

T1 침윤성 유방암에서 인접 간질 조직의 Cathepsin D 발현

조백현 · 김도일 · 이원흥 · 이태진¹ · 유재형¹ · 전이경² · 박용검³ · 장인택³ · 윤세옥

미즈메디병원 외과, 중앙대학교 의과대학 병리학 교실¹, 성균관대학교 의과대학 삼성제일병원 해부병리과²,

중앙대학교 의과대학 외과학 교실³

Cathepsin D expression in the tumor cells and juxta-tumoral stromal cells of T1 invasive ductal carcinoma, Nos

Baik-Hyeon Jo, Doy Il Kim, Won Hung Lee, Tae Jin Lee¹, Jae Hyung Yoo¹, Yee Kyung Chun², Yong Keum Park³, In Taik Chang³, Sei Ok Yoon

Breast Center and department of General Surgery, Miz Medi Hospital, Seoul, Korea; Department of Anatomic Pathology¹ and General Surgery³, Chung Ang University, Seoul, Korea; Department of Pathology², Samsung Cheil Hospital, Sungkyunkwan University, Seoul, Korea

Introduction: Cathepsin D (CD) is a lysosomal protease that can be used as an important prognostic cytosolic factor for breast cancer. Its over-expression in breast cancer cells and in the host stromal cells in the tumor has been proposed as being a poor prognostic indicator. However, its prognostic value is still being debated. Therefore, CD expression needs to be examined in more relevant subsets of tissue in order to refine its prognostic significance and the clinical applications.

Methods: Regardless of the lymph node status, 110 T1 invasive ductal carcinomas of the breast were immunohistochemically evaluated for the CD expression using rabbit anti-cathepsin D monoclon-

al antibody. This study separately assessed the expression of CD in the invasive component (IDC), in the in situ component (DCIS), and in the juxtatumoral stromal cells (JTSC). The CD expression level in these three kinds of tissues were correlated with the nuclear grade, ER, PR, c-erb-B2, p53, the N stage, the T stage, and the 5 year metastasis-free survival.

Results: Positive CD expression in the JTSC was associated with the T stage ($p = 0.001$) and the N stage ($p = 0.029$), whereas positive CD expression in the DCIS and IDC was not. In addition, strong CD expression in the JTSC correlated with the nuclear grade of the invasive component ($p = 0.024$). In all three components, no statistically significant correlation was found between the biomarker (ER, PR, c-erb-B2, p53) and the CD expression. On univariate analysis, positive expression in the JTSC was correlated with a poor 5 year- metastasis free survival ($p = 0.007$), but the positive expression in the IDC and DCIS was not.

책임저자 : 조백현

157-833, 서울시 강서구 내발산동 701-4, 강서 미즈메디병원 외과

Tel: 02-2007-1442, Fax: 02-2007-1249, E-mail: drjo515@yahoo.co.kr

접수일 : 2004년 10월 12일, 게재승인일 : 2005년 3월 4일

본 논문의 요약은 2004년 The 6th Milan Breast Cancer Conference, Milan, Italy에서 Poster Presentation, 2004 추계외과 학회에서 구연으로 발표함

Conclusion: CD expression of the JTSC could represent the N stage, the T stage, and the nuclear grade of T1 IDC. Whether or not it would have an independent influence on the prognosis of T1 IDC, CD expression in the JTSC is probably an indicator of the tumor virulence. CD expression in the JTSC will provide an important clue for the development of new CD targeted therapies, and it will serve as an important criterion for selecting the appropriate candidates for these future targeted therapies.

(J Breast Cancer March 2005;8(1):17-26)

Key Words Cathepsin D expression, invasive ductal carcinoma, juxta- tumoral stromal cell(JTSC)

중심 단어 Cathepsin D, 침윤성 유관암, 종양외접기질세포

서 론

유방암의 일차적 치료에는 수술 후 종양의 크기와 림프절 전이, 그리고 에스트로겐 수용체 (ER), 프로게스테론 수용체 (PR), c-erb-B2 등 생물학적 표지자 (biomarker) 들의 표현양상을 참고하고, 이것을 근거로 여러 가지 치료법을 조합해서 적용하는 이른바 포괄적 치료법 (comprehensive therapeutic modality)이 이용된다. 특히 다양한 생물학적 표지자의 표현양상을 근거로 한 치료는 유방암의 생물학적 이질성을 극복하는데 큰 역할을 해 왔다. (1) 최근에는 진단 기술의 발달과 유방암 선별검사의 확대로 0기 및 1기암이 전체 발견 암에서 차지하는 비율이 증가하는 추세이고, 그 비율이 국내에서도 이미 30% 가 넘었으며, 국내의 정기 진단에서 발견된 암에서는 그 비율이 50% 가 넘는 보고가 있다. (2) 따라서 향후 과반수를 차지할 0기 또는 1기암에 대한 포괄적 치료법을 결정할 때 T stage 및 N stage의 가치는 상실되고 상대적으로 생물학적 표지자의 중요성이 더 커질 것이다.

유방암 환자의 예후에 관한 생물학적 표지자를 찾기 위해 단백분해효소를 대상으로 많은 연구가 이루어졌는데 그 중에서 cathepsin D는 유방암의 가장 많은 연구 대상이 되었을 뿐만 아니라, 현재는 cathepsin D를 이용한 치료법을 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. (3,4) 그러나 Westley와 May (5)가 다클론 (polyclonal antibody) 및 단클론항체 (monoclonal antibody)를 이용한 cathepsin D에 관한 여러 연구들을 분석하고 cathepsin D 발현과 유방암 환자 예후와의 관계는 연구자와 연구방법에 따라 많은 차이가 있다고 하였다.

이에 저자들은 cathepsin D의 예후인자로서의 가치를 재조명하기 위하여 연구 방법 (study design)을 고안할 때 다음 두 가지 가정을 고려하였다. 첫째 유방암에서 예후에 영향

을 미치는 cathepsin D 발현은 암 진행초기, 즉 종양이 작을 때 그 차이가 민감하게 나타날 것이며, 둘째 종양조직 안에 존재하는 기질세포의 cathepsin D 표현보다 종양에 인접해 있으나 조직학적으로는 정상 조직에 존재하는 기질세포 cathepsin D의 표현이 환자의 예후에 더 큰 영향을 미칠 것이라는 가정 하에 연구를 고안하였다. 이 두 가지 가정의 타당성을 조사하기 위해, 저자들은 림프절 전이 상태와는 관계없이 2cm 이하 크기의 침윤성 유관 상피암 (T1) 환자에서 침윤성 암 조직, 또는 이에 동반된 상피내 암 조직뿐만 아니라 비종양 조직의 섬유아세포 (fibroblast)와 조직구 (histiocyte)에서도 cathepsin D 표현 양상을 조사하기로 하였다.

