

유방암에서 술 전 화학요법의 반응 예측지표로서 c-erbB2 과발현과 p53 돌연변이의 유용성

부산대학교 의과대학 외과학교실, ¹병리학교실

손경모 · 곽희숙 · 배영태 · 심문섭 · 김지연¹

p53 Mutation and c-erbB2 Over-expression in Predicting Factor of Responsibility to Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Breast Cancer

Gyung Mo Son, M.D., Hi Suk Kwak, M.D., Young Tae Bae, M.D., Mun Sup Sim, M.D. and Jee Yeon Kim, M.D.¹

Purpose: The predictive value of c-erbB2 over-expression, and p53 mutation, to the response rate to neoadjuvant chemotherapy, were assessed in patients with breast cancer.

Methods: Between January 2000 and June 2002, 185 patients, with breast cancer, were put forward for two commonly used chemotherapy regimens prior to surgery. The first 135 received the CMF (cyclophosphamide 600 mg/m², methotrexate 40 mg/m², 5-FU 500 mg/m²) regimen, and the remaining 50 the CAF (cyclophosphamide 600 mg/m², adriamycin 50 mg/m², 5-FU 500 mg/m²) regimen. The expressions of the estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), p53 mutation and c-erbB2, were evaluated by immunohistochemistry of needle biopsy samples prior to neoadjuvant chemotherapy. Tumor response was categorized according to the WHO criteria, using the largest diameter in ultrasonography or magnetic resonance imaging.

Results: The mean age of the patients in the CMF and CAF groups were 48.8 and 47.4 years. Forty eight (35.6%) and 24 (48.0%) of the patients, in the CMF and CAF groups, respectively, had pathologically partial or complete responses. The tumor size, axillary lymph nodes, lymphatic and vascular invasions, as clinicopathological factors, were significantly correlated with the response to chemotherapy in the CAF group. The absences of ER or PR were also significantly associated with a remission in both the CMF and

CAF groups. p53 mutation was not correlated to the response rate of either chemotherapy regimen. There was no significant relationship between the expression of c-erbB2 and the response rate in the CMF group, but a higher percentage of patients with c-erbB2 positive tumors had a response to the CAF regimens.

Conclusion: p53 mutation is not significantly associated with tumor response, but the over-expression of c-erbB2 can predict the response to the different chemotherapies used in breast cancer. (*J Korean Surg Soc* 2003;65:85-94)

Key Words: c-erbB2 over-expression, p53 mutation, Neoadjuvant chemotherapy, Breast cancer

중심 단어: c-erbB2 과발현, p53 돌연변이, 술 전 화학요법, 유방암

Departments of Surgery and ¹Pathology, College of Medicine, Pusan National University, Busan, Korea

서 론

국소 진행성 유방암에서 술 전 화학요법(neoadjuvant chemotherapy)은 종양의 부피를 감소시켜 유방보존술을 가능하게 하고, 존재 가능한 종양세포의 전신적 과급을 조절하여 예후를 향상시키는 것으로 알려져 있다.(1)

유방암에 대한 동일한 화학요법에도 불구하고 환자에 따라 종양의 관해가 다르게 나타나는 것을 볼 수 있다. 특히 유방암 환자에서 술 전 화학요법을 시행한 경우 5~15%의 환자에서 완전 관해가 얻어지는 반면, 15~50%의 예에서는 정지 혹은 진행상태가 지속되는 것으로 알려져 있다. 이러한 반응도의 차이를 일으키는 기전은 아직 명확하지 않으나, 다양한 유전학적 배경과 호르몬 환경 등이 관여할 것으로 생각되고 있다.(2) 핵 등급(nuclear grade), 조직학적 등급(histologic grade), DNA 배수성, 세포 역동학(cell kinetics) 그리고 호르몬 수용체 등과 보강화학요법에 대한 반응도의 상관성에 대하여 많은 연구들이 이뤄졌으나, 상반된 결과들이 보고되고 있어 아직 논란으로 남아 있다.(3)

최근 유방암의 화학요법에 대한 반응지표로서 종양 억제

책임저자 : 손경모, 부산광역시 서구 아미동 1가 10번지

☎ 602-739, 부산대학교병원 외과

Tel: 051-240-7238, Fax: 051-247-1365

E-mail: skm171@hanmail.net

접수일 : 2003년 2월 17일, 게재승인일 : 2003년 4월 26일

본 논문의 요지는 대한외과학회 2002년 추계학술대회에서 발표하였음.

인자인 p53 단백질과 세포증식에 관여하는 c-erbB2 단백질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 결손(deletion) 혹은 점 돌연변이(point mutation)를 통하여 대부분 일어나는 p53 단백질의 돌연변이는 유방암의 20~40%에서 나타나며, 세포내 반감기가 길어져 세포핵 내에 축적된다. 세포사멸(apoptosis)에 관여하는 p53 단백질의 불활성화는 세포사멸을 유도하는 세포독성 항암제의 효과를 저해시키고, 항암제에 대한 내성을 일으키는 요인으로 알려져 있다.(4) c-erbB2 단백질은 세포막에 존재하는 티로신 성장인자 수용체(transmembrane tyrosine growth factor receptor)로서 유방암의 25~50%에서 과발현이 관찰되며, 종양세포의 침윤성과 불량한 예후인자를 반영하는 것으로 알려져 있으며, 화학요법에 따른 반응도의 차이와 관련이 있음이 보고되고 있다.(5)

저자들은 유방암으로 진단 받은 환자에서 병리조직학적 특성, 에스트로겐 수용체(ER), 프로게스테론 수용체(PR), p53 돌연변이 그리고 c-erbB2 과발현을 측정하고 술 전 화학요법에 대한 반응도와 상관성을 비교하여 술 전 화학요법에 대한 반응 예측지표로서의 유용성을 평가하고자 본 연구를 시도하였다.

방 법

1) 연구대상

부산대학교병원 유방클리닉에서 2000년 1월부터 2002년 6월까지 유방암으로 진단 받은 225예 중 술 전 화학요법을 시행 받은 193예를 대상으로 하였다.

세침흡인생검과 침 조직생검은 각각 68예(36.8%)와 117예(63.7%)에서 시행되었으며, 절제 생검을 시술하여 술 전 화학요법 전에 종양이 제거된 8예는 대상에서 제외하였다. 이러한 술 전 조직검사에서 환자군 중 180예(97.2%)는 침윤성 관암(invasive ductal carcinoma)이었으나, 5예(2.8%)는 분류하기 어려운 침윤성 암종이었으며, 비침윤성 유방암의 예는 없었다.

