

유방암종과 양성 유방 질환의 세침흡인 검체와 조직에서의 카텡신 D 단백질의 발현

인제대학교 상계 백병원 진단병리과

박 경 미 · 고 일 향

= Abstract =

Immunocytochemical Assay of Cathepsin D in Fine Needle Aspiration Cytology of Breast Carcinoma and Benign Breast Diseases

Kyeongmee Park, M.D. and Ilhyang Ko, M.D.

Department of Diagnostic Pathology, Inje University Sanggye Paik Hospital, Seoul, Korea

Cathepsin D is a protease which is known to facilitate invasion and metastasis of breast carcinoma. Overexpression of cathepsin D is associated with poor clinical outcome and biologic aggressiveness of the breast cancer. We underwent immunocytochemical assay(ICA) for cathepsin D in fine needle aspiration cytology(FNAC) specimens from the breast carcinoma and benign breast diseases. In FNAC specimens cathepsin D was expressed in 21(42.9%) out of 49 cases of invasive ductal carcinoma, whereas negative result was observed in all 15 cases of benign breast diseases including 7 fibroadenomas, 6 fibrocystic diseases, and 2 benign ductal hyperplasias. Among the 11 FNAC specimens from ductal carcinoma in situ(DCIS), cathepsin D was expressed in 3 cases(27.3%). In FNAC specimens immunocytochemistry for cathepsin D showed positive result in 24 out of 60 carcinomas(sensitivity, 40%) and negative result in 15 out of all 15 benign breast diseases(specificity, 100%). No significant correlation was noted between cathepsin D expression in FNAC specimen and clinicohistological characteristics of the breast carcinoma, such as hormone receptors and cell differentiation. In conclusion, ICA of cathepsin D in FNAC specimens thought to be a good adjunct to differentiate malignancy from benign breast diseases.

Key words: Fine needle aspiration cytology, Breast carcinoma, Cathepsin D, Immunocytochemistry

책임저자 : 박경미

주 소 : (139-207) 서울시 노원구 상계 7동 761-1, 인제대학교 상계 백병원 진단병리과

전 화 : 02-950-1263

팩 스 : 02-950-1266

E-mail address : ysdol@unitel.co.kr

*본 논문은 1996년도 인제연구 장학재단의 연구비에 의하여 연구되었음.

서 론

유방암은 우리나라 여성암 발생의 3위를 차지하며 유방암 조기검진이 보편화되면서 조기암의 발견 빈도가 점차 증가하고 있다. 따라서 수술전 정확한 진단의 필요성이 절실하나 조기 유방암은 임상 및 방사선학적으로 흔히 비전형적 또는 비특이적 소견을 보이므로 조기 진단에 매우 어려움이 있다. 그러나 면밀한 촉진에 뒤따르는 정확한 세침흡인 세포검사는 유방암을 진단할 수 있는 가장 유용한 비외과적 검사법이다. 또한 암환자의 유방 보존 수술이 널리 시행되면서 세침흡인 세포검사의 중요성은 더욱 증가하고 있다.

카텡신 D는 52-kD의 단백질로 유방 조직에서 에스트로겐의 조절을 받는 단백분해효소이다.¹⁾ 그러나 에스트로겐 수용체 음성인 유방암종 세포 중에서는 에스트로겐의 영향없이도 생성하기도 한다.²⁾ 카텡신 D의 농도는 정상 세포에 비하여 성장 세포나 종양 세포에서 높으며 유방암종의 성장을 촉진시키고 단백질 분해작용을 일으켜서 유방암종의 전이에 관여하는 것으로 알려져 있다.³⁻⁵⁾ 적출된 유방암종 조직에서 카텡신 D의 발현은 환자의 예후와 연관되는 인자로 현재 활발히 연구되고 있지만 임상적 이용도는 아직 확립되어 있지 않다.^{1, 6-10)} 유방암종 조직에서의 카텡신 D의 발현율은 60% 정도로 보고되어 있고 암종의 크기나 림프절 전이, 에스트로겐 수용체 발현 등과 부분적인 상관관계가 확인되어 있다.^{10, 11)} 현재까지 유방암종 조직 검체에서의 압착 도말 표본을 이용한 카텡신 D의 면역 염색에 대한 연구는 있지만¹²⁾ 수술 전의 세침흡인 세포검체에서 면역염색을 시행한 보고는 없다.

