

## 유방암에서 c-erbB2의 과발현이 항암화학요법의 치료성적에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 <sup>1</sup>외과학교실, <sup>2</sup>병리학교실

구 자 윤<sup>1</sup> · 이 회 대<sup>1</sup> · 정 우 회<sup>2</sup>

### Overexpression of c-erbB2 and Its Relationship with Chemotherapy in Breast Cancer

Ja Yun Koo, M.D.<sup>1</sup>, Hy-De Lee, M.D.<sup>1</sup> and Woo Hee Jung, M.D.<sup>2</sup>

Department of <sup>1</sup>General Surgery, <sup>2</sup>Pathology, Yonsei University College of Medicine

**Purpose:** c-erbB2 encodes 185 kDa oncoprotein with tyrosine kinase activity and has homology to the epidermal growth factor receptor. c-erbB2 proto-oncogene is found to be overexpressed in approximately 20 to 30% of primary breast cancer and has been associated with poor prognosis and lower response to conventional chemotherapy.

**Materials and methods:** We performed a study on 40 infiltrating ductal breast cancers treated with primary surgery and adjuvant chemotherapy. We investigated c-erbB2 expression by immunohistochemistry in paraffin-embedded tissue using polyclonal antipeptide antibody(DAKO). We evaluated the relationships between its expression and the results after over 6 cycles of adjuvant chemotherapy including cyclophosphamide, methotrexate and 5-FU.

**Results:** The median age at diagnosis was 43 years and the median follow-up time was 47.3 months. Thirteen(32.1%) of 40 patients showed the c-erbB2 overexpression in the external domains of protein. There were no correlations among c-erbB2 amplification and other prognostic factors such as hormonal receptors, histologic grade and tumor size. Estrogen receptor and progesterone receptor showed tendency of inverse correlation with c-erbB2 overexpression but it was not statistically significant( $p > 0.05$ ). c-erbB2 positive patients showed shorter disease free survival compared to c-erbB2 negative patients in univariate analysis( $p < 0.05$ )(Kaplan Meire analysis). The patients without c-erbB2 overexpression seemed to survive longer but had no significant survival benefit( $p > 0.05$ ).

**Conclusion:** These findings suggest that overexpression of c-erbB2 may be a marker of poor response to adjuvant chemotherapy with CMF regimen and may be an indicator of more aggressive therapy.

---

**Key Words:** Primary breast cancer, Adjuvant chemotherapy, c-erbB2 overexpression

## 서 론

c-erbB2(Her-2/neu) 종양유전자는 185-kDa trans-membrane glycoprotein을 생성하는데 구조가 표피 성장인자수용체(epidermal growth factor receptor: EGFR)와 매우 유사하고 tyrosine kinase activity를 가지고 있으며(1) 다른 성장인자 수용체와 마찬가지로 세포성장을 조절하는 기능을 가진 것으로 알려져 있다(2).

유방암에서는 10~30% 정도에서 c-erbB2 발현이 관찰되는데 이 경우 생존율의 감소 등 예후가 나쁜 것으로 알려져 있다(3~6). 또한 c-erbB2의 과발현은 고등급의 종양에서 많으며(7), 종괴의 크기가 클수록 많은 경향을 보였고(8) 에스트로젠 수용체와 프로게스테론수용체는 c-erbB2의 과발현시 감소하는 경향을 보였다(7,9). 최근에는 항암 화학요법 및 호르몬요법에 대한 반응도를 예측하는 인자로서의 가능성을 연구 중에 있다.

따라서 본 연구에서는 이러한 예후인자와 c-erbB2의 연관성을 보고 이 유전인자의 발현여부에 따른 슬루항암화학요법 후의 생존율 및 무병생존율의 결과를 연구하고자 하였다.

## 대상 및 방법

연세대학교 의과대학 영동세브란스병원에서 수술당시에 원격전이가 없는 유방암으로 진단을 받은 후 유방절제술 및 액와림프절 절제술을 시행 받은 환자 중에서 림프절의 전이가 있거나 재발의 위험성이 있어 6회 이상의 항암화학요법(CMF 용법: cyclophosphamide 100 mg/m<sup>2</sup> 14일간 복용, methotrexate 40 mg/m<sup>2</sup>/day, fluorouracil 400 mg/m<sup>2</sup>/day)을 시행 받고 추적조사가 가능한 환자 중에서 c-erbB2의 면역조직화학 염색에 필요한 파라핀 블록 보존이 양호하고 조직의 양이 충분한 40명을 대상으로 하였다.

