

유방암에서 HER2 유전자 검사를 위한 자동화 은제자리부합법 검사의 유용성: 형광제자리부합법과 면역조직화학염색과의 비교

성우정 · 박석주 · 구미진¹ · 배영경

영남대학교 의과대학 병리학교실,
¹대구파티마병원 병리과

Automated Silver-enhanced In Situ Hybridization for Evaluation of HER2 Gene Status in Breast Carcinoma: Comparison with Fluorescence In Situ Hybridization and Immunohistochemistry

Woo Jung Sung · Seok Ju Park · Mi Jin Gu¹ · Young Kyung Bae

Department of Pathology, Yeungnam University College of Medicine;
¹Department of Pathology, Daegu Fatima Hospital, Daegu, Korea

Background : The human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) is amplified in 20-25% of breast cancers. HER2 overexpression or amplification is associated with a worse clinical outcome and it can predict the benefit from anthracycline and anti-HER2 therapies. The HER2 status has usually been assessed by immunohistochemistry (IHC) or fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in clinical samples. A new silver-enhanced *in situ* hybridization (SISH) technique was recently introduced. Therefore we evaluated the usefulness of SISH for detecting HER2 amplification. **Methods :** Tissue microarrays (TMAs) were constructed with 144 invasive breast cancer tissue samples. We performed IHC, FISH and SISH for HER2 on the tissue sections from the TMAs and we interpreted the results according to the American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists (ASCO/CAP) guidelines. The concordant rates between the two different tests were calculated. **Results :** HER2 was overexpressed and amplified in 16.9%, 16.9%, and 18% of the cases by IHC, FISH and SISH, respectively. The concordant rates between IHC and FISH, IHC and SISH, and FISH and SISH were 95.1%, 95.7%, and 97.8%, respectively. **Conclusions :** SISH can be an alternative test for evaluating HER2 amplification because the 97.8% concordance with FISH satisfies the ASCO/CAP requirement of > 95% concordance with an alternative validated method.

Key Words : Breast neoplasms; HER2 protein, human; *In situ* hybridization, fluorescence; Silver; *In situ* hybridization

접수 : 2009년 6월 30일
제재승인 : 2009년 9월 22일

책임저자 : 배 영 경
우 705-717 대구광역시 남구 대명5동 317-1
영남대학교 의과대학 병리학교실
전화: 053-620-3336
Fax: 053-622-8432
E-mail: ykbae@ynu.ac.kr

*본 연구는 2008학년도 영남대학교 학술
연구조성비에 의한 것임.

유방암에서 human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) 유전자의 증폭은 침윤성 유방암의 20-25%에서 관찰되며, HER2 단백 과발현은 유전자의 증폭과 밀접한 관련이 있다.¹ HER2 유전자의 증폭 또는 과발현은 유방암 환자에게 있어 나쁜 예후와 관련이 있고, tamoxifen을 이용한 호르몬치료에 저항성을 나타내지만 anthracycline 계열의 항암제나 paclitaxel의 치료에 좋은 반응을 나타내는 예측인자이다. 또한 HER2 표적 치료제인 trastuzumab (Herceptin®, Genentech, South San Francisco, CA, USA)이나 lapatinib (Tykerb, GlaxoSmithKline, Philadelphia, PA, USA)이 개발됨으로써 HER2 상태는 유방암 환자 치료방침 결정에 필수적인 요소가 되었다. 따라서 미국암학회나 한국유방암학회에서는 모든 침윤성 유방암 환자를

대상으로 진단 당시 또는 재발했을 때 반드시 HER2 검사를 시행하도록 권장하고 있다.^{2,3}

환자 조직에서 HER2 유전자 상태를 검사하는 방법으로는 면역조직화학염색(immunohistochemistry, IHC)을 이용하여 HER2 단백 과발현을 검사하는 방법과 형광제자리부합법(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)이나 발색제자리부합법(chromogenic *in situ* hybridization, CISH)을 이용하여 유전자 증폭을 검사하는 방법 등이 있다. 국내에서는 IHC를 일차적으로 시행하여 0 또는 1+인 경우 HER2 음성 유방암으로, 3+인 경우 HER2 양성 유방암으로 판정하고 IHC에서 2+로 판독된 경우에만 FISH나 CISH를 시행하여 HER2 상태를 결정하는 것이 일반적이다. 그러나 검사실마다 사용하는 시약이나 검사 방법의

차이가 있으므로 어느 검사 방법도 HER2 상태를 평가하는데 있어 최적의 방법이라고 말할 수는 없다. 따라서 유방암에서 HER2의 중요성을 고려할 때 엄격한 검사 방법 및 결과 해석에 관한 질적인 관리가 필요하다. 이에 미국임상암학회(American Society of Clinical Oncology, ASCO)와 미국병리학회(College of American Pathologists, CAP)는 공동으로 HER2 검사를 위한 지침서를 개발하였으며 전세계적으로 이 지침서에 따라 검사를 시행하고 결과를 판독하고 있다.⁴