저자들은 세침흡인 표본에서 카텡신 D의 발현이 양성 유방질환과 유방암종의 정확한 감별에 도움을 줄 수 있는지 알아보기 위하여 본 연구를 시행하였다. 유방암종 환자에서 수술전

세침흡인 세포검사로 얻은 암종세포에서 카텡신 D의 발현을 분석하였고 같은 암종조직 표본에서 카텡신 D의 발현을 검색하여 그 결과를 비교하였다.

연구 재료 및 방법

1. 연구 재료

침윤성 관암종 49예, 관내 암종 11예, 총 60예의 유방암종 환자에서 치료전에 얻은 세침흡인 세포검체를 이용하여 카텡신 D의 발현을 검색하였다. 양성 유방질환에서도 카텡신 D의 발현이 있는지 알아보기 위하여 7예의 섬유선종, 6예의 섬유 낭성 질환 및 2예의 양성 관상구조 증식 등 총 15예에서 얻은 세침흡인 세포검체에서도 카텡신 D의 발현을 검색하였다. 암종 환자 즉 침윤성 관암종 환자와 관내 암종 환자의 평균 연령은 48세, 양성 유방질환 환자의 평균 연령은 43세였다.

2. 면역세포화학염색

세침흡인 세포검사를 통하여 얻은 도말 표본은 10% 포르말린 phosphate-buffered saline(PBS)에 담군 후 4℃에서 15~30분 두고 pH 7.0의 PBS로 세척하였다. 무수 메탄올에 담군 상태로 20℃에서 5분간 적용한 후 PBS로 세척한 후 아세톤에 담구어 20℃에서 2분간 적용하고 다시 PBS로 세척하였다. 3% 과산화수소로 내인성 과산화 효소의 작용을 억제하였고 TBS로 5분씩 3회 세척한 후 정상 돼지 혈청으로 비특이적 반응을 억제시켰다. 카텡신 D(polyclonal rabbit anti-cathepsin D, Dako, USA, 1:150) 항체를 가한 후 상온에서 1시간 30분 동안 반응한 후 TBS로 세척하고 biotin과 결합된 이차 항체에 5분씩 3회 반응하였다. TBS에 세척하고 streptavidin과 peroxidase가 결합된 용액에 15분

간 반응한 후 diaminobenzidine으로 발색한 다음 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색하고 봉입하였다.

3. 판 독

세포 표본에 대한 면역세포화학염색은 1개를 제작하였고 1개 이상의 종양세포의 세포질에 뚜렷이 염색된 경우를 양성으로 판독하였다. 임상적, 병리학적 정보를 모르는 상태에서 조직 표본에서는 5% 이상의 세포에서 세포질에 뚜렷하게 갈색으로 발현된 경우를 양성으로 판독하였다. 세포 표본에서 얻어진 카텡신 D의 발현 결과를 조직검사 표본에서 검색된 카텡신 D의 발현 결과와 비교하였고 최종 진단에 따라서 카텡신 D의 발현을 분석하였다. 침윤성 관암종에서 얻은 세침흡인 세포검체의 카텡신 D 발현을 임상 및 조직학적 예후 인자와 비교 분석하였다. 침윤성 관암종의 조직학적 분화도는 Bloom과 Richardson¹³⁾에 의한 등급을 이용하였고 핵의 분화도는 Fisher 등¹⁴⁾에 의한 등급을 이용하였다.

4. 통계학적 분석

자료의 통계적 분석은 SPSS 프로그램의 χ^2 test를 이용하였고 p 값이 0.05 이하인 경우를 의미있는 결과로 판정하였다.