술 전 조직검사에서 침윤성 유방암으로 진단된 예에서 종양 직경이 1 cm 이상인 경우와 겨드랑 림프절 전이가 의심되는 경우 술 전 항암요법을 시행하였으며, 화학요법으로 CMF (cyclophosphamide 600 mg/m², methotrexate 40 mg/m², 5-FU 500 mg/m²) 요법과 CAF (cyclophosphamide 600 mg/m², adriamycin 50 mg/m², 5-FU 500 mg/m²) 요법을 투여하였으며, 술 전 화학요법은 주로 3회 혹은 4회 시행하였다.

2) 병리조직학적 평가

유방절제술 후 육안 검사를 시행하고 10% 중성 완충 포르말린에 24시간 고정한다. 고정된 조직에서 종양의 최장경을 측정하고, 통상적인 방법으로 파라핀에 포매하였다. 포매된 조직을 4mm의 두께로 절편을 만들어 Hematoxylin-eosin 염색을 하여 조직학적 유형, 종양세포의 림프관 혹은

혈관 침윤 그리고 겨드랑 림프절의 전이 유무를 확인하였다. 그리고 분화 정도가 양호한 경우 1, 중간 분화인 경우 2 그리고 미분화인 경우 3으로 하여 핵 등급 및 조직학적 등급을 평가하였다.

3) 면역조직화학적 염색

화학요법 전 유방 조직검사를 위한 침생검 혹은 세침흡인생검으로 얻은 표본에 대하여 면역조직화학 검사를 시행하였다.

침 조직생검으로 얻은 조직표본에 대한 면역조직화학적 염색은 10% 중성 완충 포르말린에 고정한 후 파라핀에 포매한 조직을 4mm의 두께로 박절하여 자일렌으로 5분간 3회 탈파라핀시킨 후 무수알코올, 90%, 75% 및 50% 에탄올에 각각 2분씩 처리하여 함수시켰다. Citrate 완충액에서 가열한 후 과산화수소수로 5분간 처리하여 내인성 과산화효소의 작용을 차단하였다. 증류수와 Tris 완충액으로 수세한 후 비특이적 항원을 제거하기 위해 30분간 염소혈청과 반응시켰다. 여분의 용액을 제거한 후 일차 항체인 ER (monoclonal 1 : 50, Novocastra, Newcastle, U.K.), PR (monoclonal 1 : 50, Novocastra, Newcastle, U.K.), p53 (monoclonal 1 : 50, Zymed, San Francisco, U.S.A.), c-erbB2 (monoclonal 1 : 50, Zymed, San Francisco, U.S.A.)를 실온에서 2시간 동안 작용시켰다. 일차 항체 반응 후 절편을 Tris 완충액으로 5분간 3회 수세하고, biotin이 부착된 이차 항체(1 : 300, Zymed, San Francisco, U.S.A.)와 작용시킨 후 통상적인 avidin-biotin complex법으로 20분간 반응시켰다. 발색제는 3-amino-9-ethyl mount로 봉인한 후 광학 현미경으로 관찰하였다.

세침흡인생검으로 얻은 도말 세포에 대한 면역조직화학적 염색은 citrate 완충액으로 가열하는 과정을 제외하고는 조직 표본에 대한 염색과 동일한 방법으로 시행하였다.

4) 면역조직화학적 결과 판정

ER, PR 발현의 결과 핵에 갈색의 과립상이 보이는 세포가 전체 종양세포의 30% 이상인 경우 양성으로 판정하였다. p53 단백질의 발현은 면역반응세포가 10% 미만인 경우 음성, 10% 이상이고 1/3 미만인 경우 1+, 1/3 이상이고 2/3 미만인 경우 2+, 그 이상인 경우 3+로 하였으며, 반응도 평가 시 1+ 이상을 p53 돌연변이 양성으로 하였다. c-erbB2의 발현은 종양세포의 세포막에 갈색으로 염색이 되는 정도에 따라 3단계로 나누어서 판독하였다. 음성 반응을 나타내거나 10% 미만의 종양세포에서 약하게 염색되는 경우를 0, 종양세포의 10% 이상에서 염색은 되었으나 세포막의 일부가 약하게 염색된 경우는 1+, 종양세포의 10% 이상에서 세포막의 전체가 중등도로 염색된 경우를 2+, 종양세포의 10% 이상에서 세포막 전체가 강하게 염색된 경우를 3+로 판독하였으며, 그중 염색 점수가 3+인 경우를 과발현 양성