한편 최근에 유전자 증폭을 직접 평가하는 검사법으로 은제자리부합법(silver-enhanced *in situ* hybridization, SISH)이 소개되었는데, 이 방법은 탐식자(probe)가 해당 DNA 부위에 부착하면 환원은 침착을 유도하여 조직 내에서 오랫동안 유지되는 검은색 점으로 반응 결과가 나타나 광학현미경으로 판독할 수 있는 검사 방법이다. 이 SISH는 자동화 면역염색기(Benchmark[®] XT, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA)에서 검사 전 과정이 진행되므로 일관된 검사 결과를 얻을 수 있고 검사에 소요되는 시간이 FISH나 CISH에 비해 짧다. SISH 결과를 FISH 또는 CISH 결과와 비교 관찰한 연구들^{5,6}에 의하면 두 검사 간 결과 일치율(concordance)이 약 96%로 ASCO/CAP에서 권장하는 95%를 초과하므로 HER2 유전자 증폭을 검사하는 새로운 방법으로 제시되고 있으나 아직까지 국내에서 시행된 연구 결과는 없다.

이에 저자들은 유방의 침윤성 암종을 대상으로 SISH를 이용하여 HER2 유전자 상태를 평가하고 이 결과를 IHC 및 FISH 결과와 비교함으로써 SISH 검사법의 유용성을 알아보고자 하였으며, 이를 실제 검사에 적용한다면 어떤 장단점이 있는지 직접 경험해보고자 하였다.

재료 및 방법

연구 대상

2002년 5월부터 2003년 2월 사이 영남대학교 의과대학 부속 병원에서 침윤성 유방암으로 진단받고 근치적 절제술을 시행한 144명의 환자 조직을 이용하여 연구를 수행하였으며, 이에 이용된 연구 대상 환자의 임상병리학적 특성은 Table 1에 정리하였다. 이때 환자 조직은 10% 중성 포르말린에 고정된 후 파라핀에 포매된 조직으로 통상적인 병리조직검사가 끝난 뒤 병리과에 보관되어 있던 검체를 이용하였다. 또한 각 환자당 대표 파라핀 블록 1개를 선정하여 조직배열블록(tissue microarray, TMA) (AccuMaxTM array, ISU Abxis, Seoul, Korea)을 제작하고, 각 증례당 직경 1 mm 조직 2개를 파내 새로운 파라핀 블록에 심었으며 144명의 환자 조직으로 총 3개의 새로운 TMA 블록을 제작하였다. 그런 후 각 블록에서 4 μ m 두께의 연속 절편 5장을 얻어 hematoxylin and eosin (H&E), IHC, FISH에 각

Table 1. Clinicopathologic characteristics of 144 patients

Characteristics	No. of the patients (%)
Age (yr)	47 (20-77)
Histology	
Ductal	133 (92.4)
Lobular	4 (2.8)
Medullary	3 (2.1)
Mucinous	3 (2.1)
Micropapillary	1 (0.7)
Tumor size (cm)	
≤ 2	55 (38.2)
2 < and ≤ 5	75 (52.1)
> 5	9 (6.3)
Unknown	5 (3.5)
LN metastasis	
0	66 (45.8)
1-3	46 (31.9)
4-9	14 (9.7)
≥ 10	18 (12.5)

LN, lymph node.

한 장씩을 그리고 SISH를 위해 2장을 사용하였다.

면역조직화학염색

HER2 면역염색은 PATHWAY[®] anti-HER2/neu (4B5) rabbit monoclonal antibody (Ventana Medical Systems)와 Ultra ViewTM Universal DAB Detection Kit (Ventana Medical Systems)를 이용하여 자동화 면역염색기(Benchmark[®] XT, Ventana Medical Systems)로 시행하였다.

형광제자리부합법

FISH는 PathVysis[®] HER-2 DNA Probe Kit (Abbott/Vysis, Abbott Park, IL, USA)를 이용하여 자동화장비(Discovery[®], Ventana Medical Systems)로 시행하였다. 각 검사 단계를 간략하게 정리하면 다음과 같다. 즉 4 μ m 두께의 조직 절편을 EZ PrepTM (Ventana Medical Systems)을 이용하여 탈파라핀 한 후, RiboMap[®] Kit (Ventana Medical Systems)의 RiboPrepTM reagent를 37°C에서 32분간 그리고 RiboClearTM reagent를 37°C에서 16분간 전처리하고, 37°C에서 40분간 Protease 3 (Ventana Medical Systems)와 반응시켰다. 그 후 20 μ L의 PathVysis[®] LSI HER2/CEP probe를 적용시킨 뒤 커버슬립을 덮고 75°C에서 6분간 변성시킨 다음 37°C에서 12시간 유지하여 부합 반응을 시켰다. 또 커버슬립을 제거하고 Ribo-WashTM Bulk Reagent (Ventana Medical Systems)로 세척한 후, RiboMap[®] Kit의 RiboFixTM reagent로 후 부합화 고정을 한 다음 말렸으며, 20 μ L의 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)로 핵막염색을 한 다음 판독할 때까지 슬라이드는 영하

20°C에서 보관하였다. 그리고 결과 판독을 위해 형광현미경 1,000배 시야에서 DAPI/Spectrum Green/Orange에 대한 단 필터와 삼중 필터를 이용해 각 증례당 침윤성 유방암세포 20-100개에서 형광신호를 세었다.