결 과

양성과 악성을 포함한 총 75예의 수술전 세침흡인 세포검체 중 24예(32%)에서 카텡신 D에 대한 면역세포화학염색에 양성 반응을 나타냈다(Fig. 1). 카텡신 D의 발현을 보인 24예를 조직학적 진단과 비교했을 때 24예 모두 악성 종양이었으며 21예(87.5%)가 침윤성 관암종이었고 3예(12.5%)가 관내 암종이었다(Table 1). 유방암종에서 카텡신 D 발현을 나타낸 세포의 분포는 5%에서 97%(평균 16.5%)로 다양하게 관찰되었다. 총 15예의 양성 유방질환에서 세침흡인 세포검사 표본을 이용하여 카텡신 D의 발현을 검사한 결과 카텡신 D의 발현을 볼 수 없었고 수술 후 조직표본에서도 15예 모두에서 카텡신 D의 발현을 관찰할 수 없었다. 적출 후

Table 1. Expression of cathepsin D in the breast carcinoma and benign breast disease

Diagnosis	No. of cases	FNAC		Histology	
		negative	positive	negative	positive
FA	7	7	0	7	0
FCD	6	6	0	6	0
BDH	2	2	0	2	0
DCIS	11	8	3	3	8
IDC	49	28	21	21*	22*
Total	75	51	24	39*	30*

FNAC: fine needle aspiration cytology, FA: fibroadenoma, FCD: fibrocystic disease, BDH: benign ductal hyperplasia, DCIS: ductal carcinoma *in situ*, IDC: invasive ductal carcinoma
 *: Tissue biopsy was not done in 6 cases.
 Sensitivity = $3+21/60 = 40.0(\%)$
 Specificity = $7+6+2/15 = 100.0(\%)$
 Positive predictive value = $3+21/24 = 100.0(\%)$
 Negative predictive value = $7+6+2/51 = 29.4(\%)$

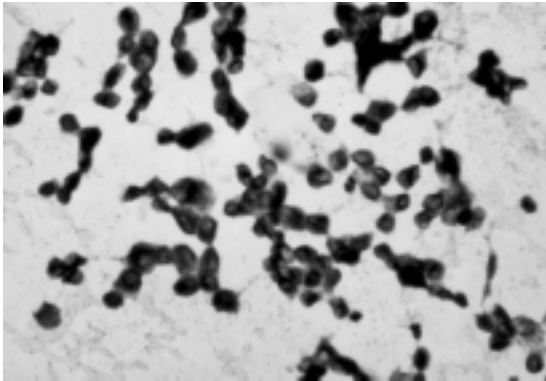


Fig. 1. Immunocytochemical finding of fine needle aspiration cytology: Ductal carcinoma cells reveal cytoplasmic expression of cathepsin D($\times 400$).

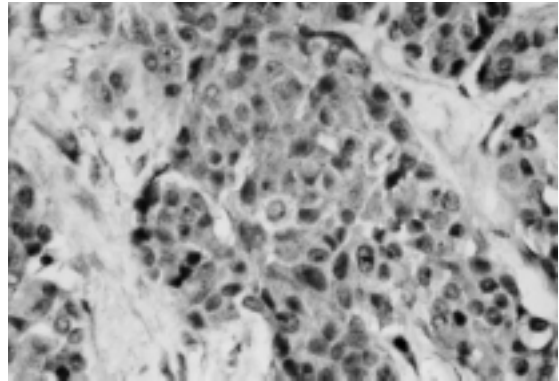


Fig. 2. Immunocytochemical finding of tissue biopsy: Invasive ductal carcinoma shows cytoplasmic expression of cathepsin D($\times 400$).

조직검사에서 관내 암종으로 밝혀진 11예의 조직표본에서는 카텡신 D의 발현이 8예(72.7%)에서 관찰되었으나 동일한 11예의 세침흡인 세포 검사에서는 카텡신 D의 발현이 3예(27.3%)에서만 보였다. 세침흡인 세포검사서 침윤성 관암종으로 의심되었던 환자 49명중 6명은 수술을 받지 않아서 조직검사에서 카텡신 D의 검색을 할 수 없었다. 수술을 받은 침윤성 관암종 43예중 22예(51.2%)에서 카텡신 D의 발현을 관찰할 수 있었다(Table 1)(Fig. 2). 침윤성 관암종의 경우 세침흡인 세포검사보다 조직 검사에 있어서 카텡신 D의 발현이 다소 높았다.

