷한 관 구조를 형성하며, 주변 조직으로 침윤성 성장을 보였다. 조직학적 등급은 1등급 27예 (22.5%), 2등급 44예 (36.7%), 3등급 49예 (40.8%)였다. 관 형성 정도는 1점 4예 (3.3%), 2점 45예 (37.5%), 3점 71예 (59.2%)였다. 핵 등급은 1점 8예 (6.7%), 2점 65예 (54.2%), 3점 47예 (39.2%)였다. 유사분열 정도는 1점 42예 (35.0%), 2점 37예 (30.8%), 3점 41예 (34.2%)였다. 에스트로겐 수용체는 총 110예 중 58예에서 양성 (52.7%), 프로게스테론 수용체는 총 110예 중 60예 (54.5%), 그리고 HER2 단백질은 총 98예 중 48예 (49.0%)에서 양성이었다.

2. 면역조직화학 염색 결과

가. RHEB

RHEB는 상피 성분인 상피 세포와 근육상피 세포 및 기질 세포의 핵과 세포질에 모두 염색되었다. 종양의 기질에서 형질 세포, 비만 세포, 중성구의 세포질에 염색이 되어 정상 내부 대조군으로 이용할 수 있었다 (그림 1, A-C).

상피 세포에서 RHEB는 섬유선종 102예 (100.0%), 엽상 종양 23예 (92.0%), 침윤성 관암종 107예 (89.2%)에서 양성으로 섬유선종에서 침윤성 관암종으로 진행할수록 발현율이 유의 있게 감소하였으며 ($p=0.003$), 염색 점수의 평균값은 섬유선종 5.28점, 엽상 종양 5.00점, 침윤성 관암종 4.57점으로 섬유선종에서 침윤성 관암종으로 진행할수록 감소하였고 통계학적 의의가 있었다 ($p=0.000$) (표 2). 기질 세포에서 RHEB는 섬유선종 99예 (97.1%), 엽상 종양 25예 (100.0%)에서 양성으로 발현율은 거의 비슷하였지만, 염색 점수의 평균값은 섬유선종 2.65점, 엽상 종양 5.60점으로 섬유선종 보다 엽상 종양의 기질 세포에서 통계학적으로 유의 있게 RHEB의 발현이 높았다 ($p=0.000$) (표 3).

나. ROS1

ROS1은 상피 성분의 상피 세포와 근육상피 세포 및 기질 세포의 세포질에 염색되었고 주변의 정상 혈관 내피 세포, 적혈구, 형질 세포, 비만 세포, 증성구에 염색되었다 (그림 1, D-F). 상피 세포에서 ROS1은 섬유선종 102예 (100.0%), 엽상 종양 25예 (100.0%), 침윤성 관암종 91예 (75.8%)에서 양성으로 섬유선종과 엽상 종양은 모든 예에서 염색되었지만, 침윤성 관암종에서 발현율이 유의 있게 감소하였고 ($p=0.000$), 염색 점수의 평균값은 섬유선종 5.67점, 엽상 종양 5.40점, 침윤성 관암종 3.89점으로 섬유선종에서 침윤성 관암종으로 진행할수록 감소하였으며 통계학적 의의가 있었다 ($p=0.000$) (표 2). 기질 세포에서 ROS1은 섬유선종 102예 (100.0%), 엽상 종양 25예 (100.0%)에서 양성으로 모든 예에서 염색되었지만, 염색 점수의 평균값은 섬유선종 2.88점, 엽상 종양 5.28점으로 섬유선종 보다 엽상 종양에서 발현이 더 높았으며 통계학적으로 의의가 있었다 ($p=0.000$) (표 3).

다. HDAC1

HDAC1은 상피 성분의 상피 세포와 기질 세포의 핵에만 염색되었고 상피 성분의 근육상피 세포에는 염색되지 않았다. 주변의 정상 림프구의 핵에도 강하게 염색되었다 (그림 1, G-I). 상피 세포에서 HDAC1은 섬유선종 88예 (86.3%), 엽상 종양 16예 (64.0%), 침윤성 관암종 88예 (73.3%)에서 양성으로 섬유선종에서 발현이 가장 높았고 엽상 종양에서 가장 낮았으며 통계학적 의의가 있었다 ($p=0.015$). 또한 염색 점수의 평균값은 섬유선종 4.49점, 침윤성 관암종 3.93점, 엽상 종양 3.64점으로 섬유선종에서 가장 높았고 엽상 종양에서 가장 낮았으며 통계학적 의의가 있었다 ($p=0.015$) (표 2). 기질 세포에서 섬유선종의 52예 (51.0%), 엽상 종양의 20예 (80.0%)에서 양성으로 엽상 종양에서 섬유선종보다 HDAC1의 발현율이 더 높았고 통계학적 의의가 있었다 ($p=0.012$). 또한 염색 점수의 평균값은 섬유선종 1.24점, 엽상 종양 2.24점으로 섬유선종보다 엽상 종양에서 더 높았고 통계학적 의의가 있었다 ($p=0.002$) (표 3).

라. WEE1

WEE1은 상피 성분에서 상피 세포의 핵에만 염색이 되었고 근육상피 세포에는 염색되지 않았다. 기질 세포에는 거의 염색되지 않았지만 염색된 1예는 핵에 염색되었다. 주변의 림프구나 형질 세포에는 염색되지 않았다 (그림 1, J-L). 상피 세포에서 WEE1은 섬유선종 97예 (95.1%), 엽상 종양 22예 (88.0%), 침윤성 관암종 45예 (37.5%)에서 양성으로 섬유선종에서 침윤성 관암종으로 진행할수록 발현율이 뚜렷하게 감소하였고 ($p=0.000$), 염색 점수의 평균값은 섬유선종 3.24점, 엽상 종양 2.84점, 침윤성 관암종 1.87점으로 섬유선종에서 침윤성 관암종으로 진행할수록 감소하였으며 통계학적 의의가 있었다 ($p=0.000$) (표 2). 기질 세포에서는 섬유선종 1예 (1.0%)에서만 양성이었다 (표 3).