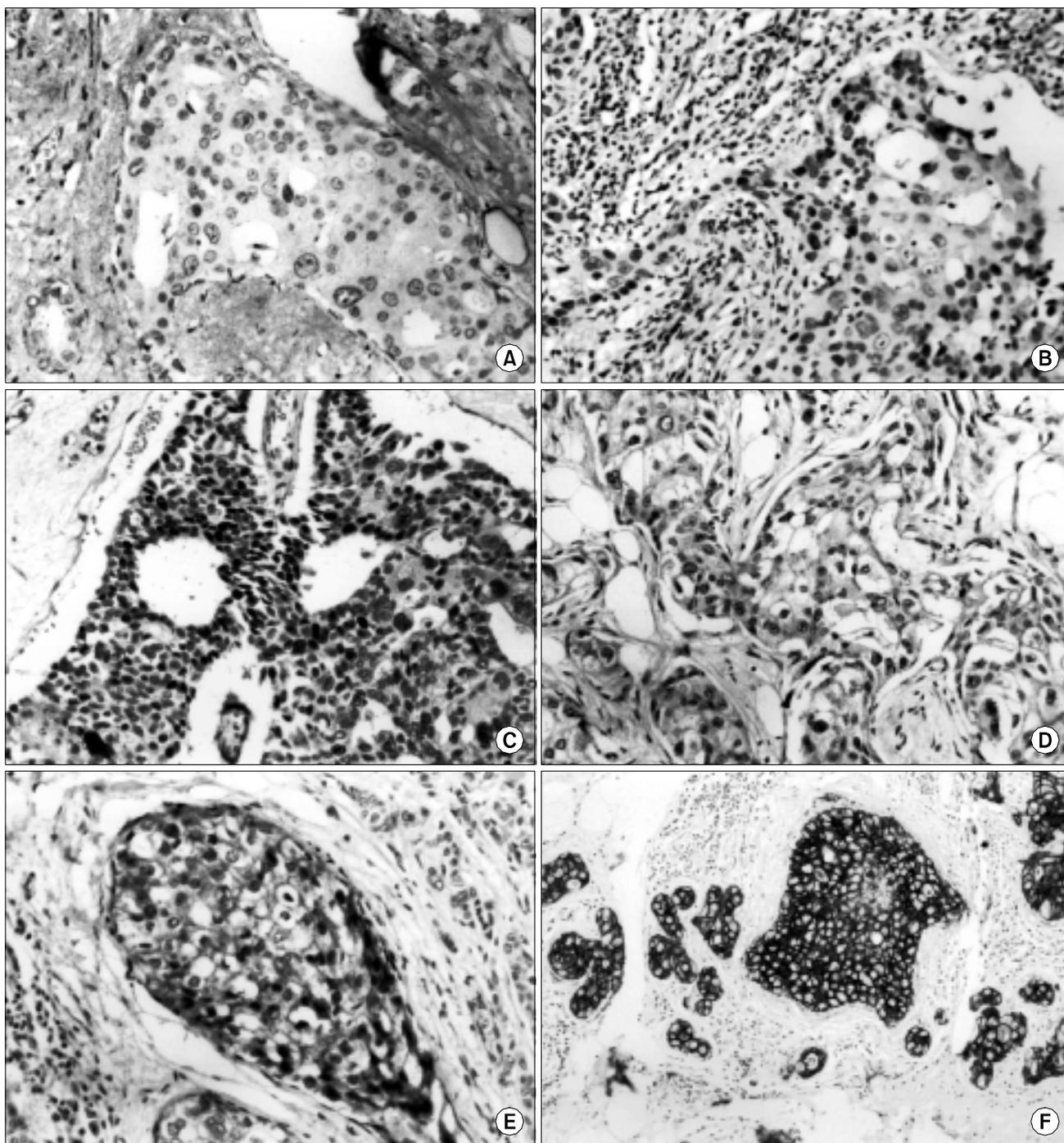


Fig. 1. Examples of invasive breast carcinoma immunostained for (A, B, C) p53 mutation and (D, E, F) for c-erbB2 over-expression. (A) 1+ is immunostained in 10% to less than 1/3 positive nuclear staining with p53 mutation of tumor cells, (B) 2+ is 1/3 to less than 2/3, and (C) 3+ is more than 2/3. (D) 1+ is immunostained in more than 10% of tumor cells with faint membranous staining of c-erbB2, (E) 2+ with moderate staining, and (F) 3+ with strong staining (A to E; $\times 400$, F; $\times 200$).

으로 하였다(Fig. 1).

5) 화학요법에 대한 반응도 측정

술 전 화학요법을 시행하기 전에 시행된 유방 초음파 또

는 자기공명영상 검사를 통하여 종양의 최장경을 측정하였고, 유방 초음파와 자기공명영상에서 나타난 병변의 크기가 다를 경우 자기공명영상의 결과를 선택하였다. 화학요법 및 유방절제술이 시행된 후 절제조직에서 육안으로 관

찰되는 종양의 최장경을 측정하여 종양 크기의 변화를 관찰하였다.

화학요법의 반응도는 WHO 기준에 의하여 4단계로 분류하였다. 직경의 증가가 25% 이상인 경우 진행(progression)으로 하였으며, 직경이 25% 미만의 증가와 50%만 감소한 경우 정지(stable)로 하였다. 그리고 직경의 감소가 50% 이상인 경우 부분 관해(partial remission)로 하였으며, 종양이 완전히 사멸된 경우 완전 관해(complete remission)로 하였다. 정지와 진행상태를 무반응군으로 하였으며, 부분 관해와 완전 관해를 반응군으로 분류하였다.

6) 통 계

임상적 인자 및 병리조직학적 인자와 화학요법에 대한 반응도와의 통계적 유의성을 평가하기 위한 단변량 분석으

로 χ^2 검증과 Pearson 상관분석을 시행하였으며, 화학요법의 반응도와 상관성이 있는 인자들에 대한 다변량 분석을 위하여 partial correlation coefficients test를 시행하였다. 통계처리는 SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois)을 이용하였으며, 통계적 유의수준은 P value가 0.05 이하인 경우로 하였다.

결 과

대상환자들 중 CMF 요법을 시행 받은 경우는 135예였으며, CAF 요법을 시행 받은 경우는 50예였다(Table 1). 평균 연령은 CMF 군에서 48.8세(24~74세)이었으며, CAF 군에서 47.4세(32~62세)이었다. CMF 군과 CAF 군에서 폐경이 동반된 예는 각각 56예(39.2%)와 24예(48.0%)이었다.

술 전 병기를 평가하기 위하여 유방 초음파와 자기공명

Table 1. Patients characteristics

Variables	CMF* group (%)	CAF† group (%)	Total (%)	P value
No.	135	50	185	
Age				
<35	7 (5.2)	1 (2.0)	8 (4.3)	0.685
≥35	128 (94.8)	49 (98.0)	177 (95.7)	
Menopause				
Premenopause	53 (39.3)	24 (48.0)	77 (41.6)	0.316
Postmenopause	82 (60.7)	26 (52.0)	108 (58.4)	
Preoperative staging				
I	39 (28.9)	10 (20.0)	49 (26.5)	0.023
IIA	72 (53.3)	21 (42.0)	93 (50.3)	
IIB	16 (11.9)	12 (24.0)	28 (15.1)	
IIIA	7 (5.2)	3 (6.0)	10 (5.4)	
IIIB	1 (0.7)	3 (6.0)	4 (2.1)	
IV	0 (0.0)	1 (2.0)	1 (0.5)	
Pathologic type				
Invasive ductal ca.	129 (95.5)	48 (96.0)	177 (95.7)	1.000
Others	6 (4.5)	2 (4.0)	8 (4.3)	
Operation‡				
MRM	14 (10.4)	11 (22.0)	25 (13.5)	0.074
SSM+ALND	4 (3.0)	2 (4.0)	6 (3.2)	
Quadrantectomy+ALND	109 (80.7)	37 (74.0)	146 (78.9)	
Lumpectomy+ALND	8 (5.9)	0 (0.0)	8 (4.3)	
No. of chemotherapy cycle				
1	5 (3.7)	3 (6.0)	8 (4.3)	0.274
2	22 (16.3)	5 (10.0)	27 (14.6)	
3	49 (36.3)	22 (44.0)	71 (38.4)	
4	37 (27.4)	16 (32.0)	53 (28.6)	
5	11 (8.1)	4 (8.0)	15 (8.1)	
6	11 (8.1)	0 (0.0)	11 (5.9)	

*CMF = cyclophosphamide, methotrexate, 5-FU; † CAF = cyclophosphamide, adriamycin, 5-FU; ‡ MRM = modified radical mastectomy; SSM = skin sparing mastectomy; ALND = axillary lymph node dissection.