은제자리부합법

SISH는 dinitrophenol (DNP)이 부착되어 있는 INFORM® HER2 DNA Probe Kit (Ventana Medical Systems)를 이용하여 자동화 면역염색기(Benchmark® XT, Ventana Medical Systems)에서 시행하였으며, 발색 반응 결과가 모두 검은색으로 나타났기 때문에 두 장의 조직 절편 슬라이드에 HER2 probe와 Chr17 probe를 각각 적용하였다. 이때 HER2 DNA probe는 95°C에서 12분간 변성시키고 52°C에서 2시간 동안 조직과 부합시킨 후 72°C에서 3회 세척하였다. 또한 Chr17 probe는 95°C에서 12분간 변성시키고 부합화는 44°C에서 2시간 동안 진행하였으며 59°C에서 3회 세척하였다. 발색 반응은 rabbit anti-DNP primary antibody와 ultraView™ SISH Detection Kit (Ventana Medical Systems)를 이용하였다. Kit 내에는 horse radish peroxidase (HRP)가 결합된 anti-rabbit antibody와 은A (silver acetate), 은B (hydroquinone), 은C (H_2O_2)가 들어 있어 이들을 조직에 적용시키면 은이온(Ag^+)이 hydroquinone에 의해 금속 은원자(metallic silver atoms)로 환원되어 probe가 결합된 부위에 침착하는데 이 반응을 HRP 기질인 H_2O_2 (silver C)가 유도한다. 발색 반응 후 Ventana hematoxylin II를 이용하여 대조염색을 시행하고 광학현미경 600배 시야에서 20-100개의 침윤성 유방암 세포에서 나타나는 발색 신호를 세었다.

결과 판독

검사 결과 판독은 다른 검사 결과를 모르는 상태에서 IHC와 FISH는 한 명의 병리의사가 SISH는 두 명의 병리의사가 각각 판독하였다. 이때 FISH와 SISH는 적어도 20개의 침윤성 유방암 세포를 관찰하였고, 종양의 불균질성(tumor heterogeneity)이 있다고 판단되면 20개씩 세포 수를 늘려서 100개까지 관찰하였다. 두 병리의사의 SISH 판독 결과가 서로 다른 증례에 대해서는 두 사람이 다안현미경(multi-head microscope)을 통해 함께 관찰하면서 합의를 이루었다. IHC와 FISH 결과 판독은 ASCO/CAP 기준에 따랐으며 Table 2에 기술하였다. SISH 결과 판독은 제조사인 Ventana Medical Systems (<http://www.her2sish.com/training.php>)에서 제공하는 온라인 교육을 이수하고 제조사가 제시하는 기준에 따라 판독하였는데 이는 FISH에 대한 ASCO/CAP 기준과 동일하였다. 이때 IHC와 FISH, IHC와 SISH 그리고 FISH와 SISH 간 결과 일치율을 계산하였고, 병리의사 간 SISH의 결과 일치 정도는 k계수를 이용하여 분석하였다.

Table 2. Interpretation criteria according to the ASCO/CAP guidelines

Interpretation	Definition
IHC	
Positive (3+)	Uniform intense membrane staining of > 30% of invasive tumor cells
Equivocal (2+)	Weak or nonuniform, complete membrane staining in > 10% of tumor cells
Negative (1+)	Weak incomplete membrane staining in any portion of tumor cells
Negative (0)	No staining
FISH	
Positive	FISH ratio ^a > 2.2 or HER2 gene copy > 6.0
Equivocal	FISH ratio 1.8-2.2 or HER2 gene copy 4.0-6.0
Negative	FISH ratio < 1.8 or HER2 gene copy < 4.0
SISH ^b	
Positive	HER2 / Chr17 > 2.2
Equivocal	1.8 ≤ HER2 / Chr17 ≤ 2.2
Negative	HER2 / Chr17 < 1.8

^aFISH ratio means HER2 gene signals to chromosome 17 signals; ^bThis is manufacturer's guideline.

ASCO/CAP, American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists; IHC, immunohistochemistry; FISH, fluorescence *in situ* hybridization; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; SISH, silver-enhanced *in situ* hybridization.

결과

144예 중 IHC와 FISH는 142예로부터 결과를 얻을 수 있었고 SISH는 139예로부터 결과를 얻었다. 이 중 2예는 TMA 제작에 침윤성 유방암 조직이 포함되지 않은 경우였고 3예는 SISH에서 HER2 또는 Chr17에 해당하는 발색반응이 나타나지 않은 경우였다. IHC에서는 142예 중 103예(72.5%)가 0, 11예(7.7%)가 1+, 4예(2.8%)가 2+ 그리고 24예(16.9%)가 3+였다(Fig. 1). 또한 FISH에서는 142예 중 116예(81.7%)가 음성(negative), 2예(1.4%)가 불확실(equivocal), 24예(16.9%)가 양성(positive)이었으며, SISH에서는 139예 중 112예(80.6%)가 음성, 2예(1.4%)가 불확실 그리고 25예(18%)가 양성이었다.

