

유방암종에서 p27^{kip1} 단백질의 세포 내 발현 위치와 예후와의 관련성

홍숙희 · 김대철 · 조세현¹ · 홍영섭²

동아대학교 의과대학 병리학교실
외과학교실, ²예방의학교실

접 수 : 2006년 2월 6일
게재승인 : 2006년 4월 10일

책임저자 : 홍 숙 희
우 602-715 부산시 서구 동대신동 3가 1
동아대학교 의과대학 병리학교실
전화: 051-240-2923
Fax: 051-243-7396
E-mail: shhong@dau.ac.kr

*본 연구는 2004학년도 동아대학교 학술연구비(공모과제) 지원을 받아 이루어졌음.

포유류 세포에서 세포의 성장과 분화는 세 군의 세포주기 조절 단백질, 즉 cyclin, cyclin-dependent kinase (CDK) 및 CDK inhibitor (CDKI)의 상호작용에 의해 조절된다.¹ CDK의 기능은 cyclin과 결합하면 활성화되고 CDKI와 결합하면 억제된다. CDKI에는 cyclin/kinase inhibitor proteins (Cip/Kip)군과 INK4군의 두 군이 있으며, 이들은 CDK와 cyclin의 결합을 방해하여 세포주기 진행을 억제하고 무제한적인 세포증식을 막는다. 따라서 CDKI의 기능에 이상이 생기면 세포증식을 초래할 수 있다. Cip/Kip에 속하는 p21, p27, p57 단백질은 CDK2의 강력한 억제인자로서 G1기를 정지시켜 세포성장을 멈추게 한다. CDKI 중 p27은 핵단백으로 여러 종류의 cyclin/CDK 복합체와 결합하여 키나아제 활동을 억제하여 세포증식을 막는 종양 억제 단백질로

Subcellular Localization of p27^{kip1} in Breast Cancer and Its Prognostic Significance

Sook Hee Hong, Dae Choel Kim, Se Heon Cho¹ and Young Seoub Hong²

Departments of Pathology, ¹Surgery, and ²Preventive Medicine, Dong-A University Medical School, Busan, Korea

Background : p27 is a member of the cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors that arrest the progression of the cell cycle; thus, it acts as a tumor suppressor gene. The loss or decrease of p27 protein is frequently seen and this has an independent prognostic potential for many human cancers. p27 is functionally inactivated through accelerated proteolysis and cytoplasmic sequestration. Cytoplasmic mislocalization of p27 by abnormal phosphorylation in the tumor cells doesn't allow it to bind and inhibit nuclear cyclin/CDK targets. **Methods :** We examined the p27 protein expression in 86 cases of invasive ductal carcinoma of the breast via immunohistochemical staining to evaluate the subcellular localization of p27 and its relationship with the clinicopathologic features and the prognostic factors. **Results :** The nuclear expression of p27 was noted in 48.9% of the tumors, a combined nuclear and cytoplasmic expression was noted in 20.9%, a cytoplasmic expression was noted in 12.8%, and a negative expression was noted in 17.4%. The decreased nuclear expression and/or cytoplasmic mislocalization of p27 were statistically correlated with the nuclear grade (p=0.001), histologic grade (p=0.036), tumor size (p=0.033), lymph node metastasis (p=0.043), ER (p=0.001), and PR (p=0.001) status, while they were not correlated with patient age, stage, HER2, p53, and Ki67. **Conclusions :** The breast tumors showing both decreased nuclear expression and cytoplasmic mislocalization of p27 are associated with a deranged cell cycle via functional inactivation and also with poor prognostic factors. It is expected that p27 can be a promising anticancer target molecule for the treatment of breast cancer.

Key Words : Breast cancer; CDK inhibitor p27; Immunohistochemistry; Prognosis

알려져 있다. 또 이러한 세포증식 억제 기능 외에도 세포분화, 노화, 세포사멸, 세포부착, 세포이동 등 다양한 기능을 하는 단백질로 알려져 있다.¹

p27의 활성도는 주로 세포 내에서 발현되는 양에 의해 조절된다. 세포주기 동안에 p27의 mRNA와 단백질함성은 일정하므로 세포 내 p27 양은 ubiquitin-proteasome에 따른 단백질분해 등 전사 후 조절에 의하여 변한다.^{1,2} p27이 하는 역할을 다룬 연구 중에서 p27 결손 쥐에게서 장기 증식증과 뇌하수체 종양이 발생한다고 보고한 연구도 있어,³ p27의 절대량이 세포주기 조절에 중요함을 알 수 있다.

또한 여러 가지 종양에서 p27 발현 정도는 세포증식과 반비례 관계를 보여, p27 발현이 감소한 종양은 과도한 세포증식을 일으

켜 나쁜 예후를 보이는 것으로 알려져 있다.^{2,4-6} 그러나 p27 발현은 높지만 세포증식은 억제되지 않는 종양에서는 p27이 핵이 아닌 세포질에 잘못 발현된 현상이 관찰된다. 이러한 현상은 p27이 핵이 아닌 세포질에 격리됨으로써, 핵 안의 cyclin E/CDK2와 결합하여 키나아제를 억제시켜 세포주기를 정지시키는 p27의 고유 기능이 상실되어 세포증식이 일어나는 것으로 생각된다.⁷⁻⁹

또한 세포질에 발현하는 p27은 세포이동과 관련이 있다는 연구 결과가 있어 세포 내에서 p27이 발현하는 위치에 따라 기능이 달라진다는 사실을 알 수 있다.¹ 종양세포에서 발생하는 단백질 분해에 따른 핵 p27의 감소와 p27의 세포질 내 격리는 서로 다른 기전에 의하여 일어나는 것으로 알려져 있다.^{9,10} 종양세포에서는 protein kinase B/Akt (Akt)의 활성화에 따른 비정상적인 p27 인산화와 분해에 의해 세포질 p27이 발현된다.⁸⁻¹² 이러한 현상은 종양의 분화가 나쁘고 진행된 암에서 잘 나타나며, 또 이러한 환자는 생존율도 낮다고 한다.^{7,10,13} 그러므로 세포증식에 관여하는 p27이 종양의 예후인자로서 가치가 있는지 정확하게 평가하려면 종양세포에서 p27 발현의 감소뿐만 아니라 세포질 p27 발현에 대한 평가를 병행해야 할 것이다. 종양에서 발현하는 p27에 관한 연구는 주로 핵에서 발현하는 p27을 관찰한 결과를 토대로 한 것이며, 국내 연구에서도 세포질 발현을 관찰한 연구는 찾아보기가 어렵다.¹⁴⁻¹⁸