영상 등 방사선학적 검사를 시행하였다. CMF군 중 유방 초음파와 자기공명영상을 모두 시행한 경우는 95예(70.4%)였으며, 40예(29.6%)는 유방 초음파 검사만을 하였다. CAF군에서 유방 초음파와 자기공명영상을 모두 시행한 경우는 38예(76.0%)였으며, 유방 초음파만을 시행한 경우는 12예(24%)였다. CMF 군에서 항암요법 전 병변의 평균 크기는 2.3 cm이었고, 항암요법 후 1.6 cm으로 감소하였다. CAF 군에서는 항암요법 전·후 병변의 크기는 평균 3.3 cm과 2.1 cm이었다. 술 전 병기는 IIA가 93예(50.3%)로 가장 많았으며, CMF 군보다 CAF 군에서 병기가 유의하게 높았다 (P=0.023).

술 후 병리조직검사서 177예(95.7%)의 환자가 침윤성 관암으로 진단되었으며, 침윤성 소엽암(invasive lobular carcinoma) 5예, 침윤성 수질암(invasive medullary carcinoma) 3예 등 침윤성 관암 이외의 침윤성 암종으로 진단된 경우는 8예(4.3%)이었고, 비침윤성 유방암의 예는 없었다. 술 전 조직검사서 CMF 군 135예 중 130예는 침윤성 관암으로 진단되었으나, 5예는 분류하기 어려운 침윤성 암종이었다. 이들 5예 중 2예는 술 후 병리조직검사서 침윤성 관암으로 확진되었으나, 나머지 3예와 함께 술 전 침윤성 관암으로

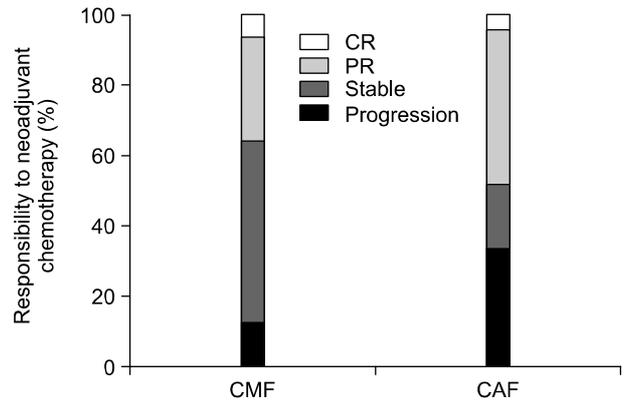


Fig. 2. Responsibility to neoadjuvant chemotherapy in CMF group and CAF group. Tumor response assessment is classified as 4 grade: progression, an increase in tumor size of $\geq 25\%$; stable, a tumor reduction of $< 50\%$ or an increase in tumor size of $< 25\%$; PR, A tumor reduction of $\geq 50\%$; CR, a disappearance of the primary tumor (CMF = cyclophosphamide, methotraxate, 5-FU; CAF = cyclophosphamide, adriamycin, 5-FU; PR = partial remission, CR = complete remission).

Table 2. Responsiveness of chemotherapy and clinicopathologic factors in CMF and CAF group

Variables	CMF group		CAF group	
	Response (%)	P value	Response (%)	P value
Age				
< 35	1/7 (14.3)	0.421	0/1 (0.0)	1.000
≥ 35	47/128 (36.7)		24/49 (49.0)	
Tumor size				
≤ 2 cm	8/47 (17.0)	0.001	0/6 (0.0)	0.023
> 2 cm	40/88 (45.5)		24/44 (54.5)	
Axillary lymph node				
Negative	37/114 (35.6)	0.992	20/28 (71.4)	0.0001
Positive	11/31 (35.5)		4/22 (18.2)	
Nuclear grade				
1	3/15 (20.0)	0.544	0/4 (0.0)	0.124
2~3	28/89 (31.5)		16/34 (47.1)	
Histologic grade				
1	3/14 (21.4)	0.753	0/4 (0.0)	0.125
2~3	27/89 (30.3)		15/32 (46.9)	
Lymphatic invasion				
Negative	41/111 (36.9)	0.303	22/39 (56.4)	0.040
Positive	5/20 (25.0)		2/11 (18.2)	
Vascular invasion				
Negative	38/106 (35.8)	0.325	21/37 (56.8)	0.037
Positive	7/24 (29.2)		2/12 (23.1)	

진단 받은 2예 등 5예에서 침윤성 소엽암으로 진단되었으며, 술 전 침윤성 관암으로 진단된 1예는 침윤성 수질암으로 술 후 확진되었다. CAF 군의 50예에서 술 전 조직검사상 침윤성 관암으로 모두 진단되었으나, 술 후 침윤성 수질암으로 확인된 2예가 있었다.

사분 절제술이 146예(78.9%)에서 가장 많이 시행되었으며, 변형 근치적 유방절제술이 25예(13.5%)에서 이뤄졌다. 피부보존유방절제술이 6예(3.2%)에서 시행되었으며, 사분 절제술과 피부보존유방절제술을 시술한 예에서 겨드랑 림프절 광청술과 함께 광배근피관술을 이용한 즉시 유방재건술을 시행하였다. 유방종괴절제를 시술한 8예(4.3%)에서도 겨드랑 림프절 광청술을 하였다.

술 전 화학요법은 3회 혹은 4회 시행된 경우가 124예

(67.0%)로 가장 많았으며, CMF 군과 CAF 군에서 각각 평균 3.3회와 3.4회 시행되어 양 군 간에 유의한 차이는 없었다.

