

의학 석사학위 논문

유방암 환자에서 골수 미세 전이가
원격 전이에 미치는 영향

아주대학교 대학원

의학과

정용식

유방암 환자에서 골수 미세 전이가
원격 전이에 미치는 영향

지도교수 김 명 옥

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함.

2005 년 2 월

아 주 대 학 교 대 학 원

의 학 과

정 용 식

정용식의 의학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 김 명 욱 인

심 사 위 원 소 의 영 인

심 사 위 원 임 현 이 인

아 주 대 학 교 대 학 원

2004 년 12 월 22 일

유방암 환자에서 골수 미세 전이가 원격전이에 미치는 영향

목적: 유방암은 비교적 원격전이가 잘되는 고형 종양이며 환자의 생존율은 원격전이의 여부에 의하여 결정이 된다. 따라서 타 장기의 원격전이를 조기에 발견하고자 하는 노력이 계속 되어 왔으며 골수의 미세전이 측정도 그 중의 하나라고 할 수 있다. 골수 전이의 표지자로는 cytokeratin 과 mammaglobin 이 널리 이용되고 있으며 이에 대한 유용성은 아직도 확립되고 있지 않다. 이에 저자들은 역전사 중합효소반응법을 이용하여 골수에서 cytokeratin 과 mammaglobin 을 측정하여 골수 미세 전이가 원격전이에 미치는 영향을 연구하였다.

대상 및 방법: 2001 년 6 월부터 2003 년 12 월까지 본원에서 유방암으로 수술 받은 환자 중 골수를 채취한 254 명에 대해서 후향적으로 분석하였다. 여성이 252 명, 남성이 2 명이었으며 나이는 25 세에서 80 세까지로 평균나이는 46 세였다. 수술 전 전신마취 하에서 골수 천자를 시행하였으며 유핵 세포를 분리한 후 RNA 를 추출하여 cytokeratin 19 과 mammaglobin 에 대해 역전사 중합 효소 반응법을 시행 하였다. 대조군으로는 β -actin 을 이용하였으며 골수 미세 전이와 기존 예후인자 및 재발과의 관계를 chi square 법을 이용하여 분석하였으며 무전이 생존율에 대해 Kaplan-Meier 법을 이용하여 log rank 법으로 분석하였다.

결과: 환자의 병기는 관상피내암이 16 명, 1 기 58 명, 2 기 126 명, 3 기 43 명, 4 기 4 명이었으며 cytokeratin 19 만 측정된 군이 76 명 두 가지 모두 측정된 군이 178 명 이었다. 골수에서 cytokeratin 19 에 양성인 군은 66 명(26%)이었으며 mammaglobin 에 양성인 군은 27 명(15.2%), 두 가지 모두 양성인 군은 11 명이었다. 총 19 예의 재발이 관찰 되었으며 원격전이인 14 예였다.

골수 미세 전이가 없던 군에서 6 명, cytokeratin 19 양성 군에서 8 명, mammaglobin 양성 군에서 1 명의 원격 전이가 관찰되어 cytokeratin 19 양성 군에서 의미 있게 많은 원격 전이가 관찰되었다($p=0.019$). cytokeratin 19 과 mammaglobin 의 발현 여부와 병기, 호르몬 수용체, 조직학적 등급 및 c-erb B2 간에 유의한 상관성은 관찰되지 않았다. 무전이 생존율에 있어서도 cytokeratin 19 양성 군에서 유의하게 낮았으며($p=0.01$) mammaglobin 은 통계적 차이를 보이지 않았다.

결론: 짧은 추적 관찰 기간에도 cytokeratin 19 양성군에서 많은 원격 전이와 낮은 무전이 생존율이 관찰되어 의미 있는 표지자 임을 확인 하였으며 예후인자로서의 가치가 있을 것으로 생각된다. 골수에서 cytokeratin 19 의 발현과 기존의 예후 인자와는 상관 관계가 없어 골수 미세 전이가 독립적인 예후 인자로서의 가능성이 있을 것으로 생각 되며 추적 관찰 기간이 연장 되고 재발의 예가 증가 한다면 더욱 확실해 질 것으로 생각한다.

중심단어: 유방암, 골수미세전이, 역전사 중합 효소 반응, Cytokeratin 19, Mammaglobin

차 례

| | | |
|-------------------------------------|-------|-----|
| 국문 요약 | | i |
| 차례 | | iii |
| 그림차례 | | v |
| 표차례 | | vi |
| I. 서 론 | | 1 |
| II. 연구대상 및 방법 | | 3 |
| A. RNA 추출 | | 3 |
| B. Oligonucleotide primer 합성 | | 4 |
| C. RT-PCR 과 Nested PCR | | 6 |
| D. 민감도와 특이도 | | 6 |
| E. 환자의 추적관찰 | | 7 |
| III. 결 과 | | 8 |
| A. 민감도와 특이도 | | 8 |
| B. 임상 양상 | | 9 |
| C. 종양의 병기와 골수 cytokeratin 19 결과의 비교 | | 10 |
| D. 종양의 병기와 골수 mammaglobin 결과의 비교 | | 10 |
| E. 골수 미세 전이와 원격 전이와의 관계 | | 13 |
| IV. 고 찰 | | 16 |
| V. 결 론 | | 20 |

| | | |
|------|-------|----|
| 참고문헌 | | 21 |
| 영문요약 | | 29 |

그림 차례

| | |
|--|----|
| Fig. 1. External and internal primer for cytokeratin 19 | 5 |
| Fig. 2. External and internal primer for mammaglobin | 5 |
| Fig. 3. Nested RT-PCR for beta actin, cytokeratin and mammaglobin in control group | 8 |
| Fig. 4. Sensitivity test of nested RT-PCR for cytokeratin 19 and mammaglobin | 9 |
| Fig. 5. Distant metastasis free survival according to expressions of bone marrow cytokeratin 19 and mammaglobin | 15 |

표 차 례

| | |
|---|----|
| Table 1. Relationship between expressions of bone marrow cytokeratin 19 and age and TNM staging | 11 |
| Table 2. Relationship between expressions of bone marrow mammaglobin and age and TNM staging | 12 |
| Table 3. Incidence of distant metastasis according stage | 14 |
| Table 4. Incidence of distant metastasis according expressions of cytokeratin 19 and mammaglobin | 14 |