유방암은 서양 여성에게서 가장 흔히 발생하는 악성 종양이며, 우리나라에서도 점차 발병률이 증가하여 현재 여성 암 발생률 1위를 차지하고 있다. 유방암의 예후는 흔히 조직학적 분류, 조직학적 등급, 종양의 크기, 호르몬 수용체 상태, 임상 병기 등으로 평가하여 적절한 치료방법을 선택하고 있다. 특히 초기 유방암 환자에서는 림프절 전이 유무와 호르몬 수용체 발현 유무에 근거하여 적절한 보조요법을 시행하고 있으며, 재발을 방지하고 생존율을 높이기 위한 여러 가지 치료방법이 제시되고 있다.^{5,11,12,19-21} 그리고 이러한 연구 결과를 기초로 초기 유방암 환자의 재발 위험이나 치료에 대한 반응을 예견할 수 있는 지표를 찾고자 노력하고 있다. 그러나 임상적으로 유용한 정보는 소수에 불과하며, 아직도 많은 연구가 필요한 실정이다.

본 연구는 한국 여성에게서 가장 흔하게 발생하는 유방암 중 침윤성 관상암 조직에서 p27 단백질에 대한 면역조직화학 검사를 시행하였다. 그리하여 종양세포에서 p27 단백질의 발현 정도와 세포 내에서 발현하는 위치의 변동이 유방암의 예후 관련 인자로 알려진 임상병리학적 인자들과 어떤 상관관계가 있는지 살펴보고, p27이 유방암의 예후인자로서 가치가 있는지 알아보려고 한다.

재료와 방법

2003년 1월부터 12월까지 동아대학교 병원에서 변형 근치 유방 절제술을 받은 환자 중 침윤성 관상암으로 진단받고 종양조직이 충분한 86예를 선택하였다. 환자의 나이, 종양의 크기, 핵

및 조직학적 등급, 림프절 전이 유무, 임상 병기는 병력지를 검토하여 조사하였다.

면역조직화학 염색 방법

유방암 조직의 헤마톡실린-에오신 염색표본을 재검색하여 종양을 대변할 수 있는 가장 대표적인 파라핀 포매 블록 1, 2개를 선택하였다. 그런 다음 p27, 에스트로겐 수용체(ER), 프로게스테론 수용체(PR), HER2, p53 및 Ki67 단백질에 대한 면역조직화학 염색을 시행하였다. 면역조직화학 염색은 EnVision™ Chem-Mate™ Detection Kit (Dako, Carpinteria, CA, USA)를 사용하여 표본의 전 처치로 전자오븐에서 15분간 가열한 후 통상적인 방법으로 시행하였다.

본 연구에 사용한 일차항체는 p27 (Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA, 1:400), ER (Dako, 1:50), PR (Dako, 1:200), HER2 (NeoMarkers, Fremont, CA, USA, 1:200), p53 (Dako, 1:100), Ki67 (Dako, 1:100)이다.

면역조직화학 염색 판독

p27 발현은 광학현미경으로 관찰하여 종양세포 주위의 정상 유방조직의 근상피세포와 림프구 핵을 양성 대조세포로 하여 종양세포의 핵이나 세포질이 적갈색으로 염색되면 양성 반응으로 판독하였다. 세포 내에서 p27이 발현하는 양상은 Baldassarre 등⁷의 기준을 참고로 하여 네 가지로 나누었다. 종양세포 중 p27 양성 세포가 15% 미만이면 p27 음성 종양으로 판정하였고, 종양세포의 15% 이상이 염색되면 p27 염색의 강도와 상관없이 p27 양성 종양으로 판정하였다. 다시 p27 양성 종양은 세포 내에서 p27이 발현하는 위치에 따라 세 가지 형으로 나누었다. p27 양성 세포 중 50% 이상이 핵에서 양성 반응을 보이면 핵 p27 발현 종양(N p27)으로, p27 양성 세포 중 15-50%가 핵과 세포질에서 동시에 양성 반응을 보이면 혼합 p27 발현 종양(NC p27)으로, 그리고 핵 p27 발현은 15% 미만이나 p27 양성세포 중 35% 이상이 세포질에 양성 반응을 보이면 세포질 p27 발현 종양(C p27)으로 판정하였다(Fig. 1).

ER, PR, p53은 5% 이상의 종양 세포핵이 염색되면 양성 종양으로 분류하였다. HER2는 10% 이상의 종양세포에서 연속적인 세포막 염색을 보이는 2+ 이상을 양성 종양으로 분류하였다. Ki67 염색에서는 Spataro 등²¹의 연구를 참고하여 양성 세포가 8% 이상이면 높은 Ki67 발현 종양으로 분류하였다.

통계학적 분석

p27 단백질에 대한 면역조직화학 검사에서 p27의 발현 양상과 발현 위치에 따라 나눈 네 가지 분류(N p27/NC p27/C p27/음성)와 종양의 임상병리조직학적 소견 및 다른 여러 단백질 발현

