

## 유방암의 종양 신생혈관형성과 전이의 연관성에 대한 연구\*

한양대학교 의과대학 병리학교실

김 남 훈 · 박 문 향

### Correlation between Tumor Angiogenesis and Metastasis in Invasive Breast Carcinoma

Nam Hoon Kim, M.D. and Moon Hyang Park, M.D.

Department of Pathology, HanYang University Medical School

Tumor angiogenesis(TA) refers to the growth of new vessels toward and within a tumor. TA is necessary both at the beginning and at the end of the metastatic cascade of events. Recently, experimental evidence suggests that the growth of a tumor beyond a certain size requires angiogenesis. To investigate how tumor angiogenesis correlates with metastases in breast carcinoma, the microvessels were counted (per 200 / field) in the most active areas of neovascularization by two investigators. The microvessels within breast carcinoma were highlighted by immunohistochemical staining for factor VIII-related antigen. Microvessel count(MVC) in node-positive carcinoma( $59.66 \pm 35$ ) was significantly higher than in node-negative carcinoma( $44.76 \pm 17$ )( $p=0.009$ ). MVC was also statistically correlated with tumor size and stage, but not with histologic grading, DNA ploidy, or hormonal receptors(estrogen and progesterone). MVC in invasive breast carcinoma may be one of many prognostic predictors of node-positive breast carcinoma. Assessment of tumor angiogenesis may therefore be valuable in selecting patients with early breast carcinoma for aggressive therapy. (**Korean J Pathol 1995; 29: 740 ~ 745**)

**Key Words:** Breast, Invasive carcinoma, Factor VIII-related antigen, Angiogenesis, Microvessel count (MVC)

### 서 론

종양의 성장과 파급에는 종양세포의 증식 뿐만아

니라 종양세포가 자라는 주변조직의 반응이 중요하다. 암종이 파급되려면 암세포와 비종양성 혈관, 면역계와 결합조직과의 여러가지 중요한 관계 즉 결합조직에서는 Type IV collagenase, Cathepsin D, urokinase-type plasminogen activator등이, 면역계에서는 NK 세포가 중요작용을 한다. 이 중에서 종양의 신생혈관형성(tumor angiogenesis)은 종양의 성장과 전이에 필수적인 것으로 알려지고 있다<sup>1</sup>. 최근 유방암은 종양의 크기, 조직학적 및 핵등급, 호르몬 수용체상태, 종양주변 혈관침습 등 통상의 예후인자이외

접 수 : 1995년 2월 10일, 게재승인 : 1995년 7월 27일

주 소 : 서울시 성동구 행당동 17, 우편번호 133-791

한양대학교 의과대학 병리학교실, 김남훈

\* 이 연구는 1994년도 한양대학교 교내 연구비로 이루어졌음.

에 부가하여 여러 인자들이 연구되고 있다. 현재까지 수술가능한 유방암의 예후를 예측하는 가장 중요한 인자로는 액와 림프전의 전이상태여부로 알려져 있으나 실제로는 약 20%의 액와림프절 전이가 없는 예에서 종양의 재발이 보이고 사망할 위험이 있다고 알려져 있다<sup>2</sup>. 액와 림프전 유성인 유방암 환자에서 수술후 부가적인 전신적 치료요법이 유익할 것이나 이들 모든 예에서 사용할 것인지에 대해서는 아직도 의견의 일치를 보지 못하고 있다<sup>3,4</sup>. 그러므로 더 정확한 예후예측 인자를 알아내는 것이 중요하다. 최근 여러가지 실험적인 근거에 의거하여 Weidner등이 49명의 침윤성 유방암에서 전이와 미세혈관의 수(microvessel count, MVC)간에 통계학적으로 유의한 상관관계가 있음을 보여 주었다<sup>5</sup>. 이에 저자들은 유방암에서 신생혈관 형성의 숫자(MVC)와 다른 예후적인 인자들간에 연관성을 비교하여 신생혈관 밀도가 예후예측 인자로서 이용가능한지를 알아보려고 본 연구를 시도하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

본 연구는 1990년 1월부터 1992년 12월까지 한양대학병원 조직병리과에서 유방암종으로 변형근치유방절제술을 받은 123예 중 101예의 침윤성 유방암종을 대상으로 하였으며 나머지 22예는 이전 종괴 제거술로 수술표본에 종괴가 남아 있지 않아 제외

하였다.