IHC와 FISH 결과의 비교

142예 중 135예(95.1%)에서 두 검사 간 음성, 불확실 그리고 양성으로 판독한 결과가 일치하였다(Table 3). 한편 불일치를 보인 7예를 살펴보면 다음과 같다. IHC에서 음성(0)이었던 2예는 FISH에서 FISH ratio (HER2 signals/CEP17 signals) 1.8을 보여 불확실로 판독하였으며, 종양의 여러 부위에서 판독하였을 때 20개 종양세포당 FISH ratio가 1.2-2.1로 다양하게 나타나 이는 종양의 불균질성에 의한 것으로 생각하였다. 또한 IHC에서 2+였던 4예 중 3예가 FISH 음성이었는데, 이 가운데 2예가 polysomy (CEP17 signals/nucleus ≥ 3)였으며, IHC 2+였던 나머지 1예는 FISH 양성(FISH ratio 7.3)이었다(Fig. 2A-C).

Table 3. Results of IHC, FISH and SISH for HER2 status

IHC	FISH				SISH			
	Negative	Equivocal	Positive	Total (%)	Negative	Equivocal	Positive	Total (%)
Negative (0)	101	2	0	103 (72.5)	98	2	0	100 (71.9)
(1+)	11	0	0	11 (7.7)	11	0	0	11 (7.9)
Equivocal (2+)	3	0	1	4 (2.8)	3	0	1	4 (2.9)
Positive (3+)	1	0	23	24 (16.9)	0	0	24	24 (17.3)
Total (%)	116 (81.7)	2 (1.4)	24 (16.9)	142	112 (80.6)	2 (1.4)	25 (18)	139

IHC, immunohistochemistry; FISH, fluorescence *in situ* hybridization; SISH, silver-enhanced *in situ* hybridization; HER2, human epidermal growth factor receptor 2.

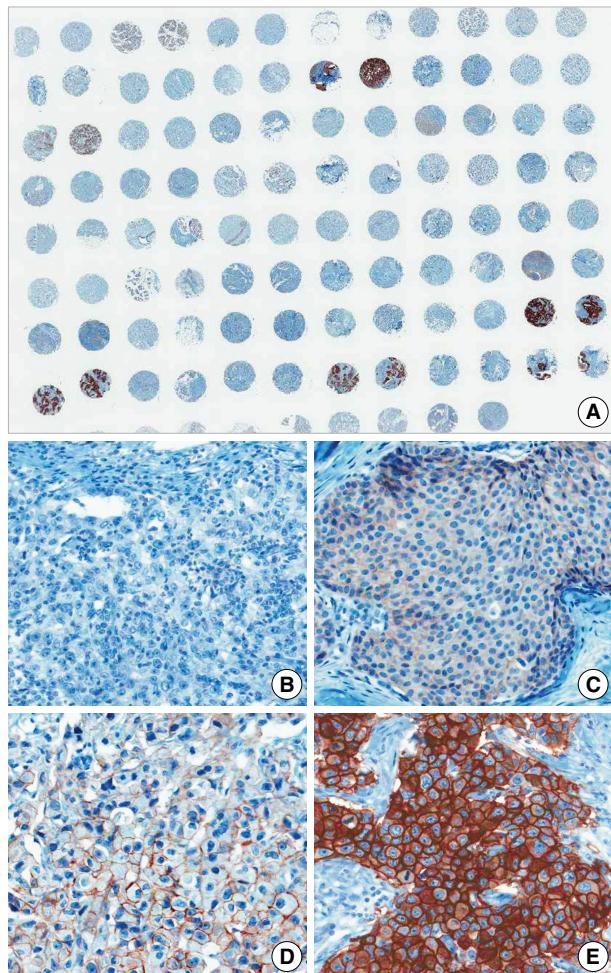


Fig. 1. Representative immunohistochemistry (IHC) results for human epidermal growth factor receptor 2 on tissue microarray slide (A). IHC score 0 (B), 1+ (C), 2+ (D) and 3+ (E) are shown.

IHC와 FISH 결과의 불일치를 보인 마지막 1예는 HER2뿐만 아니라 CEP17 형광신호가 모두 증가하여 polysomy (HER2/CEP17=23.3/20)로 보았으며 (Fig. 2D-F), IHC에서 음성 또는 양성으로 판독된 증례만을 대상으로 FISH 결과와 비교하였을 때 결과 일치율은 97.8% (135/138)였다.

Table 4. Comparison between FISH and SISH results for HER2 status

FISH	SISH			
	Negative	Equivocal	Positive	Total (%)
Negative	111	1	1	113 (81.3)
Equivocal	1	1	0	2 (1.4)
Positive	0	0	24	24 (17.3)
Total (%)	112 (80.6)	2 (1.4)	25 (18)	139

FISH, fluorescence *in situ* hybridization; SISH, silver-enhanced *in situ* hybridization; HER2, human epidermal growth factor receptor 2.