I. 서론

유방암은 조기에 원격 전이가 잘 일어나는 고형 종양으로 환자의 생존율은 원격 전이의 유무에 의해서 많이 결정된다. 현재까지 이 원격 전이나 재발을 줄이고 생존율을 증가시키기 위하여 항암 화학 요법과 호르몬 조절 요법이 사용되고 있으며 현재의 예후 인자로는 종양의 크기와 임파선 전이가 주된 지표로 사용되고 조직학적 분화도, 호르몬 수용체의 발현 유무나 c-erb-B2 등이 치료의 결정에 도움이 되고 있다(Rochefordiere 등, 1993; Fisher 등, 1983; Fisher 등, 1990; Rudolph 등, 1999; Harada 등, 1994). 그러나 재발의 대부분은 유방암의 진단 당시에 다른 장기에 미세 전이가 일어나고 이 종양 세포가 추후에 계속 자라거나 보조 치료로부터 살아 남아서 임상적으로 의미를 가지는 크기로 자라면 전이나 재발로 판정하게 되는 것으로 알려져 있으며, 따라서 암의 생물학적 특징을 조기에 알기 위하여 타 장기에 미세 전이가 존재하는가를 판정하려는 노력이 꾸준히 있어왔다. 유방암 환자에서 골수 미세전이에 대해서는 Redding 등에 의해 처음 시도 되었으며 Cote 등의 연구에서 예후와 관계가 있음이 제시 되었다(Redding 등, 1983; Cote 등, 1991). 그러나 초기의 연구에서는 미세 전이의 발견율이 낮아서 그 후로 민감도를 높이기 위해 많은 노력이 지속 되었다. 현재 두 가지 방법이 널리 쓰이는데 골수 세포에서 유핵 세포 분획을 분리하여 상피세포에 존재하고 골수세포에는 존재하지 않는 단백질에 대한 면역화학염색법을 이용하여 전이세포를 발견하는 방법이 있고 다른 하나는 특정 단백질의 생성에 필요한 m-RNA 를 역전사 중합효소 연쇄반응법(RT-PCR)에 의해서 발견하는 방법이다 (Raj 등, 1998; Luppi 등, 1996;

Datta 등, 1994). 또한 골수에서 미세전이를 발견하는데 이용되는 표지자로는 cytokeratin 과 mammaglobin, CEA 등이 널리 이용되고 있으며 연구자에 따라 각기 다른 결과들이 보고 되고 있어 이에 대한 연구는 아직 논란의 여지가 있는 것이 사실이다.

저자들은 RT-PCR 법을 개선하여 감수성을 높인 nested RT-PCR 법을 이용하여 cytokeratin 19 와 mammaglobin 에 대해 골수 내에서의 미세 전이를 검사하였으며 골수 미세 전이 여부와 임상적 특징과의 관련성에 대해 연구 하였으며 원격 전이와의 관련성에 대해 연구하였다.

II. 연구 대상 및 방법

환자의 대상은 2001 년 6 월부터 2003 년 12 월까지 아주대학교 병원에 내원하여 유방암으로 수술 받은 환자 중 골수에서 cytokeratin-19 혹은 mammaglobin 에 대해 RT-PCR 법을 시행한 환자 254 명을 대상으로 하여 검사결과와 임상결과를 비교하였다.

실험방법은 수술 전후 골수 천자를 시행하여 골수를 채취한 후 유핵 세포를 분리하고 이들 세포에서 acid guanidine phenol chloroform 방법을 이용하여 total RNA 를 추출한 후 cytokeratin-19 혹은 mammaglobin 에 대해 각기 다른 두 쌍의 primer 를 이용하여 RT-PCR 을 시행하였다(Table 1). RT-PCR 후 증폭된 DNA 를 2% agarose gel 에 전기 영동 하여 확인하였다. 전체 RNA 에 대한 대조군은 베타 액틴(β -actin)을 이용하였다. 자세한 과정은 다음과 같다.

A. RNA 추출

유방암 환자로부터 채취한 골수 10 ml 을 lymphoprep(Nycomed) 동량에 띄운 후 2,700 rpm 에서 20 분간 원심 분리하여 세포분획을 취하여 -70°C 에 보관하였다. Trizol(Gibco BRL)을 첨가하여 total RNA 추출 후 분광광도계를 이용하여 260 과 280 nm 에서 측정하여 순도와 농도를 측정하였다.

B. Oligonucleotide primer 합성

네 가지의 oligonucleotide primer 는 human cytokeratin 19 DNA 에 상보적으로 결합하는 DNA 단편으로서 external primer set 인 K19ES(external sense) 5'-

AGGTGGATTCCGCTCCGGGCA-3', K19EA(external antisense) 5'-
GCTCGAGGGACAGGAAGAT-3'는 RT-PCR 에 사용되어 461 개 염기쌍의 산물을
합성하게 되며 inner primer set 인 K19IS(internal sense) 5'-
GACATGCGAAGCCAATATGAGG-3', K19IA(internal antisense) 5'-
GCTGCCTTGGAAGACACACT-3'는 nested PCR 에 사용되어 최종적으로 221 개
염기쌍의 PCR 산물을 합성하는데 사용하였다 (Fig. 1).

Mammaglobin 의 DNA 에 상보적으로 결합하는 primer set 는 external sense 5'-
GAAGTTGCTGATGGTCCTCATGCTGGC-3', external antisense 는 5'-
GTCACCATACCCTGCAGTTCTGTGAGC-3'가 사용되어 325 개의 염기 쌍을
합성하게 되며 internal sense 로 5'-GTCCCAGCACTGCTACGCAGGCTC-3', internal
antisense 로 5'-CACCTCAACATTGCTCAGAGTTTCATCCG-3'로 사용되어 201 개
염기 쌍의 산물을 합성하는데 사용되었다 (Fig. 2).

| | |
|--------------|-------------------------------|
| Ex-sense | 5'--AGGTGGATTCCGCTCCGGGCA-3' |
| Ex-antisense | 5'--GCTCGAGGGACAGGAAGAT-3' |
| In-sense | 5'--GACATGCGAAGCCAATATGAGG-3' |
| In-antisense | 5'--GCTGCCTTGGAAGACACACT-3' |

PCR products amplified from K-19 mRNA

1. by external primer pairs: 461 base pairs
2. by internal primer pairs: 221 base pairs

Location of the primer pairs

External primer pairs: Ex-sense(nucleotides 738-759)
Ex-antisense(nucleotides 1179-1199)

Internal primer pairs: In-sense(nucleotides 782-804)
In-antisense(nucleotides 984-1003)

Fig. 1. External and internal primer for cytokeratin 19

| | |
|--------------|--------------------------------------|
| Ex-sense | 5'--GAAGTTGCTGATGGTCCTCATGCTGGC-3' |
| Ex-antisense | 5'--GTCACCATAACCCTGCAGTTCTGTGAGC-3' |
| In-sense | 5'--GTCCCAGCACTGCTACGCAGGCTC-3' |
| In-antisense | 5'--CACCTCAACATTGCTCAGAGTTTCATCCG-3' |