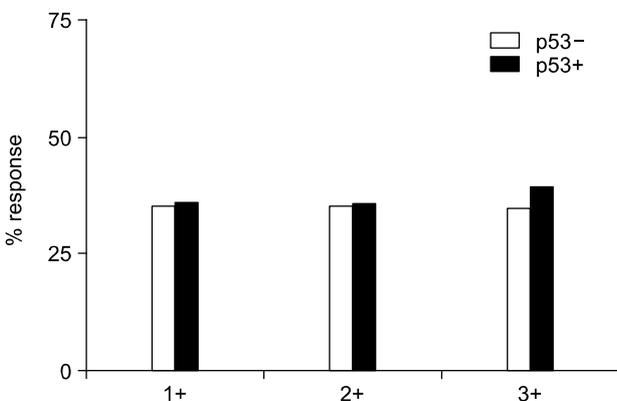
화학요법에 대한 반응도는 CMF 군에서 진행과 정지 등 비반응인 경우가 87예(64.4%), 부분 관해 혹은 완전 관해 등 반응을 보인 경우가 48예(35.6%)였다. CAF 군에서 비반응인 경우는 26예(52.0%), 반응을 보인 경우는 24예(48.0%)로 CMF 군보다 반응을 보인 예가 많았으나, 통계적 유의성은 없었다(Fig. 2).

임상 인자와 화학요법과의 관련성에 있어 양 군 모두에서 종양의 크기가 2 cm보다 큰 경우 반응도가 유의하게 높았으며, 나이는 반응도와 무관하였다. CMF 군에서 화학요법의 반응도는 종양의 크기를 제외한 임상 인자들과 연관성이 없었다. CAF 군에서 겨드랑 림프절 전이, 림프관 침윤

Table 3. Responsiveness of chemotherapy and immunostaining status in CMF and CAF group

Variables	CMF group		CAF group	
	Response (%)	P value	Response (%)	P value
Estrogen receptor				
Negative	33/74 (44.6)	0.016	17/33 (51.5)	0.488
Positive	15/61 (24.6)		7/17 (41.2)	
Progesterone receptor				
Negative	33/91 (36.3)	0.805	23/38 (60.5)	0.002
Positive	15/44 (34.1)		1/12 (8.3)	
p53 mutation				
No	23/65 (35.4)	0.968	11/27 (40.7)	0.266
Yes	25/70 (35.7)		13/24 (56.5)	
c-erbB2 over-expression				
No	37/98 (23.8)	0.385	5/21 (23.8)	0.004
Yes	11/37 (29.7)		19/29 (65.5)	

A. p53 in CMF group



B. p53 in CAF group

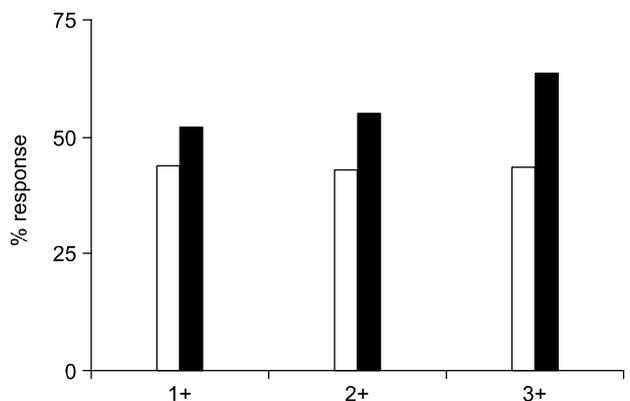
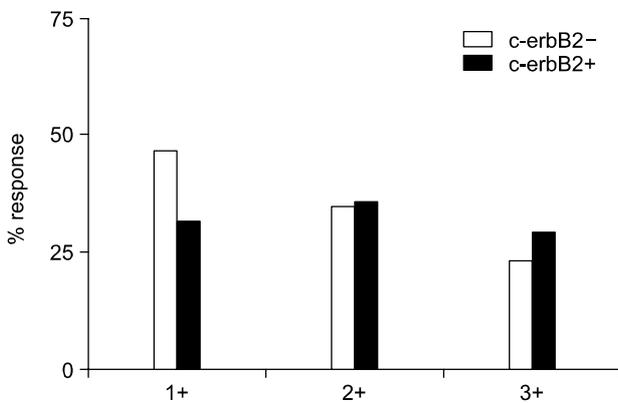


Fig. 3. Response rate according to status of p53 mutation in CMF and CAF groups. The % response is given as sum of partial response and complete response rate at each cutoff values of p53 mutation.

Table 4. Relationship among p53, c-erbB2 and clinicopathologic factors of breast cancer

Variables	p53 mutation (%)	P value	c-erbB2 over-expression (%)	P value
Age				
< 35	4/8 (50.0)	1.000	1/8 (12.5)	0.263
≥ 35	89/177 (50.3)		65/177 (36.7)	
Tumor size				
≤ 2 cm	26/53 (49.1)	0.834	14/53 (26.4)	0.126
> 2 cm	67/132 (50.8)		52/132 (39.4)	
Axillary lymph node				
Negative	66/132 (50.0)	0.908	47/132 (35.6)	0.975
Positive	27/53 (50.9)		19/53 (35.8)	
Nuclear grade				
1	4/19 (21.1)	0.005	5/19 (26.3)	0.383
2~3	68/123 (55.3)		45/123 (36.6)	
Histologic grade				
1	3/18 (16.7)	0.002	4/18 (22.2)	0.239
2~3	67/121 (55.4)		44/121 (36.4)	
Lymphatic invasion				
Negative	75/150 (50.0)	0.870	56/150 (37.3)	0.593
Positive	15/31 (48.4)		10/31 (32.3)	
Vascular invasion				
Negative	72/143 (50.3)	0.744	52/143 (36.4)	0.957
Positive	18/38 (47.4)		14/38 (36.8)	
Estrogen receptor				
Negative	53/107 (49.5)	0.814	42/107 (39.3)	0.234
Positive	40/78 (51.3)		24/78 (30.8)	
Progesterone receptor				
Negative	62/129(48.1)	0.362	52/129 (40.3)	0.046
Positive	31/56 (55.4)		14/56 (25.0)	

A. c-erbB2 in CMF group



B. c-erbB2 in CAF group

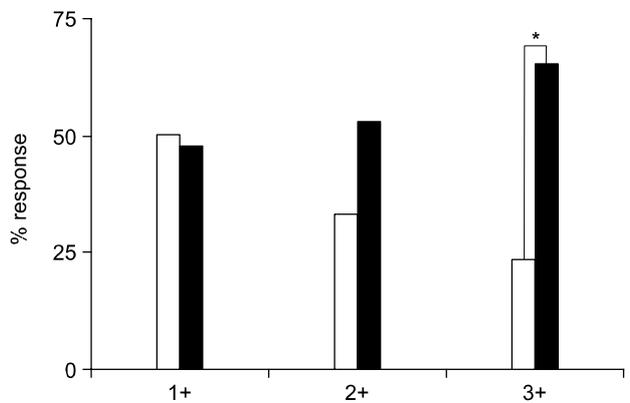


Fig. 4. Response rate according to status of c-erbB2 over-expression in CMF and CAF groups. The % response is given as sum of partial response and complete response rate at each cutoff values of c-erbB2 over-expression (*P<0.05).