IHC와 SISH 결과의 비교

두 검사 모두에서 결과를 얻을 수 있었던 139예 가운데 133예(95.7%)에서 두 검사 간 음성, 불확실 그리고 양성으로 판독한 결과가 일치하였다 (Table 3). IHC에서 음성(0 또는 1+)이었던 증례 중 2예는 SISH에서 불확실로 판독되었는데, SISH ratio 2.0과 2.1이었다. 또한 IHC에서 불확실 결과(2+)를 보였던 4예 중 1예는 SISH 양성이었으며, IHC 양성(3+)이었던 24예는 모두는 SISH에서도 양성으로 나타났다. IHC에서 음성 또는 양성으로 판독된 증례만을 대상으로 SISH 결과와 비교하였을 때의 결과 일치율은 98.5% (133/135)였다.

FISH와 SISH 결과의 비교

두 검사 모두에서 결과를 얻을 수 있었던 139예 가운데 136예(97.8%)에서 두 검사 간 음성, 불확실 그리고 양성으로 판독한 결과가 일치하였다 (Table 4). 각 증례의 FISH ratio와 SISH ratio의 대략적인 분포는 Fig. 3에 표시하였는데, HER2 증폭이 있는 경우 SISH ratio가 FISH ratio에 비해 다소 높게 측정되었다. 불일치를 보인 증례 가운데 1예는 FISH에서 음성(HER2/CEP17=2.2/2.5)이었으나 SISH에서는 불확실(HER2/chr17=2.9/1.4)로 판독되었고, 다른 1예는 이와 반대였다 (FISH ratio, HER2/chr17=3/1.6; SISH ratio, HER2/chr17=2.4/1.9). 이 두 증례 모두 IHC 음성(0)이었으며, FISH와 SISH 검사방법에 따른 결과 불일치는 종양의 불균질성에 의한 것으로 보았다. 또