임상기록의 검토를 통하여 환자들의 진단 당시 연령, 수술방법, 폐경의 여부, 에스트로젠 및 프로

게스테론 수용체의 발현 여부 등을 조사하였다.

병리조직학적 검사는 10% 중성 포르말린에 고정 후 파라핀에 포매하여 보관된 블록을 연속 절편하여 hematoxylin-eosin염색을 한 후 시행하였는데 조직학적 분류는 변형된 세계보건기구(World health organization)분류에 따르고 조직학적등급은 Bloom and Richardson 점수법에 따랐다. c-erbB2의 면역조직학적 검색은 다음의 방법으로 시행하였다. 각 예의 조직 표본 중 조직학적 분류형을 대표할만한 블록을 선택하여 4 μm 두께로 연속 절편 하였다. 이 절편을 xylene(2×15 minutes)에서 파라핀을 제거한 후 함수화 및 탈수화 과정을 거쳐 avidin-biotin complex method로 염색하였다. Normal horse serum(Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA)으로 slides를 배양하여 비특수 염색을 제거한 후 슬라이드를 1 : 80으로 희석한 Rabbit polyclonal Anti-Human c-erbB2 Oncoprotein(DAKO, Denmark)와 함께 BSA에서 4°C로 밤새 배양하였다. Horse biotinylated antimouse IgG in 2% BSA를 상온에서 30분간 절편에 첨가한 후 streptavidin-peroxidase conjugate(Vector Laboratories)와 함께 상온에서 30분간 배양, 3,3-diaminobenzidine(Polyscience Inc., Warrington, PA)로 5분간 염색하였다. 모든 배양은 humidified chamber에서 시행하였다. 마지막으로 slight Mayer hematoxylin 대조염색을 시행한 후 탈수 및 봉입을 시행하였다. 일차항체를 첨가하지 않은 절편을 2% BSA in TBS로 처리하여 음성판정기준으로 하였으며 강한 c-erbB2 양성을 보인 슬라이드를 c-erbB2에 대한 양성판정기준으로 하였다. 모든 슬라이드는 광학현미경하에서 관찰하는데 암세포의 표면세포막에 있는 증강신호를 c-erbB2의 과발현으로 정하고 임상결과나 병리 조직적 자료를 모르는 상태에서 면역염색에 대한 평가를 하였다. c-erbB2의 양성판정은 50% 이상의 강한 세포막염색을 보인 경우로 하였으며 국소적 세포막염색이나 세포질염색은 음성으로 판정하였다(Fig. 1).

통계적방법을 보면 환자군의 특성비교에 chi-square test를 이용하였고, 생존율의 분석은 Ka-

Fig. 1. The immunohistochemical staining of c-erbB2 in breast cancer: Breast cancer cells with a strong positive membrane staining result, magnification  $\times 100$ .

plan Meier 분석법을 log rank test로 검증하였는데  $p < 0.05$ 를 통계적으로 유의한 수준으로 정하였다.

**결 과**

진단당시 환자군의 중앙치 나이는 43세이었고 c-erbB2발현군과 비발현군과의 특성에서 통계적 차이는 없었다(Table 1). 중앙추적기간은 47.3개월 이었는데 대상 환자군 40명의 유방암 환자 중에서 c-erbB2 과발현을 보인 경우는 13예로 32.1%의 양성률을 보였다.

c-erbB2의 과발현이 있는 경우 에스트로겐수용체 및 프로게스테론수용체의 발현이 적고 c-erbB2의 발현이 없을 경우 호르몬수용체의 양성이 많은 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다( $p > 0.05$ ). 종괴의 크기나 림프절전이여부는 c-erbB2의 발현과 연관성을 보이지 않았으며 조직학적 등급 및 핵등급에서도 연관성이 없었다( $p > 0.05$ ).

c-erbB2 양성을 보인 환자의 경우는 음성의 환자에 비하여 Kaplan Meire 생존율분석을 통한 단일변량분석에서 무병생존율의 감소를 보였고 통계적으로도 유의하였다( $p < 0.05$ )(Fig. 1). 또한 c-erbB2