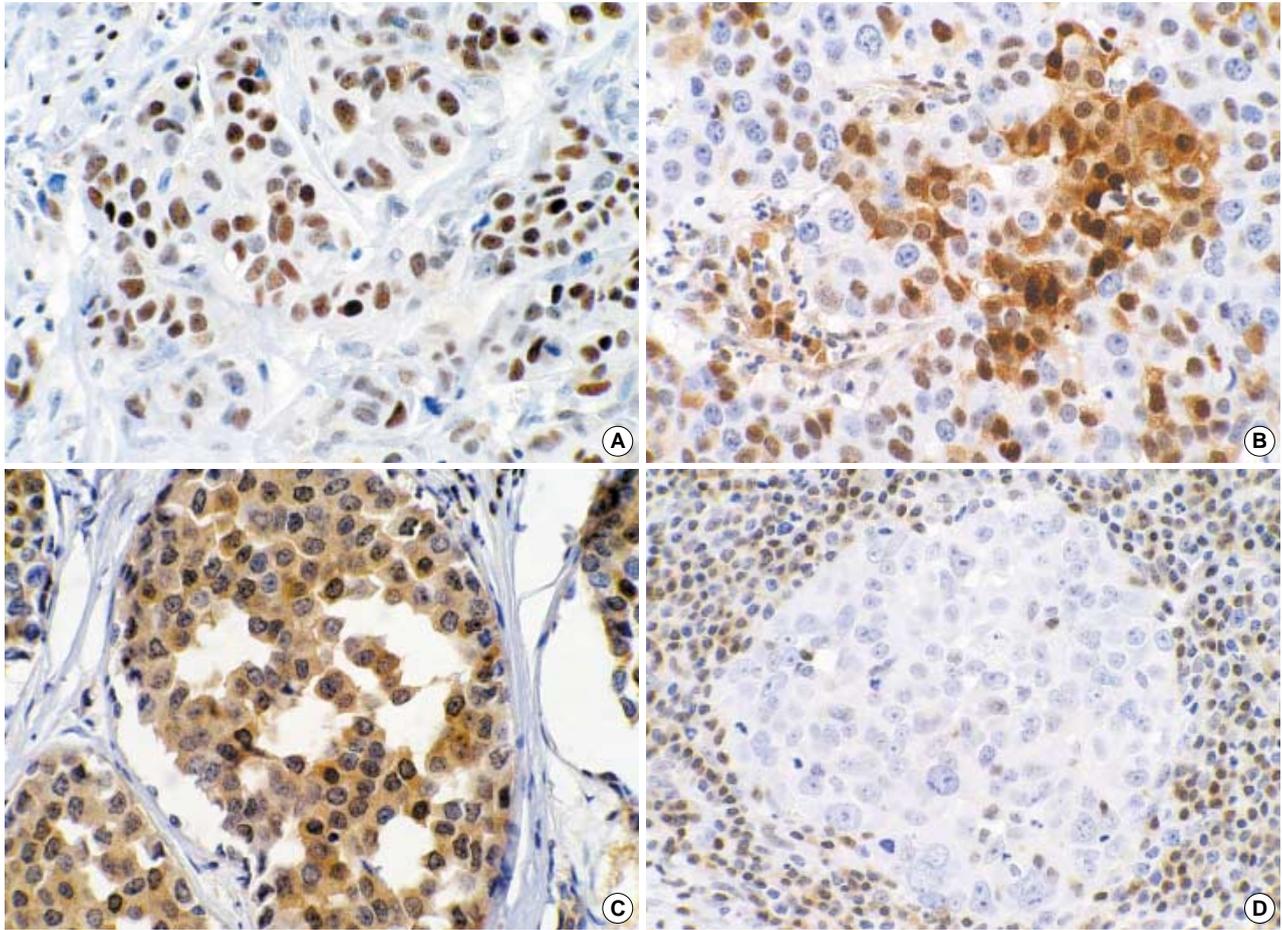


Fig. 1. Immunohistochemical stain for p27 shows nuclear (A), mixed nuclear-cytoplasmic (B), cytoplasmic (C) and negative (D) expression in breast carcinoma.

양상의 상관관계를 분석하였다. p27 발현 양성 종양을 판정하는 기준이 연구자마다 다르므로 그 기준에 따라 상관관계 분석에서 다소 차이를 보일 것으로 가정하여, p27 양성 종양의 기준을 50% 이상 핵 발현, 15% 이상 핵 발현, 15% 이상 핵과 세포질 혼합 발현의 세 가지로 나누어 각각의 사례를 비교 분석하였다. 양성 기준을 자세히 설명하면, 첫 번째 기준은 핵 발현이 50% 이상인 종양을 p27 양성 종양, 핵 발현이 50% 미만으로 감소하거나 세포질 발현을 보이는 종양을 음성 종양으로 판정하였고(N p27/NC p27+C p27+음성), 두 번째 기준은 핵 발현이 15% 이상인 종양을 p27 양성 종양, 15% 미만으로 감소한 종양을 음성 종양으로 판정하였고(N p27+NC p27/C p27+음성), 세 번째 기준은 p27 발현이 핵과 세포질에서 15% 이상인 모든 종양을 양성 종양, 15% 미만인 종양을 p27 음성 종양으로 판정하였다(N p27+NC p27+C p27/음성).

통계분석은 개인용 컴퓨터 통계 프로그램인 SPSS (version 12.0)를 이용하여 χ^2 test로 검정하였다. 유의 수준은 p값이 0.05 이하일 때로 하였으며 수치로 표시하였다.

결 과

임상병리학적 소견

대상 환자의 나이는 25세부터 76세까지로 평균 50세이었다. 종양의 크기는 0.5 cm부터 8 cm까지로 평균 2.7 cm이었다. 감시 림프절과 액와 림프절을 포함하여 림프절 전이는 43예(50%)에서 일어났다.

면역조직화학 검사 결과 대상 환자 중 ER 양성은 50예(58.1%), PR 양성은 46예(53.5%)였으며, HER2 양성은 32예(37.2%), p53 양성은 47예(54.7%)였다. Ki67에 대한 면역조직화학 염색 결과 양성 세포 수는 0-90%까지 다양하였으며 8% 이상 높은 지수를 보인 예는 78예(90.7%)였다.

p27 발현 양상과 임상병리학적 인자들의 상관성

유방암 세포에서 p27은 핵과 세포질에서 다양한 비율로 발현되었다. 15% 이상의 종양세포에서 p27이 양성인 종양은 71예

Table 1. Relationship between subcellular localization of p27 and clinicopathologic parameters in breast cancer

