

# 유방암 조직내 HER2 검색 표준화의 필요성

박 경 미

인제대학교 의과대학 상계백병원 병리학교실

## 서 론

대부분의 인체 암은 특정 암유전자 및 암억제유전자의 변이만으로 발생하지 않으며 여러 과정의 다양한 유전적 변화를 동반한다. human genome project의 결과로 암 환자의 혈청이나 암조직으로 cDNA microarray를 이용하여 다양한 유전자들의 변화를 신속하고 경제적으로 분석할 수 있게 되었다. 그러나 유전자 분석의 결과를 이용하여 동정한 여러 유전자들의 증폭 또는 결손이 특정 질환에 관여하는가의 여부는 일정 모수 이상의 동일 질환에서 특정 유전자의 발현 변화를 분석하여 확인하는 것이 필수 과정이다. 이러한 과정을 거쳐 특정 암질환에 관여하는 것이 확인된 유전자는 암의 진단뿐 아니라 치료 약제의 개발에도 이용되고 있다. 최근 암치료의 경향은 독성이 강한 항암요법을 최소한으로 줄이는 반면 특정 목표를 선택적으로 치료하는 유전자요법과 면역요법을 선호하여 치료 효과는 높이면서 치료에 의한 부작용을 최소화하려는 방향을 지향하고 있다. 현재 임상에 사용되고 있는 면역요법인 폐암의 EGFR 항체, 백혈병의 bcr - abl 유전자 억제제와 함께 유방암에서는 HER2 억제요법이 대표적이다.

## 유방암 치료에 HER2/neu 검색의 필요성

암유전자인 HER2는 유방암의 발생에 관여할 뿐 아니라 특정 치료 약제에 대한 반응을 예측하는 데에도 이용되어 유방암 환자에서 HER2의 검색은 호르몬수용체 검색과 같은 의미를 가진다. 인체 암에서 HER2 단백질의 과발현은 HER2 유전자의 증폭에 의한 결과가 대부분이

며 유방암에서 HER2 유전자의 증폭이나 단백질의 과발현은 20 - 30%의 환자에서 관찰된다. HER2 유전자는 transmembrane receptor tyrosine kinase 작용을 가지고 있으며 세포의 성장을 촉진시킨다. HER2는 유방암의 발생에 관여하는 암유전자로 불량한 예후와의 관련이 확인되었다 (1, 2). HER2의 과발현을 보이는 경우 anthracycline 계열의 치료 효과가 좋다는 임상시험 결과가 보고되고 있지만 cyclophosphamide, methotrexate, 5-FU(CMF) 치료에는 내성을 보여 치료 예측인자로서의 역할도 확인되었다 (3 - 7). 또한 HER2 과발현을 나타내는 경우 tamoxifen에 대한 내성을 보이고 aromatase 억제제의 효과가 상대적으로 높다는 연구 결과들도 보고되고 있다 (8). 이 후 taxane 계열의 항암제 효과와 HER2 발현과의 상관성을 분석한 자료들도 발표되고 있다 (9). 최근에는 HER2의 extracellular domain에 대한 단클론 항체인 trastuzumab (Herceptin®)이 개발되면서 유방암 환자의 HER2가 분자생물학적 치료의 첫번째 표적이 되면서 HER2 상태의 중요성이 재확인 되었다 (10, 11). Trastuzumab은 HER2를 통한 암세포의 성장 신호전달을 차단하여 성장을 억제시킴으로써 HER2 과발현을 보이는 유방암의 40% 내외에서 우수한 치료효과를 나타낸다. 전이성 유방암 환자 중 HER2의 과발현을 보이는 경우, trastuzumab과 paclitaxel과의 병합요법이 trastuzumab 단독요법보다 높은 치료효과를 보인다 (12). Trastuzumab은 HER2 단백질의 과발현을 보이거나 HER2 유전자 증폭이 관찰되는 유방암에만 치료효과를 보이며 HER2 과발현이 없는 유방암에는 효과가 증명되지 않았다. 결국 항암제 치료를 받는 모든 유방암 환자들에서 HER2 과발현을 정확히 검색하는 것은 유방암 환자 진료의 필수적인 과정이 되었다 (13). HER2를 검색하는 방법에는 HER2 DNA의 증폭, mRNA, 또는 HER2 단백질의 과발현을 확인하는 방법 등이 있는데 실제적으로 면역조직화학검색과 형광제자리부합법(fluorescence in situ hybridization: FISH)이 가장 보편적으