본 연구의 목적은 종양 조직뿐만 아니라 종양 조직에 인접한 비종양 조직에서의 cathepsin D 표현양상을 분석하여, cathepsin D 발현이 기존의 예측 인자 및 예후 인자 그리고 환자의 생존율과의 연관성을 조사하고, 그 결과를 분석함으로써 cathepsin D의 예후 인자로서 가치를 정립하고, cathepsin D를 이용한 표적 치료제 개발을 위한 연구모델 제시하여 궁극적으로 치료대상자 선택에 이용할 수 있게 하는데 있다.

방 법

(1) 대상

1996년 1월부터 1997년 12월 까지 삼성 제일 병원 외과에서 근치적 수술 (유방보존치료 포함)을 받은 유방암 환자 중 림프절 전이에 관계없는 2cm 이하의 침윤성 유방암 환자 143예 중 침윤성 유관암 110예를 대상으로 하였다. 환자의 조직 병리 소견은 수술 당시 보고된 조직병리 소견을 참고하였다. 환자의 추적 조사는 환자의 임상기록을 참고하였고, 수술 후 최소한 5년간의 임상기록이 없는 환자에 대하여서는 동일한 내용의 설문으로 전화 방문을 시행하였다.

(2) 방법

(1) 수술 당시 조직은 1cm 간격으로 절삭하여 판정하였으며, 10% 중성 완충 포르말린으로 고정한 후, 1.5 x 1.5 x 0.5 cm 크기의 파라핀 포매로 보관 하였다.

(2) cathepsin D의 면역조직화학염색법

보관된 파라핀 포매 조직으로 4 μm의 두께로 절편을 만들어 30분 간 50-60 °C의 항온기 내에서 부착시킨 후 xylene을 이용하여 탈파라핀하였으며, 100%, 95%, 80%, 70% 의 알코올을 단계별로 사용하여 함수과정을 거친 후 조직 내의 내인성 과산화효소 (endogenous peroxidase)를 제거하기 위하여 3% 과산화수소로 10분간 처리하였다. 중류수로 수세

과정을 거친 후 항체의 비특이적 결합을 억제하기 위하여 정상 면양혈청을 이용하여 20분간 반응시킨 후 일차항체로 Rabbit-Anti-Cathepsin D monoclonal antibody (Zymed co., Cat. NO., 18-0109, South San Francisco, USA) 를 1:50 으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 부치시켰다. 0.05M Tris buffer PH 7.6을 사용하여 각각 5분간 세 단계의 수세과정을 거친 후 biotin과 결합한 항 생쥐 면양혈청 인 이차항체에 30분간 반응시켰다. Tris buffer로 수세하고 avidin과 결합한 과산화효소 복합제를 가하여 30분간 반응시킨 후, AEC (3-amino-9-ethylcarbazole, Zymed Lab. Inc., USA) 를 이용하여 양성세포를 발현시켰다. 이어 Mayer's hematoxylin 으로 대조염색하고 Ultramount (Labvision Inc., Cat. NO. TA-125-UM, USA) 로 봉입하여 광학현미경으로 검경하였다.

(3) ER, PR, p53, c-erb-B2 의 면역조직화학염색법

보편된 비염색 파라핀 포매 조직을 4 μ m의 두께로 박절하여 xylene으로 2회 탈파라핀하고 100%, 93%, 80% 에탄올로 처리한 후 증류수로 합수시켰다. 합수시킨 절편을 전자배인지를 사용하여 구연산 버퍼 pH 6.0에 15분간 처리한 후 3% 과산화수소수로 내인성 과산화효소의 작용을 억제하였다. 트리스 완충용액으로 수세한 다음 1차 항체로 에스트로겐 수용체 (이하 ER, monoclonal antibody 1D5, DAKO, Denmark), 프로게스테론 수용체 (이하 PR, monoclonal antibody 1A6, DAKO, CA USA), p53 (monoclonal antibody DO-7, DAKO Denmark), c-erbB-2(poly-clonal antibody DAKO, Denmark)를 이용하여 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 트리스 완충용액으로 수세하였다. Biotin과 결합된 2차 항체에 30분 3회 반응시키고 다시 트리스 완충용액으로 수세하고 streptavidin과 peroxidase

가 결합된 용액에 15분 간 처리하였다. 3-amino-ethyl carbamazol (AEC) 로 발색한 다음 헤마톡실린으로 대조염색하고 봉입하였다.

(4) 예후인자

종양의 분화도는 침윤성 암조직의 핵에서 reversed Black's nuclear grade (이하 RBNG) 를 기준으로 하여 RBNG II를 고 등급으로, RBNG I과I 를 비고등급으로 분류하였다. 6) 환자의 림프절 전이 및 종양의 크기를 American Joint Committee on Cancer (AJCC) 기준에 따라 NO (림프절 음성), N1 (양성 림프절 1-3개), N2 (양성 림프절 4-9개), N3 (양성 림프절 10개 이상), 그리고 T1a ($\leq$ 0.5 cm), T1b ($>$ 0.5 cm, $\leq$ 1.0 cm), T1c ($>$ 1 cm, $\leq$ 2 cm) 로 분류하였다.