Table 1. Patients characteristics(N=40)

Characteristics	No of patients(%)	
	c-erbB2(-)	c-erbB2(+)
Age*		
Under 50	18(81.8)	12(66.7)
50 and over 50	4(18.2)	6(32.3)
Tumor size		
T1	3(13.6)	3(15.0)
T2	13(59.1)	10(57.5)
T3	6(27.3)	5(27.5)
Lymph node status		
No metastasis	8(36.4)	3(16.7)
Metastasis	14(63.6)	15(83.3)
Histologic grade <sup>†</sup>		
I	7(33.3)	6(33.3)
II,III	14(66.7)	12(66.7)
Nuclear grade <sup>†</sup>		
I	5(23.8)	2(11.1)
II,III	16(76.2)	16(88.9)
Estrogen receptor		
negative	10(45.5)	9(50.0)
positive	12(54.5)	9(50.0)
Progesterone receptor		
negative	12(54.5)	12(66.7)
positive	10(45.5)	6(33.7)

No statistical significance by Chi-square test

\*Median age: 43 years old

<sup>†</sup>one case was not included due to carcinosarcoma.

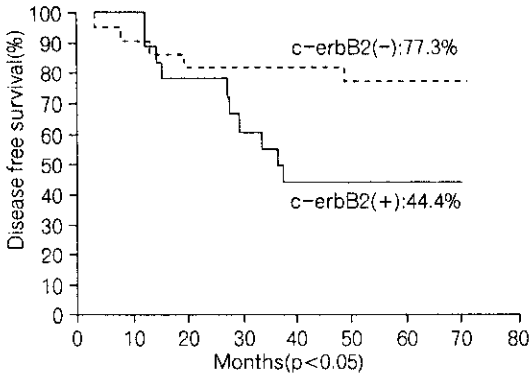


Fig. 2. Disease free survival by c-erbB2 status

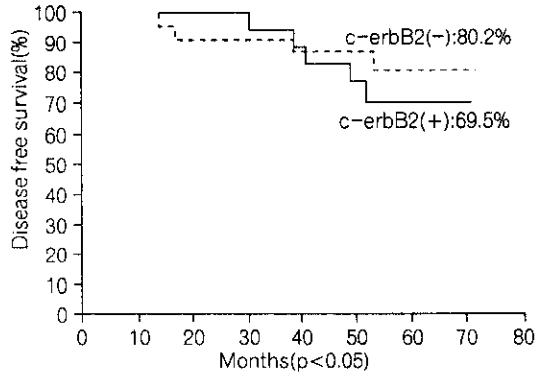


Fig. 3. Survival by c-erbB2 status

의 과발현이 있는 경우 과발현이 없는 환자에 비하여 생존율의 감소를 관찰할 수 있었으나 통계적인 유의성은 없었다( $p > 0.05$ )(Fig. 2).

### 고 찰

유방암에서 흔히 발견되는 유전변이종의 하나인 c-erbB2의 증폭은 이 유전자에 의하여 생성되는 단백질산물의 과발현과 함께 중요한 연구대상으로 되어있다. c-erbB2 종양유전자는 185 kDa의 세포막당단백(membrane glycoprotein)을 형성하는데 이의 구조는 표피성장인자수용체와 유사하며 tyrosine kinase activity를 가진다(1,2,9).

c-erbB2는 type I 성장인자수용체계열 중의 하나로 여기에는 표피성장인자수용체, c-erbB3와 c-erbB4등이 포함된다. c-erbB2 gene이 형성하는 transmembrane glycoprotein(p185<sup>erbB2</sup>)은 extracellular ligand binding domain과 intracellular tyrosine kinase activity를 가지고 있으며 표피성장인자수용체, c-erbB3와 c-erbB4 등의 수용체계열과 구조적 유사성이 많다(9,11). 생물학적 특성으로 알려진 바는 다른 성장인자수용체처럼 세포성장을 조절하며(2) 또한 표피성장인자수용체와 마찬가지로 종양의 증식능을 향상시킨다(12,13). 이 유전자의 증폭은 인간염색체 17(17q21)에서 관찰되는데(14) 다른 선암에서도 관찰된다(15,16).