통신저자 : 박경미  
(우) 139 - 797, 서울시 노원구 상계7동 761 - 1, 상계백병원 병리과  
Tel. (02) 950 - 1263, Fax. (02) 951 - 6963  
E - mail: kmpark@sanggyepaik.ac.kr

로 이용되고 있다. HER2 단백질의 과발현은 대부분 DNA 증폭에 의한 결과이며 조직의 처리나 보관 과정에 대하여 가장 안정적인 HER2 DNA의 증폭을 검색하는 방법인 FISH 검사가 가장 정확하고 바람직하다. 특정 유전자의 발현을 확인하기 위하여 시행하는 면역조직화학적 검색은 유전자의 산물인 단백질을 간편하게 확인할 수 있는 방법이다. 그러나 면역조직화학적 검색으로는 유전자 레벨의 유전자 증폭, 결손, 전위 등을 확인할 수 없다. HER2 유전자의 경우 유전자의 증폭이나 과발현이 항암제에 대한 효과를 더 정확히 예측할 수 있는 지표이므로 (14) HER2 유전자에 대한 검색이 환자 치료에 필수적이다. 유전자 복제 수와 단백질 발현간의 불일치율이 존재하는 것도 면역조직화학적 검색보다는 유전자 증폭의 분석이 필요한 증거가 된다. 그러나 면역조직화학적 검색방법은 일차 항체의 다양한 특이도나 판독자간의 객관성 결여 등이 문제점으로 제시되고 있다 (13, 15). 유방암에서 HER2 유전자의 증폭은 15 - 25%의 빈도로 관찰되는 반면 HER2 단백질의 발현은 10 - 50%로 연구논문마다 다양한 빈도로 보고되었다 (16). 실제로 면역조직화학적 검색으로 HER2 단백질의 과발현이 확인되는 경우에도 FISH로는 HER2 유전자의 증폭이 전혀 없는 경우가 드물지 않으므로 효과적인 치료를 위해서는 반드시 FISH로 확인하는 것이 중요하다 (17 - 19). 유방암의 HER2 상태와 anthracycline 치료의 반응에 대한 연구에서 단백질 과발현 상태보다는 유전자 증폭이 치료 반응을 예측함에 있어 더 민감한 것으로 보고되고 있다 (1, 14). 치료 약제의 반응을 정확히 예측하는 것은 치료 효과를 극대화하고 불필요한 치료를 줄이는 것이며 HER2를 유방암 치료의 예측 인자로 사용하기 위해서는 검색방법의 표준화가 trastuzumab의 임상 이용에 앞서 시급한 과제라고 하겠다. 인체의 암은 다양한 유전자 이상에 의하여 발생하므로 유전자 레벨에서의 연구가 최근 급진적으로 발달되고 있다. 인체 암 조직에서 유전자의 증폭을 분석하는 방법으로 FISH가 많은 장점을 가지고 있다. 인체 암 조직은 암세포뿐만 아니라 주위의 간질 조직 및 염증세포를 포함하고 있다. 이러한 종양 조직의 이질성(heterogeneity)에 의하여 Southern blot은 암세포의 다른 세포들이 포함되어 분석의 정확도가 떨어질 수 있다. FISH는 정상 세포와 동시에 조직학적으로 동정된 암세포의 핵 내에서 유전자 복제 수를 관찰하여 유전자 증폭 여부를 정확히 구별할 수 있는 장점을 가지고 있다. 또한 소량의 조직에서도 검색이 가능하므로 조기 진단으로 얻을 수 있는 암조직의 양이 점점 작아지는 현실에도 유리한 면을 가지고 있다.