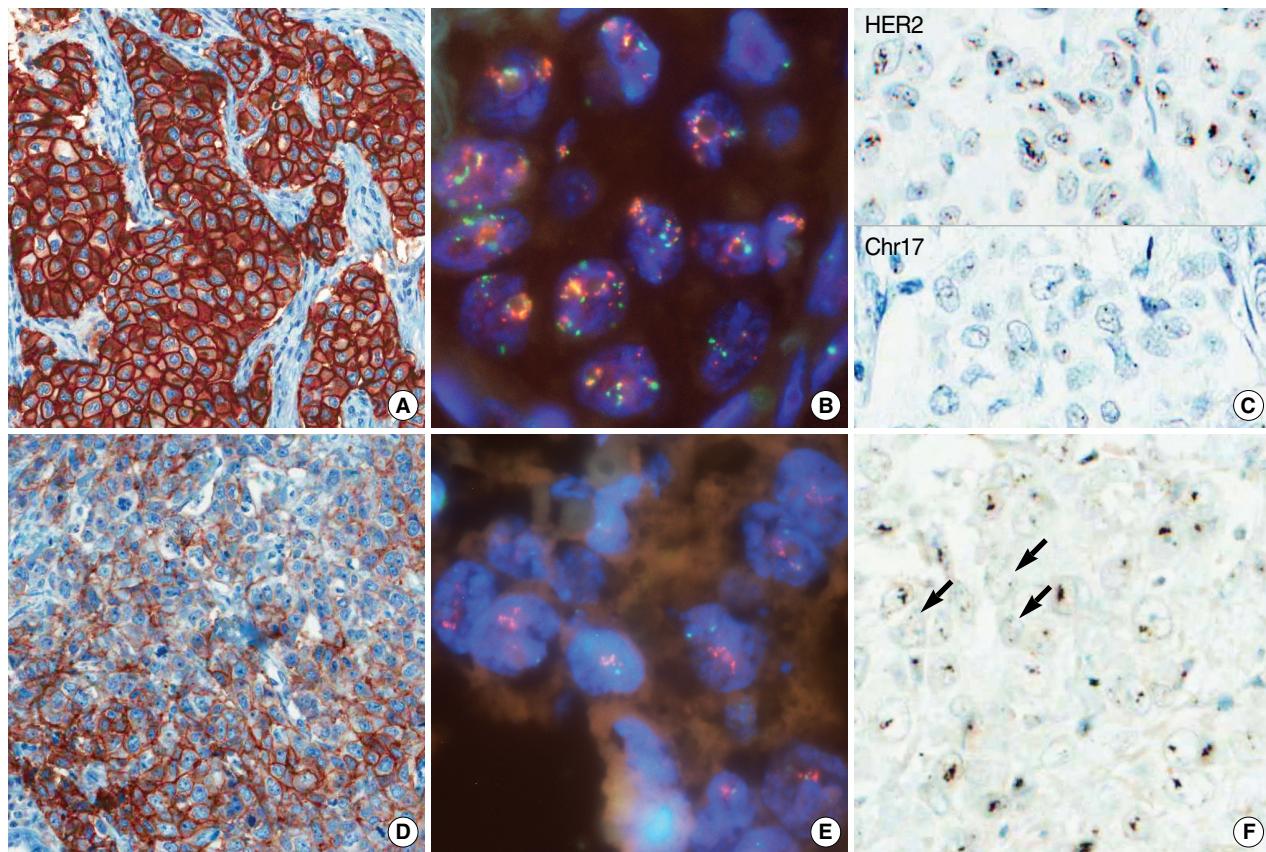


Fig. 2. Comparison of immunohistochemistry (IHC), fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and silver-enhanced *in situ* hybridization (SISH) results in case 20 (A-C) and case 136 (D-F). (A) IHC shows 3+ membrane staining. (B) FISH result was interpreted as negative because of multiple chr17 signals. (C) Positive SISH result with clusters of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) signals and 1-4 chr17 signals in tumor cells. (D) IHC shows heterogeneous 2+ membrane staining. (E) Positive FISH result with clusters of HER2 signals and 1 or 2 chr17 signals. (F) Positive SISH result. Some tumor cells have clusters of HER2 signals and others (arrows) have 1 to 3 HER2 signals.

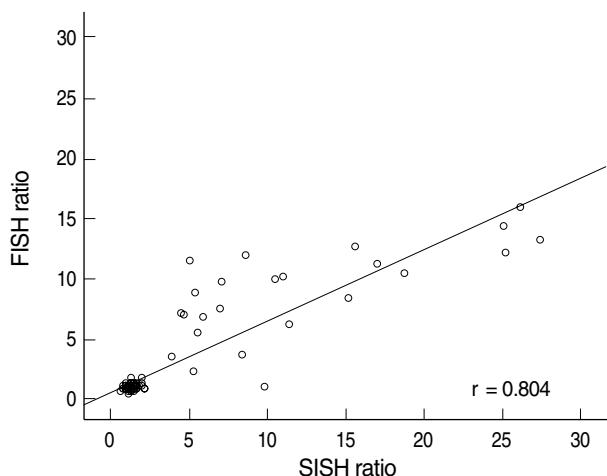


Fig. 3. Comparison of fluorescence *in situ* hybridization ratio and silver-enhanced *in situ* hybridization ratio for 139 patients.
r, correlation coefficient.

FISH, fluorescence *in situ* hybridization; SISH, silver-enhanced *in situ* hybridization.

한 불일치를 보인 3예 중 나머지 1예는 IHC 양성(3+)이면서 FISH에서는 음성(HER2/chr17=23.3/20)이었으나 SISH에서 양성(HER2/chr17=27.5/2.8)으로 판독되었다. FISH에서 음성 또는 양성으로 판독된 증례만을 대상으로 SISH 결과와 비교하였을 때 결과 일치율은 98.5% (135/137)였다.

병리의사 간 SISH 검사 결과의 일치도

두 명의 병리의사가 각각 따로 판독한 SISH 결과에서는 139 예 중에서 134예(96.4%)의 결과가 일치하였다($k=0.885$, $p<0.001$). 불일치를 보인 5예 중 2예는 한 명의 병리의사는 음성, 다른 병리의사는 불확실로 판독하였고, 나머지 2예는 그 반대의 경우였다. 또한 5예 중 1예는 한 명의 병리의사는 양성 다른 병리의사는 음성으로 판독하였지만 함께 다안현미경으로 여러 부위를 검색하여 최종적으로 양성으로 간주하였다. 이 증례의 최종 SISH ratio는 8.4였다.

고 찰

HER2 IHC와 FISH 결과의 높은 일치율을 보고한 연구들⁷⁻¹⁰이 있음에도 불구하고 통상적으로 환자의 유방암 조직에서 HER2 상태 측정은 단백 발현을 관찰하는 IHC보다 유전자증폭을 직접 관찰하는 FISH가 좀 더 나은 방법으로 여겨져 왔다. 가장 큰 이유는 IHC 결과가 조직 고정액의 종류, 고정 시간, 항원 노출 방법, 사용한 일차항체의 종류에 따라 영향을 받으며 결과 판독도 주관적일 수 있기 때문에 실험실 간 또는 검사자 간 결과의 차이가 크기 때문이다.¹¹ Bartlett 등¹²은 숙련된 병리의사 간 결과 일치도에 있어 HER2 IHC에서의 k계수가 0.67 (Herceptest)과 0.74 (CB11)인 반면 FISH에서는 0.97이라고 하여 IHC 판독이 더 주관적이라고 하였다. 저자들은 HER2 IHC와 FISH를 자동화 장비로 시행하고 ASCO/CAP 기준에 따라 결과를 판독하여 두 검사 간 95.1%의 결과 일치율을 얻었는데, IHC에서 불확실 결과를 보인 증례를 제외하면 일치율은 97.8%나 된다. 저자들과 동일한 일차항체(4B5)를 사용하여 IHC와 FISH 결과를 비교한 연구¹³에서도 97.8%의 결과 일치율을 보고하고 있어 IHC도 잘 시행한다면 FISH와 같이 높은 결과 일치율을 얻을 수 있다고 생각한다.