PCR products amplified from mammaglobin mRNA

1. by external primer pairs: 325 base pairs
2. by internal primer pairs: 201 base pairs

Location of the primer pairs

External primer pairs: Ex-sense(nucleotides 63-89)
Ex-antisense(nucleotides 387-361)

Internal primer pairs: In-sense(nucleotides 96-119)
In-antisense(nucleotides 297-269)

Fig. 2. External and internal primer for mammaglobin

C. RT-PCR 과 nested PCR

PCR 반응액(50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl(pH 9.0), 0.1 % Triton X-100, 200 uM dNTP, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mM DTT, 60 U M-MLV reverse transcriptase, 0.5 U taq polymerase, 12 U RNase inhibitor, 10 mM sense primer, 10 mM antisense primer)에 total RNA 1 ug 과 DEPC 처리 DW 를 넣어 반응액의 최종량을 30 ul 로 하였다. DNA thermal cycler(Perkin Elmer Cetus)를 이용하여 42°C에서 1 시간 반응하여 cDNA 를 합성하고 denaturation(94°C, 1 분), annealing(57°C, 1.5 분), extension(72°C, 2 분)의 PCR cycle 을 35 회 반복한 후 마지막 extension 은 10 분간 유지시켜 RT-PCR 을 수행하였다. 이 시료를 2 ul 를 취하여 위와 동일한 조건으로 nested PCR 을 수행하였다. 이 시료를 2% agarose gel 에서 전기 영동 하여 ethidium bromide 염색 후 UV illuminator 하에서 밴드를 확인하였다.

D. 민감도와 특이도

검사의 특이도 확인을 위해서 14 명의 골수 이식 공여자에게서 채취된 골수를 이용하였으며 mRNA 의 검출의 대조군으로 모든 세포에서 발현되는 β -actin 의 RNA 를 사용하였다. Nested RT-PCR 의 감수성을 확인하기 위하여 MCF 7 과 SKBR3 세포주를 이용하였다. Cytokeratin 19 mRNA 의 민감도 확인을 위해 MCF 7 세포주를 이용하였고 Mammaglobin 의 민감도 확인을 위해 SKBR3 세포주를 이용하였다. 1000 개의 세포주를 건강한 자원자의 10 ml 의 말초혈액에 투여한 뒤 5 ml 의 샘플에 5 ml 의 말초혈액을 계속 투여하여 세포주의 수가 말초혈액 5

ml 당 3 개가 될 때까지 희석 시켰으며 각각의 희석된 5 ml 의 말초혈액에서 RNA 를 추출하여 nested RT-PCR 을 시행 하였다.

E. 환자의 추적관찰

환자는 3 개월 간격으로 진찰을 시행하고 말초 혈액검사와 흉부 촬영, 복부 초음파 검사와 골 주사를 6 개월 간격으로 시행하여 원격 전이 여부를 검사하였다. 통계 처리는 SPSS (version 11.0)를 이용하였으며 기존의 예후 인자와 재발과의 관계에 대해 Pearson chi square test 로, 골수미세전이와 재발과의 관계를 Kaplan-Meier 법을 이용하여 통계적 의의를 검사하였으며 p value 가 0.05 이하 일 때 의미가 있는 것으로 판정하였다.

III. 결 과

A. 민감도와 특이도

14 명의 골수 이식 공여자에게서 채취된 골수를 이용한 특이도 검사에서 cytokeratin 19 및 mammaglobin 이 한 예에서도 검출 되지 않아 nested RT-PCR 의 검사 특이도는 100%였다 (Fig. 3).

MCF 7 과 SKBR 3 세포주를 이용한 민감도 검사에서 희석된 5 ml 의 말초혈액에서 MCF 7 세포 12 개와 SKBR 3 세포 25 개를 검출 할 수 있어 cytokeratin 19 의 민감도가 좀 더 높음을 알 수 있었다 (Fig. 4).

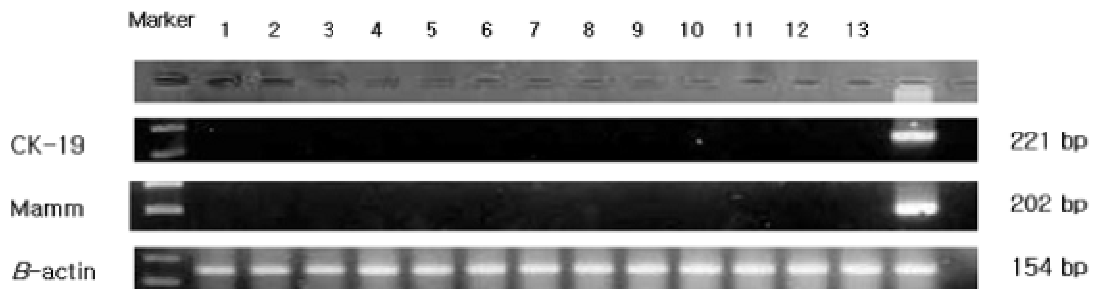


Fig. 3. Nested RT-PCR for beta actin, cytokeratin-19, and mammaglobin in control group. Beta actin shows positive result in all samples of normal bone marrow transplant donors but cytokeratin-19 and mammaglobin are not.

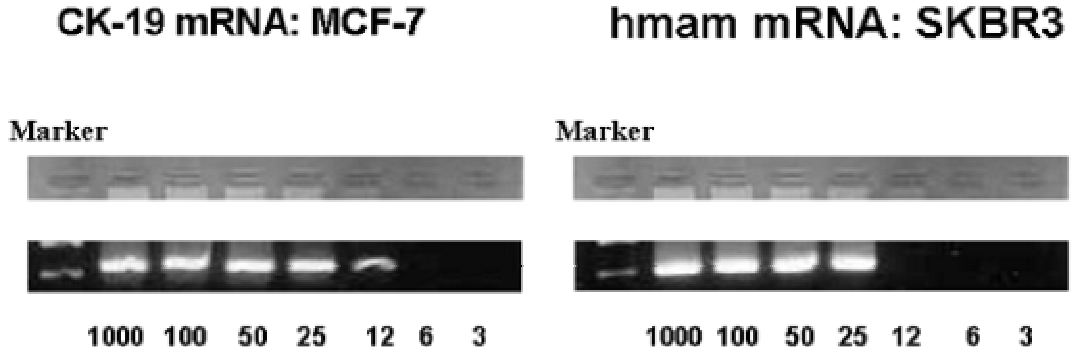


Fig. 4. Sensitivity test of nested RT-PCR for cytokeratin 19 and mammaglobin. One thousand cells of the breast cancer cell line MCF7 and SKBR3 were transferred into 10 mL of peripheral blood of healthy volunteers and diluted with 5mL of peripheral blood until reaching a calculated concentration of 3 cells in 5 mL of peripheral blood. Cytokeratin-19 could be detected in 12 cells dilution and mammaglobin could be detected in 25 cells dilution.