그리고 혈관 침윤이 없는 경우 반응도가 유의하게 높았다. 그리고 CAF 군에서 핵 등급과 조직학적 등급이 1이었던 4예 모두에서 화학요법에 비반응을 보인 반면, 2~3인 경우 46.9~47.1%에서 반응을 나타내어 유의한 차이를 보였다 (Table 2).

CMF 군에서 ER이 음성인 경우 화학요법에 대한 반응도는 유의하게 높았으나, PR의 발현은 반응도와 상관성이 없었다. 이와 반대로, CAF 군에서는 PR이 음성인 경우 반응도가 높았으나 ER은 통계적 상관성이 없었다 (Table 3).

10% 이상의 세포에서 p53 돌연변이가 관찰된 경우는 CMF 군에서 70예(51.9%), CAF 군에서 23예(46.0%)였으며, 양 군 모두에서 반응도와 p53 돌연변이 간의 유의한 상관성은 없었다. CMF 군에서 p53 돌연변이의 cutoff value를 2+와 3+로 상향하여도 반응도의 변화는 없었다. 그러나 CAF 군에서는 p53 돌연변이가 양성인 경우 높은 반응도를 보였으나 통계적 유의성은 없었다 (Fig. 3).

c-erbB2 과발현이 3+로 나타난 경우는 CMF 군과 CAF 군에서 각각 37예(27.4%)와 29예(58.0%)였다. CMF 군에서는 화학요법의 반응도가 c-erbB2 과발현과 상관성이 없었으나, CAF 군에서는 과발현이 나타난 경우 유의하게 높은 반응도를 보였다 (Fig. 4). c-erbB2의 발현 정도에 따라 cutoff value를 변경하여 반응도를 평가한 결과, 1+와 2+인 경우 반응도와 유의한 상관성이 없었으나, 3+인 경우에서만 통계적 상관성이 확인되었다 ($P=0.005$).

p53 돌연변이 및 c-erbB2 과발현과 임상적, 병리조직학적 인자들 간의 상관관계를 평가한 결과, p53 돌연변이는 핵 등급과 조직학적 등급이 높은 경우와 유의한 상관성이 있었으나, 나이, 종양의 크기, 겨드랑 림프절 전이, 종양세포의 림프관 및 혈관 침윤, 호르몬 수용체 등과는 상관성이 없었다. c-erbB2 과발현은 PR이 음성인 경우 좀더 흔하게 나타나 통계적 상관성이 있었으나, 이외의 인자와는 상관성이 없었다 (Table 4).

다변량 분석을 통하여 CAF 군에서 화학요법의 반응도와 유의한 상관성이 있었던 종양의 크기, 겨드랑 림프절 전이, 림프관 및 혈관 침윤, 핵 등급, 조직학적 등급 그리고 PR 등 임상 병리인자들을 조건 변수로 하여 c-erbB2 과발현에 대한 다변량 분석을 시행한 결과, c-erbB2 과발현은 화학요법의 반응에 대한 독립변수로서의 유의성은 없었다 ($P=0.926$). 그러나 c-erbB2 과발현과 유의한 연관성이 있는 PR을 조건 변수에서 제외한 경우 c-erbB2 과발현은 화학요법의 반응 지표로서 유의성이 있었다 ($P=0.017$).

고 찰

술 전 화학요법에 대한 완전 관해는 3~15%에서 얻어지며, 무병생존율과 전체생존율을 연장시키는 요인으로 되어 있다. 그러나 화학요법을 시행하여도 유방암이 진행하거나

정지상태가 지속되는 경우가 50% 이상에서 보고되고 있다. (1) 유방암에서 보통 나이, 폐경 유무, 겨드랑 림프절 전이, 스테로이드 호르몬 수용체의 발현, 그리고 병리조직학적 특성 등의 인자들이 화학요법의 선택에 사용되어 왔다. (2) 그러나 이러한 임상적 요인은 예후와 관련된 인자이지, 화학요법에 대한 반응도의 예측 인자는 아니다. (3) 그러므로 화학요법에 대한 반응도를 예측할 수 있는 종양의 생물학적 특성은 다양한 치료전략의 선택에 있어 유용하게 적용될 수 있으며, 특히 화학요법에 대한 반응 예측지표로서의 p53 돌연변이와 c-erbB2 과발현의 유용성에 대하여 연구들이 활발히 진행되고 있다. (4-6)

p53 단백질은 세포독성 화학요법에 의한 세포 사멸의 유도에서 중요하게 작용하며, p53 단백질의 돌연변이로 인한 불활성화는 화학요법에 대한 세포내성을 유발하는 것으로 알려져 있다. (7) 유방암 환자를 대상으로 한 초기 연구에서 p53 돌연변이는 불량한 예후를 반영하는 지표로서 알려졌으나, 이후 연구들은 CMF 요법을 시술 받은 환자군에서 화학요법의 실패 혹은 예후에 대한 예측인자로서 유의성이 없었으며, p53 돌연변이에 따른 생존율의 차이 역시 없었다는 상반된 보고를 하였다. (8,9) 최근 Bottini 등(6)은 CMF 요법을 시행한 유방암 환자에서 p53 돌연변이가 음성인 경우 완전 관해가 높은 경향을 보였으나, 통계적 유의성은 없다고 보고하였다.