Parameters	No. of cases (%)	Subcellular localization of p27 (%)				p value
		N p27*	NC p27 [†]	C p27 [‡]	Negative [§]	
No. of cases (%)	86 (100)	42 (48.9)	18 (20.9)	11 (12.8)	15 (17.4)	
Age (yr)						0.715
≤50	46 (53.5)	21 (24.4)	11 (12.8)	7 (8.1)	7 (8.1)	
>50	40 (46.5)	21 (24.4)	7 (8.1)	4 (4.7)	8 (9.3)	
Nuclear grade						0.001
I	11 (12.8)	7 (8.1)	0 (0)	4 (4.7)	0 (0)	
II	42 (48.8)	29 (33.7)	6 (7.0)	4 (4.7)	3 (3.5)	
III	33 (38.4)	6 (7.0)	12 (14.0)	3 (3.5)	12 (14.0)	
Histologic grade						0.036
I	20 (23.3)	12 (14.0)	1 (1.2)	6 (7.0)	1 (1.2)	
II	23 (26.7)	17 (19.7)	2 (2.3)	2 (2.3)	2 (2.3)	
III	43 (50)	13 (15.1)	15 (17.4)	3 (3.5)	12 (14.0)	
Stage						0.583
I	19 (22.1)	11 (12.8)	3 (3.5)	1 (1.2)	4 (4.7)	
II	49 (57.0)	22 (25.6)	9 (10.5)	8 (9.3)	10 (11.6)	
III	17 (19.8)	8 (9.3)	6 (7.0)	2 (2.3)	1 (1.2)	
Tumor size (cm)						0.033
≤2	39 (45.3)	27 (31.4)	4 (4.7)	4 (4.7)	4 (4.7)	
>2	47 (54.7)	15 (17.4)	14 (16.3)	7 (8.1)	11 (12.8)	
Lymph node metastasis						0.075
Negative	43 (50)	21 (24.4)	5 (5.8)	6 (7.0)	11 (12.8)	
Positive	43 (50)	21 (24.4)	13 (15.1)	5 (5.8)	4 (4.7)	
Estrogen receptor						0.001
Negative	36 (34.9)	9 (10.5)	12 (14.0)	3 (3.5)	12 (14.0)	
Positive	50 (58.1)	33 (38.4)	6 (7.0)	8 (9.3)	3 (3.5)	
Progesterone receptor						0.001
Negative	40 (46.5)	11 (12.8)	12 (14.0)	4 (4.7)	13 (15.1)	
Positive	46 (53.5)	31 (36.0)	6 (7.0)	7 (8.1)	2 (2.3)	
HER2						0.640
Negative	54 (62.8)	29 (33.7)	10 (11.6)	7 (8.1)	8 (9.3)	
Positive	32 (37.2)	13 (15.1)	8 (9.3)	4 (4.7)	7 (8.1)	
p53						0.127
Negative	39 (45.3)	18 (20.9)	9 (10.5)	8 (9.3)	4 (4.7)	
Positive	47 (54.7)	24 (27.9)	9 (10.5)	3 (3.5)	11 (12.8)	
Ki67						0.500
<8%	8 (9.3)	4 (4.7)	0 (0)	2 (2.3)	2 (2.3)	
>8%	78 (90.7)	38 (44.2)	18 (20.9)	9 (10.5)	13 (15.1)	

*N p27 (nuclear localization) was assigned when more than 50% of cells staining positive for p27 had nuclear p27 staining; [†]NC p27 (mixed nuclear and cytoplasmic localization) was assigned when 15-50% of cells that stained for p27 had simultaneous cytoplasmic and nuclear staining; [‡]C p27 (cytoplasmic localization) was assigned when less than 15% of cells were positive for nuclear p27 and more than 35% of p27-positive cells had clear cytoplasmic staining; [§]negative was assigned when less than 15% of cells were positive for p27 staining.

(82.6%)였다. 이들을 세포 내에서 발현한 위치에 따라 나누어 보면, 50% 이상의 핵에서 발현된 핵 발현 종양은 42예(48.9%), 핵과 세포질에서 발현된 혼합 발현 종양은 18예(20.9%), 세포질 발현 종양은 11예(12.8%)였다. 15% 미만으로 발현된 p27 음성 종양은 15예(17.4%)였다(Table 1).

p27 발현 양상과 종양의 핵 등급의 상관관계를 분석해본 결과, 핵 p27 발현이 50% 미만으로 감소하거나 세포질 p27 발현을 보이는 종양은 핵 등급이 비교적 낮은 I과 II등급의 53예 중 17예(32.1%)에서, 핵 등급이 높은 III등급의 33예 중 27예(81.8%)에서 나타나 핵 등급이 높을수록 핵 p27 발현이 감소하는

빈도가 높아 핵 등급과 p27 발현은 통계학적으로 유의한 상관관계를 보였다($p=0.001$).

p27 발현 양상과 조직학적 등급의 상관관계를 분석해보면, 핵 p27 발현이 50% 미만으로 감소하거나 세포질 p27 발현을 보이는 종양은 I과 II등급 43예 중 14예(32.6%)에서, III등급 43예 중 30예(69.8%)에서 나타나 조직학적 분화가 나뉠수록 핵 p27 발현이 감소하는 빈도가 높아 조직학적 등급과 p27 발현은 통계학적으로 유의한 상관관계를 보였다($p=0.036$).

p27 발현 양상과 종양의 크기의 상관관계를 살펴보면, 핵 p27 발현이 50% 미만으로 감소하거나 세포질 p27 발현을 보이는

종양은 크기가 2 cm 이하인 39예 중 12예(30.8%)에서, 2 cm 이상인 47예 중 32예(68.1%)에서 나타나 종양의 크기가 클수록 핵 p27 발현이 감소하는 빈도가 증가하여 종양의 크기와 p27 발현은 통계학적으로 유의한 상관관계를 보였다($p=0.033$).

림프절 전이와 p27 발현의 상관관계를 분석해보면, 50% 이상 핵 p27 발현은 림프절 전이가 없는 43예 중 21예(48.8%)에서, 림프절 전이가 있는 43예 중 21예(48.8%)에서 나타나 림프절 전이와 p27 발현은 유의한 상관관계를 보이지 않았다($p>0.05$). 그러나 p27 양성 종양의 판정 기준을 15%로 달리 하여 분석하였을 때 p27 발현이 15% 이하인 p27 음성 종양은 림프절 전이 음성인 43예 중 11예(25.6%)에서, 림프절 전이 양성인 43예 중 4예(9.3%)에서 나타나 p27 음성 종양에서 림프절 전이 음성 빈도가 높았는데, 이 차이는 통계학적으로 유의하였다($p=0.043$). 또 p27이 핵에서 50% 이상 발현된 종양은 ER 양성 종양 50예 중 33예(66%)에서, PR 양성 종양 46명 중 31예(67.4%)에서 나타나 ER 및 PR 발현과 p27 발현은 통계학적으로 유의한 상관관계를 보였다($p=0.001$).