### 2. 방 법

대상외 검체는 동상적으로 처리되어 진단되었던 유방암의 조직학적 유형, Bloom과 Richardson에 의한 종양의 조직학적 분화도<sup>6</sup> 및 림프전 전이 여부를 재검토하였다. 종양의 크기, 병기, DNA 유세포측정 결과, 에스트로겐 수용체(estrogen receptor, ER)와 프로게스테론 수용체(progesterone receptor, PR) 존재여부 등은 병리보고서를 참고하였고 환자의 임상적 추적관찰 결과는 입원 및 외래기록지에서 얻었다. 101예 중에 병리보고서에 종양의 크기와 병기를 기재하지 않은 것이 각각 2예 및 1예로서 알 수 있었고 3예는 침윤성 편세포암종이 이니어서 분화등급을 하지 않았다. 또 ER과 PR 존재여부, DNA 유세포 분석은 각각 62, 53, 53예에서만 시행되었다.

통상적인 방법으로 제작된 절편을 검토한 후 종양이 가장 많이 포함된 절편의 파라핀 블록을 선택하여 약 4 µm 두께의 절편을 만들었다. 혈관 내피 세포의 표지자로 Factor VIII 관련 항원(DAKO Co.)에 대한 면역조직화학염색을 HRP Streptavidin방법으로 시행하여 소혈관(세정맥 및 모세혈관)이 가장 많이 관찰되는 부위를 선택하여 2명의 병리의사가 200배 광학현미경 시야에서 가장 많은 미세혈관의 수(MVC)를 측정하였다. 수가 일치하지 않을 경우는 다시 두사람이 같이 세어서 정하였다(Fig. 1). MVC를 림프전 전이유무, DNA ploidy결과, ER과 PR에

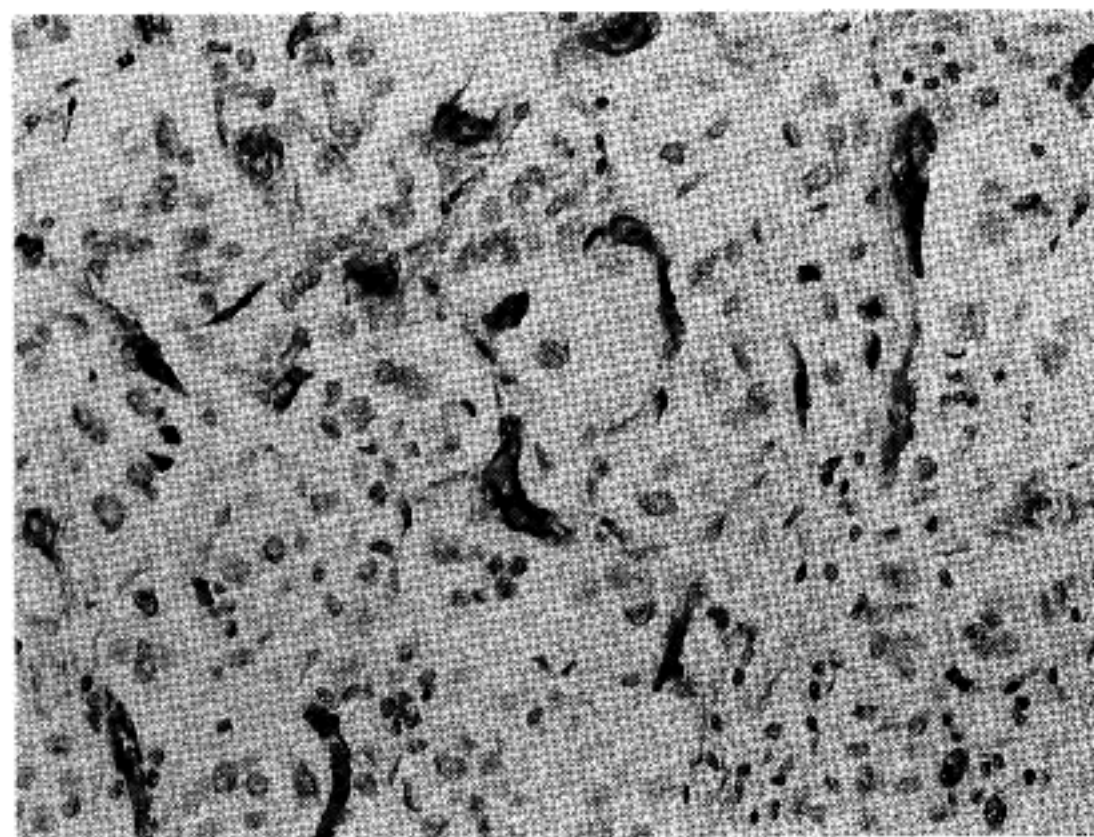


Fig. 1. Example of an area from a tumor with a high microvessel count (Immunoperoxidase staining for factor VIII-related antigen).