FISH는 유전자의 복제 수를 분석하므로 면역조직화

적 검색에 비하여 객관적이고 정확한 정량적 분석법이다. 그러나 FISH는 고가 장비인 특수 형광현미경이 필요하며 DNA probe의 가격이 비싼 단점이 있다 (20). DNA 검사 비용의 절감을 위하여 FISH와 면역조직화학적 검색을 절충한 발색제자리부합법(chromogenic in situ hybridization: CISH) 방법이 개발되기도 하였다. 이 검색은 통상의 광학현미경으로 유전자 증폭을 확인할 수 있어 각광을 받았지만 FISH 방법처럼 정상 대조 염색체와의 비교가 불가능하고 아직 표준화가 이루어지지 않아 임상에 이용되고 있지는 않다 (21 - 23). FISH와 비교하여 면역조직화학적 검색을 이용한 HER2 단백질 검색은 신속하고 경제적이며 보편성을 가지고 있다. 그러나 조직의 보관이나 처리과정, 면역염색에 사용하는 항체의 종류 또는 염색방법에 따라 다른 결과를 얻을 수 있고 판독의사에 따라 주관적인 판독을 초래하는 단점이 있다. HER2 검색에 있어 같은 방법들의 결과간에도 일치하지 않는 경우가 많고 시행하는 기관에 따라서도 큰 편차를 보여 HER2 검색법의 표준화는 아직 이루어지고 있지 않은 실정임을 알 수 있다 (24 - 26). 특히 National Surgical Breast and Bowel Project(NSABP)의 경험을 보면 검사 건수가 적은 기관에서는 FISH 외의 다른 방법으로 HER2를 검사하는 경우에 검사 건수가 많고 표준화가 이루어진 기관으로부터 인증을 받아야 한다고 강조하였다 (25).

## HER2 검색의 표준화 경험

단일 기관에서 시행한 HER2 검색의 비교는 면역조직화학적 염색과 비교하여 FISH의 정확도를 보여 준 바가 있다 (27). 이 연구는 한 증례의 유방암 파라핀 블록 당 3군데에서 조직을 채취하여 tissue microarray(TMA) 블록을 제작한 후 3개의 연속 절편 슬라이드를 얻어 2회 이상에 걸쳐 HER2 FISH 검색과 면역조직화학적 검색을 시행하여 결과를 비교하였다. 각 TMA에는 134 - 261 예의 유방암 조직이 포함되었다. FISH 검색은 PathVysion™ HER2 DNA probe(Vysis Inc., Downers Grove, IL, U.S.A.)를 사용하였고 면역조직화학적 검색을 위한 항체로는 HercepTest®(Dako, Carpinteria, CA, U.S.A.), Rabbit anti - c - erbB2 (Zymed, South San Francisco, CA, U.S.A.), Mouse anti - c - erbB2(Zymed)를 이용하였다. 동일한 실험 조건에서 동시에 FISH와 면역조직화학적 검색을 시행하여 그 결과들을 비교 분석하였다.

FISH 검색으로 HER2 유전자의 증폭은 24 - 28%의 빈도로 관찰되었고 동일한 TMA의 FISH 결과의 일치도는

92 - 100% ( $\kappa=0.994 - 0.965$ )로 검색 결과의 일치도가 매우 높음을 확인하였다. 면역조직화학적 검색으로 HER2 단백질의 과발현은 21 - 27%에서 관찰되었다. 면역조직화학적 검색 결과가 강 양성(3+)인 예들을 FISH의 결과와 비교 분석했을 때 HER2 유전자의 증폭과 단백질의 과발현은 70 - 100%에서 일치하였다. 면역조직화학적 검색 결과 2+인 예들을 FISH의 결과와 비교 분석했을 때 HER2 유전자 증폭과 단백질의 과발현은 45 - 100%의 일치도를 보였다. 면역조직화학적 검색으로 HER2 단백질의 과발현을 보이지 않은 예들(1+, -)에서도 HER2 유전자의 증폭을 보인 예들이 5 - 17%에서 확인되었다.

두 개의 TMA를 이용하여 3가지 다른 일차 항체를 이용하여 면역조직화학적 검색을 시행하고 그 결과를 비교 분석한 결과, 사용된 일차 항체에 따라서 결과는 조금씩 차이를 보였으며 HER2 과발현 빈도는 23 - 27%였고 각 항체간의 일치도는 비교적 높았다 ( $\kappa$  value: 0.902 - 0.798). 이 연구의 결과 같은 기관에서 같은 방법으로 검색해도 면역조직화학적 검색의 경우 그 결과가 완전히 일치하지 않는 것을 확인할 수 있었다. 반면 FISH는 반복 검색으로 그 결과가 거의 일치함을 알 수 있었다. Trastuzumab의 치료 효과와의 관계를 연구한 보고들도 대부분 HER2 유전자의 증폭 검색이 더 정확한 치료 효과 판정에 도움이 된다는 것을 보고하고 있으며 HER2 유전자 검색은 FISH가 아닌 CISH를 이용한 결과도 FISH 검색과 거의 일치하는 것을 본 연구자는 확인한 바 있다 (30, 36 - 38). 이러한 결과들은 아직 HER2 검색에서 면역조직화학적 검색의 표준화가 이루어지지 않았다는 것을 시사한다고 할 수 있다.