이상의 결과를 종합하면 p27 발현 양상은 종양세포의 핵 등급, 조직학적 등급, 종양의 크기, 림프절 전이, ER, PR과 통계학적으로 유의한 상관관계를 보인 반면, 환자 나이, 임상 병기, HER2, p53, Ki67 발현과는 상관관계를 보이지 않았다($p>0.05$).

본 연구에서는 p27 양성 유방암의 판정 기준을 세 가지로 달리 하여 각각의 경우에서 임상병리학적 소견 및 다른 단백 발현과의 상관관계를 다시 분석하였다. p27 양성 유방암의 판정 기준을 50% 이상 핵 발현군으로 정했을 때는 핵 등급, 조직학적 등급, 종양 크기, ER, PR의 다섯 가지 인자와 유의한 상관관계를 보였다. 그렇지만 15% 이상 핵 발현군만으로 정했을 때는 핵 등급과 PR의 두 가지 인자만 유의한 상관관계를 보였고, 15% 이상 핵과 세포질 발현군으로 정하였을 때는 핵 등급, 조직학적 등급, 림프절 전이, ER, PR의 다섯 가지 인자와 유의한 상관관계를 보여 약간의 차이를 보였다. 그러나 p27 양성 종양의 판정 기준을 세 가지로 나누어 분석하였음에도 핵 등급과 PR은 세 가지 경우 모두에서 p27 발현과 통계학적으로 유의한 상관관계를 보여주고 있어, p27 발현 감소는 유방암의 예후인자로서 의미가 있는 소견으로 생각된다.

고 찰

여러 종류의 인체 종양에서 세포주기를 조절하는 cyclin, CDK, CDKI의 변화가 자주 관찰된다. 그리고 p27 발현 감소는 위암,¹⁸ 결장직암,^{2,16,22} 갑상선암,⁷ 난소암,¹³ 신장암¹⁶ 등 여러 인체 암에서 다양한 빈도로 나타나며, 이러한 종양에서는 p27의 기능이 비활성화되는 것으로 보고되어 있다. 따라서 발현 감소로 인한 p27의 기능 이상은 종양의 진행과 예후와 관련성을 보이므로 p27은 암의 악성도를 평가할 수 있는 인자 가운데 하나라고 할

수 있다.

유방암에서 핵 p27 발현은 41-69% 정도 감소하는 것으로 보고되어 있으며,²¹ p27 발현이 감소한 종양은 높은 조직학적 등급, ER 음성, PR 음성, cyclin D1 감소, HER2 과발현, Ki-67 증가, S기 분획의 증가, 재발 위험률 증가, 항에스트로겐에 대한 저항, 생존율 감소 등 나쁜 예후를 보이는 인자와 관련이 있어 예후인자로서 p27의 가치를 긍정적으로 평가하고 있다.^{4,5,14,15,19-22}

국내 유방암 환자를 대상으로 p27 발현에 대해 연구한 결과를 보면, 45명의 유방암 조직을 대상으로 조사한 강 등¹⁴은 핵 p27 발현이 25% 이하로 감소한 유방암은 69%였고, 이들에서는 림프절 전이가 높고 생존율도 낮아 예후인자로 가치가 있다고 하였다. 183예의 유방암을 대상으로 한 김 등¹⁵의 연구에서는 핵 p27 발현이 50% 이하로 감소한 빈도가 59%였으며, 이들도 나쁜 예후인자들과 상관관계를 보이고 또 생존율과도 연관이 있다고 하였다. 본 연구에서는 면역조직화학 검사를 시행하여 p27 발현을 핵뿐만 아니라 세포질에서 동시에 관찰하였는데, 핵 p27 발현이 50% 미만으로 감소한 종양은 51.1%였으며, 15% 미만으로 감소한 종양은 30.2%였다. 또한 유방암 관련 임상병리학적 인자와 상관관계를 분석한 결과, 핵 p27 발현 감소는 종양세포의 핵 등급, 조직학적 등급, 종양 크기, 림프절 전이, ER, PR과 통계학적으로 유의한 상관관계를 보인 반면, 환자 나이, 임상 병기, HER2, p53, Ki67과는 관련이 없었다. 본 연구대상 환자의 추적 기간이 짧아 비록 생존율 조사는 하지 않았지만, 핵 p27 감소는 나쁜 예후인자와 관련이 있음을 나타내어 다른 연구들과 비슷한 소견을 보였다.

그러나 Barnes 등²³은 830명의 유방암 환자를 장기간 추적 조사한 결과를 다변량 분석하여, p27은 독립적인 예후인자로서 가치가 없어 p27은 유방암 세포의 증식과 분화에 관여하나 임상적으로 유용한 표지자는 아니라고 하였다. 유럽 유방암 환자 512명을 장기간(평균 9년간) 추적 조사한 Barbareschi 등²⁴은 p27 감소군은 나쁜 예후인자와 연관이 있으나, 림프절 전이 음성군 중에서 생존율은 p27 증가군보다 p27 감소군에서 오히려 높아 p27은 예후인자로서 가치가 없다고 하였다. 국내에서 102명의 유방암 환자를 대상으로 연구한 김 등¹⁷의 결과에서도 p27 발현과 예후인자 및 생존율과는 상관관계가 없다고 하였다.

이와 같이 p27이 종양의 예후 관련 인자로서 가치에 대해 저마다 다른 평가를 내리는 이유는 p27 양성 종양과 음성 종양의 판정 기준이 되는 핵 p27 발현 정도의 기준이 연구자마다 다르기 때문이기도 하지만, 세포주기를 조절하는 p27의 기능이 세포 내에서 발현하는 위치와 깊은 연관이 있고, 또 정상세포와 종양 세포에 존재하는 p27의 기능에 차이가 있기 때문이다. 대장암에서 p27의 발현을 Western blot 방법으로 조사한 Ciaparrone 등²은 핵 p27 양이 정상조직과 종양조직에서는 의미 있는 차이를 보이지 않았으나, 총 p27 양은 조직학적 등급과 병기가 높은 진행 암에서 감소하였고, 세포질 p27 양은 정상조직보다 종양조직에서 더 높다는 사실을 관찰하였다. 공격적인 진행을 보이는 다른

종양에서도 세포 내에서 p27 발현 위치를 자세히 관찰해보면 세포질에서 높게 발현되는 것을 확인할 수 있다. 이러한 소견은 p27의 발현 감소와 세포 내에서 발현하는 위치의 변동으로 인하여 p27의 불활성화를 야기해 p27의 세포주기 억제 기능이 상실되어 종양이 발생한다는 것을 암시한다.