양성유무, DNA 유세포 분석결과 등은 t-검정을 이용하였고, 종양의 크기, 종양의 병기, 분화도 등은 분산분석(analysis of variance, ANOVA)을 이용하여 검정하였으며 통계학적 프로그램으로는 SPSS for window(ver 5.02)를 사용하여 분석하였다.

**결 과**

101예의 유방암종중 림프절 전이가 있었던 예는 50예로 이들의 최고 MVC는 23에서 252였으며 평균  $59.66 \pm 35$ 이었고, 림프절 전이가 없었던 51예의 최고 MVC는 7에서 79사이로 평균  $44.76 \pm 17$ 으로 낮아 MVC가 높을 수록 림프절 전이가 많았으며 통계학적으로 유의하였다( $p=0.009$ ) (Table 1 및 Fig. 2).

종양의 크기는 99예에서 알 수 있었는데 장경이 2 cm 이하가 24예로 평균 MVC가  $45.58 \pm 17$ 이었고, 장경 2~5 cm인 예가 65예로 평균 MVC가  $50.86 \pm 20$ 이었고, 장경이 5 cm 이상인 10예는 평균 MVC가

$78.8 \pm 67$ 로 크기의 증가에 따라 점차 증가되어 통계학적으로 유의한 차이를 보였다( $p=0.009$ )(Table 2). 종양의 병기(stage)와의 관계는 100예중 Stage I이 18예로 평균 MVC가  $43.77 \pm 17$ 이었고, Stage II가 60예로 평균 MVC가  $49.81 \pm 20$ , Stage III이 22예로 평균 MVC는  $65.54 \pm 67$ 로 병기가 높을수록 MVC의 증가를 보여 통계학적으로 유의한 차이를 보였다( $p=0.015$ ) (Table 3).

Bloom과 Richardson에 의한 종양의 조직학적 분화도는 98예중 등급 1은 16예였으며 평균 MVC가  $44.12 \pm 20$ 이었고, 등급 2는 48예로 평균 MVC가  $53.33 \pm 37$ , 등급 3은 34예였고 평균 MVC가  $55.18 \pm 17$ 로 점차 증가되었으나 통계학적 유의성은 없었다 ( $p=0.267$ ).

DNA 유세포 측정은 53예에서 시행되었으며 이중 diploidy는 27예로서 평균 MVC는  $42.59 \pm 17$ 였으며, aneuploidy는 26예로서 평균 MVC는  $54.53 \pm 26$ 으로 비배수성일수록 대체로 평균 MVC는 높았으나 통계학적 유의성은 없었다( $p=0.055$ ).

**Table 1.** Correlation of microvessel count(MVC) with status of axillary lymph node metastasis

Nodal status	No. of cases	Mean*(Range)	SD**
Negative	51	44.76(7~79)	17
Positive	50	59.66(23~252)	35