(3) 결과의 판정

(1) Cathepsin D

검사 결과는 본 연구의 가설과 환자의 임상 결과를 모르는 한 명의 병리학자가 각각 침습성관암 중 상피내암 부분 (ductal carcinoma in situ component, associated invasive ductal carcinoma: 이하 DCIS), 침습성관암 중 침습암 부분 (invasive ductal carcinoma component: 이하 IDC), 종양에 인접한 간질 조직에서 cathepsin D 발현양상을 분리하여 판정하였다. 특히 저배율 (x10) 에서 종양 연을 관찰한 다음, 종양 연에서 5 mm 이상 떨어진 정상 유관 또는 소엽조직의 존재를 확인하였다. 이 주위의 비 종양 조직 내에 존재하는 섬유아세포 와 조직구를 종양인접 간질조직 (juxta-tumoral stromal cell : 이하 JTSC) 이라 정의하고, cathepsin D 발현 양상을 고 배율 (x40) 로 관찰하였다. 고 배율에서 세포질에 갈색으로 염색된 과립을 포함한 세포를 양

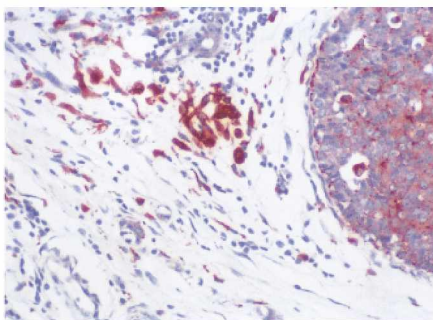


Fig 2. Immunohistochemical staining with rabbit anti-cathepsin D monoclonal antibody (H&E stain x100): The picture shows tumor margin (arrow), the positive cells of cathepsin D expression on the juxta-tumoral stromal cell (JTSC, Box) and DCIS (ductal carcinoma in situ) component.

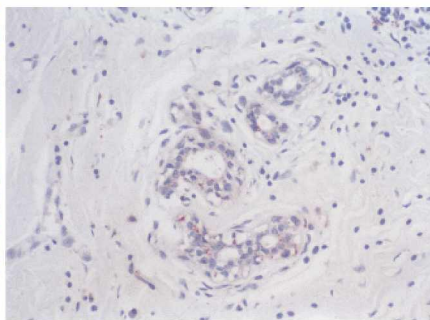


Fig 3. Immunohistochemical staining with rabbit anti-cathepsin D monoclonal antibody (H&E stain x100): The picture shows a normal duct (arrow) and the juxta-tumoral stromal cells (JTSC) with the negative expression of cathepsin D.

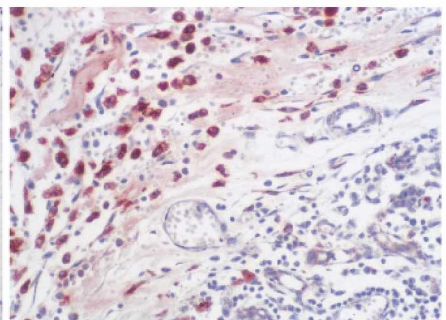


Fig 4. Immunohistochemical staining with rabbit anti-cathepsin D monoclonal antibody (H&E stain x400): The picture shows a normal lobule (bottom, right) and the juxta-tumoral stromal cells (JTSC) with the positive cathepsin D expression (top, left).

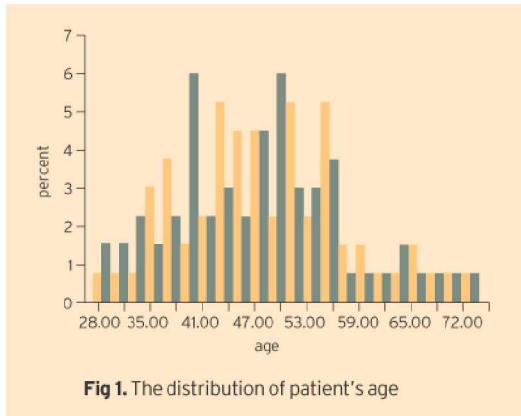


Fig 1. The distribution of patient's age

Table 1. Histopathologic classification.

Histopathology	Cases (n)	%
IDC without DCIS	35	32
IDC with DCIS	75	68
Total	110	100

IDC=invasive component of invasive ductal carcinoma;
DCIS=ductal carcinoma in situ associated with invasive ductal carcinoma.

Table 2. Cathepsin D expression in DCIS in relation to prognostic factors.

Factors		Group		Total	p value*
Factor	Subgroup	W	S		
Nodal status					
	N0	28	13	41	0.355
	N1	14	3	17	
	N2	5	2	7	
	N3	1	2	3	
	Total	48	20	68	
Tumor size					
	T1a	10	1	11	0.256
	T1b	3	2	5	
	T1c	35	17	52	
	Total	48	20	68	
Nuclear grade					
	high	23	12	35	0.364
	non-high	25	8	33	
	Total	48	20	68	

DCIS=ductal carcinoma in situ component of invasive ductal carcinoma; W=weak positive; S=strong positive.

* Pearson Chi-square test

정세포 (positive cell)로 판정하였다. 양성세포가 없는 경우를 음성 (negative), 양성세포가 전체의 10% 이하를 차지하는 경우를 약양성 (weak positive), 10% 를 초과한 경우를 강양성 (strong positive)으로 판정하였다 (Fig 2, Fig 3,

Fig 4).

(2) ER, PR, p53, c-erb-B2

한 명의 병리 의사가 판정하였으며, ER, PR, p53 단백질은 전체 종양세포의 핵 중 5%이 상 염색된 경우를 양성으로 정의하였다. c-erb-B2의 경우 종양세포의 세포막에 염색되는 정도를 약, 중간, 강으로 분류된 대조염색과 비교하여, 종양세포막 전체에 강 정도로 염색되는 경우 양성으로 판정하였다.

(4) 통계

DCIS, IDC, JTSC 등 세 가지 조직에서 관찰된 cathepsin D 발현 양상을 두 가지 기준치 (cut-off value)에 따라서 각각의 조직마다 환자 군을 분류하였다. 강 양성을 보인 환자들을 S (strong positive) 군으로 음성 또는 약 양성을 보인 환자들을 W (weak positive) 군으로 분류하였으며, 강 양성과 약 양성을 포함하는 모든 양성 환자를 P (positive) 군, 그리고 음성을 보인 환자를 N (negative) 군으로 각각 분류 하였다. 각 조직에서 S군과 W군, 그리고 P 군과 N 군 사이에 N stage, T stage, 핵 분화도, ER, PR, p53, c-erb-B2의 차이를 비교하였다. Cathepsin D 발현 양상과 각 변수와의 상관관계의 경우 SPSS (9.0 for windows) 에서 Pearson chi-square를 이용하여 각 변수에 대한 교차분석을 시행하였다. 그리고 cathepsin D 발현양상에 따른 세 조직에서의 5년 무원격전이 생존율 (Metastasis-free survival)을 Kaplan-Meier 누적 생존곡선에서 log-rank test를 이용하여 비교하였다. P 값이 0.05 이하일 때 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결 과

진단 당시 환자의 평균연령은 47.8 세 (28 -76세)였으며, 환자의 연령분포는 Fig 1에 표시되어 있다. 추적기간의 중간 값은 66개월 (6-83개월) 이었다. 전체 110예 중 DCIS를 동반하지 않은 IDC가 35예 (32%)였으며, DCIS를 동반한 경우가 75예 (68%) 였다 (Table 1).