세포질 p27은 대장암의 35%, 경계영역 종양을 포함한 난소암종의 55%, 갑상선암의 80%에서 발현되어 다소 높은 빈도로 나타나며, 분화가 나쁘고 진행된 암에서 잘 나타나며 이들의 생존율은 낮은 것으로 보고되어 있다.^{2,7,10,13} 유방암의 경우 세포질 p27이 약 40% 정도에서 발현되는 것으로 보고되어 있는데,^{8,10} 본 연구에서 세포질 p27 발현 종양의 빈도는 18예의 혼합 p27 발현 종양과 11예의 세포질 p27 발현 종양을 합하여 33.7%를 차지하였다. 유방암 조직에서 Western blot 방법으로 p27 총 단백질 양과 세포질 발현 양을 측정 한 Liang 등¹⁰은 이들 사이에는 상관관계가 없으며, 높은 핵 p27 발현군에서 생존율이 가장 높았으나 p27 감소와 더불어 세포질 p27 발현군에서 생존율이 가장 낮아, p27 감소뿐만 아니라 세포질 p27 존재 유무가 유방암 예후 평가에 중요하다고 주장하였다.

종양세포에서 p27 발현의 핵과 세포질 사이의 이동 과정 경로와 세포질 내 축적 기전은 확실히 밝혀져 있지 않다. p27은 핵단백으로 세포주기에서 G1기에서 S기로 진행을 억제하는 주 조절인자다. 세포주기 동안에 p27의 mRNA와 단백질성은 비교적 일정하므로 p27 양은 전사보다는 주로 유전암호해독(translation), cyclin D/CDK 복합체와의 결합, ubiquitin-proteasome 단백질 분해 등 전사 후 변화에 의해 조절되는데,¹ 휴지기 세포에서는 p27의 단백질 분해가 감소하기 때문에 핵에 많이 존재한다. 세포주기 동안에 p27 단백질 분해에 의한 p27 양의 조절과 핵과 세포질 사이의 이동에 의한 p27의 세포 내 발현 위치 변동은 서로 다른 기전에 의하여 매우 복잡하게 일어난다.^{9,10}

p27 단백을 구성하는 아미노산 분자 중 serine (S10)과 threonine (T187)의 인산화가 p27이 핵과 세포질 사이의 이동에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.⁸⁻¹² G0와 초기 G1기에서 핵에 존재하던 p27은 후기 G1기에서는 핵단백 hKIS (human kinase interacting stathmin)와 결합하여, S10이 인산화되면 exportin의 매개로 핵 밖으로 유출되어 G1/S 이행기에는 세포질에 존재한다.⁹ 이곳에서 phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)와 Akt 경로에 따라 T187 분자가 인산화되면 SCF-Skp2/Cks1의 매개로 ubiquitination되고 proteasome에 의해 분해가 촉진되어 p27 양은 급속히 감소한다.¹ 이로써 cdk2 억제인자로서 p27의 기능은 상실되고, cyclin E/cdk2 복합체에 의해 세포는 S기로 진입한다.

세포의 성장과 생존에 매우 중요한 신호전달 경로인 Akt는 발암 과정에서는 암유전자에 의해 활성화된다. 유방암에서도 HER2 과발현 등 암유전자의 활성화로 인한 PI3K-Akt 경로의 활성화로 p27을 비롯한 주요 조절인자들의 인산화가 일어난다. p27이 비정상적으로 인산화되면 핵 안으로 들어가지 못하고 세포질에

격리되는데, 이 때문에 cyclin E/cdk2 억제에 필요한 핵 p27 양이 부족하므로 G1기에서 p27의 세포증식 억제 기능이 소실되어 종양세포는 증식하게 된다.^{9,10} 이로써 세포증식을 억제하는 데 유용한 p27은 절대량보다는 세포 내 발현 위치가 중요함을 알 수 있고, 유방암에서 세포질 p27의 존재는 Akt 활성화에 의한 비정상적인 p27 인산화와 분해를 의미한다.

유방암 세포에서 p27 분자의 인산화가 비정상적으로 일어난다는 사실이 최근 알려졌다.⁸⁻¹¹ Viglietto 등⁸은 p27이 세포 내에서 발현하는 위치는 p27의 T157 인산화와 밀접한 연관이 있음을 밝혔다. 이들은 사람 유방암 조직에서 단백을 분획하여 Western blot 결과와 면역조직염색 결과를 비교한 결과, p27 T157 인산화를 보이는 종양에서는 Akt 활성이 증가하고, p27 T157 인산화가 없는 종양에서는 p27이 핵에서 발현하고 Akt 활성도 감소하였음을 관찰하였다. Shin 등⁹은 세포질로 나온 p27이 Akt 활성화로 인하여 T157이 인산화되면 p27은 핵 내로 유입을 담당하는 수송단백인 importin α 와의 결합이 억제되어 세포질에 남게 되어 세포질 p27이 발현되는 것을 증명하였다. 그리고 이러한 결과를 토대로 유방암 발생에는 Akt에 의한 p27의 이동 조절이 중요하다고 하였다. 또 Motti 등²⁶도 정상세포보다 유방암 세포주에서 p27 T198의 인산화가 증가한다고 보고하였는데, 이때도 p27 T198의 인산화는 PI3K-Akt의 활성화와 비례하였다고 하였다. 인체 종양에서 p27 발현의 downregulation은 흔하지 않으며,¹⁰ 종양세포에서 p27 발현의 감소 혹은 기능의 이상으로 p27의 세포증식 억제 능력이 감소하는 이유는 대부분 p27 단백질 분해가 촉진되기 때문인 것으로 알려져 있다.¹ 그러나 많은 종양에서는 p27이 핵 밖으로 유출되어 세포질 내에 축적될 때도 p27의 세포증식 억제 능력이 감소할 수 있다.⁸⁻¹⁰ 그러므로 각종 종양에서 PI3K-Akt 경로와 이에 의한 p27의 인산화와 importin/exportin의 결합에 의한 핵으로의 이동과 분해 경로를 좀 더 자세히 연구하면 p27의 종양성 활성화와 세포주기 조절이상 사이의 연관성을 밝힐 수 있을 것으로 생각된다.