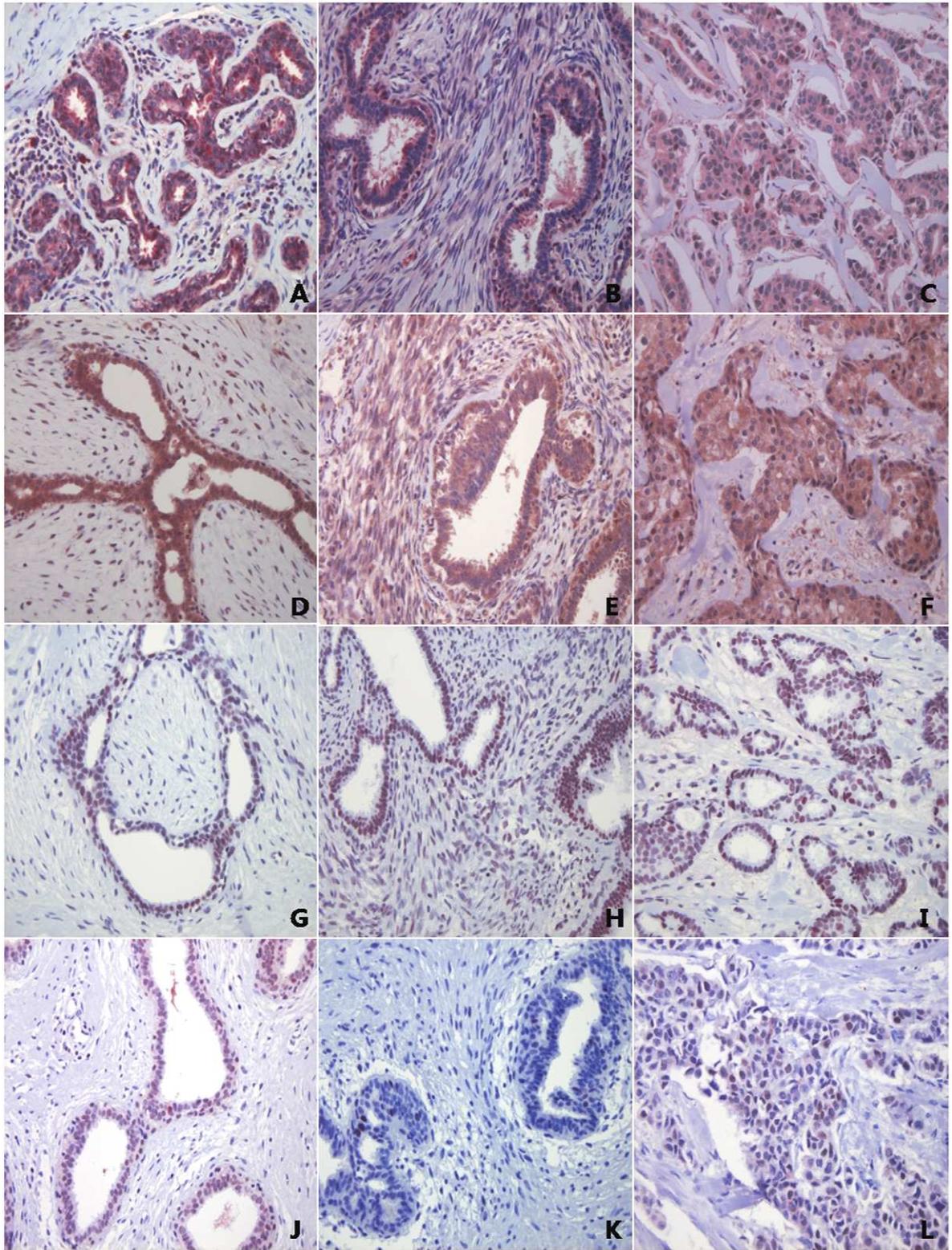


Figure 1. Immunohistochemical findings. The immunohistochemical stains for RHEB reveal positive reaction in the nuclei and cytoplasm of epithelial cells and stromal cells of fibroadenoma (A) and phyllodes tumor (B), and in the epithelial cells of invasive ductal carcinoma (C). The immunohistochemical stains for ROS1 show positive expression in the cytoplasm of epithelial cells and stromal cells of fibroadenoma (D) and phyllodes tumor (E), and in the epithelial cells' cytoplasm of invasive ductal carcinoma (F). The immunohistochemical stains for HDAC1 demonstrate positivity in the nuclei of epithelial cells and stromal cells of fibroadenoma (G) and phyllodes tumor (H), and in the epithelial cells of invasive ductal carcinoma (I). The immunohistochemical stains are positive for WEE1 in the nuclei of epithelial components of fibroadenoma (J) and phyllodes tumor (K), and invasive ductal carcinoma (L).

Table 2. The results of immunohistochemical stain in the epithelial cells of breast neoplasm.

		Cases of positive immunohistochemical stains (%)			
		RHEB	ROS1	HDAC1	WEE1
	FA	102 (100.0)	102 (100.0)	88 (86.3)	97 (95.1)
	PT	23 (92.0)	25 (100.0)	16 (64.0)	22 (88.0)
	IDC	107 (89.2)	91 (75.8)	88 (73.3)	45 (37.5)
	p-value*	0.003	0.000	0.015	0.000
Mean score (±SD)	FA	5.28±0.76	5.67±0.57	4.49±1.39	3.24±0.97
	PT	5.00±1.19	5.40±0.65	3.64±1.85	2.84±1.14
	IDC	4.57±1.45	3.89±1.49	3.93±1.88	1.87±1.62
	p-value [†]	0.000	0.000	0.015	0.000

FA; fibroadenoma, PT; phyllodes tumor, IDC; invasive ductal carcinoma, SD; standard deviation, *; χ^2 test, [†]; oneway ANOVA test

Table 3. The results of immunohistochemical stain in the stromal cells of breast neoplasm.

		Cases of positive immunohistochemical stains (%)			
		RHEB	ROS1	HDAC1	WEE1
	FA	99 (97.1)	102 (100.0)	52 (51.0)	0 (0.0)
	PT	25 (100.0)	25 (100.0)	20 (80.0)	1 (1.0)
	p-value*	1.000	NA	0.012	1.000
Mean score (±SD)	FA	2.65±1.23	2.88±1.15	1.24±1.38	0.02±0.20
	PT	5.60±0.82	5.28±1.14	2.24±1.67	0.00±0.00
	p-value [†]	0.000	0.000	0.000	0.622

FA; fibroadenoma, PT; phyllodes tumor, SD; standard deviation, NA; not available, *; χ^2 test, [†]; independent t-test