FISH는 결과가 좀 더 객관적이고 증폭 정도를 정량화할 수 있다는 장점이 있지만 검사에 사용되는 시약이 매우 비싸고 또 결과 판독을 위해서는 고가의 형광현미경과 필터가 필요하며 형광 신호가 급속히 퇴색한다는 단점을 가지고 있다. 이에 비해 CISH는 IHC 방법과 유사한 peroxidase 반응을 통해 비형광성 탐식자의 반응을 광학현미경하에서 관찰하는 방법으로 FISH에 비해 형태를 구분하기가 쉽고 발색반응 결과가 오래 지속되는 장점이 있지만 상대적으로 민감도가 낮고 광학현미경으로 관찰할 정도의 충분한 발색반응을 얻기 어려운 점이 지적되기도 하였다.¹⁴ 그러나 ASCO/CAP는 잘 인증된 검사를 시행한다면 HER2 표적 치료제의 이점을 예측하는데 IHC나 ISH 중 어느 검사가 더 우위라고 볼 수 없다고 하였으며, HER2 검사를 위한 검체 취급, 결과판정 제외기준 및 판독기준에 대한 지침서를 발표하였다.⁴

저자들은 침윤성 유방암 조직에서 HER2 상태 측정을 위한 새로운 검사법인 SISH의 유용성을 알아보기 위해 자동화장비를 이용한 SISH 검사 결과를 IHC, FISH 결과와 각각 비교해 보았다. SISH는 IHC와는 95.7%, FISH와는 97.8%의 결과 일치율을 보였고, IHC와 FISH에서 불확실한 결과(2+ 또는 equivocal)를 보인 증례를 제외하면 IHC 및 FISH와의 결과 일치율은 각각 98.5%와 99.3%로 나타났다. 또 HER2 증폭이 있는 경우 SISH ratio가 FISH ratio에 비해 다소 높게 측정되었는데 SISH는 제조사가 제공한 판독 지침에 따라 작은 군집(cluster)은 형광신호 6개, 큰 군집은 12개로 헤아린 반면 FISH는 형광신호가 뭉친 경우 SISH만큼 선명하게 분리하는 것이 쉽지 않아 형광신호 수가 다소 낮게 측정된 결과라고 생각한다. 그 한 예가 FISH는 음성이나 SISH에서는 양성으로 판독된 것이다. 즉

HER2 형광신호가 증폭되어 있었음에도 불구하고 FISH에서 음성으로 나타난 이유는 CEP17 형광신호가 무수히 많이 관찰되어 FISH ratio가 1.2 (HER2/CEP17=23.3/20)로 나타났기 때문이다. 저자들은 CEP17 신호가 반응 후 붕괴되어 과편으로 나타났거나 배경의 찌꺼기가 교묘하게 종양세포에 겹쳐져 판독에 혼란을 준 것으로 생각하였으나, SISH에서는 Chr17 신호가 세포당 평균 2.8개였으며, SISH ratio가 9.8로 나타남으로써 양성으로 판독하였다. SISH와 상이한 결과를 보인 원인으로 Troxell 등¹⁵이 보고한 염색체 17 centromere locus의 증폭을 고려해 볼 수 있다. 통상적으로 세포당 CEP17 신호가 3개 이상이면 염색체 17 polysomy로 간주하였으나, Troxell 등¹⁵은 CEP17 외에 SMS (Smith-Magenis syndrome critical region), RARA (retinoic acid receptor) 등을 17번 염색체의 control probe로 함께 사용하여, 염색체 17 polysomy가 아닌 CEP17 부착 부위 (centromere locus)에 증폭이 있는 증례들을 보고하였다. 염색체 17 centromere locus 증폭은 HER2 증폭과 동반될 수도 있고 동반 안 될 수도 있으며, HER2 증폭이 있더라도 FISH ratio가 정상 범주에 들기 때문에 FISH 결과 해석에 주의를 필요로 하며, 반드시 HER2 IHC 결과와 비교해야 한다. 저자들은 IHC 결과(3+)를 고려하여 최종적으로는 HER2 증폭이 있는 것으로 판단하였지만, 이런 경우 FISH만 시행했다면 FISH ratio에 따라 음성으로 분류되어 표적치료 대상에서 제외될 가능성도 있다. 또 SISH에서 Chr17 신호가 FISH CEP17과 달리 약 2.8개로 적게 관찰된 것은 발색신호가 덩어리로 합쳐졌거나 SISH에서 사용한 Chr17 probe 부착 부위가 FISH의 CEP17 부착 부위와 일치하지 않기 때문으로 생각한다.

새로운 검사는 이전의 인증된 검사와 비교했을 때 95% 이상의 결과 일치율을 보여야 한다는 ASCO/CAP 기준에 따르면 저자들의 결과는 SISH가 한국인 유방암 환자에서 HER2 유전자 증폭을 검사하는데 있어 FISH의 대체 검사가 될 수 있음을 보여 주는 것이다. 또한 SISH가 FISH 또는 CISH와 95% 이상의 결과 일치율을 보인다는 것은 외국에서 시행한 여러 연구들에서도 찾아볼 수 있다.^{5,6,13}

SISH는 FISH에 비해 조직 형태를 알아보기 쉽고, 검사방법이 자동화되어 있어 검사에 소요되는 시간이 FISH나 CISH에 비해 짧기 때문에 당일 검사 및 판독이 가능하고 검사 결과의 일관성을 유지할 수 있다는 장점이 있다. 저자들이 직접 시행해 보니 HER2 유전자와 chr17에 대한 반응을 각각 다른 슬라이드에서 관찰해야 하는 불편함이 있었는데, 최근 각 탐식자에게 반응하는 발색을 달리 해서 FISH와 마찬가지로 한 장의 슬라이드에서 두 반응을 동시에 관찰할 수 있도록 하는 방법이 개발되었다.