세침흡인 세포검사시 유방암종 세포의 카텡신 D 발현을 보면 민감도와 특이도는 각각 40%, 100%이었고 양성 기대치와 음성 기대치는 각각 100%, 29.4%이었다(Table 1). 카텡신 D의 발현과 임상 및 조직학적 예후 인자들간의 의미있는 상관성은 없었다(Table 2).

고 찰

카텡신 D는 유방암의 특징인 전이와 국소 침윤을 촉진시키는 단백질 분해효소이다.¹⁵⁾ 정상 세포에도 카텡신 D는 52 kD의 전구 효소 형태

로 존재하지만 산성 pH를 보이는 환경에서 성숙형의 34 kD과 14 kD의 단백질로 변화하여 강력한 단백질 분해효소 작용을 나타낸다.¹⁶⁾ 본 연구에서 유방암종은 세침흡인 검체와 수술 후 조직에서 카텡신 D의 발현이 50% 내외에서 관찰되는 반면에 양성 유방 질환의 세침흡인 검체와 조직에서는 카텡신 D의 발현이 전혀 관찰되지 않았는데 이는 암세포에서 카텡신 D의 활성화가 특징적으로 이루어진다는 증거로 생각한다. 따라서 세침흡인 세포검사서 카텡신 D의 발현을 확인하는 것이 유방암을 정확히 진단할 수 있는 보조적인 방법으로 이용할 수 있을 것으로 보인다. 다만 세침흡인 검체뿐만 아니라 암조직에서도 카텡신 D가 전혀 발현되지 않는 경우가 많고 본 연구에서도 총 43예 중 25예(58.1%)에서만 양자간의 일치율을 나타냈으므로 카텡신 D 음성인 것이 암의 가능성을 완전히 배제하지는 못하는 것으로 생각한다.

단백질 분해효소의 성질을 가진 카텡신 D가 실제로 암세포의 국소 침윤과 전파를 촉진시키는지에 대해서는 논란이 많다. Johnson 등¹⁷⁾은 유방암세포주를 이용한 실험에서 카텡신 D가 기저막을 파괴하고 암세포의 침윤을 촉진시키는 것을 확인하는데 실패하였다.¹⁷⁾ 이 실험에

Table 2. Correlation of clinico-pathologic features and cathepsin D expression in fine needle aspiration cytology of invasive ductal carcinoma

Prognostic factors	Cathepsin D expression		Total No.	p value
	negative(%)	positive(%)		
Estrogen receptor				NS
negative	7(58.3)	5(41.7)	12	
positive	18(58.1)	13(41.9)	31	
Progesterone receptor				NS
negative	4(50.0)	4(50.0)	8	
positive	21(60.0)	14(40.0)	35	
Histologic grade				NS
I	3(100.0)	0(0.0)	3	
II	13(54.2)	11(45.8)	24	
III	9(56.3)	7(43.7)	16	
Nuclear grade				NS
I	2(50.0)	2(50.0)	4	
II	14(58.3)	10(41.7)	24	
III	9(60.0)	6(40.0)	15	
Lymph node metastasis				NS
negative	12(63.2)	7(36.8)	19	
positive	13(54.2)	11(45.8)	24	

* NS : not significant

서는 세포질내의 카텡신 농도를 측정 한 것인데 이 경우 염증세포에도 존재하는 카텡신 D가 포함되어 있어서 순수한 암세포내의 카텡신 농도를 측정하였다고 보기는 어렵다. 본 연구에서 세침흡인 검체에서 카텡신 D의 발현과 림프절 전이를 비롯한 임상적, 조직학적 예후 인자들과의 상관성을 분석해 보았으나 유의한 상관 관계를 증명할 수 없었다. 다른 연구의 결과들에서도 카텡신 D의 발현과 예후 인자간의 상관 관계는 부분적으로 인정되었다.^{12, 13, 18, 19)} 이 결과는 카텡신 D가 유방암에서 에스트로겐 수용체의 발현이나 암의 분화도와는 무관하게 독립적인 예후 인자로 해석할 수도 있지만 본 연구의 대상 환자의 수가 많지 않았으므로 단정할 수는 없겠다.