유방암에서 림프절 전이는 가장 의미 있는 예후인자다. 그러나 림프절 전이가 없는 경우라도 약 30%에서 재발과 사망을 일으킬 수 있으므로, 기존의 예후인자 중 어떤 것을 근거로 치료를 해야 하는지 결정하기 어렵다. 세포주기를 억제하는 기능 외에도 p27은 F-actin과 결합하여 actin 세포골격을 재배열하여 세포이동을 유도하는 기능을 한다.^{1,27}

유방암에서 세포이동 기능을 하는 p27과 림프절 전이의 관련성에 대해서는 의견이 다양하다. p27 감소가 림프절 전이 양성 과 관련이 있다는 보고가 있는 반면,¹⁴ p27 감소는 림프절 전이 양성군보다 전이 음성군에서 더 흔하게 일어난다는 상반된 보고도 있으며,^{24,25} p27 발현 감소는 림프절 전이와 상관관계가 없다는 보고도 있다.²³ Kouvaraki 등²⁵은 진행된 유방암 환자에게서 핵 p27이 50% 이상 발현된 사례는 액와 림프절 전이 양성 예의 42%에서 보였으나 림프절 전이 음성 예에서는 없어, 종양의 전이는 비활성화된 안정상태의 p27이 축적되거나 p27의 CDK 억

제 기능보다 우월한 다른 기전이 관여하여 발생하는 것이라고 하였다. 본 연구 결과에서는 15% 이상의 종양세포 핵과 세포질에서 p27이 발현된 종양은 림프절 전이 양성 43예 중 39예(90.7%)에서 나타나 종양세포의 분화와 전이에는 다른 기전이 관여하고 있음을 시사하였다. 핵 p27은 종양의 성장을 억제하는 기능을 하는 반면, 세포질 p27은 세포이동을 촉진해 전이 유전자의 역할을 하는 이중 기능을 하므로, p27이 전이와 관련 있는 인자라는 것을 확증하기 위해서는 이 두 기능을 연결짓는 깊이 있는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

면역조직화학 검사를 통해 p27 발현 양성 종양을 판정하는 기준은 연구자마다 달라, 유방암에서는 종양세포 핵의 5%부터^{13,16,18} 50%까지^{15,21,24,25} 다양한 범위를 채택하고 있다. 또한 p27의 면역조직화학 염색에서 핵 발현만을 관찰하였는지, 핵뿐 아니라 세포질 발현을 함께 관찰하였는지에 따라 예후인자로서 유용한지에 대한 평가도 상당히 다르게 나타난다. 따라서 유방암을 포함한 여러 종양에서 p27 발현 정도를 예후인자로 삼기 위해서는 p27 양성 종양의 기준을 표준화하여 엄격하게 적용해야 연구 결과에 따른 해석의 차이를 줄일 수 있을 것이다.

종양에서 p27 발현에 관한 연구를 살펴보면, 예후인자들과 관련이 있다는 보고와 함께 치료에 대한 반응도 p27 발현 정도에 따라 차이가 있다는 연구도 있다. 유방암에서 MEK 경로의 활성화, p27 인산화 변화, HER2 과발현이 동반되면 p27 발현이 감소하거나 세포질 발현이 나타날 수 있는데, 이러한 유방암은 항에스트로겐, Herceptin[®] 및 화학요법 치료에 저항을 보일 것으로 예견되므로 다른 치료 방법을 강구하여야 한다는 견해도 있다.¹⁹⁻²¹ 유방암 세포 중 Herceptin[®] 내성 세포에서는 p27이 감소되었지만, p27을 주입하면 Herceptin[®]에 대한 감수성이 증가하므로 p27 발현 정도는 Herceptin[®]에 대한 반응과도 관련이 있음을 알 수 있다.^{11,20,28} Herceptin[®]이 종양 성장을 억제하는 기전은 아직 자세히 밝혀지지 않았지만, p27의 인산화를 조절하여 반감기를 증가시켜 세포 내에 축적되어 G1기를 정지시키는 것으로 알려져 있다.¹¹ 이러한 조건은 p27 발현을 유도할 수 있는 다양한 경로와 방법을 알게 되면 유방암 환자의 생존율을 높일 수 있음을 시사하기도 한다.^{1,11,20,28} 이러한 점에 착안하여 Zhang 등¹²은 T187의 인산화에 의해 p27의 단백질 분해가 시작되는데, p27 T187 위치에 threonine 대신 alanine으로 대치한 돌연변이 p27 (T187A)은 단백질 분해에 영향을 받지 않아 세포 내에서 p27이 증가하고 세포증식 억제 효과가 유도되는 것을 관찰하였다. 그리고 이러한 결과를 토대로 단백질 분해에 저항성을 보이는 p27을 제작하면 유전자 치료로 유방암을 치료할 수 있다는 가능성을 제시하였다. 그러나 본 연구에서는 HER2 발현과 p27 발현은 상관관계를 보이지 않았으며, p27 발현 정도에 따른 Herceptin[®]에 대한 반응은 아직 임상 예가 충분하지 않아 추가 연구를 진행해야 할 수 있을 것 같다.

본 연구 결과에서도 핵 p27 발현의 감소 혹은 세포질 p27 발현 종양은 나쁜 예후와 관련이 있었다. 그러나 p27 발현을 유방

암 예후 관련인자로 이용하기 위해서는 p27 발현 양성 종양을 판정하는 기준에 대한 연구자들의 의견 일치가 필요하다. 또한 p27의 핵 발현은 세포주기를 억제하는 종양 억제인자로 역할을 하는 반면, 세포질 p27은 세포증식 억제 기능을 상실하므로 세포 내에서 p27의 발현 위치의 변동에 대한 자세한 관찰이 필요하다. 앞으로 p27의 분자생물학적 성상, 암유전자와의 상호연관성을 조절하는 경로, 그리고 p27의 단백질 분해 과정과 세포 내 발현 위치의 변동과 관련된 요인이 밝혀지면 핵 p27 발현을 안정시키거나 증가시킬 수 있는 다양한 p27 증가법을 유방암의 보조 치료 방법으로 이용할 수 있을 것으로 기대한다.