B. 임상 양상

총 254 명의 유방암 환자가 본 연구에서 분석 되었으며 여자가 252 명 남자가 2 명이였다. 환자의 나이는 25 세부터 80 세까지였으며 평균 나이는 46 세였다. 환자의 병기는 관상피내암이 16 명, 1 기암이 58 명, 2 기가 126 명, 3 기가 43 명, 4 기가 4 명이였으며 나머지 7 명은 정확한 병기가 파악 되지 않았다.

연구 초기의 76 명은 *cytokeratin 19* 만을 측정 하였고 나머지 178 명에 대해서는 *cytokeratin 19* 와 *mammaglobin* 두 가지를 함께 측정하였다.

골수에서 *cytokeratin 19* 가 양성인 군은 254 명 중 66 명으로 26%였고 *mammaglobin* 이 양성인 군은 178 명 중 27 명으로 15.2%였다. *cytokeratin 19* 와 *mammaglobin* 이 함께 발현된 군은 11 명으로 6.2%였다.

C. 종양의 병기와 골수 cytokeratin 19 결과의 비교

관상피내암 16예 중 1예(6.3%)에서 양성을 보였으며 1기 58예 중 15예(25.9%), 2기 126예 중 35예(27.8%), 3기 43예 중 12예(27.9%), 4기 4예 중 1예(25%)에서 골수에서 cytokeratin 19 가 발현 되었으며 병기에 따른 차이는 없었다. 세부적으로도 T1 병변에서 19예(23.8%), T2 병변에서 41예(29.5%), T3 병변에서 2예(28.6%), T4 병변에서 1예(14.3%)로 종양의 크기와 골수미세전이 간의 통계적 유의성은 관찰되지 않았으며 임파선 전이와도 관계가 없는 것으로 나타났다. (Table 1) 다른 예후 인자인 호르몬 수용체나 c-erb B2의 발현 여부와 골수 cytokeratin 19의 발현 여부는 관계가 없었으며 조직학적 분화도에 따른 발현의 차이는 관찰되지 않았다.

D. 종양의 병기와 골수 mammaglobin 결과의 비교

관상피내암 9예 모두 골수 mammaglobin 발현이 관찰되지 않았으며 1기 42명 중 9명(21.4%), 2기 82명 중 11명(13.4%), 3기 36명 중 5명(13.9%), 4기 3명 중 2명(66.7%)에서 골수 미세전이가 관찰되었으며 병기와 mammaglobin의 발현 간에는 통계적인 유의성이 관찰되지 않았다. 종양의 크기와 골수 mammaglobin의 발현은 T1에서 11명(20%), T2에서 14명(14.3%), T3에서 1명(14.3%), T4에서 1명(20%)으로 관계가 없었으며 임파선 전이와도 통계적 유의성이 관찰되지 않았다(Table 2). 기타 호르몬 수용체, c-erb B2의 발현 및 조직학적 분화도도 골수 mammaglobin의 발현에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

Table 1. Relationship between expression of bone marrow cytokeratin 19 and age and TNM staging.

| | All patients | CK 19 (+)* | CK 19 (-) | <i>p</i> value |
|-----------|---------------|-----------------|-----------------|----------------|
| | N=254 | N=66(26%) | N=188(74%) | |
| Age, mean | 46 (25~80) | 44.2 (25~74) | 46.5 (28~80) | NS |
| Stage | | | | |
| DCIS | 16(6.3%) | 1(6.2%) | 15(93.8%) | |
| I | 58(22.8%) | 15(25.9%) | 43(74.1%) | |
| II | 126(49.6%) | 35(27.8%) | 91(72.2%) | NS |
| III | 43(16.6%) | 12(27.9%) | 31(72.1%) | |
| IV | 4(1.6%) | 1(25.0%) | 3(75.0%) | |
| T stage | | | | |
| Tis | 16(6.3%) | 1(6.2%) | 15(93.8%) | |
| T1 | 80(31.5%) | 19(23.8%) | 61(76.2%) | |
| T2 | 139(54.7%) | 41(29.5%) | 98(70.5%) | NS |
| T3 | 7(2.7%) | 2(28.6%) | 5(71.4%) | |
| T4 | 7(2.7%) | 1(14.3%) | 6(85.7%) | |
| N stage | | | | |
| N0 | 150(59.1%) | 39(26.0%) | 111(74.0%) | |
| N1 | 57(22.4%) | 14(24.6%) | 43(75.4%) | |
| N2 | 18(7.1%) | 4(22.2%) | 14(77.8%) | NS |
| N3 | 24(9.4%) | 7(29.2%) | 17(70.8%) | |

* CK-19: cytokeratin 19

Table 2. Relationship between expression of bone marrow mammaglobin and age and TNM staging.

| | All patients N=178 | hmam (+) * N=27(15.2%) | hmam (-) N=151(84.8%) | <i>p</i> value |
|-----------|-----------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------|
| Age, mean | 46.5 (25~80) | 46.6 (25~80) | 46.5 (28~64) | NS |
| Stage | | | | |
| DCIS | 9(5.1%) | 0(0.0%) | 9(100%) | |
| I | 42(23.6%) | 9(21.4%) | 33(78.6%) | |
| II | 82(46.1%) | 11(13.4%) | 71(86.6%) | NS |
| III | 36(20.2%) | 5(13.9%) | 31(86.1%) | |
| IV | 3(2.0%) | 2(66.7%) | 1(33.3%) | |
| T stage | | | | |
| Tis | 9(5.1%) | 0(0.0%) | 9(100%) | |
| T1 | 55(30.9%) | 11(20.0%) | 44(80.0%) | |
| T2 | 98(55.1%) | 14(14.3%) | 84(85.7%) | NS |
| T3 | 7(3.9%) | 1(14.3%) | 6(85.7%) | |
| T4 | 5(2.8%) | 1(20.0%) | 4(80.0%) | |
| N stage | | | | |
| N0 | 104(58.4%) | 13(12.5%) | 91(87.5%) | |
| N1 | 37(20.8%) | 6(16.2%) | 31(83.8%) | |
| N2 | 15(8.4%) | 3(20.0%) | 12(80.0%) | NS |
| N3 | 19(10.7%) | 4(21.1%) | 15(78.9%) | |

* hmam: mammaglobin

E. 골수 미세 전이와 원격전이와의 관계

총 254예 중 진단 당시 종양의 병기가 4기였던 4명을 제외한 250명에 대해 재발 여부를 조사하였다. 추적 관찰 기간은 5개월에서 33개월이었으며 평균 관찰 기간은 15개월이었다. 이 기간 중 18예의 재발이 관찰 되었으며 이중 원격 전이는 14예에서 관찰되었다. 원격전이 부위는 골 전이가 9예로 가장 많았으며 폐 전이 3예, 뇌 전이 1예, 간 전이 1예였으며 수술 후 재발까지의 평균 기간은 12.9개월(4~32개월)이었다.