P=0.009 by Student t-test

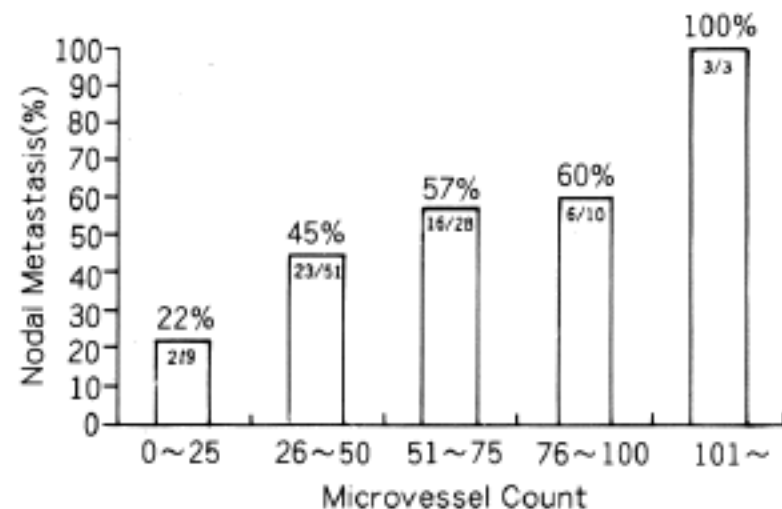
\*Mean: mean microvessel count

\*\*SD: Standard deviation

**Table 2.** Correlation of MVC with tumor size

Tumor size	No. of cases	Mean(Range)	SD
<2 cm	24	45.38(37~53)	17
2~5 cm	65	50.86(45~56)	20
>5 cm	10	78.80(30~127)	67

p=0.05 by ANOVA



**Fig. 2.** Nodal metastasis among 101 patients in relation to microvessel count in progressive increments. The incidence of metastasis increased as the vessel counts increased, reaching 100 percent among patients with counts above 100 per 200x field.

**Table 3.** Correlation of MVC with stage

Stage	No. of cases	Mean(Range)	SD
I	18	43.77(35~53)	17
II	60	49.81(45~54)	20
III	22	65.54(43~88)	67

p=0.05 by ANOVA

**Table 4.** Correlation between MVC and the other prognostic parameters

	Grade	DNA ploidy	ER*	PR**
P value	0.267	0.055	0.095	0.895

\*ER: estrogen receptor, \*\*PR: progesterone receptor

호르몬 수용체에 대한 면역조직화학염색에서 ER에 대한 검사가 시행되었던 62예중 음성인 33예의 평균 MVC는  $43.48 \pm 21$ 이었으며 양성인 29예의 평균 MVC는  $52.76 \pm 22$ 로 약간 높았다. PR에 대한 검사가 시행되었던 53예 중 음성인 47예의 평균 MVC는  $47.66 \pm 23.6$ 이었으며 양성인 6예의 평균 MVC는  $49.00 \pm 18.8$ 였다. ER과 PR의 양성여부와 MVC와의 통계학적 유의성은 없었다( $p=0.095, 0.895$ )(Table 4).

평균 MVC와 림프절 전이유무, 종양의 크기, 병기를 상호비교하여 상관계수(correlation coefficient)를 구하여 보았는데 각각 0.2575, 0.2631, 0.2427로 본 연구에서는 높은 상관계수를 보이지는 않았다.

평균 MVC의 수가 림프절 전이유무를 예측할 수 있는지를 통계학적으로 분석하여 보았는데 MVC의 cut off 값(value)을 50으로 정하는 경우에는 특이도(specificity)가 66.7%, 민감도(sensitivity)가 54.0%였으며, MVC를 51로 정하는 경우에는 특이도가 68.6%, 민감도가 50.0%로 낮은 특이도와 민감도 때문에 예측할만한 수치를 얻지는 못했다. 본 연구대상 101명 중 현재까지 2명만이 사망하여 MVC를 사망한 예와 비교하지는 않았다.

## 고 찰

암세포의 유발, 성장 및 과급은 종양세포의 증식 뿐만 아니라 종양이 자라는 부위조직의 반응에 따라 다르다. 암이 전이하기 위해서는 종양세포와 비종양성 혈관, 면역계와 결합조직간의 여러가지 중요한 상호작용이 일어나게 된다. 종양의 신생혈관형성은 종양의 생물학적 동태에 중요하다.

종양의 성장은 맥관형성에 의존한다는 여러가지 실험적 증거가 있다<sup>1</sup>. 몇 mm 정도의 작은 종양이 처음 생겨 성장을 계속하기 위해서는 새로운 모세혈관형성을 유도하게 된다. 이렇게 되면 종양세포가 모세혈관을 통해 순환하기가 용이해져서 되어 전이가 일어나게 된다<sup>2</sup>. 이 과정에서 맥관형성의 유도에는 여러인자가 작용하게 된다. 1971년 Folkman<sup>3</sup>은 종양 성장은 맥관형성과 관계있다는 개념을 처음으로 제안하였고 일단 종양이 생기면 종양세포들이 증식하기 위하여 종양으로 향하는 새로운 모세혈관의 증가가 선행하게 된다. 이런 가설은 그후 많은 연구를 통해 맥관형성분자들의 염기서열결정과 cloning을 하게 되었다<sup>4</sup>. 맥관억제성 스테로이드(angiostatic steroids), 맥관형성 방해물질(angiogenesis inhibitors)과 맥관형성성 질환(angio-genic disease)을 설명하려는 연구가 시도되었다<sup>10-12</sup>.