마. 침윤성 관암종의 면역조직화학 염색 결과와 예후 인자와의 상관 관계

침윤성 관암종에서 RHEB 발현과 유방암의 예후 인자인 조직학적 등급을 비교한 결과, 조직학적 등급이 1등급 및 2등급인 경우 RHEB 양성인 예가 60예 (84.5%), 3등급 47예 (95.9%)로 조직학적 등급이 높아질수록 RHEB 발현율이 증가하였고 통계학적 의의가 있었다 ($p=0.048$). RHEB 발현과 관 형성 정도 점수를 비교하였을 때, 관 형성 정도 점수가 1점 및 2점인 경우, RHEB 양성인 예는 39예 (79.6%), 3점인 경우, 68예 (95.8%)로 관 형성 정도 점수가 증가할수록 RHEB 발현율이 증가하였고 통계학적 의의가 있었다 ($p=0.007$) (표 4). ROS1 발현과 조직학적 등급을 비교하였을 때, 조직학적 등급이 1 등급 및 2 등급인 경우 ROS1 양성인 예가 59예 (83.1%), 3 등급인 경우 32예 (65.3%)로 조직학적 등급이 높아질수록 ROS1 발현율이 감소하였고 통계학적 의의가 있었다 ($p=0.031$). ROS1 발현과 유사분열 정도를 비교하였을 때, 10 군데의 고배율 시야당 유사분열 수가 10개 미만인 37예에서 ROS1 양성 (88.1%)이었으며, 유사분열 수가 10개 이상인 54예에서 ROS1 양성 (69.2%)으로 유사분열 수가 증가할수록 ROS1 발현율이 감소하였고 통계학적 의의가 있었다 ($p=0.025$) (표 5). HDAC1 발현과 유사분열 정도를 비교하였을 때, 유사분열 수가 10개 미만인 36예에서 HDAC1 양성 (85.7%)이었으며, 유사분열 수가 10개 이상인 52예에서 HDAC1 양성 (66.7%)으로 유사분열 수가 증가할수록 HDAC1 발현율이 감소하였고 통계학적 의의가 있었다 ($p=0.030$). HDAC1 발현과 에스트로겐 수용체 발현을 비교하였을 때 에스트로겐 수용체 음성일 때, HDAC1 양성인 예는 34예 (65.4%), 에스트로겐 수용체 양성일 때, HDAC1 양성인 예는 49예 (84.5%)로 에스트로겐 수용체가 발현될수록 HDAC1 발현이 증가하였고 통계학적 의의가 있었다 ($p=0.027$) (표 6).

Table 4. Relationship between RHEB expression, histologic grade, and tubule formation.

		Result of RHEB expression (N)			p-value
		Negative	Positive	Total	
Histologic grade (%)	I and II	11 (15.5)	60 (84.5)	71 (100.0)	0.048
	III	2 (4.1)	47 (95.9)	49 (100.0)	
Tubule formation (%)	1 and 2	10 (20.4)	39 (79.6)	4 (100.0)	0.007
	3	3 (4.2)	68 (95.8)	71 (100.0)	
	Total	13	107	120	

Table 5. Relationship between ROS1 expression, histologic grade, and mitotic count.

		Result of ROS1 expression (N)			p-value
		Negative	Positive	Total	
Histologic grade (%)	I & II	12 (16.9)	59 (83.1)	71 (100.0)	0.031
	III	17 (34.7)	32 (65.3)	49 (100.0)	
Mitotic count (/10 HPF) (%)	< 10	5 (11.9)	37 (88.1)	42 (100.0)	0.025
	≥ 10	24 (30.8)	54 (69.2)	78 (100.0)	
Total		29	91	120	

HPF; high power field

Table 6. Relationship between HDAC1 expression, mitotic count, and estrogen receptor expression.

		Result of HDAC1 expression (N)			p-value
		Negative	Positive	Total	
Mitotic count (/10 HPF) (%)	< 10	6 (14.3)	36 (85.7)	42 (100.0)	0.030
	≥ 10	26 (33.3)	52 (66.7)	78 (100.0)	
	Total	32	88	120	
Estrogen receptor (%)	Negative	18 (34.6)	34 (65.4)	52 (100.0)	0.027
	Positive	9 (15.5)	49 (84.5)	58 (100.0)	
	Total	27	83	110	

HPF; high power field

3. Real-time PCR 결과

가. 신선 조직에 대한 PCR 결과

신선 조직 사용이 가능하였던 섬유선종 14예, 침윤성 관암종 46예에서 신선

조직에 대한 PCR을 시행하였다. 엽상 종양은 신선 조직이 없어 비교할 수가 없었다. 신선 조직에서 RNA를 분리하여 먼저 역전사효소 증합효소 연쇄 반응 (reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)으로 cDNA 합성을 확인하였고 합성된 cDNA를 이용하여 real-time PCR을 시행하였다. *RHEB* mRNA에 대한 real-time PCR을 시행한 결과에서는 10예의 섬유선종에서 *RHEB* mRNA 상대 농도의 평균값은 3.04이고 20예의 침윤성 관암종에서 *RHEB* mRNA 상대 농도 평균값은 1.81로 섬유선종에서 침윤성 관암종에 비해 *RHEB* mRNA 농도가 더 높았다. *ROS1* mRNA에 대한 real-time PCR을 시행한 결과에서는 2예의 섬유선종에서 *ROS1* mRNA 상대 농도 평균값은 0.13이었고 21예의 침윤성 관암종에서 상대 농도 평균값은 1.80으로 침윤성 관암종에서 섬유선종보다 *ROS1* mRNA 농도가 더 높았다. *HDAC1* mRNA에 대한 real-time PCR을 시행한 결과에서는 14예의 섬유선종에서 상대 농도의 평균값은 21.56이고 44예의 침윤성 관암종에서 상대 농도 평균값은 6.10으로 *HDAC1* mRNA의 농도는 통계학적으로 유의 있게 침윤성 관암종보다 섬유선종에서 더 높았다 ($p=0.000$). *WEE1* mRNA에 대한 real-time PCR을 시행한 결과에서는 8예의 섬유선종에서 상대 농도 평균값은 1.68이었고, 15예의 침윤성 관암종에서 상대 농도 평균값은 1.48로 섬유선종에서 침윤성 관암종에 비해 *WEE1* mRNA의 상대 농도 평균값이 더 높았다 (표 7).

나. 포르말린 고정 파라핀 포매 조직에 대한 PCR 결과

섬유선종, 엽상 종양, 침윤성 관암종 각각 15예의 포르말린 고정 파라핀 포매 조직을 대상으로 시행하였다. Real-time PCR 결과, *RHEB* mRNA 상대 농도의 평균값은 각각 섬유선종 4.10 (5예), 엽상 종양 3.41 (6예), 침윤성 관암종 0.52 (3예)로 섬유선종에서 가장 높았고 엽상 종양, 침윤성 관암종 순으로 감소하였다.

ROS1 mRNA 상대 농도의 평균값은 각각 섬유선종 0.76 (3예), 엽상 종양 1.48 (5예), 침윤성 관암종 0.70 (4예)으로 엽상 종양에서 가장 높았고 섬유선종, 침윤성 관암종 순으로 감소하였다. *HDAC1* mRNA 상대 농도의 평균값은 각각 섬유선종 1.55 (8예), 엽상 종양 0.90 (10예), 침윤성 관암종 0.87 (6예)로 섬유선종에 가장 높았고 엽상 종양, 침윤성 관암종 순으로 감소하였다. *WEE1* mRNA 상대 농도 평균값은 각각 섬유선종 2.22 (7예), 엽상 종양 1.54 (6예), 침윤성 관암종 0.11 (2예)로 섬유선종에서 가장 높았고 엽상 종양, 침윤성 관암종 순으로 감소하였다 (표 7).