병기에 따라서는 관상피내암과 1기암에서는 원격 전이가 관찰되지 않았으며 2기와 3기에서만 관찰되어 통계적 의의가 있는 것으로 나타났다(Table 3).

Cytokeratin 19를 측정한 250명 중 골수에서 음성인 185명 중 6예에서 원격 전이가 관찰되었으며 양성인 65명 중 8예에서 원격 전이가 관찰되어 골수 미세 전이 여부와 원격 전이 간에 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다(Table 4A).

Mammaglobin을 측정한 175명 중 골수에서 음성인 150명 중 10명, 양성인 25명 중 1명에서 원격 전이가 관찰되어 통계적인 유의성은 없었다(Table 4B).

골수 미세 전이와 원격 전이와의 상관 관계를 log rank test 를 이용하여 무전이 생존율을 구하였다. 15 개월 간의 평균 추적관찰 기간 동안 골수 cytokeratin 19 음성 군에서는 96.8%, 골수 cytokeratin 19 음성 군에서는 87.7%로 통계적으로 유의한 차이를 나타내었으며 골수 mammaglobin 의 발현 여부에 따라서는 무전이 생존율에는 차이가 없었다(Fig. 5). 병기에 따른 무전이 생존율도 관상피내암이 100%, 1 기암이 100%, 2 기암 92%, 3 기암 90%로 병기에 따라 낮아지는 양상을 보였으나 통계적인 의의는 없는 것으로 관찰 되었다.

Table 3. Incidence of distant metastasis according stage.

| Stage | Number of cases | Number of distant metastasis | <i>p</i> value |
|-----------|-----------------|------------------------------|----------------|
| DCIS | 16 | 0 | 0.003 |
| Stage I | 58 | 0 | |
| Stage II | 126 | 10 | |
| Stage III | 43 | 4 | |
| Total | 243 | 14 | |

Table 4. Incidence of distant metastasis according expression of cytokeratin 19(A) and mammaglobin(B).

A.

| | Number of cases | Number of distant metastasis | <i>p</i> value |
|----------------|-----------------|------------------------------|----------------|
| CK-19 negative | 185 | 6 | 0.019 |
| CK-19 positive | 65 | 8 | |
| Total | 250 | 14 | |

B.

| | Number of cases | Number of distant metastasis | <i>p</i> value |
|----------------------|-----------------|------------------------------|----------------|
| Mammaglobin negative | 150 | 10 | 0.61 |
| Mammaglobin positive | 25 | 1 | |
| Total | 175 | 11 | |

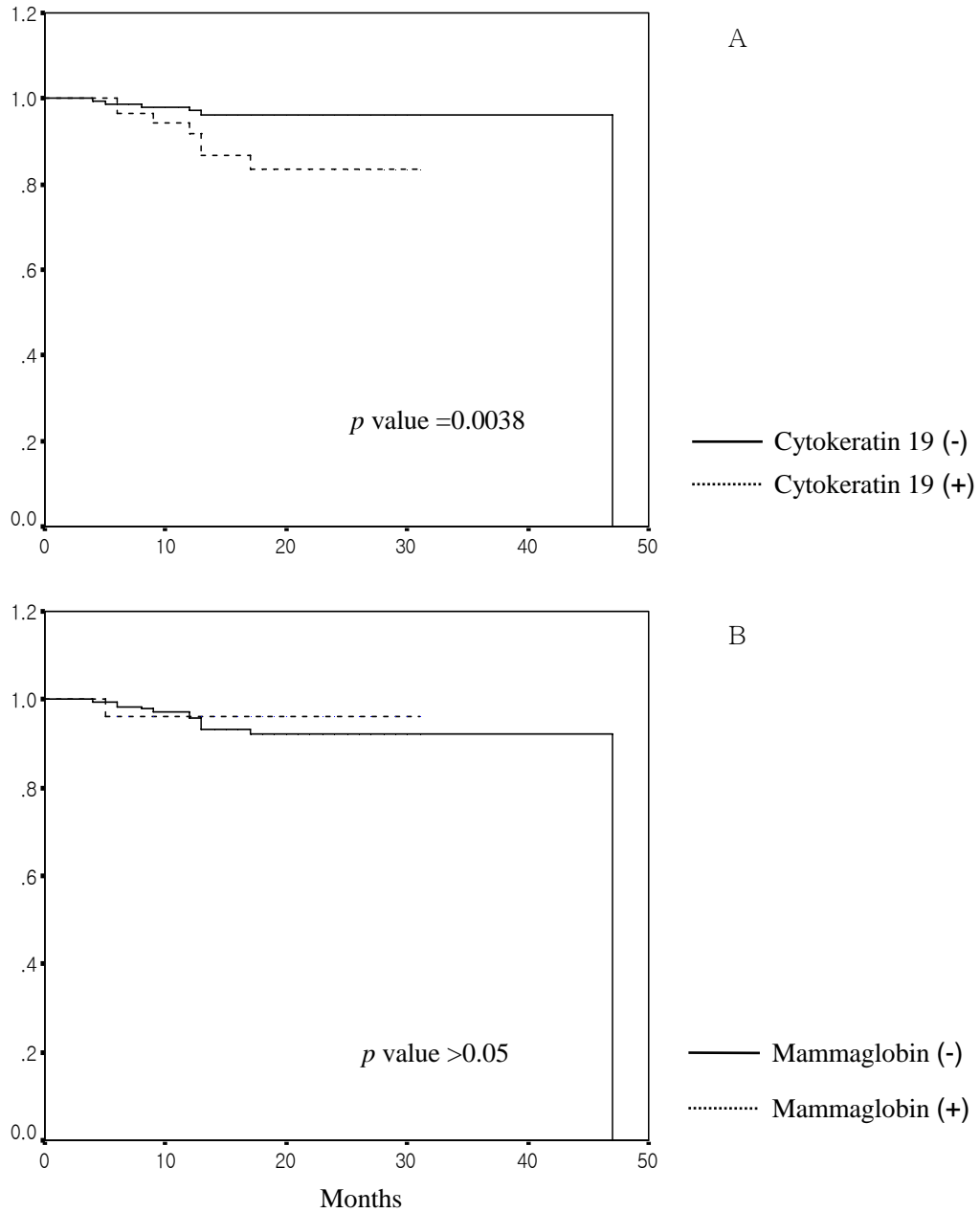


Fig. 5. Distant metastasis free survival according to expression of bone marrow cytokeratin 19(A) and mammaglobin(B). Disease free survival curve by cytokeratin 19 shown statistically significant difference between groups but mammaglobin was not.