SISH 검사과정의 자동화는 SISH 제조사에서 생산한 자동화 면역염색기(Benchmark® XT, Ventana Medical Systems)를 필요로 하기 때문에 비용 면에서 단점으로 작용한다. 또한 SISH 제조사의 자동화 면역염색기를 이미 사용하고 있는 기관에서는 바로 SISH 검사를 시행할 수 있지만, 이 또한 국내에서는 소수

기관에 한정되어 있다. 그러나 SISH는 광학현미경으로 결과 판독이 가능하고 실온에서 발색신호가 오랫동안 보존된다는 장점 때문에 결과가 애매한 증례는 다른 기관으로 슬라이드를 보내 자문을 구하기 쉽고 판독 오류를 줄일 수 있다.

저자들은 판독자 간 SISH 결과의 일치도를 알아보았는데 한 명의 병리의사는 FISH 판독의 경험자였고 다른 한 명의 병리의사는 FISH 판독 경험이 전혀 없는 병리의사였음에도 판독자 사이의 결과 일치율은 96.4% ($k=0.885$, $p<0.001$)로 나타나 Dietel 등⁶의 결과(94.4~95.2%, $k=0.767$)보다 조금 높았다. 따라서 SISH의 결과 판독은 FISH 판독 경험과 관련 없이 시행하여도 검사자 간 매우 높은 결과 일치율을 얻을 수 있었다.

결론적으로 저자들이 유방암을 대상으로 HER2 유전자 상태를 평가하기 위한 새로운 검사법인 SISH를 IHC 및 FISH 결과와 비교해 본 결과, IHC 및 FISH 결과와 각각 95.7%와 97.8%의 일치율을 보였고 판독자 간 결과 일치율도 96.4%로 높게 나타나 SISH는 HER2 유전자 증폭을 검사하는데 FISH의 대체 검사법이 될 수 있다고 생각한다. 또한 SISH는 FISH에 비해 검사 소요 시간이 짧고 광학현미경에서 관찰이 가능하다는 점 등의 장점이 있으므로 외과 병리 영역에서 유용성이 높을 것으로 생각한다.

참고문헌

- 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: 177-82.
- Harris L, Fritsche H, Mennel R, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 5287-312.
- Practice Recommendations of Breast Cancer 2008 [Internet]. Seoul: Korean Breast Cancer Society, c2009 [cited 2009 Jun 22]. Available from: <http://www.kbcs.or.kr>.
- Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 118-45.
- Francis GD, Jones MA, Beadle GF, Stein SR. Bright-field *in situ* hybridization for HER2 gene amplification in breast cancer using tissue microarrays: correlation between chromogenic (CISH) and automated silver-enhanced (SISH) methods with patient outcome. *Diagn Mol Pathol* 2009; 18: 88-95.
- Dietel M, Ellis IO, Höfler H, et al. Comparison of automated silver enhanced *in situ* hybridisation (SISH) and fluorescence ISH (FISH) for the validation of HER2 gene status in breast carcinoma according to the guidelines of the American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists. *Virchows Arch* 2007; 451: 19-25.
- Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ. Comparison of fluorescence *in situ* hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1974-82.
- Pauletti G, Dandekar S, Rong H, 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: 3651-64.
- Owens MA, Horten BC, Da Silva MM. HER2 amplification ratios by fluorescence *in situ* hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. *Clin Breast Cancer* 2004; 5: 63-9.
- Yaziji H, Goldstein LC, Barry TS, et al. HER-2 testing in breast cancer using parallel tissue-based methods. *JAMA* 2004; 291: 1972-7.
- Sauter G, Lee J, Bartlett JM, Slamon DJ, Press MF. Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1323-33.
- Bartlett JM, Going JJ, Mallon EA, et al. Evaluating HER2 amplification and overexpression in breast cancer. *J Pathol* 2001; 195: 422-8.
- Carbone A, Botti G, Gloghini A, et al. Delineation of HER2 gene status in breast carcinoma by silver *in situ* hybridization is reproducible among laboratories and pathologists. *J Mol Diagn* 2008; 10: 527-36.
- Kim JY, Choi KU, Jung YJ, Kwak HS, Bae YT. Chromogenic *in situ* hybridization analysis to determine HER-2/neu status in breast carcinoma. *J Korean Surg Soc* 2004; 66: 447-53.
- Troxell ML, Bangs CD, Lawce HJ, et al. Evaluation of Her-2/neu status in carcinomas with amplified chromosome 17 centromere locus. *Am J Clin Pathol* 2006; 126: 709-16.