(1) 조직에 따른 cathepsin D 발현과 예후 인자들과 관계

(1) DCIS의 cathepsin D 발현과 예후인자

DCIS가 동반된 75예 중 68예에서 cathepsin D 측정이 가능하였다. Cathepsin D 발현을 S 군과 W 군 사이에 T stage, N stage, 및 핵 분화도의 차이를 비교하였으나 의미 있는 차이는 없었다 (Table 2). 모든 DCIS 조직에서 cathepsin D 발현 양성을 보여 P 군과 N 군의 비교는 불가능하였다.

Table 3. Cathepsin D expression in IDC in relation to prognostic factors (cut-off value; 10% positive cells).

Factors		Group			p value*
Factor	Subgroup	W	S	Total	
Nodal status					
	N0	42	14	56	0.914
	N1	22	6	28	
	N2	6	3	9	
	N3	6	2	8	
	Total	76	25	101	
Tumor size					
	T1a	5	0	5	0.161
	T1b	10	1	11	
	T1c	61	24	85	
	Total	76	25	101	
Nuclear grade					
	non-high	39	15	54	0.450
	high	37	10	47	
	Total	76	25	101	

IDC=invasive component of invasive ductal carcinoma;
W=weak positive; S=strong positive. * Pearson Chi-square test

Table 5. Cathepsin D expression in JTSC in relation to prognostic factors (cut-off value; 10% positive cells).

Factors		Group			p value*
Factor	Subgroup	W	S	Total	
Nodal status					
	N0	44	19	63	0.307
	N1	22	7	29	
	N2	5	5	10	
	N3	4	4	8	
	Total	75	35	110	
Tumor size					
	T1a	10	1	11	0.233
	T1b	8	4	12	
	T1c	57	30	87	
	Total	75	35	110	
Nuclear grade					
	non-high	43	12	55	0.024
	high	32	23	55	
	Total	75	35	110	

JTSC=juxta-tumoral stromal cell; W=weak positive; S=strong positive.
* Pearson Chi-square test

Table 4. Cathepsin D expression in IDC in relation to prognostic factors (cut-off value; the presence of positive cell).

Factors		Group			p value*
Factor	Subgroup	N	P	Total	
Nodal status					
	N0	8	48	56	0.534
	N1	2	26	28	
	N2	0	9	9	
	N3	1	7	8	
	Total	11	90	101	
Tumor size					
	T1a	2	3	5	0.101
	T1b	1	10	11	
	T1c	8	77	85	
	Total	11	90	101	
Nuclear grade					
	non-high	8	46	54	0.150
	high	3	44	47	
	Total	11	90	101	

IDC=invasive component of invasive ductal carcinoma;
P=positive; N=negative. * Pearson Chi-square test

Table 6. Cathepsin D expression in JTSC in relation to prognostic factors (cut-off value; the presence of positive cell).

Factors		Group			p value*
Factor	Subgroup	W	S	Total	
Nodal status					
	N0	21	42	63	0.029
	N1	11	18	2	
	N2	0	10	10	
	N3	0	8	8	
	Total	32	78	110	
Tumor size					
	T1a	8	3	11	0.001
	T1b	5	7	12	
	T1c	19	68	87	
	Total	32	78	110	
Nuclear grade					
	non-high	12	43	55	0.093
	high	20	35	55	
	Total	32	78	10	

JTSC=juxta-tumoral stromal cell; P=positive; N=negative.
* Pearson Chi-square test

(2) IDC의 cathepsin D 발현과 예후인자

전체 110예 중 101예에서 IDC의 cathepsin D 측정이 가능하였다. 침윤성 암 조직의 cathepsin D 발현을 살펴보기 위해 S군과 W군 사이에 T stage, N stage, 및 핵 분화도의

비교하였으나 역시 의미 있는 차이는 없었다(Table 3). P군과 N군 사이에 세 가지 예후인자를 비교한 결과 역시 의미 있는 차이는 없었다(Table 4).

Table 7. Relationship between cathepsin D in IDC expression and biomarkers in IDC.

Biomarkers		Cathesin D expression in IDC		p value*
		Negative	positive	
ER	Negative	1	34	0.077
	Positive	9	55	
PR	Negative	4	34	0.912
	Positive	6	55	
P53	Negative	6	49	0.550
	Positive	3	38	
c-erbB-2	Negative	4	36	0.859
	Positive	5	51	

IDC=invasive component of invasive ductal carcinoma.

* Pearson Chi-square test

Table 8. Relationship between cathepsin D in JTSC expression and biomarkers in IDC.

Biomarkers		Cathesin D expression in JTSC		p value*
		Negative	positive	
ER	Negative	7	32	0.078
	Positive	23	45	
PR	Negative	10	33	0.367
	Positive	20	44	
P53	Negative	15	41	0.921
	Positive	13	34	
c-erbB-2	Negative	12	29	0.699
	Positive	16	46	

IDC=invasive component of invasive ductal carcinoma; JTSC=juxta-tumoral stromal cell.