그러나 p53 돌연변이는 anthracycline 계열의 화학요법에 대한 반응도 및 예후와 상관성이 있다. Clahsen 등(10)은 CAF 요법을 시행한 환자군에서 p53 돌연변이가 음성인 경우 5년 무병생존율의 향상이 있었으나, 양성인 경우 화학요법에 의한 생존율의 향상은 없었다고 보고하였다. 그리고 epirubicin을 투여한 환자군에서 p53 돌연변이가 음성인 경우 완전 관해가 26.5%인 반면, 양성인 경우 3.6%로 나타나 p53 돌연변이에 따른 완전 관해율의 유의한 차이가 보고되었다. (6)

본 연구 결과 10% 이상의 세포에서 p53 돌연변이가 관찰된 경우는 CMF 군에서 70예(51.9%), CAF 군에서 23예(46.0%)로 이전 연구와 유사한 발현도를 보였으나, CMF와 CAF 군 모두에서 반응도와 p53 돌연변이 간의 유의한 상관성은 없었다. 그러나 CAF 군에서 p53 돌연변이가 양성인 경우 화학요법에 대하여 비교적 높은 반응도를 보여 이전 연구와 상반된 결과로 나타났다. 이는 CAF 군에서 p53 돌연변이가 유방암 세포의 핵 등급 및 조직학적 등급과 유의한 관련성이 있었기 때문으로 생각되며, 면역조직화학에서 확인되는 p53 돌연변이가 화학요법에 대한 예측지표로서의 한계가 있음을 보여준다.

c-erbB2 단백질은 세포막에 존재하는 티로신 활성효소 수용체 (tyrosine kinase receptor)로서 세포질 내 단백질의 인산화 과정을 유발하여 유전자 전사와 세포 증식과정을 활성화시킨다. c-erbB2 단백질의 과발현은 유방암의 15~30%에서

나타나며, 종양의 크기가 큰 경우, 겨드랑 림프절 전이, 국소 진행성 유방암, 스테로이드 호르몬 수용체 음성, 그리고 종양의 빠른 증식속도 등과의 관련성이 있다.(11) 본 연구에서 c-erbB2 단백질의 과발현은 PR이 음성인 경우와 관련성이 있었으나, 겨드랑 림프절 전이, 종양의 크기와는 무관하였다.

유방암 환자에서 화학요법의 반응 예측지표로서의 c-erbB2 과발현의 역할에 대한 연구는 CMF 요법에서 가장 먼저 시도되어졌다. 초기의 연구들은 CMF 요법에 대한 내성이 c-erbB2 과발현과 관련성이 있음을 보고하였다. Gusterson 등(12)은 c-erbB2 과발현이 없는 경우 CMF 요법이 효과적이었다고 보고하였으며, Allred 등(13)은 CMF 요법을 시행받은 환자군에서 c-erbB2 과발현이 있었던 군의 5년 생존율은 40%이었으나, 과발현이 없었던 군에서는 80%로 나타나 c-erbB2 과발현이 화학요법에 대한 저항성을 유발할 가능성을 보고하였다. Willsher 등(14)은 mitoxantrone, methotrexate, mitomycin-C 요법을 시행한 50예 중 c-erbB2 단백질 음성인 30예 중 73%에서 반응을 보인 반면, 양성인 20예 중 30%에서만 반응이 나타나, CMF 요법과 유사하게 c-erbB2 과발현에 따라 화학요법 반응도의 차이가 있음을 보고하였다.

이와 반대로 anthracycline 계열의 화학요법을 받은 유방암 환자들을 대상으로 한 연구들에서 c-erbB2 과발현이 동반된 유방암의 경우 화학요법에 대한 높은 반응도와 생존율의 연장을 보인다고 하였다. Paik 등(15)은 대규모의 후향적 무작위 연구를 통하여 adriamycin 화학요법군에서 c-erbB2 과발현이 있는 경우 무병생존율이 유의하게 높았음을 보고하였다. 그러나 c-erbB2 과발현이 adriamycin 화학요법의 반응도와 유의성이 없었다는 상반된 보고도 있다.(16)

본 연구 결과 c-erbB2 과발현에 따른 화학요법의 반응도가 CMF 군과 CAF 군에서 차이를 보였다. CMF 군에서 c-erbB2 음성인 경우 반응률은 35.9%로 양성인 경우의 33.3%와 유의한 차이는 없었다. 그러나 CAF 군에서는 c-erbB2 음성인 경우 23.8%의 반응률을 보인 반면, 양성인 경우 65.5%로 나타나 통계적으로 유의한 차이를 나타내어 이전 연구와 유사한 결과를 얻었다.

Wang 등(2)은 adriamycin 화학요법군에서 높은 핵 등급과 증식 활성도를 보인 경우 보강화학요법에 대한 반응도가 높았다고 보고하였다. 본 연구의 CAF 군에서 핵 등급 및 조직학적 등급이 2~3인 경우 46.9%에서 반응을 보인 반면, 1인 경우 모든 예에서 비반응을 보여 이전 연구와 일치하였으나, 통계적 유의성은 없었다.

CAF 군에서 화학요법의 반응도와 상관성이 있는 임상 병리학적 인자들에 대한 다변량 분석 결과, c-erbB2 단백질 과발현은 PR과의 높은 관련성에 의하여 화학요법의 반응에 대한 독립변수로서의 유의성은 없어 단일 예측지표로서의 유용성에는 한계가 있다고 생각된다.

비록 본 연구 결과는 몇몇 이전 연구들과 일치하고 있으

나, 일치하지 않는 결과를 보고한 연구들도 역시 있다. 이러한 결과의 차이를 유발하는 원인으로 각기 다른 항암제의 선택, 항암제의 용량, 환자의 선택 조건, 종양의 반응도 판정 기준 그리고 면역조직화학염색 기법과 판정 기준의 차이 등에 의한 것으로 생각된다.(2)

최근 Petit 등(5)은 c-erbB2 과발현에서 adriamycin의 용량에 따른 반응도의 차이를 보고하였다. c-erbB2 음성인 경우 adriamycin의 용량에 따른 반응률의 차이는 없었으나, c-erbB2 양성인 경우 adriamycin 50 mg/m²인 경우 완전 관해와 부분 관해는 12.5%에서 있었으며, adriamycin 100 mg/m²인 경우 100%로 향상되어 c-erbB2 양성 환자에서 고용량의 adriamycin이 효과적일 수 있음을 보고하였다. 본 연구에서는 CAF 군 모두에 adriamycin 50 mg/m²을 투여하였으므로, c-erbB2 과발현과 화학요법의 반응도와 상관성 분석에 있어 저용량의 adriamycin에 따른 반응도만을 반영하고 있다.