세침흡인 검체에서 카텡신 D의 발현은 침윤성 관암종은 42.9%, 관내 암종은 27.3%에서 관

찰되었고 수술 후 암조직에서는 각각 51.2%, 72.7%에서 발현되어 세침흡인 검체에서보다 전체 조직에서 검색했을 때 발현율이 높음을 알 수 있다. 세침흡인 검체에서 카텡신 D의 발현율이 낮게 나타난 것은 전체 암조직의 일부분을 검색한다는 제한적 여건이 그 원인일 것으로 생각하며 암종을 구성하는 세포들의 이질성(heterogeneity)으로도 설명할 수 있다. 세침흡인 검체와 조직을 이용한 면역세포화학염색 결과의 일치율이 61% 내지 92% 정도로 보고되어 있어²⁰⁻²⁵⁾ 본 연구의 58.1%의 일치율은 낮은 편이라고 할 수 있다. 현재까지 카텡신 D에 대한 면역 염색의 연구는 주로 조직 검체에서만 시행되어 있으므로 본 연구의 세포학적 연구 결과를 다른 문헌과 비교해 볼 수는 없었다. 유방 암종에서 세침흡인 세포검사를 이용한 면역세포화학염색은 대부분 호르몬 수용체, 종양세포

의 증식 인자나 p53 단백 등에 관한 연구가 보고되어 있고 이러한 연구에서는 세포와 조직간의 불일치의 원인을 면역 염색과정에서 종양세포의 분자 생물학적 변형이나 이질성을 그 원인으로 추측하고 있고 수술전의 항호르몬 치료도 그 원인중의 하나라고 생각하고 있다.^{20, 21)} 면역 염색에 이용한 항체에 따라서도 그 결과가 달라질 수 있다는 견해도 있다.²¹⁾ 다른 문헌에 보고된 유방암 조직에서의 카텡신 D의 발현율이 42~60%^{12, 13)}였던 것을 참고하면 본 연구에서의 조직을 이용한 카텡신 D의 면역 염색방법의 표준화는 어느 정도 이루어진 것으로 생각한다.

결 론

세침흡인 세포학적 검사로 유방암종으로 진단한 60예 중 24예가 카텡신 D 면역 염색에 양성 반응을 나타내 민감도는 40%이었고, 섬유선종, 섬유 낭성 질환, 양성 관상 구조 증식과 같은 양성 병변에서는 15예 모두에서 카텡신 D 면역 염색에 음성 반응을 보여 특이도는 100%이었다. 따라서 침윤성 관암종에서 뿐만 아니라 관내암종 세포에서도 역시 카텡신 D가 발현되는 점을 고려할 때 세침흡인 검체에서의 카텡신 D의 발현 검사는 유방의 악성과 양성 질환을 감별 진단하는 데 유용하게 이용할 수 있는 특이도가 높은 방법이라고 생각한다.

참 고 문 헌

1. Henry JA, McCarthy AL, Westley BR, et al.: Prognostic significance of the estrogen-regulated protein, cathepsin D, in breast cancer. *Cancer* 65:265-271, 1990
2. Westley B, Rochefort H: A secretory glycoprotein induced by estrogen in human breast cancer cell lines. *Cell* 20:353-362, 1980
3. Rochefort H, Capony F, Garcia M: Cathepsin D