Folkman등<sup>13</sup>은 맥관형성에 관여하는 tumor angiogenesis factor (TAF)라는 매개체를 처음으로 악성 종양에서 추출하고 이 인자의 맥관형성 억제능(antiangiogenesis)을 악성 성장을 조절하기 위한 새로운 접근방법으로 제안하였다<sup>8,14</sup>. 여러가지 맥관형성에 관여하는 폴리펩타이드가 밝혀졌는데 중요한 성장인자로는 산성과 염기성 섬유모세포성 성장인자(acidic and basic fibroblastic growth factor(A & B FGF), angiogenin, 종양괴사인자- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), transforming growth factor  $\alpha$ 와  $\beta$ 등이며<sup>9</sup> 그 외에도 지방으로 이루어진 여러 인자가 관여하는 것으로 알려져 왔다. 이들은 혈관의 내피세포에 직접작용하여 유사분열을 자극하거나 동원되는 숙주세포(대식세포 등)에 간접적으로 작용하여 혈관 내피세포성 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)를 유리시켜 작용하기도 한다<sup>9</sup>.

사람의 종양에서 맥관형성의 정도가 전이의 가능성을 예측할 수 있다는 정량적 근거는 피부의 악성 흑색종에서 처음으로 보고되었다<sup>15-17</sup>.

종양세포에서 맥관형성능(angiogenic activity)의 시작은 종양의 전 과정에서 아주 다른 시기에 일어날 수 있다. 예를 들어 자궁경부암은 종양이 생기기 이전에 맥관형성이 생기며, 방광암과 유방암은 종양과 동시에, 그리고 악성흑색종과 복강내에 착상된 난소암은 종양발생 이후에 맥관형성이 이루어진다<sup>1</sup>. 특히 유방암에서는 종양의 형성과 동시에 맥관형성이 이루어지기 때문에 이것으로 종양의 생물학적 진행과정을 어느정도 예측할 수 있는 지표가 될 수 있다.

Bosari등<sup>18</sup>이 처음으로 유방암종을 이용하여 맥관형성과 종양재발 또는 원격전이와의 연관관계를 9년간의 추적조사를 통하여 연구하였다. 그들은 림프절 전이가 없는 88명과 림프절 전이가 있는 32명을 대상으로 factor VIII-관련 항원과 blood group isoantigens(ABH)를 염색하여 MVC를 측정하였는데 림프절 전이가 있는 환자에는  $99 \pm 22$ 로 그렇지 않은 환자의 MVC  $73 \pm 22$ 보다 의미있는 증가를 보였다고 했다. 또한 림프절 전이가 없는 환자 중에는 원격재발이 있는 환자가  $84 \pm 19$ 로 재발이 없었던 예의  $70 \pm 22$ 에 비해 높은 MVC를 보였다. 그들은 예후예측치를 84로 잡았는데 84이하에서는 20%에서 재발하였고 84이상에서는 57%가 재발하였다. 또 Weidner등<sup>19</sup>은 MVC 100 이상일 때는 진단 33개월 후에 모두 재발하였고 MVC가 33 이하일 때는 5% 미만에서 재발하였다고 한다. 더우기 림프절 전이가 없는 환자에서 MVC가 전체 생존에서 유일한 의미있