c-erbB2 단백질, 즉 p185<sup>erbB2</sup>(이하에서는 c-erbB2로

사용)의 과발현은 유방암과 난소암에서 생존율의 감소를 가져오는 것으로 알려져 있는데(4) 특히 유방암에서는 10~30%에서 c-erbB2의 발현이 관찰되며 이 경우에는 생존율의 감소하는 등 예후가 나쁜 것으로 알려져 있으며(3~6) 특히 일부 예외는 있지만 림프절 전이가 있는 유방암에서 c-erbB2의 과발현이 있는 경우는 예후가 나쁜 것으로 알려져 있다(4,9,15).

림프절 전이가 없는 유방암에서 c-erbB2의 발현이 예후에 미치는 영향은 논란이 많으나 많은 환자를 대상으로 연구한 결과에서 무병생존율(18) 및 생존율(19,20)이 감소하는 것으로 보고 있다. 그러나 다른 예후인자와의 차이점 및 독립적인 예후인자로서의 가능성은 연구마다 매우 상이하다. 이러한 논란과 예후인자로서 p185가 비교적 제한적인 유용성만을 인정받고 있는 이유는 기술적인 문제가 그 원인이며 좀더 기술적인 발전을 이루면 해결되리라 예상된다(17). 종양에서의 c-erbB2를 분석하여 보면 homologous hormone 이나 transmodulating hormone에 의하여 활성화되는 p185나 agonist가 없는 경우와 구분이 되지 않는다. 이는 p185의 호르몬에 의한 활성화가 신호 전달능력을 매우 증가시키므로 의의가 있으나 수용체의 하향조절을 유발하여 안정화상태의 수용체를 감소시킬 수 있으며 면역화학적으로 p185가 낮거나 음성인 경우를 보일 수도 있다. 따라서 p185 신호전달능을 직접 측정하여 보면 예후와

더욱 의의 있는 연관성을 보이는데 이 수용체의 Tyr autophosphorylation의 정도가 신호전달능을 잘 반영할 수 있으며 p185 Tyr autophosphorylation의 정량을 통하여 측정할 수 있는데 immunoblotting에 의한 혈청내 anti-phosphotyrosine의 측정으로 알 수 있다(21).

그러나 c-erbB2는 기존의 예후인자에 비하여 명확한 우수성을 보여주지 못하던 중 최근의 여러 연구에서 치료에 대한 반응을 예측하는 예측인자(predictive factor)로서의 가능성 때문에 다시 중요성이 대두되게 되었다. c-erbB2의 과발현이 있는 경우 항암화학요법 중에서 CMF요법(cyclophosphamide, methotrexate, fluorouracil)으로 치료한 경우에 저항성을 보인다고 하였다(22,23). 특히 림프절전이 없으나 에스트로겐수용체 음성이거나, 에스트로겐수용체 양성이면서 종괴의 크기가 3 cm 이상으로 재발의 가능성이 많은 재발고위험군에서 CMFp(cyclophosphamide, methotrexate, fluorouracil, prednisolone)로 치료한 경우에 c-erbB2 발현이 음성인 경우에만 생존율의 향상을 보였고 c-erbB2 양성인 경우는 치료군과 비치료군간에 치료성적의 차이가 없다고 하였다(19). Ludwig group의 연구에서는 림프절전이가 있는 경우 일회의 수술전 CMF 투여와 6회의 수술후 CMFp 투여한 경우를 비교하였는데 c-erbB2 음성의 경우에 무병생존율이나 생존율의 향상을 보였고 c-erbB2 양성인 경우는 두치료군의 성적에 차이가 없었다(23). 본 연구에서는 림프절전이가 있거나 재발고위험군의 유방암환자에서 CMF 항암화학요법을 6회 이상 시행한 경우 c-erbB2 양성인 경우 무병생존율이 44.4%로 c-erbB2 음성의 77.3%에 비하여 낮은 수준을 보였고 이는 통계적으로도 유의한 수준이었다( $p < 0.05$ ). 또한 생존율의 경우도 c-erbB2 양성인 경우에 비하여 낮은 수준을 보였으나 통계적 유의성은 없었다.