## 결 론

현재 HER2 검색의 가장 정확한 표준법은 FISH를 이용하여 유전자 증폭을 확인하는 것이다. 그러나 FISH는 사용하는 probe의 가격이 비싸고 검색에 특수한 형광현미경이 있어야만 가능한 단점이 있다. 반면에 면역조직화학적 검색은 검색법 자체가 보편적으로 사용되고 있으며 특수 장비없이 대부분 병원에서 시행이 가능한 장점을 가지고 있다. 본 연구자의 기관에서는 이러한 표준화 과정의 경험을 토대로 현재 모든 유방암 환자들의 HER2 검색에 FISH를 이용하고 있으며 면역조직화학적 검색은 별도로 병행하여 계속 정도 관리를 하고 있다. 외국의 문헌 보고를 참고하여 국내의 대부분 기관에서 면역조직화학적 검색으로 강양성(+3)을 보이는 경우 FISH로 확인하는 과정을 거치지 않고 있으나 본 연구의 결과 각 기

관간의 긴밀한 교류로 표준화 과정을 거치지 않은 현재에는 면역조직화학적 검색으로 강양성을 보인 경우에도 반드시 FISH를 이용하여 확인하는 과정이 필요한 것으로 판단된다. 저자의 이러한 주장은 NSABP와 Breast Intergroup Trial N9831의 연구 결과로 뒷받침된다 (25, 26). 면역조직화학적 검색의 신뢰도가 확립되지 않은 현 시점에서는 모든 유방암 환자의 HER2 증폭 여부를 FISH로 확인하는 것이 면역조직화학적 검색의 표준화가 이루어질 때까지는 부적절한 대상 환자에게 불필요한 치료를 시행하는 것보다 오히려 경제적인 방법이 될 수 있다는 것이 본 연구자의 생각이다.

양질의 치료를 경제적으로 제공하기 위해서는 전국 의료기관의 전문가들 간의 긴밀한 교류와 정보 교환으로 HER2 검색의 표준화된 방법을 하루 빨리 확립하여 환자들에게 불필요한 경제적 부담을 줄이고 최선의 치료를 제공하는 것이 시급하다고 생각하는 바이다.

HER2의 면역조직화학적 검색의 신뢰도가 확립되지 않은 경우에는 유전자의 증폭을 확인하는 FISH를 이용하여 HER2 상태를 확인하는 것이 바람직하다. 즉 HER2의 면역조직화학적 검색의 표준화가 이루어질 때까지는 부적절한 대상 환자에게 불필요한 치료를 시행하는 것보다 정확한 HER2 결과를 확인한 후에 치료하는 것이 바람직하다.

## 참 고 문 헌

- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177-182
- Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of the HER-2/neu protooncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989;244:707-712
- Paik S, Bryant J, Park C, 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;90:1361-1370
- Thor AD, Berry DA, Budman DR, et al. erbB-2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1346-1360
- Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, et al. HER2 and choice of adjuvant chemotherapy for invasive breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-15. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1991-1998
- Park K, Kim J, Lim S, Han S. Topoisomerase II- $\alpha$ (topoII) and HER2 amplification in breast cancers and response to preoperative doxorubicin chemotherapy. *Eur J Cancer* 2003;39:631-634
- Di Leo A, Gancberg D, Larsimont D, et al. HER-2 amplification and topoisomerase II- $\alpha$  gene aberration as predictive markers in node-positive breast cancer patients randomly treated either with an anthracyclin-based therapy or with cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 2002;8:1107-1116