유방 조영술과 신체 검사를 이용하여 종양의 임상적 반응도를 측정할 경우, 잔류암의 섬유화 반응과 석회화로 인하여 종양 크기의 감소가 과소평가 될 수 있으며, 이와 반대로 잔류암의 크기가 작은 경우 과대평가 될 가능성이 있다.(17) 본 연구에서 완전 관해율이 이전 연구보다 다소 낮은 이유는 병리조직학적 반응도를 측정하여 1 cm 미만의 종양에서도 잔류암을 확인할 수 있었기 때문으로 생각된다.

최근 종양의 이차원적 단면적 혹은 3차원적 부피를 비교하여 반응도 평가를 시도하고 있으나,(14,18) 본 연구에서는 종양의 최장경만을 이용하여 화학요법에 대한 반응도를 평가하였으며, 이는 본 연구의 결과 분석에 있어 한계로 작용하였다.

정확한 면역조직화학염색을 위하여 절개 생검을 통하여 충분한 유방암 조직을 얻어야 한다.(6) 본 연구대상의 70%에서는 침생검을 통하여 조직을 적절히 얻을 수 있었으나, 세침흡인생검을 시행한 30%에서는 조직의 양이 비교적 충분치 않아 면역조직화학염색의 정확도에 있어 한계점으로 작용할 가능성이 있다. 특히 최근 p53 돌연변이를 면역화학염색법이 아닌 DNA 염기순서분석(sequencing)을 이용하여 직접 유전자 돌연변이의 확인이 가능하게 되어 향후 이에 대한 많은 연구가 필요할 것이다.(18)

결론

본 연구에서 CMF와 CAF 군 모두에서 술 전 화학요법에 대한 반응도와 p53 돌연변이간의 통계적인 상관성은 없었다. 그러나 c-erbB2 과발현과 화학요법의 반응도에 있어 CMF 군과 CAF 군간에 유의한 차이를 보여, 유방암 환자에서 술전 화학요법 선택을 위한 반응 예측지표로서 c-erbB2 과발현이 유용하게 적용될 수 있을 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Cance WG, Carey LA, Calvo BF, Sartor C, Sawyer L, Moore DT, et al. Long-term outcome of neoadjuvant therapy for locally advanced breast carcinoma: effective clinical downstaging allows breast preservation and predicts outstanding local control and survival. *Ann Surg* 2002;236:295-302.
- 2) Wang J, Buchholz TA, Middleton LP, Allred DC, Tucker SL, Kuerer HM, et al. Assessment of histologic features and expression of biomarkers in predicting pathologic response to anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in patients with breast carcinoma. *Cancer* 2002;94:3107-14.
- 3) Sjostrom J, Krajewski S, Franssila K, Niskanen E, Wasenius VM, Nordling S, et al. A multivariate analysis of tumour biological factors predicting response to cytotoxic treatment in advanced breast cancer. *Br J Cancer* 1998;78:812-5.
- 4) Kandioler-Eckersberger D, Ludwig C, Rudas M, Kappel S, Janschek E, Wenzel C, et al. TP53 mutation and p53 overexpression for prediction of response to neoadjuvant treatment in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000;6:50-6.
- 5) Petit T, Borel C, Ghnassia JP, Rodier JF, Escande A, Mors R, et al. Chemotherapy response of breast cancer depends on HER-2 status and anthracycline dose intensity in the neoadjuvant setting. *Clin Cancer Res* 2001;7:1577-81.
- 6) Bottini A, Berruti A, Bersiga A, Brizzi MP, Brunelli A, Gorzegno G, et al. p53 but not bcl-2 immunostaining is predictive of poor clinical complete response to primary chemotherapy in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000;6:2751-8.
- 7) Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993 Sep 24;74:957-67.
- 8) Elledge RM, Gray R, Mansour E, Yu Y, Clark GM, Ravdin P, et al. Accumulation of p53 protein as a possible predictor of response to adjuvant combination chemotherapy with cyclophosphamide, methotrexate, fluorouracil, and prednisone for breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1254-6.
- 9) Degeorges A, de Roquancourt A, Extra JM, Espie M, Boursstyn E, de Cremoux P, et al. Is p53 a protein that predicts the response to chemotherapy in node negative breast cancer? *Breast Cancer Res Treat* 1998;47:47-55.
- 10) Clahsen PC, van de Velde CJ, Duval C, Pallud C, Mandard AM, Delobelle-Deroide A, et al. p53 protein accumulation and response to adjuvant chemotherapy in premenopausal women with node-negative early breast cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16:470-9.
- 11) Tsutsui S, Ohno S, Murakami S, Hachitanda Y, Oda S. Prognostic value of c-erbB2 expression in breast cancer. *J Surg Oncol* 2002;79:216-23.
- 12) Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, Price KN, Save-Soderborgh J, Anbazhagan R, et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 1992; 10:1049-56.
- 13) Allred DC, Clark GM, Tandon AK, Molina R, Tormey DC, Osborne CK, et al. 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.
- 14) Willsher PC, Pinder SE, Gee JM, Ellis IO, Chan SY, Nicholson RI, et al. c-erbB2 expression predicts response to preoperative chemotherapy for locally advanced breast cancer. *Anticancer Res* 1998;18:3695-8.
- 15) Paik S, Bryant J, Park C, Fisher B, Tan-Chiu E, Hyams D, et al. erbB-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1361-70.
- 16) Rozan S, Vincent-Salomon A, Zafrani B, Validire P, De Cremoux P, Bernoux A, et al. No significant predictive value of c-erbB-2 or p53 expression regarding sensitivity to primary chemotherapy or radiotherapy in breast cancer. *Int J Cancer* 1998;79:27-33.
- 17) Moskovic EC, Mansi JL, King DM, Murch CR, Smith IE. Mammography in the assessment of response to medical treatment of large primary breast cancer. *Clin Radiol* 1993; 47:339-44.
- 18) Geisler S, Lonning PE, Aas T, Johnsen H, Fluge O, Haugen DF, et al. Influence of TP53 gene alterations and c-erbB-2 expression on the response to treatment with doxorubicin in locally advanced breast cancer. *Cancer Res* 2001;61:2505-12.