Cancer and Leukemia Group B(CALGB) 8869 study에서 CAF (cyclophosphamide, doxorubicin, fluorouracil) 요법으로 고용량 (600,60,600 mg/m<sup>2</sup>, 4 cycles), 중간용량 (400,40,400 mg/m<sup>2</sup>, 6 cycles) 및

저용량(300,30,300 mg/m<sup>2</sup>, 6 cycles)으로 비교한 결과 c-erbB2의 과발현이 있는 경우 고용량의 항암화학요법이 저용량보다 생존율 및 무병생존율의 향상을 가져오는 것으로 나타났다(24). 따라서 CAF 요법의 용량-반응효과는 c-erbB2 과발현의 경우에 한하여 동반됨을 짐작할 수 있다. 이상에서 c-erbB2의 예후적인, 또는 예측적인 역할에 대한 논란이 많지만 발현여부에 따라 항암화학요법의 종류 및 용량에 따른 치료효과를 예측할 수 있을 것으로 예상되므로 술후 항암화학요법의 선택에 있어서 참고가 되리라 기대된다.

최근에는 c-erbB2의 발현을 유방암에서 예후 및 치료에 대한 반응의 예측인자로서의 역할과 연관시키는 연구가 활발하며 c-erbB2 수용체는 단일클론항체를 이용한 종양치료의 목표로서 연구 중에 있어 머지않아 유방암에서 c-erbB2의 역할에 대한 규명이 이루어 질 것으로 보이므로 자료의 구축을 하여 두는 것이 좋으리라 판단된다.

## 결 론

유방암에서 c-erbB2 발현은 32.1%에서 관찰되었고 CMF 항암화학요법으로 치료한 경우 c-erbB2 발현군이 비발현군에 비하여 무병생존율이 낮았고 생존율도 낮은 경향을 보이는 것으로 보아 본 단백의 발현은 항암화학요법의 반응도를 예측하는 예후인자(predictive factor)로서의 가능성이 있다고 볼 수 있으며 좀더 장기간의 추적관찰을 통하여 항암화학요법의 결정에 참고자료로 사용될 가능성을 연구하여야 하겠다.

## 참 고 문 헌

1. Yamamoto T, Ikawa S, Akiyama T, Semba K, Nomura N, Miyajima N, Saito T, Toyoshima K. Similarity of protein encoded by the human c-erbB-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* 1986; 319: 230-4.
2. Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, Toyoshima K, Yamamoto T. The product of the human c-erbB-2

- gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science* 1986; 232: 1644-6.
3. Venter DJ, Tuzi NL, Kumar S, Gullick WJ. Over-expression of the c-erbB-2 oncoprotein in human breast carcinomas: immunohistochemical assessment correlated with gene amplification. *Lancet* 1987; 2: 69-72.
  4. Slamon DJ, Clark Gm, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235: 177-82.
  5. Zhou D, Battifora H, Yokota J, Yamamoto T, Cline MJ. Association of multiple copies of the c-erbB-2 oncogene with spread of breast cancer. *Cancer Res* 1987; 47: 6123-5.
  6. Wright C, Angus B, Nicholson S, Sainsbury JR, Cairns J, Gullick WJ, Kelly P, Harris AL, Horne CH. Expression of c-erbB-2 oncoprotein: a prognostic indicator in human breast cancer. *Cancer Res* 1989; 49: 2087-90.
  7. Tsuda H, Hirohashi S, Shimosato Y, Hirota T, Tsugane S, Yamamoto H, Miyajima N, Toyoshima K, Yamamoto T, Yokota J, Yoshida T, Sakamoto H, Terada M, Sugimura T. Correlation between long term survival in breast cancer patients and amplification of two putative oncogene-co-amplification units: hst-1 int-2 and c-erbB-2/ear-1. *Cancer Res* 1989; 49: 3104-3108.
  8. Borg A, Baldetorp B, Ferno M, Killander D, Olsson H, Sigurdsson H. erbB2 amplification in breast cancer with high rate of proliferation. *Oncogene* 1991; 6: 137-143.
  9. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao Y-C, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Liberman TA, Schelesinger J, Francke U, Levinson A, Ullrich A. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 1985; 230: 1132-1139.
  10. Hynes NE, Stern DF. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1198: 165-84.
  11. Tzahar E, Waterman H, Chen X, Levkowitz G, Karunakaran D, Lavi S: A hierarchical network of inter-receptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 5276-87.
  12. Barnes DM, Meyer JS, Gonzalez JG, Gullick WJ, Millis RR. Relationship between c-erbB2 immunoreactivity and thymidine labeling index in breast carcinoma in situ. *Breast Cancer Res Treat* 1991; 18: 11-7.
  13. Kallioniemi OP, Holli K, Visakorpi T, Koivula T, Helin HH, Isola JJ. Association of c-erbB-2 protein over-expression with high rate of cell proliferation, increased risk of visceral metastasis and poor long-term survival in breast cancer. *Int J Cancer* 1991; 49: 650-5.
  14. Schechter AL, Hung MC, Vaidyanathan L, Weinberg RA, Yang-Feng TL, Francke U, Ullrich A, Coussens L. The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked the gene encoding EGF receptor. *Science* 1985; 229: 976-8.
  15. Yokota J, Yamamoto T, Toyoshima K, Terada M, Sugimura T, Battifora H, Cline MJ. Amplification of c-erbB-2 oncogene in human adenocarcinoma in vivo. *Lancet* 1986; 1: 765-7.
  16. Tal M, Wetzler M, Josefsberg Z, Deutch A, Gutman M, Assaf D, Kris R, Shiloh Y, Givol D, Schlessinger J. Sporadic amplification of c-erbB-2 oncogene in human adenocarcinomas of various tissues *Cancer Res* 1988; 48: 1517-1520.
  17. Press MF, Pike MC, Chazin VR, Hung G, Udove JA, Markowicz M, Danyluk J, Godolphin W, Sliwkowski M, Akita R, Paterson MC, Slamon DJ. Her-2/neu expression in node-negative breast cancer: direct tissue quantitation by computerized image analysis and association of overexpression with increased risk of recurrent disease. *Cancer Res* 1993; 53: 4960-4970.
  18. Sauer R, Schauer A, Rauschecker HF, Schunacher M, Gatzemeier W, Schmoor C, Dunst J, Seegenschmiedt MH, Marx D. Therapy of small breast cancer: a prospective study on 1036 patients with special emphasis on prognostic factors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992; 23: 907-914; 1992.
  19. Allred DC, Clark GM, Molina R, Tandon AK, Schnitt SJ, Gilchrist KW, Osborne CK, Tormey DC, McGuire WL. Overexpression of HER-2/neu and its relationship with other prognostic factors change during the progression of in situ to invasive breast cancer. *Hum Pathol* 1992; 23: 974-979.
  20. Gusterson BA, Machin LG, Gullick WJ, Gibbs NM, Powles TJ, Price P, McKinna A, Harrison S. Immunohistochemical distribution of c-erbB-2 in infiltrating and in situ breast cancer. *Int J Cancer* 1988; 42: 842-845.
  21. Wildenhain Y, Pawson T, Blackstein ME, Andrulis IL. p185neu is phosphorylated on tyrosine in human primary breast tumors which overexpress neu/erbB-2. *Oncogene* 1990; 5: 879-83.

22. Allred DC, Clark GM, Tandon AK, Molina R, Tormey DC, Osborne Kent, Gilchrist KW, Mansour EG, Abeloff M, Eudey L, McGuire WL. HER-2/neu in node negative breast cancer: Prognostic significance of overexpression influenced by the presence of in situ carcinoma. *J Clin Oncol* 1992; 10: 599-605.
23. Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, Price KN, Soderborgh S, Anbazhagan R, Styles J, Rudenstam CM, Golouh R, Martinez-Tello RF, Tiltman A, Torhorst J, Grigolato P, Bettelheim R, Neville AM, Burki K, Castiglione M, Collins J, Lindtner J, Senn HJ for the international(Ludwig) Breast Cancer Study Group. Prognostic importance of c-erbB2 expression in breast cancer. *J Clin Oncol* 1992; 10: 1049-1056.
24. Muss HB, Thor AD, Berry DA, Kute T, Liu ET, Koerner F, Cirrincione CT, Budman DR, Wood WC, Barcos M. c-erbB2 expression and response to adjuvant therapy in women with node positive early breast cancer. *N Engl J Med* 1994; 330: 1260-1266.