참고문헌

1. Sgambato A, Cittadini A, Faraglia B, Weinstein IB. Multiple functions of p27^{Kip1} and its alterations in tumor cells: a review. *J Cell Physiol* 2000; 183: 18-27.
2. Ciaparrone M, Yamamoto H, Yao Y, *et al.* Localization and expression of p27^{Kip1} in multistage colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* 1998; 58: 114-22.
3. Nakayama K, Ishida N, Shirane M, *et al.* Mice lacking p27 (Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* 1996; 85: 707-20.
4. Tan P, Cady B, Wanner M, *et al.* The cell cycle inhibitor p27 is an independent prognostic marker in small (T1a,b) invasive breast carcinomas. *Cancer Res* 1997; 57: 1259-63.
5. Wu J, Shen ZZ, Lu JS, *et al.* Prognostic role of p27^{Kip1} and apoptosis in human breast cancer. *Br J Cancer* 1999; 79: 1572-8.
6. Migita T, Oda Y, Naito S, Tsuneyoshi M. Low expression of p27^{Kip1} is associated with tumor size and poor prognosis in patients with renal cell carcinoma. *Cancer* 2002; 94: 973-9.
7. Baldassarre G, Belletti B, Bruni P, *et al.* Overexpressed cyclin D3 contributes to retaining the growth inhibitor p27 in the cytoplasm of thyroid tumor cells. *J Clin Invest* 1999; 104: 865-74.
8. Viglietto G, Motti ML, Bruni P, *et al.* Cytoplasmic relocation and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1} by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat Med* 2002; 8: 1136-44.
9. Shin I, Rotty J, Wu FY, Arteaga CL. Phosphorylation of p27^{Kip1} at Thr-157 interferes with its association with importin α during G1 and prevents nuclear re-entry. *J Biol Chem* 2005; 280: 6055-63.
10. Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, *et al.* PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and apposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med* 2002; 8: 1153-60.
11. Le XF, Claret FX, Lammayot A, *et al.* The role of cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1} in anti-HER2 antibody-induced G₁ cell cycle

- arrest and tumor growth inhibition. *J Biol Chem* 2003; 278: 23441-50.
12. Zhang Q, Tian L, Mansouri A, Korapati AL, Johnson TJ, Claret FX. Inducible expression of a degradation-resistant form of p27^{Kip1} causes growth arrest and apoptosis in breast cancer cells. *FEBS Lett* 2005; 579: 3932-40.
 13. Masciullo V, Sgambato A, Pacilio C, *et al.* Frequent loss of expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 1999; 59: 3790-4.
 14. Kang HS, Noh DY, Park IA, Youn YK, Oh SK, Choe KJ. The prognostic significance of p27 and cyclin E in human breast cancer. *Korean J Breast Cancer* 1998; 1: 241-50.
 15. Kim CY, Yang KH, Bae BN, *et al.* Significance of the expression of p27^{Kip1} protein in human breast cancer. *Korean J Breast Cancer* 2002; 5: 291-7.
 16. Lim YJ, Kim YH, Ahn GH, *et al.* Cyclin E, p27 and mutant p53 do not predict the prognosis in AJCC stage II colorectal carcinomas. *Korean J Gastroenterol* 2004; 44: 314-20.
 17. Kim DH, Park CK, Lee HJ, Lee WM, Kim EK, Joo JE. Expression of p34^{cdc2}, p27^{Kip1}, p21^{WAF1/Cip1} and p53 in human breast cancers. *Korean J Pathol* 2005; 39: 391-400.
 18. Myong NH. Immunohistochemical study of p27^{Kip1} expression in gastric adenomas and early gastric carcinoma -analysis of 65 cases-. *Korean J Pathol* 2003; 37: 325-32.
 19. Pohl G, Rudas M, Dietze O, *et al.* High p27^{Kip1} expression predicts superior relapse-free and overall survival for premenopausal women with early-stage breast cancer receiving adjuvant treatment with tamoxifen plus goserelin. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3594-600.
 20. Nahta R, Takahashi T, Ueno NT, Hung MC, Esteva FJ. P27^{Kip1} down-regulation is associated with trastuzumab resistance in breast cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64: 3981-6.
 21. Spataro VJ, Litman H, Viale G, *et al.* Decreased immunoreactivity for p27 protein in patients with early-stage breast carcinoma is correlated with HER-2/*neu* overexpression and with benefit from one course of perioperative chemotherapy in patients with negative lymph node status: results from international breast cancer study group trial V. *Cancer* 2003; 97: 1591-600.
 22. Fredersdorf S, Burns J, Milne AM, *et al.* High level expression of p27^{Kip1} and cyclin D1 in some human breast cancer cells: inverse correlation between the expression of p27^{Kip1} and degree of malignancy in human breast and colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 6380-5.
 23. Barnes A, Pinder SE, Bell JA, *et al.* Expression of p27^{Kip1} in breast cancer and its prognostic significance. *J Pathol* 2003; 201: 451-9.
 24. Barbareschi M, van Tinteren H, Mauri FA, *et al.* P27^{Kip1} expression in breast carcinomas: an immunohistochemical study on 512 patients with long-term follow-up. *Int J Cancer* 2000; 89: 236-41.
 25. Kouvaraki M, Gorgoulis VG, Rassidakis GZ, *et al.* High expression levels of p27 correlate with lymph node status in a subset of advanced invasive breast carcinomas: relation to E-cadherin alterations, proliferative activity, and ploidy of the tumors. *Cancer* 2002; 94: 2454-65.
 26. Motti ML, De Marco C, Califano D, Fusco A, Viglietto G. Akt-dependent T198 phosphorylation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1} in breast cancer. *Cell Cycle* 2004; 3: 1074-80.
 27. McAllister SS, Becker-Hapak M, Pintucci G, Pagano M, Dowdy SF. Novel p27^{Kip1} C-terminal scatter domain mediates Rac-dependent cell migration independent of cell cycle arrest functions. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 216-28.
 28. Yang HY, Zhou BP, Hung MC, Lee MH. Oncogenic signals of HER-2/*neu* in regulating the stability of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *J Biol Chem* 2000; 275: 24735-9.