IV. 고 찰

현재까지 알려진 유방암의 예후 인자로는 액와부 임파선 전이를 들 수 있다. 그러나 임파선에 전이가 없는 유방암 환자의 25-30%에서 원격 전이가 관찰되어(Adair 등, 1974; Carter 등, 1989) 기존의 예후 인자 외에 생존율에 영향을 미치는 다른 인자를 찾기 위한 노력이 계속 되어 왔으며 최근 들어 면역 화학 염색법이나 역전사 효소 중합 반응 등을 이용하여 골수나 말초혈액에서 암세포를 검출 하고자 하는 시도가 꾸준히 진행 되어 오고 있다.

면역 화학 염색법을 통한 연구는 오랜 역사를 가지고 있으며 많은 연구가 이를 기반으로 해서 진행되어 왔으나 초기의 연구에 사용 되었던 항체들은 정상 골수 세포의 세포막에도 반응을 보여 10% 가까운 위양성율을 보임으로 특이도가 낮다는 단점이 있으며(Brugger 등, 1999) 이후 사용된 cytokeratin family(CK-8, CK-18, CK-19, CK-20) 등을 통해 향상되기는 했으나 항체의 다양성과 정상 골수 세포와의 교차 반응, 판독상의 문제 등으로 인해 만족할 만한 민감도와 특이도를 보여주지 못하는 것이 사실이다(Braun 등, 1998; Thor 등, 1988).

역전사 중합 효소 반응법을 이용한 방법은 미세 전이를 발견하는 가장 예민한 방법이며 10^6-10^7 개의 골수세포 중에서 한 개의 암세포를 발견 할 수 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 유방암 자체의 특이적인 표지자가 적고(Zippelius 등, 1997; Johnson 등, 1995) 골수 세포에서도 낮은 양의 cytokeratin 메신저 RNA 가 검출이 된다는 점 (Berger 등, 1988), 그리고 골수 채취 과정에서 오염으로 인한 위양성이 있을 수 있다는 점 등이 결점으로 지적된다(Yamamoto 등, 1997). 역전사 중합 효소 반응법을 이용한 골수 미세 전이 측정에는 cytokeratin 과 mammaglobin,

CEA 등이 널리 이용되고 있으며 이 중 가장 널리 이용되는 표지자는 cytokeratin 이다. 본 연구에서 골수 전이의 표지자로 사용한 것은 cytokeratin19로서 상피 세포에서만 발현되는 것으로 골수 세포에서는 정상적으로 발현되지 않는다. 이러한 cytokeratin 에는 8,18,19 등이 있으며 이중 cytokeratin 8,18 은 위양성이 많은 것으로 알려져 있고 cytokeratin 19 는 유방암에서 높은 특이성을 나타내고 혈액 및 골수에서 민감도가 높아 미세 전이의 표지자로 적합하며 실제로 Schoenfeld 등의 연구에서 면역 화학 염색법과 비교하여 10 배 가까운 민감도를 나타내는 것으로 보고 되었다(Schoenfeld 등, 1997). 여러 연구에서 보고된 골수에서의 cytokeratin 의 발현율은 30-49% 정도이며 평균적으로 30% 전후로 알려져 있다(Naume 등, 2001; Braun 등, 2000; Gerber 등, 2001). 본 연구에서도 26%의 발현율을 보여 비슷한 결과를 보였다. Silva 등은 본 연구와 같은 nested RT-PCR 법을 이용하여 49%의 발현율을 보고하였으나 민감도 검사에서 일반적인 역전사 중합효소 반응법에서와 유사한 수준을 나타냈고 검사 대상의 수가 적어 실제로 nested RT-PCR 법이 전통적인 역전사 중합효소법에 비해 뛰어난 민감도를 나타낸다고 보기는 어렵다(Silva 등, 2001).

Mammaglobin 을 이용한 말초 혈액에서의 미세 전이는 Zach 등에 의해서 최초로 보고되었으며 cytokeratin 에 비해 유방 조직에 대한 특이도가 높아 미세 전이 측정의 유용한 대안으로 많이 연구가 되고 있다(Zach 등, 1999; Watson 등, 1999). 역전사 중합 효소 반응법을 이용한 방법에서 골수 혹은 말초 혈액에서 mammaglobin 의 양성율은 9-54% 정도로 연구에 따라 다양하게 나타나며 이는 연구에 원격 전이가 있는 유방암의 포함 여부에 의해서 차이가 나타나는 것으로 생각된다(Gruenewald 등, 2000; Silva 등, 2002; Bossolasco 등, 2002).

골수 미세 전이와 기존의 예후 인자들간의 연관성에 대해서는 여러 연구 간에 다른 결과를 보여 아직 논란의 여지가 있다. Mansi 등은 골수 미세 전이의 발현이 종양의 크기, 임파선 전이, 호르몬 수용체의 발현과 연관이 있다고 보고 하였고, Gebauer 등은 임파선 전이와, Solomayer 등은 종양의 크기, 임파선, 혈관침윤, 폐경 여부등과 관련이 있다고 보고 하였다(Mansi 등, 1991; Gebauer 등, 2001; Solomayer 등 2001). 그러나 Braun 등을 비롯한 여러 연구에서는 기존의 예후 인자와 연관성이 관찰 되지 않는다고 보고하여 추후 더 많은 연구가 더 필요할 것이다(Harbeck 등, 1994; Molino 등, 1997; Braun 등, 2001). 본 연구에서도 종양의 크기나 임파선 전이 등에 상관 없이 비슷한 발현을 보였으며 호르몬 수용체, 조직학적 등급, 혈관침윤과도 연관이 없는 것으로 나타났다. 관상피내암 16 예 중 1 예에서 cytokeratin 19 가 발현 되었으며 이는 채취 과정에서 피부로부터 오염이 되었거나 혹은 종양의 일부에서 침윤성 유방암이 존재하고 있을 가능성을 시사하는 소견이라고 할 수 있다.