* Pearson Chi-square test

(3) JTSC의 cathepsin D 발현과 예후인자

전체 110예 중 110에서 JTSC의 cathepsin D 측정이 가능하였다. 75예의 W군 환자 중에서는 고 등급의 침윤성 암을 가진 환자가 32예 (42.7%) 였으며, S군 35예의 환자 중 고 등급의 침윤성 암을 가진 환자가 23예 (65.7 %) 로 S군에서 고 등급의 암이 더 많았다 ($p = 0.024$). 그러나 S군 과 W군 사이에 T stage 와 N stage의 의미 있는 차이는 없었다 (Table 5). 78 예의 P군 환자 중 36예 (46.2%) 가 림프절 양성 이었으며 이 중 18예 (23.1%) 가 N2 이상이었던 반면, 32예의 N군에서는 11예 (34.4%) 가 림프절 양성이었으며 N2 이상의 환자는 한명도 없어 P 군의 환자에서 N 군의 환자보다 상대적으로 높은 N stage를 보였다 ($p = 0.029$). 또한, P군에서는 T1a, T1b, T1c 가 각각 3예 (3.8%), 7예 (9.0%), 68예 (87.2%) 이었고, N군에서는 각각 8예 (25.0%), 5예 (15.6%), 19예 (59.4%) 로 P 군 환자의 T stage가 높았다 ($p = 0.001$).

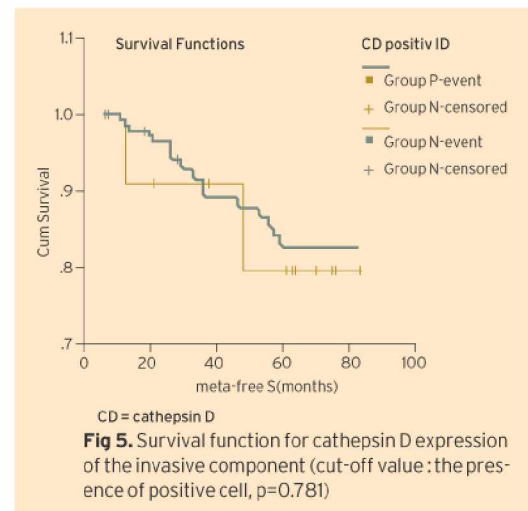


Fig 5. Survival function for cathepsin D expression of the invasive component (cut-off value: the presence of positive cell, $p=0.781$)

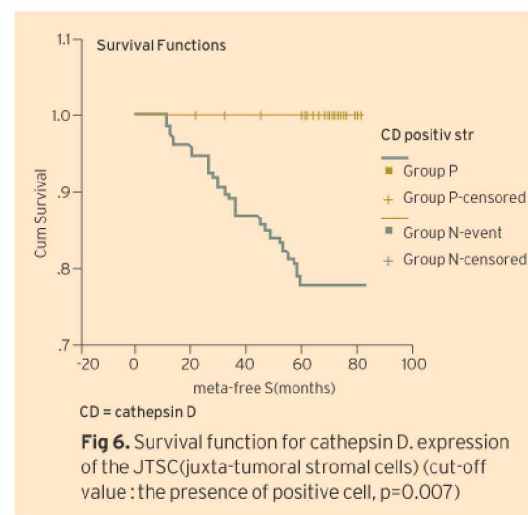


Fig 6. Survival function for cathepsin D expression of the JTSC(juxta-tumoral stromal cells) (cut-off value: the presence of positive cell, $p=0.007$)

그러나 P군과 N군 사이에 핵 분화도의 차이는 없었다 ($p = 0.093$) (Table 6).

(2) 생물학적 표지자와 cathepsin D 발현양상

IDC에서 cathepsin D의 발현을 조사한 101예 중 99예에서 ER과 PR의 발현을 조사할 수 있었으며, p53과 c-erbB-2는 96예에서 관찰할 수 있었으며, cathepsin D 발현은 ER, PR, p53, c-erbB-2의 발현양상과는 연관성이 없었다 (Table 7).

JTSC에서 cathepsin D의 발현을 조사한 110예 중 ER과 PR은 107 예에서, p53과 c-erbB-2는 103 예에서 발현양상을 조사할 수 있었으며, cathepsin D 발현은 ER, PR, p53, c-erbB-2의 발현양상과는 연관성이 없었다 (Table 8).

(3) cathepsin D 발현과 무원격전이 생존율

(1) DCIS의 cathepsin D 발현과 생존율

DCIS 조직에서 S군과 W군의 cathepsin D 발현양상에 따라 5년 무원격전이 생존율을 비교해 본 결과 두 군 간의 차이는 없었다 ($p = 0.085$).

(2) IDC의 cathepsin D 발현과 생존율

IDC 조직에서는 cathepsin D 발현양상에 따른 S군과 W군 간의 생존율의 차이를 조사하였으며, P군과 N군 간의 생존율도 같은 방법으로 비교하였다. S군과 W군 사이의 생존율 차이는 없었으며 ($p = 0.249$), P군과 N군 사이의 생존율 역시 차이가 없었다 ($p = 0.781$) (Fig 5).

(3) JTSC의 cathepsin D 발현과 생존율

JTSC의 cathepsin D의 발현양상에 따른 생존율 차이 역시 두 가지 판정기준으로 S군과 W군 간 그리고 P군과 N군 간에 조사하였다. S군과 W군 사이의 5년 무원격 전이 생존율의 비교에서 두 환자군 사이에 의미 있는 차이는 없었으나 ($p = 0.390$), P군과 N군 간의 비교에서는 32예의 N군에서는 추적기간 중 단 한 예도 원격전이를 일으키지 않았으나, P군에서는 전체 78예 중 16예에서 원격전이를 일으켜 두 환자군 사이에 의미 있는 차이를 보였다 ($p = 0.007$) (Fig 6).

고 찰

암 환자의 생존에 영향을 미치는 가장 중요한 종양세포의 생물학적 특성은 종양의 원격 전이성향 (propensity of metastasis) 이다.⁽⁷⁾ 이러한 전이 성향과 관련된 중요한 분자 기전은 단백분해효소 (protease) 의 과분비로 인한 기저막 (basement membrane) 의 파괴와 세포의 기질 (extra-cellular matrix) 의 파괴인데, 유방조직에서 분비되는 여러 계통의 단백 분해효소도 유방암의 침윤성과 원격전이에 관계하는 것으로 알려져 있다.⁽⁸⁾