Table 7. The result of real-time PCR analysis between fibroadenoma, phyllodes tumor, and invasive ductal carcinoma.

		Mean value of relative concentration (\pm SD)			
		<i>RHEB</i>	<i>ROS1</i>	<i>HDAC1</i>	<i>WEE1</i>
Fresh tissue	FA	3.04 \pm 6.82	0.13 \pm 0.15	21.56 \pm 6.76	1.68 \pm 3.15
	IDC	1.81 \pm 4.47	1.80 \pm 2.34	6.10 \pm 10.90*	1.48 \pm 3.98
Formalin-fixed tissue	FA	4.10 \pm 8.43	0.76 \pm 0.37	1.55 \pm 1.45	2.22 \pm 2.24
	PT	3.41 \pm 3.18	1.48 \pm 2.11	0.90 \pm 0.96	1.54 \pm 1.03
	IDC	0.52 \pm 0.75	0.70 \pm 0.45	0.87 \pm 0.61	0.11 \pm 0.13

*p=0.000, SD; standard deviation, FA; fibroadenoma, PT; phyllodes tumor, IDC; invasive ductal carcinoma

4. 웨스턴 블롯 면역염색 결과

섬유선종 8예와 침윤성 관암종 8예의 신선 조직을 이용하여 RHEB, ROS1, HDAC1, WEE1 단백질에 대한 웨스턴 블롯 면역염색을 시행하였다. 엽상 종양은 신선 조직이 없어서 비교하지 못했다. β -actin은 양군에서 모두 비슷한 양으로 관찰되었고 RHEB, HDAC1 및 WEE1은 섬유선종에서 발현이 증가되어 있는 것으로 관찰되었지만, ROS1은 침윤성 관암종에서 발현이 증가되어 있는 것으로 관찰되었다 (그림 2).

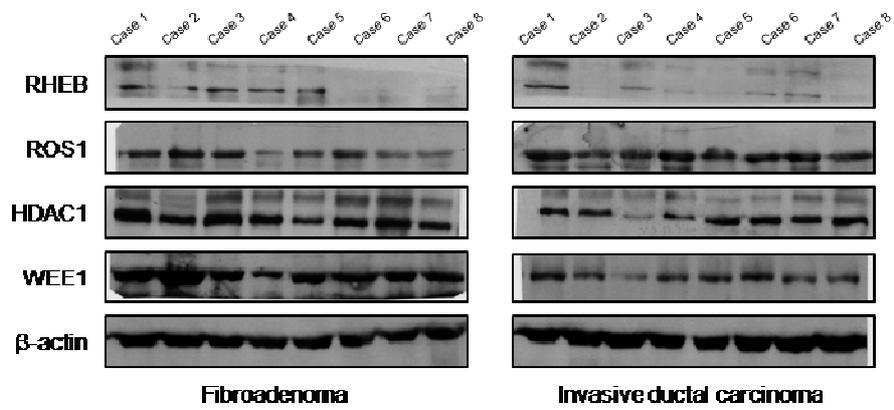


Figure 2. Western blot analysis. The result shows similar expression in both groups for β -actin, increased expression of protein in fibroadenoma for RHEB, HDAC1, and WEE1, and increased expression in invasive ductal carcinoma for ROS1 protein.

IV. 고찰

정상 유방조직의 간질은 대부분을 차지하는 소엽간 간질 (interlobular stroma)과 많은 림프구를 포함하는 세밀한 점액성의 특수한 간질인 소엽사이 간질 (intralobular stroma)로 구성되며, 소엽사이 간질은 유방 특이 호르몬인 에스트로겐에 반응성이 있다. 유방의 기질 세포에서 유래되는 대표적인 양성 종양은 섬유선종이고 유방의 소엽사이 간질에서 유래되는 것으로 알려져 있다.^{1, 26} 엽상 종양은 발생 빈도가 매우 낮으며 섬유선종과 마찬가지로 유방의 소엽사이 간질에서 발생하는 것으로 알려져 있고, 발병 연령은 주로 50대로 섬유선종보다 약 10~20년 후에 호발한다. 섬유선종에 비해 재발율이 더 높아 양성보다는 중등도의 악성도를 보이는 종양으로, 종양의 경계, 기질 세포 밀도, 기질 세포의 유사분열 정도 및 이형성 정도에 따라 양성, 경계영역성, 악성으로 구분된다.²⁷ 소엽사이 간질은 상피 세포에 대한 성장 인자를 분비하여 섬유선종 및 엽상 종양에서 비종양성으로 생각되는 상피 성분을 증식시킨다고 알려져 있다.¹ 일부 연구에서는 유방의 기질 종양에서 호르몬 단백질인 endothelin-1이 상피 세포에서 분비되어 기질 세포의 성장에 영향을 준다고 보고되고 있지만, 아직 정확한 기전은 밝혀져 있지 않다.^{28, 29} 침윤성 관암종은 유방의 대표적인 상피 세포 유래 악성 종양이며 전체 유방 악성 종양의 약 65~80%를 차지한다.^{1, 26}

섬유선종, 엽상 종양, 침윤성 관암종에서 *RHEB*, *ROS1*, *HDAC1*, *WEE1*에 대한 면역조직화학 염색, real-time PCR, 웨스턴 블롯 분석 결과, 모두 저자의 이전 마이크로어레이 연구 결과와 비슷하게,³ 섬유선종에서 악성인 침윤성 관암종보다 전반적으로 이들 유전자뿐만 아니라 단백질의 발현이 높았다. 또한 침윤성

관암종은 명백한 상피 세포 종양으로 알려져 있어,^{1, 26} 기질 세포 종양으로 알려져 있는 섬유선종이나 엽상 종양과 직접적으로 비교하기는 어렵지만,^{1, 27} 양성 및 악성의 중간 정도로 생각되는 엽상 종양에서 이들 유전자 및 단백질이 중간 정도로 발현되는 점을 관찰할 수 있었다. 따라서 이들 유전자 또는 단백질 발현이 유방의 양성 및 악성 종양의 발생과 연관되어 있을 가능성이 있고 또한 이들 유전자나 단백질 발현 감소 또는 소실이 유방 종양의 진행과 악성화와 연관성이 있음을 시사하는 결과로 생각할 수 있었다. 원래 기질 세포 종양으로 알려져 있는 섬유선종과 엽상 종양의 상피 세포에서 침윤성 관암종에 비해 이들 유전자의 발현이 증가되어 있었고, 상피 세포의 염색 강도는 엽상 종양에서 섬유선종보다 감소하였지만, 기질 세포에서는 엽상 종양에서 RHEB, ROS1, HDAC1 발현율이 증가하였다. 이러한 결과로 섬유선종과 엽상 종양의 발생에 있어서 상피 세포도 종양의 발생에 관여할 수도 있다는 새로운 가설을 제시할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 엽상 종양에서는 섬유선종과 마찬가지로 상피 세포도 종양의 발생에 연관되어 있지만 기질 세포가 종양의 발생에 좀 더 기여함을 시사하는 결과를 보였다.