는 예측기준이라고 하였다. 본 연구에서는 림프절 전이가 있었던 50예의 평균 MVC는  $59.66 \pm 35$ 였고 림프절 전이가 없었던 51예의 평균 MVC는  $44.76 \pm 17$ 로 유의한 차이를 보여 예후인자로서 MVC 측정이 의의가 있다고 생각된다. 그러나 Bosari 등이나 Weidner 등 처럼 예후예측치를 정하여 분석한 결과 본 연구에서 MVC를 50으로 정하면 특이도가 66.7%, 민감도가 54%였고 MVC를 51로 정하는 경우는 특이도가 68.6%, 민감도가 50%로서 비교적 낮게 나타났다. 이러한 결과들은 본 연구에서 그랬듯이 낮은 민감도와 낮은 특이도 때문에 MVC를 실제로 임상에 적용하는 것은 아직 무리가 있다고 생각한다. 또한 MVC의 숫자를 세는데 문제가 되는 것은 혈관 내피 세포에 대한 면역조직학적 발현 정도이다. 실제로 ABH보다는 factor VIII-관련 항원이 더 발현정도가 좋은 것으로 되어 있으며<sup>18</sup>, factor VIII-관련 항원보다는 CD31이 더 나은 발현을 나타낸다고 한다<sup>20</sup>. 이러한 결과는 각 항원이 혈관 내피 세포의 생성 과정 중 어느 단계에 작용하여 발현하느냐에 따라 다양하게 나타날 수 있다. 또 실제로 면역조직 화학 연구가 아주 원시적인 구조로 새로 만들어진 혈관을 얼마나 구별할 것인가도 해결해야 할 문제이다. 따라서 내피세포 표지자와 더불어 여러 맥관 형성 관련 인자들과 염증세포 등에 대한 연구도 병행되어야 더욱 정확하게 종양의 맥관형성 정도를 예측할 수 있을 것이다. Bosari 등<sup>18</sup>은 높은 MVC는 종양재발에 중요한 인자로 작용하기는 하지만 종양의 크기와 DNA 유세포 측정결과 s-phase fraction과는 무관하다고 하였다. 본 연구에서는 MVC는 림프절 전이, 종양의 크기, 병기와는 통계학적으로 의미 있는 상관관계를 보였지만 그 밖에 종양의 분화도, ER, PR 결과, DNA ploidy를 위한 유세포 측정결과와는 통계학적으로 유의한 상관관계를 보이지 못하였다.

본 연구 결과를 기본으로하여 유방암의 다른 예후인자들과 더불어 하나의 예후적 인자로서 MVC를 측정하는 것이 유방암환자의 치료에 이용될 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 본 연구대상 환자 중, 2명만이 사망하였고 추적기간이 짧아 MVC치를 치료의 방법이나 생존율과 비교할 수 없었으므로, 이에 대해서는 앞으로 더 연구가 되어야 할 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Folkman J. What is the evidence that tumors are an-

- giogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 4-6.
2. Sigurdsson H, Baldetorp B, Borg Å, et al. Indicators of prognosis in node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 1990; 322: 1045-53.
3. McGuire WL. Adjuvant therapy of node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 1989; 320: 525-7.
4. DeVita VT. Breast cancer therapy: Exercising all our options. *N Engl J Med* 1989; 320: 527-9.
5. Weider N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-Correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324: 1-8.
6. 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.
7. Gimbrone MA, Leapman SB, Cotran RS, Folkman J. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J Exp Med* 1971; 136: 261-76.
8. Folkman J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182-6.
9. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235: 442-7.
10. Crum R, Szabo S, Folkman J. A new class of steroids inhibits angiogenesis in the presence of heparin or a heparin fragment. *Science* 1985; 230: 1375-8.
11. Inoue K, Korenaga H, Tanaka NG. The sulfated polysaccharide-peptidoglycan complex potently inhibits embryonic angiogenesis and tumor growth in the presence of cortison acetate. *Carbohydr Res* 1988; 181: 135-42.
12. Rastinejad F, Polverini PJ, Bouch NP. Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene. *Cell* 1989; 56: 345-55.
13. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 1971; 133: 275-88.
14. Folkman J. Anti-angiogenesis: New concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 1972; 175: 409-16.
15. Srivastava A, Laidler P, Hughes LE, Woodcock J, Shedden EJ. Neovascularization in human cutaneous melanoma: a quantitative morphological and Doppler ultrasound study. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1986; 22: 1205-9.
16. Srivastava A, Laidler P, Davies RP, Horgan K, Hughes LE. The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0.76-4.0 mm thick) skin melanoma: a quantitative histologic study. *Am J Pathol* 1988; 133: 419-23.

17. Herlyn M, Clark WH, Rodeck U, Mancianti ML, Jambrosic J, Koprowski H. Biology of tumor progression in human melanocytes. *Lab Invest* 1987; 56: 461-74.
  18. Bosari S, Lee AKC, DeLellis RA, Wiley BD, Heatley GJ, Silverman ML. Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. *Hum Pathol* 1992; 23: 755-61.
  19. Weider N, Folkman J, Pozza F, et al. Tumor angiogenesis: A new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1875-87.
  20. Horak ER, Leek R, Klenk N, et al. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* 1992; 340: 1120-4.
-