Cathepsin D는 유방 조직뿐만 아니라 모든 정상세포에서 생성되며, 수유 후 유선 조직의 쇠퇴 시 비종양 조직의 개형 (remodeling) 에 관여한다.⁽⁹⁾ 암세포에서 cathepsin D의 역할에 관한 연구는 1987년 Rochefort⁽¹⁰⁾의 연구가 기원이 되었는데 MCF-7 세포에서 에스트로겐의 자극으로 생성된 52 kDa의 단백질을 정제 분석하고, 이것을 mannose-6-phosphate signal을 가진 procathepsin D라 하였다. 이 전구물질은 산성 pH의 실험실적으로 (in vitro) autocrine 경로를 통한 세포분열 능력 (mitogenic activity)과 기저막 및 proteoglycan을 파괴하는 능력을 가지며, 자기 활성화작용으로 48 kDa의 중간형태 (intermediate form)를 거쳐서 34 kDa, 14 kDa의 활성형태 (mature form)로 전환되어 작용한다. 이러한 과정은 lysosome에서 진행되며, 유방암 세

포에서는 정상세포보다 활성화가 지연되어 전구물질과 중간 형태의 분비가 증가되고 축적된다.⁽¹¹⁾ 지금까지 밝혀진 cathepsin D의 생물학적 작용은 세포의 악성 표현과 전이성의 증가,⁽¹²⁾ 성장자극인자의 국소 생물학적 이용도를 증가시켜 전이성 세포의 증식을 자극하며 세포의 기질의 파괴,⁽¹³⁾ 성장억제자의 불활성화,⁽¹⁴⁾ 세포 자멸사의 방지,⁽¹⁵⁾ 혈관 생성⁽¹⁶⁾ 등이라고 밝혀졌다.

이러한 연구 결과와 함께 유방암에서 예후인자로서 cathepsin D의 효용성에 대한 연구가 시도되었다. 몇몇 연구에서 종양세포의 cathepsin D 발현 증가와 종양의 크기, 조직학적 등급, 호르몬 수용체 상태 등 기존의 예후 인자와는 관계없는 것으로 보고되었으나, 액와 림프절 전이와는 연관성이 있는 것으로 보고되었다.⁽¹⁷⁾

유방암 조직의 cathepsin D 발현 증가와 생존율에 관한 연구에서는 다양한 결과를 보였다. 액와 림프절 음성인 환자에서 cathepsin D 발현이 높은 환자에서 예후가 불량하였으나, 림프절 양성 환자들에서는 생존율의 차이가 없다는 보고가 있다.^(17,18) 반면, 림프절 양성에서만 예후가 불량하고 음성인 환자에서는 영향이 없다는 보고도 있다.⁽¹⁹⁾ Duffy 등⁽²⁰⁾은 림프절전이 상태와 관계없이 cathepsin D 발현 증가와 환자의 예후와는 연관성이 없다고 하였다. 그러나 Henry 등⁽²¹⁾은 cathepsin D의 발현 증가가 림프절 음성 환자의 생존율에는 영향이 없으나, 양성 환자에서는 오히려 양호하다는 결과를 보고하였다. Isola 등⁽²²⁾은 림프절 음성 환자에서의 분석에서 크기가 2 cm 이하인 종양에서만 cathepsin D의 발현 증가가 환자의 불량한 예후와 상관관계가 있다고 발표하였다.

이와 같이 유방암 세포에서의 cathepsin D 발현과 예후에 관한 분석이 서로 상이한 결과를 초래한 원인은 측정방법과 판정기준의 상이함 그리고 추적기간의 차이에 의한 것으로 분석되어 왔다. 초기에 cathepsin D에 관한 연구를 위해 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay),⁽²³⁾ IRMA (immunoradio magnetic assay),⁽²⁴⁾ 그리고 Western blot⁽¹⁷⁾이 이용되었다. 그러나 이러한 방법들은 세포질의 추출물을 이용한 방법이기 때문에 종양세포와 종양 주위의 기저세포를 각각 구분하여 cathepsin D의 발현 양상을 알기에는 불가능하였다. Henry 등⁽²⁰⁾이 처음으로 rabbit polyclonal antiserum를 이용한 면역조직화학염색법 (immunohistochemistry)으로 종양세포와 종양내 존재하는 기질세포를 분리하여 cathepsin D 발현을 조사한 이래, 기질세포에서의 cathepsin D 발현 증가와 예후의 연관성에 관한 연구 결과들이 보고되었다.⁽²⁵⁻²⁷⁾ 그런데 다수의 연구에서 종양세포에서의 cathepsin D 발현과 환자의 생존은 연관성이 없으나, 기질세포에서의 cathepsin D 발현

증가는 환자 생존율의 저하와 연관이 있다고 보고하였다. Joensuu 등 (26) 은 기질세포에서의 cathepsin D 표현 양상을 조사하여, 전체 환자와 림프절 양성군의 경우에는 예후와 상관관계가 있지만 이 음성군에서는 관계없다고 보고하였으며, Tetu 등 (25) 은 림프절 양성군의 무병생존 (relapse-free survival)에만 영향을 미친다고 하였다. 이러한 다양한 결과는 면역조직화학검사법에서 사용되는 단일클론 또는 다클론 항체의 다양성에 기인한 것이라고 분석되어졌으며, Ravdin 등 (28) 은 단일클론 항체를 사용하였을 때 다클론 항체를 사용한 경우보다 더 일정한 검사 결과를 얻을 수 있다고 하였다. 저자들은 이러한 이유 외에 두 가지 면에서 또 다른 문제를 제시하게 되었다. 첫째, 단일클론 항체를 이용한 연구들에서도 환자의 예후나 기존의 예후인자와의 상관관계가 모두 일치하지 않았으며, 둘째, 지금까지 수행된 모든 검사는 종양 세포와 종양 조직 내의 기질 세포에서 cathepsin D 발현을 측정하였다. Nadji 등 (27) 의 연구에서는 종양 가장자리에 인접한 조직에서의 기질 세포들을 포함하기는 하였으나, 기질세포에 대한 cathepsin D 발현의 측정 대상은 주로 종양 조직 안에서 이루어 졌다.