*RHEB*는 인간의 유전 질환인 결절성 경화증의 발생과 연관되어 있는데,⁶ 결절성 경화증에서는 뇌, 피부, 신장, 심장의 양성 종양인 과오종의 발생이 증가되는 것으로 알려져 있다.³⁰ 본 연구 결과, 유방의 대표적인 양성 종양에서 *RHEB* 발현이 증가되어 있는 것도 이러한 양성 종양의 발생 기전과 연관성이 있을 것으로 생각된다. *RHEB*는 유전 질환과 연관되어 있을 뿐만 아니라 다양한 인간의 암종 발생과도 연관되어 있다고 알려져 있는데, 이는 *RHEB* 단백질이 insulin/AKT/TOR 신호전달 체계와 연관되어 세포의 성장과 세포주기 조절에 중요한 역할을 하기 때문인 것으로 생각된다.^{6, 31} 또한 AKT 활성화에 HER2가

주요한 역할을 한다고 알려져 있는데, 인간의 일부 유방 암종에서 HER2가 과발현되고, HER2 과발현이 유방 암종의 발생과 연관되어 있다.³² 따라서 RHEB가 유방 암종에서도 과발현될 것으로 예측할 수 있으며 본 연구의 결과에서도 침윤성 관암종의 대부분 (약 89%)에서 RHEB 발현이 관찰되었다. 하지만 양성인 섬유선종에서도 RHEB 발현이 증가된 소견을 감안하면, RHEB가 악성 종양뿐만 아니라 양성 종양의 발생과도 밀접한 연관성이 있을 것으로 생각되며 HER2가 유방의 섬유선종의 발생과도 연관되어 있을 가능성을 시사하였다. 저자의 이전 연구에서 각각 15예의 침윤성 관암종과 섬유선종에서 면역조직화학 염색을 이용하여 HER2 발현을 비교해본 결과, 침윤성 관암종의 10예 (66.7%), 섬유선종의 13예 (86.7%)에서 양성으로 섬유선종에서 HER2 발현이 약간 더 높은 결과를 보였다. 한편, RHEB의 기능을 억제할 수 있는 farnesyltransferase inhibitor (FTI)가 insulin/TOR/S6K 세포 신호전달 체계를 억제할 수 있다고 알려져 있는데,³³⁻³⁶ 최근 FTI인 SCH66336이 유방암 세포주를 이용한 연구에서 세포 신호전달 체계를 억제할 수 있으며 동시에 일반적인 유방암 치료제인 tamoxifen의 세포자멸사 유발 효과를 강화시킬 수 있다고 보고되었다.³⁷ 따라서 RHEB가 유방의 악성 및 양성 종양의 치료에 새로운 표적 치료 (target therapy)의 연구 대상으로도 가치가 있을 것으로 생각된다.

*ROS1*은 종양 유전자로서 주로 뇌의 악성 종양인 아교모세포종과 발현율은 낮지만 양성 종양인 뇌수막종에서도 발현되는 것으로 알려져 있다.^{12, 14} 현재까지 인간의 유방조직에서 *ROS1* 발현에 관한 연구는 없었다.¹³ 본 연구 결과에서 저자의 이전 마이크로어레이 연구 결과와 비슷하게,³ 면역조직화학 염색 결과는 양성 및 악성 종양에서 모두 *ROS1* 발현이 증가되어 있지만, 악성 종양보다 양성인 섬유선종과 엽상 종양에서 그 발현율이 더 높았다. 따라서 뇌 종양에서와

마찬가지로 유방 종양 발생과 연관된 유전자의 가능성이 있다고 생각하였다. 하지만, 신선 조직을 이용한 real-time PCR과 웨스턴 블롯 면역 염색 결과에서는 *ROS1* 발현이 섬유선종에 비해 침윤성 관암종에서 증가되어 있었으며 또한 포르말린 고정 조직을 이용한 real-time PCR 결과에서는 엽상 종양에서 가장 높게 발현되고 침윤성 관암종에서 가장 발현이 낮은 결과가 관찰되었다. 이러한 결과의 차이는 신선 조직의 수가 매우 적어서 실험에 이용할 대상이 제한되어 있었으며 또한 파라핀 포매 조직을 이용한 real-time PCR에서는 조직에 따른 유전자 보존 상태의 차이로 인해 real-time PCR에 의미 있는 결과에 이를 수 있는 결과가 적어서라고 생각하였다. 앞으로 좀더 많은 증례를 이용하여 특히 신선 조직을 이용하여 추가적인 실험이 필요하다고 생각하며, 더 나아가 현미경 미세절제술 (microdissection)과 같은 방법을 이용하여 종양의 상피 성분과 기질 성분을 구분하여 실험을 진행하면 좀더 정확한 결과가 나오지 않을까 생각된다.

본 연구의 결과, 침윤성 관암종에서 HDAC1 발현이 73.3%로 증가되어 있었고 다른 유전자와 마찬가지로 섬유선종에서 침윤성 관암종보다 *HDAC1* 발현이 현저히 증가되어 있는 소견이 정량적으로 증명되었다. 이는 유방 종양에서 침윤성 관암종뿐만 아니라 양성인 섬유선종의 발생에도 *HDAC1*이 연관되어 있다는 가설을 지지하는 소견이라고 생각하였다. 또한 양성 종양에서 악성 종양보다 *HDAC1* 발현이 더욱 증가되어 있었는데, 이는 *HDAC1* 발현 감소가 유방 종양의 악성화와 연관성이 있을 것으로 생각할 수 있었다. 최근 침윤성 유방 암종에서 *HDAC1* 발현이 독립적인 예후 인자로서 가치가 있다는 연구가 보고되었는데, *HDAC1* 발현이 높을수록 환자의 예후가 좋았고 *HDAC1* 과발현은 일반적인 유방암의 좋은 예후 인자로 의의가 있다고 보고하였다.¹⁸ 본 연구에서도 침윤성