종양의 크기, 임파선 전이, 호르몬 수용체의 발현, 조직학적 등급 등은 중요한 예후 인자들이나 본 연구에서는 생존율 곡선간에 유의한 차이를 나타내지 못하였다. 이는 추적관찰 기간이 짧고 재발의 예가 적기 때문인 것으로 생각 된다. 그럼에도 불구하고 cytokeratin 이 골수에서 발현된 경우 3 배 이상의 원격 전이를 보이고 무전이 생존율에 있어서도 통계적으로 유의한 차이를 나타내는 것을 볼 때 이러한 골수 미세 전이가 원격전이, 특히 조기 재발의 경우에 있어서 중요한 예후 인자임을 의미한다고 생각한다. Mammaglobin 과 예후에 대한 연구는 아직 없으며 본 연구에서는 골수에서의 mammaglobin 의 발현이 무전이 생존율과 관련이 없는 것으로 나타났다. 다른 연구에서도

골수에서 cytokeratin 의 발현과 생존율과의 관계는 대체적으로 일치하는 결과를 보여 주고 있으며 미세 전이가 동반된 경우 나쁜 예후를 보이는 것으로 알려져 있다(Mansi 등, 1991; Gebauer 등, 2001; Molino 등, 1997; Braun 등, 2001). 그러나 대부분의 연구가 면역 조직 화학염색법을 이용하였으며 연구에 따라 다른 항체를 이용하였고 적은 환자 수와 다른 치료 방법 등으로 인해 직접적인 비교는 힘든 것이 사실이다.

향후에 관심이 가는 부분은 위양성을 최소화 하는 것과 보조적인 전신 치료의 결정에 적용 여부이다. 위양성을 줄이기 위한 기술적인 방법으로는 피부절개를 통해서 오염될 수 있는 가능성을 최소화 하고 여러 가지 표지자를 함께 검사하는 방법 등이 있으며 치료 방법의 결정에 대한 연구는 앞으로 진행해야 할 과제라고 할 수 있다.

V. 결 론

Cytokeratin 19 를 이용한 골수에서의 미세 전이 측정은 유방암의 원격 전이와 밀접한 관계가 있었으며 짧은 추적관찰 기간 내에서도 통계적으로 유의한 차이를 보여 조기에 발생하는 원격 전이에 대한 예후 인자로서의 가치를 갖는 것으로 생각 된다. 또한 기존의 예후 인자와 cytokeratin 19 의 발현은 관계가 없는 것으로 나타나 독립적인 예후 인자일 가능성이 있다고 생각되며 장기적인 추적 관찰을 통해 재발의 예가 늘어난다면 더 명확해 질것으로 보인다. Mammaglobin 은 원격 전이 및 생존율 곡선에서 통계적인 의미가 없는 것으로 나타났으며 이에 대한 추가적인 연구 또한 필요할 것으로 생각 된다.

참 고 문 헌

1. Adair F, Berg J, Joubert L, Robbins GF: Long-term follow up of breast cancer patients: the 30-year report. *Cancer* 33:1145-50, 1974
2. Berger U, Bettelheim R, Mansi JL, Easton D, Coombes RC, Neville AM: The relationship between micrometastases in the bone marrow, histopathologic features of the primary tumor in breast cancer and prognosis. *Am J Clin Pathol* 90:1-6, 1988
3. Bossolasco P, Ricci C, Farina G, Soligo D, Pedretti D, Scanni A, Deliliers GL: Detection of micrometastatic cells in breast cancer by RT-PCR for the mammaglobin gene. *Cancer Detect Prev* 26:60-63, 2002
4. Braun S, Cevatli BS, Assemi C, Janni W, Kentenich CR, Schindlbeck C, Rjosk D, Hepp F: Comparative analysis of micrometastasis to the bone marrow and lymph nodes of node-negative breast cancer patients receiving no adjuvant therapy. *J Clin Oncol* 19: 1468-75, 2001
5. Braun S, Muller M, Hepp F, Schlimok G, Riethmuller G, Pantel K: Re: Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J Natl Cancer Inst* 90:1099-1101, 1998

6. Braun S, Pantel K, Muller P, Janni W, Hepp F, Kantenich CR, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmuller G, Schlimok G: Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med* 342:525-533, 2000
7. Brugger W, Buhning HJ, Grunebach F, Vogel W, Kaul S, Muller R, Brummendorf TH, Ziegler BL, Rappold I, Brossart P, Scheduling S, Kanz L: Expression of MUC-1 epitopes on normal bone marrow: implications for the detection of micrometastatic tumor cells. *J Clin Oncol* 17:1535-1544, 1999
8. Carter CL, Allen C, Henson DE: Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24740 breast cancer cases. *Cancer* 63:181-187, 1989
9. Cote RJ, Rosen PP, Lesser ML, Old LJ, Osborne MP: Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases. *J Clin Oncol* 9:1749-1756, 1991
10. Datta YH, Adams PT, Drobyski WR, Ethier SP, Terry VH, Roth MS: Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 12:475-482, 1994

11. Fisher B, Bauer M, Wickerham DL, Redmond CK, Fisher ER: Relation of number of positive axillary lymph nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer* 52:1551-1557, 1983
12. Fisher ER, Redmond C, Fisher B, Bass G: Pathologic findings from national surgical adjuvant breast and bowel project (NSABP). Prognostic discriminants for 8-year survival for node-negative invasive breast cancer patients. *Cancer* 65:2121-2128, 1990
13. Gebauer G, Fehm T, Merkle E, Beck EP, Lang N, Jager W: Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up. *J Clin Oncol* 2001;19:3669-3674.
14. Gerber B, Krause A, Muller H, Richter D, Reimer T, Makovitzky J, Herrnring C, Jeschke U, Kundt G, Friese K: Simultaneous immunohistochemical detection of tumor cells in lymph nodes and bone marrow aspirates in breast cancer and its correlation with other prognostic factors. *J Clin Oncol* 19:960-971, 2001
15. Gruenewald K, Haun M, Urbanek M, Fliegl M, Mueller-Holzner E, Gunsilius E: Mammaglobin gene expression: a superior marker of breast cancer cells in peripheral blood in comparison to epidermal growth-factor receptor and cytokeratin-19. *Laboratory Investigation* 80:1071-1077, 2000

16. Harada Y, Katagiri T, Ito I, Akiyama F, Sakamoto G, Kasumi F, Nakamura Y, Emi M: Genetic studies of 457 breast cancers. Clinicopathologic parameters compared with genetic alterations. *Cancer* 74:2281-2286, 1994
17. Harbeck N, Untch M, Pache L, Eiermann W: Tumour cell detection in the bone marrow of breast cancer patients at primary therapy: results of a 3-year median follow-up. *Br J Cancer* 69:566-571, 1994
18. Johnson PW, Burchill SA, Selby PJ: The molecular detection of circulating tumour cells. *Br J Cancer* 72:268-276, 1995
19. Luppi M, Morselli M, Bandieri E, Fedrico M, Marasca R, Barozzi P, Ferrari MG, Savarino M, Frassoldati A, Torelli G: Sensitive detection of circulating breast cancer cells by reverse-transcriptase polymerase chain reaction of maspin gene. *Ann Oncol* 7:619-624, 1996
20. Mansi JL, Easton D, Berger U, Gazet JC, Ford HT, Dearnaley D, Coombes RC: Bone marrow micrometastases in primary breast cancer: prognostic significance after 6 years' follow-up. *Eur J Cancer* 27:1552-1555, 1991
21. Molino A, Pelosi G, Turazza M, Sperotto L, Bonetti A, Nortilli R, Fattovich G,