저자들은 암 진행에 있어서 조직 단백질분해효소는 종양조직보다 종양 조직에 인접한 정상간질조직에서의 작용이 더 중요한 영향을 미칠 것이라 생각하였다. 따라서 종양에 인접한 정상 기질세포에서의 cathepsin D의 발현 정도가 종양의 독성을 반영할 수 있다고 가정을 하였다. Joensuu 등 (26) 도 cathepsin D 발현과 예후 인자의 연관성에 대한 상반된 결과를 보인 이유를 기질세포에서의 cathepsin D 발현 양상이 예후에 미치는 중요성을 간과했기 때문이라고 분석하였다. Cathepsin D 발현과 예후와의 관계에 대한 여러 연구 중, 조직 추출물을 이용한 연구들의 결과가 면역조직화학염색법에 의한 연구들의 결과보다 더 일관된 결과를 보고하였다. 또한, 이러한 결과 역시 조직 추출물은 암세포, 암조직의 기질 세포, 또는 경계가 불분명한 종양조직 인접부위의 정상조직 등을 검사대상에 포함시켜 측정하였으며, 그 결과 환자의 예후에 가장 민감하게 영향을 미치는 종양 내외의 기질세포 cathepsin D의 발현 변화가 전체 측정치에 영향을 미쳤기 때문이라고 저자들은 판단하였다. Moirfar 등 (29) 은 유방암 세포와 유방암 인접부위 기질세포의 유전자 분석에 관한 연구에 따르면, 암조직에서 떨어진 정상 유방조직 내의 기질 세포의 유전자 변이가 유관 상피세포의 표현형 변화에 앞서 발생한다고 하였다. 인체 대장암을 대상으로 한 연구에서 침윤성 종양결절 주위의 기질세포에서는 단백질분해효소의 일종인 urokinase-type plasminogen activator의 mRNA 발현을 관찰할 수 있었으나 종양세포에서는 mRNA의 발현을 관찰하지 못하였다. (30) 이것은 비록 다른 장기에서 다른 종

류의 단백질분해 효소에 관한 연구결과지만, 저자들은 유방암 환자에서 cathepsin D 작용도 같은 기전에 의한 것이라 추론하였다.

본 연구에서는 IDC 환자의 세 가지 조직에서 cathepsin D의 발현 양상을 조사하였다. 그리고 그 결과를 여러 가지 예후 및 예측 인자 그리고 5년 무원격전이 생존율과 비교하였으며, 이 결과를 토대로 세 가지 조직 즉 DCIS, IDC, 및 JTSC 중 어느 조직에서 어떤 기준 (cut-off value) 으로 판정할 때 예후와 연관성을 지을 수 있는지 조사하였다.

유방암 세포를 에스트로겐으로 자극하여 생성되는 물질을 연구하던 중에 cathepsin D의 정체가 밝혀지기는 하였지만 ER과 cathepsin D 발현과의 연관성에 관해서는 직접적인 연관성이 없다고 의견이 모아지고 있다. (31) 저자들도 IDC와 JTSC에서 cathepsin D 양성 발현과 중앙조직의 ER, PR, c-erb-B2, p53 발현과의 상관관계를 조사하였으며, IDC와 JTSC 두 조직 모두에서 네 가지 생물학적 표지자의 발현과는 직접적인 상관관계가 없었다.

Cathepsin D 발현을 평가할 때 저자들이 단지 세포질 내에 미만성으로 염색된 세포의 경우 음성으로 간주하고, 고 배율에서 세포질 내에 갈색으로 염색된 과립이 존재하는 세포만을 양성으로 판정하였다. 이것은 첫째 cathepsin D가 용해소체 (lysosome) 에서 생성되어 작용하고, 둘째 blocking reagent와의 전배양 (preincubation) 으로 완전히 제거되지 않은 세포질 내의 비 특이적 항원과의 항체결합에 의한 위양성의 가능성을 배제하기 위함이다.

각 조직의 cathepsin D 발현을 두 가지 판정기준으로 환자를 분류했으며, 두 가지 판정기준에 따라 각 조직마다 기존 예후 인자들과의 상관관계를 분석하였다. 다른 연구 (27) 를 참고로 양성세포 10%를 기준으로 나눈 W군과 S군 사이에 T stage, N stage, 핵 분화도와의 상관관계를 DCIS, IDC, JTSC에서 조사한 결과 세 조직 모두에서 T stage 와 N stage는 연관성이 없는 것으로 분석되었다. 핵 분화도에 따른 분석에서는 DCIS와 IDC의 cathepsin D 발현과는 상관관계가 없었으나, JTSC에서 cathepsin D 발현 강 양성을 보인 S 군에서 암세포의 핵 분화도 고등급 환자의 비율이 W 군보다 의미 있게 높았다. 또한 양성세포의 존재 유무로 분류한 N군과 P군 간의 차이에 대하여 같은 방법으로 분석했는데, DCIS의 경우 모든 환자에서 양성을 보였기 때문에 IDC와 JTSC 두 조직을 대상으로 시행하였다. 이 분석에서 우리는 IDC의 경우 3가지 예후 인자 모두 두 환자군 사이에 차이가 없었으나, JTSC의 경우 T stage 와 N stage에 대하여 두 군 사이에 유의한 차이를 보였다. 즉 JTSC에서 cathepsin D 발현 양성인 환자에서 음성인 환자에서 보다 림프절 전이가 더 진행되어 있었으며, 종양의 크기가 더 크고

해석될 수 있다.

결 론

유방암 조직의 cathepsin D 발현양상은 종양 조직보다, 종양에 인접한 비 종양조직내의 간질 조직에서의 표현양상이 환자의 예후에 영향을 미치는 예후 인자들과 연관성을 가지며, 결과적으로 암의 독성 (virulence) 을 반영한다. 또한 향후 cathepsin D를 이용한 표적치료를 연구할 때, JTSC의 cathepsin D 발현 양상을 근거로 환자 군을 나누어 치료 효과를 판정하고, 나아가서 치료 대상 환자를 적절히 선택함으로써 표적치료의 효율을 향상시킬 수 있을 것이다.