관암종에서 일반적인 예후 인자인 유사분열 지수와 에스트로겐 수용체 발현과 연관성 여부를 비교하였을 때, HDAC1 발현이 높을수록 증식 지수 (proliferation index)가 감소하는 점과 동시에 에스트로겐 수용체 발현이 증가하는 점이 관찰되었다. 따라서 HDAC1 과발현이 유방암의 좋은 예후 인자로서 가치가 있을 것으로 생각할 수 있었다. 반면, 침윤성 유방암만을 대상으로 한 다른 연구에서는 HDAC1 과발현이 유방암의 진행과 연관되어 있고 또한 HDAC1 과발현이 유방암에서 세포 증식을 증가시켜서 종양의 발생과 연관되어 있으며 동시에 알파 에스트로겐 수용체 발현 감소와 연관되어 있다는 상반된 연구 결과가 보고된 바 있다.²² 앞으로 좀 더 많은 증례를 대상으로 또한 양성 및 악성 유방 종양을 대상으로 더 많은 연구가 진행되어야 할 분야라고 생각된다. 한편, 유방 암종에서 에스트로겐 수용체를 발현하는 경우, 예후가 좋고 호르몬 치료의 대상이 될 수 있으므로 매우 중요하다.^{1, 26} 최근, 에스트로겐 수용체가 소실된 유방 암종에서 HDAC1의 기능을 억제시키게 되면, 에스트로겐 수용체의 발현을 재활성화 시킬 수 있는 것으로 보고되고 있다.³⁸ 따라서 HDAC1 억제제를 사용한 표적 치료를 이용 함으로서 특히 에스트로겐 수용체의 발현이 감소하여 예후가 나쁜 유방 암종을 효과적으로 치료할 수 있는 새로운 방법이 제시되고 있다.^{17, 39, 40}

정상적인 WEE1은 CDC2를 인산화시켜 세포가 유사분열기로 진입하는 것을 억제한다.^{19, 21} 따라서 WEE1이 세포의 분열을 억제할 수 있는 능력이 있고 WEE1 발현에 이상이 있으면 종양세포의 증식이 유도될 것으로 추정된다. 특히 대장암 세포에서 WEE1 발현이 의미 있게 감소되어 있는 점이 관찰됨으로 종양의 발생에 있어서 WEE1이 강력한 종양 억제의 기능이 있는 것으로 보고되었다.²⁰ 비소세포 폐암 환자의 약 2/3에서도 WEE1 발현이 소실되었는데 이는 나쁜 예후와 높은 재발율과 연관되어 있었으며 이들 종양에서 증식 지수도

높게 관찰되었다.²¹ 또한 인간에서 *BRCA1* 유전자에 돌연변이가 있으면 유방암종과 난소 암종의 발생이 증가한다. 정상적인 *BRCA1*의 기능은 세포 주기를 G2/M기에 정지시키며 동시에 세포자멸사를 유발시키는 기능이 있는데, 이때 *BRCA1*이 *WEE1*을 활성화 시키면서 작용하게 된다. 따라서 *BRCA1* 발현 이상과 연관된 유방암종의 발생은 *WEE1*의 불활성화와 연관성이 있을 가능성이 있다고 보고된 바 있다.⁴¹ 본 연구의 결과에서, *WEE1* 유전자와 단백질의 발현이 다른 유전자와 비슷하게 섬유선종, 엽상 종양, 침윤성 관암종 순으로 점점 발현이 감소하는 소견이 관찰되었고 특히 침윤성 관암종에서는 발현율이 37.5%로 다른 유전자에 비해 매우 낮았다. 이러한 결과로 *WEE1*이 유방 종양의 발생과 연관되어 있고 특히 악성 종양에서는 그 발현이 더욱 낮아 종양 억제 유전자로 작용할 것으로 추정된다. 또한 다른 유전자와는 달리 *WEE1*은 기질 세포 종양으로 알려져 있는 섬유선종이나 엽상 종양에서 기질 세포에서는 거의 발현되지 않았으므로 *WEE1*은 주로 상피 성분의 종양 발생과 연관되어 있을 것으로 가능성이 있다고 생각된다. 한편, G2/M기에서 CDC2의 인산화는 'CDC25C'라는 이중 특이 인산분해효소 (dual specificity phosphatase)에 의해서 제거될 수 있어서 정상적인 *WEE1*의 작용을 억제할 수 있는데,⁴² 최근 연구에 의하면, 'Physalis angulata'라는 약초가 CDC25C 기능을 불활성화 시키며 동시에 *WEE1*의 발현을 증가시켜 결과적으로 CDC2 기능을 효과적으로 억제하여 유방암 세포 주의 세포 주기를 억제할 수 있다고 보고하였다.⁴³ 따라서 유방암의 치료에 있어서 *WEE1*이 표적치료의 중요한 연구 대상으로서 가능성이 있으며 앞으로 좀더 많은 유방암을 대상으로 *WEE1*에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

유방암의 예후 인자는 크게 임상적 및 병리학적 인자로 나눌 수 있는데, 임상적

인자는 ‘The American Joint Committee on Cancer Staging (AJCC, 6th ed.)’에 따른 임상 병기가 예후와 관계가 있는 것으로 알려져 있다.⁴⁴ 병리학적 인자는 종양의 크기, 조직학적 유형, 조직학적 등급, 여성호르몬 수용체 유무, 림프관 또는 혈관 침범, 증식 지수, DNA 함량, 혈관 형성 정도와 종양단백 분해효소의 양 등이 있다.^{1, 26} 현재까지 가장 유용한 조직학적 등급 체계는 1957년 Bloom 등²³ 이 제시한 등급 체계이며 그 중, 유사분열 지수가 가장 의미 있다고 보고되고 있다.⁴⁵⁻⁴⁷ 본 연구의 결과에서 조직학적 등급과 관 형성 정도 점수가 증가할수록 즉 종양의 분화가 나쁠수록 RHEB 발현이 증가되는 소견이 관찰되어 RHEB가 유방암의 나쁜 예후인자로 가치가 있을 것으로 생각된다. 또한 조직학적 등급이 낮아질수록 그리고 중요한 예후 인자인 유사분열 지수가 감소할수록 즉 종양의 분열 정도가 낮을 수록 ROS1 발현이 증가되었고 유사분열 지수가 감소할수록 그리고 에스트로겐 수용체 발현이 증가할수록 HDAC1 발현이 증가되어 ROS1과 HDAC1 발현은 유방암의 좋은 예후 인자로서 가치가 있을 것으로 생각할 수 있었다.