8. De Placido S, De Laurentiis M, Carlomagno C, et al. Twenty-year results of the Naples GUN randomized trial: predictive factors of adjuvant tamoxifen efficacy in early breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:1039-1046
9. Seidman AD, Fornier MN, Esteva FJ, et al. Weekly trastuzumab and paclitaxel therapy for metastatic breast cancer with analysis of efficacy by HER2 immunophenotype and gene amplification. *J Clin Oncol* 2001;19:2587-2595
10. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpress HER2. *N Engl J Med* 2001;344:783-792
11. Bast RC Jr, Ravdin P, Hayes DF, et al. American Society of Clinical Oncology Tumor Markers Expert Panel. 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2001;19:1865-1878
12. Press MF, Slamon DJ, Flom KJ, Park J, Zhou JY, Bernstein L. Evaluation of HER-2/neu gene amplification and overexpression: comparison of frequently used assay methods in a molecularly characterized cohort of breast cancer specimens. *J Clin Oncol* 2002;20:3095-3105
13. Press MF, Hung G, Godolphin W, Slamon DJ. Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples : potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res* 1994;54:2771-2777
14. Andrulis IL, Bull SB, Blackstein ME, et al. Neu/erbB-2 amplification identifies a poor prognosis group of women with node-negative breast cancer. Toronto Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 1998;16:1340-1349
15. Gancberg D, Jarvinen T, Di Leo A, et al. Evaluation of HER-2/NEU protein expression in breast cancer by immunohistochemistry : an interlaboratory study assessing the reproducibility of HER-2/NEU testing. *Breast Cancer Res Treat* 2002;74:113-120
16. Robertson KW, Reeves JR, Smith G, et al. Quantitative estimation of epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 in human breast cancer. *Cancer Res* 1996;56:3823-3830
17. Masood S, Bui MM, Yung JF, et al. Reproducibility of LSI HER-2/neu spectrum orange and CEP 17 spectrum green dual color deoxyribonucleic acid probe kit. *Ann Clin Lab Sci* 1998;28:215-223
18. Pauletti G, Dandekar S, Rong HM, et al. Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer : a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2000;18:3651-3664
19. Vogel CL, Cobleigh M, Tripathy D, Mass R, Murphy M, Stewart SJ. Superior outcomes with Herceptin (trastuzumab) in fluorescence in situ hybridization patients. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001;20:22a
20. Rhodes A, Jasani B, Anderson E, Dodson AR, Balaton AJ. Evaluation of HER-2/neu immunohistochemical assay sensitivity and scoring on formalin-fixed and paraffin-processed cell lines and breast tumors: a comparative study involving results from laboratories in 21 countries. *Am J Clin Pathol* 2002;118:408-417
21. Park K, Kim J, Lim S, Han S, Lee JY. Comparing fluorescence in situ hybridization and chromogenic in situ hybridization methods to determine the HER2/neu status in primary breast carcinoma using tissue microarray. *Mod Pathol* 2003;16:937-943
22. Tanner M, Gancberg D, Di Leo A, et al. Chromogenic in situ hybridization. A practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. *Am J Pathol* 2000;157:1467-1472
23. Park K, Kim J, Lim S. Comparing fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry to determine the HER2/neu status in breast carcinoma. *Korean J Pathol* 2002;36:243-248
24. Press MF, Slamon DJ, Flom KJ, Park J, Zhou JY, Bernstein L. Evaluation of HER-2/neu gene amplification and overexpression: comparison of frequently used assay methods in a molecularly characterized cohort of breast cancer specimens. *J Clin Oncol* 2002;20:3095-3105
25. Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, et al. Real-world performance of HER2 testing: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:852-854
26. Roche PC, Suman VJ, Jenkins RB, et al. Concordance between local and central laboratory HER2 testing in the breast intergroup trial N9831. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:855-857
27. Park K, Han S. A single institute's experience of standardization for the HER2 status by fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry on a primary breast cancer tissue microarray. *J Korean Breast Cancer Society* 2004;7:27-31

## Standardization of HER2 Status in Primary Breast Cancer Tissue

Kyeongmee Park

*Department of Pathology, Inje University Sanggye Paik Hospital*

Accurate assessment for the HER2 amplification and overexpression is a prerequisite step in the management of breast cancer patients since the anti-HER2 biologic therapy has been available. Most tests developed for the determination of the HER2 status still require validation, although identification of the HER2 status is important for predicting the response to specific systemic therapy in breast cancer. Fluorescence in situ hybridization (FISH) and immunohistochemistry (IHC) are the most widely used methods for HER2 assay. The results of the FISH appears to be more reproducible than those of the IHC in the most studies. FISH is an expensive procedure requiring special equipment to perform in day-to-day clinical practice. IHC is a simple and convenient procedure which can be performed in individual institute. However, a considerable proportions of the IHC positive cases are not confirmed by the FISH and reproducibility of IHC results is still in doubt by inter-observer variation variable tissue preservation procedures. Poor reproducibility of IHC hampers its clinical use in spite of its practical merit. Accurate assessment for the HER2 status appears to be established by the laboratory quality control measures through the nation-wide validation procedures when using the IHC for the HER2 assay. During the validation period, the results from the individual institute should be validated by central laboratory by FISH. Standardization of HER2 assay is mandatory to provide more effective treatment to the breast cancer patients and can improve the cost -benefit efficiency by reducing the false-positive cases.

**Index words:** Breast cancer  
Fluorescence in situ hybridization  
HER2  
Immunohistochemistry  
Standardization