- in breast cancer; from molecular and cellular biology to clinical applications. *Cancer Cells* 42: 383-388, 1990
4. Derynck R, Roberts AB, Winkler ME, Chen EY, Goeddel DV: Human transforming growth factor- β , precursor structure and expression in *E. coli*. *Cell* 38:287-297, 1984
5. Isola J, Weitz S, Visacorpi T, et al.: Cathepsin D expression detected by immunohistochemistry has independent prognostic value in axillary node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 11:36-43, 1993
6. Brouillet JP, Theillet C, Maudelonde T, et al.: Cathepsin D assay in primary breast cancer and lymph nodes; Relationship with c-myc, C-erbB-2, and int-2 oncogene amplification and node invasiveness. *Eur J Cancer* 26:437-441, 1990
7. Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Chirgwin JM, McGuire WL: Cathepsin D and prognosis in breast cancer. *N Engl J Med* 322:297-302, 1990
8. Thorpe SM, Rochefort H, Garcia M: Association between high concentrations of 52K cathepsin D and poor prognosis in primary breast cancer. *Cancer Res* 49:6008-6014, 1989
9. Spyrtos F, Maudelonde T, Brouillet JP: Cathepsin D; an important marker predicting metastasis in primary breast cancer. *Lancet* 8672:1115-1118, 1989
10. Han S, Yun IJ, Noh DY, Choe KJ, Song SY, Chi JG: Abnormal expression of four novel molecular markers represents a highly aggressive phenotype in breast cancer. Immunohistochemical assay of p53, nm23, erbB-2, and cathepsin D protein. *J Surg Oncol* 65:22-27, 1997
11. Nikolic-Vukosavljevic D, Grujic-Adanja G, Nastic-Miric D, et al.: Cathepsin D: association between TN-stage and steroid receptor status of breast carcinoma. *Tumour Biol* 19:329-334, 1998
12. Athanassiadou PP, Athanassiades PH, Davaris P, Petrakaou EI, Zerva CI, Kyrkou KA: Expression of cathepsin D and pS2 in imprint smears of breast carcinoma. *Cytopathology* 9:240-247, 1998
13. Bloom HJG, Richardson WW: Histological grading and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 11:359-377, 1957
14. Fisher ER, Gregorio RM, Fisher B, Redmond C, Vellios F, Sommers SC: The pathology of the

- National Surgical Adjuvant Breast Project(Protocol No. 4). *Cancer* 36:1-85, 1975
15. Montcourrier P, Mangeat PH, Salazar G, et al.: Cathepsin D in breast cancer cells can digest extracellular matrix in large acidic vesicles. *Cancer Res* 56:6045-6054, 1990
 16. Rochefort H: Cathepsin D in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 24:219-226, 1990
 17. Johnson MD, Torri JA, Lippman ME, Dickson RB: The role of cathepsin D in the invasiveness of human breast cancer cells. *Cancer Res* 53:873-877, 1993
 18. Glikman P, Rogozinski A, Mosto J, Pollina A, Garbovesky C, Levy C: Relationship between cathepsin-D and other prognostic factors in human breast cancer. *Tumori* 83:685-688, 1997
 19. Charpin C, Garcia S, Bouvier C, et al.: Cathepsin D detected by automated and quantitative immunohistochemistry in breast carcinomas: correlation with overall and disease free survival. *J Clin Pathol* 50:586-590, 1997
 20. Nizzoli R, Bozzetti C, Naldi N, et al.: Comparison of the results of immunocytochemical assays for biologic variables on preoperative fine-needle aspirates and on surgical specimens of primary breast carcinomas. *Cancer* 90:61-66, 2000
 21. Makris A, Allred DC, Powles TJ, et al.: Cytological evaluation of biological prognostic markers from primary breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 44:65-74, 1997
 22. Railo M, Nordling S, Krogerus L, Sioris T, von Smitten K: Preoperative assessment of proliferative activity and hormonal receptor status in carcinoma of the breast: a comparison of needle aspiration and needle-core biopsies to the surgical specimen. *Diagn Cytopathol* 15:205-210, 1996
 23. Reiner A, Spona J, Reiner G, et al.: Estrogen receptor analysis on biopsies and fine needle aspirates from human breast carcinoma. *Am J Pathol* 125:443-449, 1986
 24. Katz RL, Patel S, Sneige N, et al.: Comparison of immunocytochemical and biochemical assays for estrogen receptor in fine needle aspirates and histologic sections from breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 15:191-203, 1990
 25. Schmitt FC, Bento MJ, Amendoeira I: Estimation of estrogen receptor content in fine needle aspirates from breast cancer using the monoclonal antibody 1D5 and microwave oven processing: correlation with paraffin embedded and frozen sections determinations. *Diagn Cytopathol* 13:347-351, 1995