V. 결 론

유방의 섬유선종, 엽상 종양, 침윤성 관암종에서 *RHEB*, *ROS1*, *HDAC1*, *WEE1* 유전자 및 단백질 발현이 전반적으로 양성 종양인 섬유선종에서 가장 높았고 침윤성 관암종에서 가장 낮았으며 엽상 종양에서는 중간 정도의 발현을 보였다. 따라서 이들 유전자의 발현이 악성 유방 종양뿐만 아니라 양성 종양의 발생과도 연관되어 있으며 이들 유전자의 발현 감소나 소실이 유방 종양의 진행과 악성화에 연관되어 있을 것으로 생각된다. 섬유선종과 엽상 종양의 발생에 있어서 상피 세포도 종양의 발생과 연관되어 있다는 새로운 가설을 제시할 수 있다고 생각되며 동시에 섬유선종과 엽상 종양에서 지금까지 알려져 있는 바와 같이 기질 세포와 연관되어 발생한다는 점을 뒷받침할 수 있었다. 또한 엽상 종양에서는 섬유선종보다 기질 세포가 종양의 발생에 좀 더 많이 기여할 것으로 추정된다. 침윤성 관암종에서 *RHEB* 발현이 유방암의 나쁜 예후 인자로 그리고 *ROS1*과 *HDAC1* 발현은 유방암의 좋은 예후 인자로서 가치가 있을 것으로 생각된다. 마지막으로 *RHEB*, *HDAC1*, *WEE1*은 유방 종양에서 최근 각광을 받고 있는 표적 치료의 대상으로서 가치가 있을 것으로 생각된다. 앞으로 좀더 많은 유방 종양의 신전 조직을 대상으로 연구할 필요성이 있다고 생각된다. 또한 섬유선종과 엽상 종양에서 현미경 미세절제술 같은 방법을 이용하여 상피 성분과 기질 성분을 따로 구분하여 이들 유전자와 단백질에 대한 연구가 시행되면 두 종양의 차이점 및 발생 기전의 규명을 위한 좀 더 확실한 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

참고 문헌

1. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005.
2. Ried T, Just KE, Holtgreve-Grez H, du Manoir S, Speicher MR, Schrock E et al. Comparative genomic hybridization of formalin-fixed, paraffin-embedded breast tumors reveals different patterns of chromosomal gains and losses in fibroadenomas and diploid and aneuploid carcinomas. *Cancer Res* 1995; 55: 5415-23.
3. Eom M, Han A, Yi SY, Shin JJ, Cui Y, Park KH. RHEB expression in fibroadenomas of the breast. *Pathol Int* 2008; 58: 226-32.
4. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; 270: 467-70.
5. Quackenbush J. Microarray analysis and tumor classification. *N Engl J Med* 2006; 354: 2463-72.
6. Aspuria P, Tamanoi F. The Rheb family of GTP-binding proteins. *Cell Signal* 2004; 16: 1105-12.
7. Yamagata K, Sanders LK, Kaufmann WE, Yee W, Barnes CA, Nathans D et al. rheb, a growth factor- and synaptic activity-regulated gene, encodes a novel Ras-related protein. *J Biol Chem* 1994; 269: 16333-9.
8. Zhang Y, Gao X, Saucedo LJ, Ru B, Edgar BA, Pan D. Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. *Nat Cell Biol*

- 2003; 5: 578–81.
9. Visakorpi T. The molecular genetics of prostate cancer. *Urology* 2003; 62: 3–10.
 10. Zhou BP, Hung MC. Dysregulation of cellular signaling by HER2/neu in breast cancer. *Semin Oncol* 2003; 30: 38–48.
 11. Hsu J, Shi Y, Krajewski S, Renner S, Fisher M, Reed JC et al. The AKT kinase is activated in multiple myeloma tumor cells. *Blood* 2001; 98: 2853–5.
 12. Birchmeier C, O'Neill K, Riggs M, Wigler M. Characterization of ROS1 cDNA From a Human Glioblastoma Cell Line. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87: 4799–803.
 13. Chen J, Zong CS, Wang LH. Tissue and epithelial cell-specific expression of chicken proto-oncogene c-ros in several organs suggests that it may play roles in their development and mature functions. *Oncogene* 1994; 9: 773–80.
 14. Zhao J, Sharma S. Expression of the ROS1 oncogene for tyrosine receptor kinase in adult human meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1995; 83: 148–54.
 15. Osborne CK. Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 51: 227–38.
 16. Hortobagyi GN. Treatment of Breast Cancer. *N Engl J Med* 1998; 339: 974–84.
 17. Zhou Q, Agoston AT, Atadja P, Nelson WG, Davidson NE. Inhibition of

- Histone Deacetylases Promotes Ubiquitin-Dependent Proteasomal Degradation of DNA Methyltransferase 1 in Human Breast Cancer Cells. *Mol Cancer Res* 2008; 6: 873-83.
18. Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, Sugiura H, Ando Y, Mita K et al. Quantitation of HDAC1 mRNA expression in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 94: 11-6.
19. Lee MH, Yang HY. Negative regulators of cyclin-dependent kinases and their roles in cancers. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58: 1907-22.
20. Backert S, Gelos M, Kobalz U, Hanski M, Bohm C, Mann B et al. Differential gene expression in colon carcinoma cells and tissues detected with a cDNA array. *Int J Cancer* 1999; 82: 868-74.
21. Yoshida T, Tanaka S, Mogi A, Shitara Y, Kuwano H. The clinical significance of Cyclin B1 and Wee1 expression in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2004; 15: 252-6.
22. Kawai H, Li H, Avraham S, Jiang S, Avraham HK. Overexpression of histone deacetylase HDAC1 modulates breast cancer progression by negative regulation of estrogen receptor alpha. *Int J Cancer* 2003; 107: 353-8.
23. Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* 1957; 11: 359-77.
24. Kumar B, de Silva M, Venter DJ, Armes JE. Tissue microarrays: a practical guide. *Pathology* 2004; 36: 295 - 300.

25. Park KH, Choi SE, Eom M, Kang Y. Downregulation of the anaphase-promoting complex (APC)⁷ in invasive ductal carcinomas of the breast and its clinicopathologic relationships. *Breast Cancer Res* 2005; 7: R238–47.
26. Rosen PP. *Rosen's breast pathology*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
27. Parker SJ, Harries SA. Phyllodes tumours. *Postgrad Med J* 2001; 77: 428–35.
28. Sawhney N, Garrahan N, Douglas-Jones AG, Williams ED. Epithelial-stromal interactions in tumors. A morphologic study of fibroepithelial tumors of the breast. *Cancer* 1992; 70: 2115–20.
29. Yamashita J, Ogawa M, Egami H, Matsuo S, Kiyohara H, Inada K et al. Abundant Expression of Immunoreactive Endothelin 1 in Mammary Phyllodes Tumor: Possible Paracrine Role of Endothelin 1 in the Growth of Stromal Cells in Phyllodes Tumor. *Cancer Res* 1992; 52: 4046–9.
30. Gomez MR, Sampson JR, Whittemore VH. *Tuberous sclerosis complex*. 3rd ed. New York: Oxford University Press; 1999.
31. Li Y, Corradetti MN, Inoki K, Guan K. TSC2: filling the GAP in the mTOR signaling pathway. *Trend Biochem Sci* 2004; 29: 32–8.
32. Zhou BP, Hung M. Dysregulation of cellular signaling by HER2/neu in breast cancer. *Semin Oncol* 2003; 30: 38–48.
33. Castro AF, Rebhun JF, Clark GJ, Quilliam LA. Rheb Binds Tuberous Sclerosis Complex 2 (TSC2) and Promotes S6 Kinase Activation in a Rapamycin- and Farnesylation-dependent Manner. *J Biol Chem* 2003;