REFERENCES

- Morrow M and Harris JR. Local management of invasive breast cancer. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK, editors. Diseases of the Breast. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott; 2000. p.515-60.
- Hur MH, Jo BH, Lee HK, Lee SK, Lee JH, Kang SS, et al. Breast cancer screening of 51,179 women. J Kor Surg Soc 2002;66:11-4.
- Brunner WN, Stephens RW, Dan[©]™ K. Control of invasion and metastasis. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK, editors. Diseases of the Breast. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott; 2000. p.367-75.
- Glondou M, Liaudet-Coopman E, Derocq D, Rochefort H, Garcia M. Down-regulation of cathepsin-D expression by antisense gene transfer inhibits tumor growth and experimental lung metastasis of human breast cancer cell. Oncogene 2002;21:5127-34.
- Westley RB and May FE. Cathepsin D and Breast Cancer. Eur J Cancer 1996;32A:15-24.
- Fisher ER, Gregorio RM, Fisher B, Redmond C, Vellios F, Sommers SC. The pathology of invasive breast cancer. A syllabus derived from findings of the National Surgical Adjuvant Breast Project (protocol no. 4). Cancer 1975;36:1-85.
- Heiman R. and Hellman S. Clinical progression of breast cancer malignant behavior: What to expect and When to expect it. J Clin Oncol 2000;18:591-9.
- Rochefort H, Capony F, Garcia M. Cathepsin D in breast cancer: From molecular and cellular biology to clinical applications. Cancer Cells 1990;42:383-8.
- Hernandez-Montes H, Escudero I, Villalpando S. Changes in cathepsin D activity of maternal tissues during lactation and weaning in rats. Arch Med Res 1999;30:10-3.
- Rochefort H, Capony F, Garcia M, Cavailles V, Freiss G, Chambon M, et al. Estrogen-induced lysosomal proteases secreted by breast cancer cells: a role in carcinogenesis? J Cell Biochem 1987;35:17-29.
- Capony F, Rougeot C, Montcourrier P, Cavailles V, Salazar G, Rochefort H. Increased secretion, altered processing, and glycosylation of pro-cathepsin D in human mammary cancer cells. Cancer Res 1989;49:3904-9.
- Garcia M, Derocq D, Pujol P, Rochefort H. Overexpression of transfected cathepsin D in transfected cells increases their malignant phenotype and metastatic potency. Oncogene 1990;5:1809-14.
- Briozzo P, Badet J, Capony F, Pieri I, Montcourrier P, Barritault D, et al. MCF7 mammary cancer cells respond to bFGF and internalize it following its release from extracellular matrix: a permissive role of cathepsin D. Exp Cell Res 1991;94:252-9.
- Liaudet E, Derocq D, Rochefort H, Garcia M. Transfected cathepsin D stimulates high density cancer cell growth by inactivating secreted growth inhibitors. Cell Growth Differ 1995;6:1045-52.
- Saftig P, Hetman M, Schmahl W, Weber K, Heine L, Mossmann H, Koster A, et al. Mice deficient for the lysosomal proteinase cathepsin D exhibit progressive atrophy of the intestinal mucosa and profound destruction of lymphoid cells. EMBO J 1995;14:3599-608.
- Berchem G, Glondou M, Gleizes M, Brouillet JP, Vignon F, Garcia M, Liaudet-Coopman E. Cathepsin-D affects multiple tumor progression steps in vivo: proliferation, angiogenesis and apoptosis. Oncogene 2002;21:5951-5.
- Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Chirgwin JM, McGuire WL. Cathepsin D and prognosis in breast cancer. N Engl J Med 1990;322:297-302.
- Isola J, Weitz S, Visakorpi T, Holli K, Shea R, Knabaz N, et al. Cathepsin D expression detected by immunohistochemistry has independent value in axillary node-negative breast cancer. J Clin Oncol 1993;11:36-43.
- Namer M, Ramaioli A, Fontana X, Etienne MC, Hry M, Jourlail A, et al. Prognostic value of total cathepsin D in breast tumors. Breast Cancer Res Treat 1991;19:85-93.
- Duffy MJ, Brouillet JP, Reilly D, McDermott E, O'Higgins N, Fennelly JJ, et al. Cathepsin D concentration in breast cancer cytosols: correlation with biochemical, histological, and clinical findings. Clin Chem 1991;37:101-4.
- Henry JA, McCarthy AL, Angus B, Westley BR, May FE, Nicholson S, et al. Prognostic significance of the estrogen-regulated protein, cathepsin D in breast cancer. An immunohistochemical study. Cancer 1990;65:265-71.
- Isola J, Weitz S, Visakorpi T, Holli K, Shea R, Khabbaz N, et al. Cathepsin D expression detected by immunohis-

tochemistry has independent prognostic value in axillary node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 1993;11:36-43.

23 Maudelonde T, Khalaf S, Garcia M, Freiss G, Duporte J, Benatia M, et al. Immunoenzymatic assay of Mr 52,000 cathepsin D in 182 breast cancer cytosols: low correlation with other prognostic parameters. *Cancer Res* 1988;48:462-6.

24 Benraad TJ, Geurts-Moespot A, Sala M, Piffanelli A, Ross A, Foekens JA. Quality control of cathepsin-D measurement by the EORTC Receptor Study Group. *Eur J Cancer* 1992;28:72-5.

25 Tetu B, Brisson J, Cote, Brisson S, Potvin D, Roberge N. Prognostic significance of cathepsin D expression in node-positive breast carcinoma: an immunohistochemical study. *Int J Cancer* 1993;55:429-35.

26 Joensuu H, Toikkanen S, Isola J. Stromal cell cathepsin D expression and long term survival in breast cancer. *Br J Cancer* 1995;71:155-9.

27 Nadji M, Frenso M, Nassiri M, Conner G, Herrero A,

Morales AR. Cathepsin D in host stromal cell, but not in tumor cells, is associated with aggressive behavior in node-negative breast cancer. *Human Pathol* 1996;27:890-5.

28 Ravdin PM, Tandon AK, Allred DC, Clark GM, Fuqua SA, Hilsenbeck SH, et al. Cathepsin D by western blotting and immunohistochemistry: failure to confirm correlations with prognosis in node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 1994;12:467-74.

29 Moinfar F, Man YG, Arnould L, Bratthauer GL, Ratschek M, Tavassoli FA. Concurrent and independent genetic alterations in the stromal and epithelial cells of mammary carcinoma: implications for tumorigenesis. *Cancer Res* 2000;60:2562-6.

30 Pyke C, Kristensen P, Ralfkiaer E, Grondahl-Hansen J, Eriksen J, Blasi F, et al. Urokinase-type plasminogen activator is expressed in stromal cells and its receptor in cancer cells at invasive foci in human colon adenocarcinomas. *Am J Pathol* 1991;138:1059-67.