- Alaimo C, Piubello Q, Pavanel F, Micciolo R, Cetto GL: Bone marrow micrometastases in 109 breast cancer patients: correlations with clinical and pathological features and prognosis. *Breast Cancer Res Treat* 42: 23-30, 1997
22. Naume B, Borgen E, Kvalheim G, Karesen R, Qvist H, Sauer T, Kumar T, Nesland JM: Detection of isolated tumor cells in bone marrow in early-stage breast carcinoma patients: comparison with preoperative clinical parameters and primary tumor characteristics. *Clin Cancer Res* 7:4122-4129, 2001
23. Raj GV, Moreno JG, Gomella LG: Utilization of polymerase chain reaction technology in the detection of solid tumors. *Cancer* 82:1419-1442, 1998
24. Redding WH, Coombes RC, Monaghan P, Clink HM, Imrie SF, Dearnaley DP, Ormerod MG, Sloane JP, Gazet JC, Powles TJ: Detection of micrometastases in patients with primary breast cancer. *Lancet* 2: 1271-1274, 1983
25. Rochefordiere ADL, Asselain B, Campana F, Scholl SM, Fenton J, Vilcoq JR, Durand JC, Pouillart P, Magdelenat H, Fourquet A: Age as prognosis factor in premenopausal breast carcinoma. *Lancet* 341:1039-1043, 1993
26. Rudolph P, Olsson H, Bonatz G, Ratjen V, Bolte H, Baldetorp B, Ferno M, Parwaresch R, Alm P: Correlation between p53, c-erbB-2, and topoisomerase II

alpha expression, DNA ploidy, hormonal receptor status and proliferation in 356 node negative breast carcinomas: prognostic implications. *J Pathol* 187:207-216, 1999

27. Schoenfeld A, Kruger KH, Gomm J, Sinnott HD, Gazet JC, Sacks N, Bender HG, Luqmani Y, Coombes RC: The detection of micrometastases in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer using immunohistochemistry and reverse transcriptase polymerase chain reaction for keratin 19. *Eur J Cancer* 33:854-861, 1997

28. Silva AL, Tome MJ, Correia AE, Passos-Coelho JL: Human mammaglobin RT-PCR assay for detection of occult breast cancer cells in hematopoietic products. *Ann Oncol* 13:422-429, 2002

29. Silva JM, Dominguez G, Silva J, Garcia JM, Sanchez A, Rodriguez O, Provencio M, Espana P, Bonilla F: Detection of epithelial messenger RNA in the plasma of breast cancer patients is associated with poor prognosis tumor characteristics. *Clinical Cancer Research* 7:2821-25, 2001

30. Solomayer EF, Diel IJ, Salanti G, Hahn M, Gollan C, Schutz F, Bastert G: Time independence of the prognostic impact of tumor cell detection in the bone marrow of primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 7:4102-4108, 2001

31. Thor A, Viglione MJ, Ohuchi N, Simpson J, Steis R, Cousar J Lippman M, Kufe DW, Schlom J: Comparison of monoclonal antibodies for the detection of occult breast carcinoma metastases in bone marrow. *Breast Cancer Res Treat* 11:133-145, 1988
32. Watson M, Dintzis S, Darrow C, Voss LE, DiPersio J, Jensen R: Mammaglobin expression in primary, metastatic, and occult breast cancer. *Cancer Res* 59:3028-3031, 1999
33. Yamamoto N, Kato Y, Yanagisawa A, Ohta H, Takahashi T, Kitagawa T: Predictive value of genetic diagnosis for cancer micrometastasis: histologic and experimental appraisal. *Cancer* 80:1393-1398, 1997
34. Zach O, Kasparu H, Krieger O, Hehenwarter W, Girschikofsky M, Lutz D: Detection of circulating mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients via a nested reverse transcriptase polymerase chain reaction for mammaglobin mRNA. *J Clin Oncol* 17:2015-2019, 1999
35. Zippelius A, Kufer P, Honold G, Kollermann MW, Oberneder R, Schlimok G, Riethmuller G, Pantel K: Limitations of reverse-transcriptase polymerase chain reaction analyses for detection of micrometastatic epithelial cancer cells in bone

marrow. *J Clin Oncol* 15:2701-2708, 1997

- ABSTRACTS -

**Prognostic Value of Bone Marrow Micrometastasis Detected by
Nnested RT-PCR for Cytokeratin 19 and Mammaglobin in Breast
Cancer**

Yong Sik Jung

**Department of Medical sciences
The Graduate School, Ajou University**

(Supervised by Professor Myung Wook Kim)

Background/Aims: Breast cancers in the early phase frequently undergo distant metastasis, and survival of patients is greatly dependent on distant metastasis. Occurrence of micrometastasis has been suggested to relate with prognostic features of breast cancer, such as lymph node metastasis and the presence of vascular invasion. The aim of this study was to examine the presence of keratin-19 and mammaglobin mRNA of epithelial tumors in bone marrow aspirates obtained from breast cancer patients and its possible correlation with tumor staging and disease free survival.

Methods: Bone marrow samples were obtained from 250 breast cancer patients at the time of surgery. We separated the mononuclear fraction from the samples and carried out nested reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) for the detection of keratin-19 and mammaglobin mRNA with two different pairs of primer. After operation, the patients were followed up by 3-month intervals. We studied possible correlation with tumor size, nodal involvement, stage, and distant metastasis.

Results: Seventy-five out of 250 samples were studied cytokeratin 19 and others were studied cytokeratin and mammaglobin. Median follow-up time was 21.1 months. Sixty-five (26%) out of 250 samples were cytokeratin 19 positive and 25 (14.3%) out of 175 were mammaglobin positive. Eight cases (12.3%) in cytokeratin positive group showed recurrent lesions in the distant organ. Whereas six (3.2%) out of 185 cytokeratin negative patients had distant recurrences. Mammaglobin was not correlated with distant recurrences. Bone marrow micrometastasis, stage, axillary nodal status, and estrogen receptor were independent.

Conclusions: Bone marrow micrometastasis detected by nested RT-PCR for cytokeratin 19 can be a useful predictive marker for distant recurrence of breast cancer.

Key Words: Breast carcinoma, Cytokeratin-19, Mammaglobin, Micrometastasis, Nested RT-PCR, Distant metastasis