- 278: 32493–6.
34. Clark GJ, Kinch MS, Rogers–Graham K, Sebti SM, Hamilton AD, Der CJ. The Ras–related protein Rheb is farnesylated and antagonizes Ras signaling and transformation. *J Biol Chem* 1997; 272: 10608–15.
35. Tamanoi F, Gau CL, Jiang C, Edamatsu H, Kato–Stankiewicz J. Protein farnesylation in mammalian cells: effects of farnesyltransferase inhibitors on cancer cells. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58: 1636–49.
36. Brunner TB, Hahn SM, Gupta AK, Muschel RJ, McKenna WG, Bernhard EJ. Farnesyltransferase inhibitors: an overview of the results of preclinical and clinical investigations. *Cancer Res* 2003; 63: 5656–68.
37. Basso AD, Mirza A, Liu G, Long BJ, Bishop WR, Kirschmeier P. The Farnesyl Transferase Inhibitor (FTI) SCH66336 (lonafarnib) Inhibits Rheb Farnesylation and mTOR Signaling: Role in FTI enhancement of taxane and tamoxifen anti–tumor activity. *J Biol Chem* 2005; 280: 31101–8.
38. Yang X, Ferguson AT, Nass SJ, Phillips DL, Butash KA, Wang SM et al. Transcriptional Activation of Estrogen Receptor α in Human Breast Cancer Cells by Histone Deacetylase Inhibition. *Cancer Res* 2000; 60: 6890–4.
39. Scott GK, Marx C, Berger CE, Saunders LR, Verdin E, Schafer S et al. Destabilization of ERBB2 Transcripts by Targeting 3' Untranslated Region Messenger RNA Associated HuR and Histone Deacetylase–6. *Mol Cancer Res* 2008; 6: 1250–8.
40. Tarasenko N, Nudelman A, Tarasenko I, Entin–Meer M, Hass–Kogan D,

- Inbal A et al. Histone deacetylase inhibitors: the anticancer, antimetastatic and antiangiogenic activities of AN-7 are superior to those of the clinically tested AN-9 (Pivanex). *Clin Exp Metastasis* 2008; 25: 703-16.
41. Yan Y, Spieker RS, Kim M, Stoeger SM, Cowan KH. BRCA1-mediated G2/M cell cycle arrest requires ERK1/2 kinase activation. *Oncogene* 2005; 24: 3285-96.
42. Nilsson I, Hoffmann I. Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. *Prog Cell Cycle Res* 2000; 4: 107-14.
43. Hsieh W, Huang K, Lin H, Chung J. *Physalis angulata* induced G2/M phase arrest in human breast cancer cells. *Food Chem Toxicol* 2006; 44: 974-83.
44. Greene FL, American Joint Committee on Cancer., American Cancer Society. *AJCC cancer staging manual*, 6th ed. New York: Springer-Verlag; 2002.
45. Parham DM, Hagen N, Brown RA. Simplified method of grading primary carcinomas of the breast. *J Clin Pathol* 1992; 45: 517-20.
46. Jannink I, van Diest PJ, Baak JP. Comparison of the prognostic value of four methods to assess mitotic activity in 186 invasive breast cancer patients: classical and random mitotic activity assessments with correction for volume percentage of epithelium. *Hum Pathol* 1995; 26: 1086-92.
47. van Diest PJ, van der Wall E, Baak JP. Prognostic value of proliferation in invasive breast cancer: a review. *J Clin Pathol* 2004; 57: 675-81.

Abstract

Expression of *RHEB*, *ROS1*, *HDAC1*, and *WEE1* in the Breast Neoplasm and Their Prognostic Values

Minseob Eom

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Kwang Hwa Park)

Until now, there have been few studies regarding specific genetic expression of benign neoplasm of the breast. In the previous study, cDNA microarray analysis was performed on fresh tissue samples of fibroadenoma, and the results showed that the expression of *RHEB*, *ROS1*, *HDAC1*, and *WEE1* in fibroadenoma was two times higher than in normal breast tissue, whereas, *RHEB* expression was quantitatively decreased in invasive ductal carcinoma. The aim of this study was to compare the expression of the *RHEB*, *ROS1*, *HDAC1*, and *WEE1* in fibroadenoma as benign neoplasm, phyllodes tumor as intermediate grade neoplasm, and invasive ductal carcinoma as malignant neoplasm, using various molecular methods. In addition, this study intended to evaluate the expression of these genes as

prognostic factors in invasive ductal carcinoma. Surgically resected and pathologically diagnosed cases in the Wonju Christian Hospital, Yonsei University Wonju College of Medicine, from 1998 to 2007 were used. Formalin-fixed, paraffin embedded tissue was used for all patients (102 cases of fibroadenoma, 25 cases of phyllodes tumor, 120 cases of invasive ductal carcinoma). Fresh tissue samples were available from 14 cases of fibroadenoma and 46 cases of invasive ductal carcinoma. Immunohistochemical stains were performed by using tissue microarray blocks. Real-time PCR and Western blot analysis were performed by using both fresh tissue samples and formalin-fixed tissue samples. The results of the immunohistochemical stain, real-time PCR, and Western blot analysis showed that the expressions of *RHEB*, *ROS1*, *HDAC1*, and *WEE1* decreased generally with fibroadenoma showing the highest levels, followed by phyllodes tumor, and invasive ductal carcinoma having the lowest levels. The expression of these genes was increased both in the epithelial cells and stromal cells of fibroadenoma and phyllodes tumor. Also, the expression in the stromal cells of phyllodes tumor was higher than in those of fibroadenoma. The results of the immunohistochemical stains of invasive ductal carcinoma showed higher RHEB expression correlated with increased histologic grade and increased tubule formation score and higher ROS1 expression correlated with increased histologic grade and decreased mitotic count. The increase in HDAC1 expression correlated with lower mitotic count and higher estrogen receptor expression. These results indicated that

the expression of *RHEB*, *ROS1*, *HDAC1*, and *WEE1* was related to the mechanism of development of both malignant and benign breast neoplasm. In addition, these findings suggested 1) that the loss or decrease of the expression of these genes was related to the malignant progression in breast neoplasm, 2) that epithelial cells may influence the pathogenesis of fibroadenoma and phyllodes tumor, previously thought to be of stromal cell origin, and that stromal cells may have more influence on the pathogenesis in phyllodes tumor than in fibroadenoma, and 3) that RHEB expression may be valuable as a poor prognostic factor and ROS1 and HDAC1 expression as good prognostic factors of breast cancer.

Key Words: Breast neoplasm, Fibroadenoma, Phyllodes tumor, Invasive ductal carcinoma, *RHEB*, *ROS1*, *HDAC1*, *WEE1*, Prognostic factor