

위암암종에서 *HER2* 유전자의 변이 빈도: 면역조직화학염색과 자동화 은제자리부합법 및 형광제자리부합법과의 비교

김애리 · 배정민¹ · 김세원¹
구미진² · 배영경

영남대학교 의과대학 병리학교실 및
¹외과학교실, ²대구파티마병원 병리과

HER2 Status in Gastric Adenocarcinomas Assessed by Immunohistochemistry, Automated Silver-Enhanced *In Situ* Hybridization and Fluorescence *In Situ* Hybridization

Aeri Kim · Jung Min Bae¹ · Se Won Kim¹ · Mi Jin Gu² · Young Kyung Bae

Departments of Pathology and ¹Surgery, Yeungnam University College of Medicine; ²Department of Pathology, Daegu Fatima Hospital, Daegu, Korea

Background : Recently, many studies have focused on human epidermal growth factor receptor 2 (*HER2*) status in gastric cancer due to *HER2*-targeted therapy using trastuzumab. We investigated *HER2* overexpression and amplification and their concordance rate in Korean gastric adenocarcinomas. **Methods :** Tissue microarrays were constructed with 232 gastric adenocarcinoma samples. We performed immunohistochemistry (IHC), silver-enhanced *in situ* hybridization (SISH) and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for *HER2*. **Results :** IHC was negative in 94.8% (218/232), equivocal in 1.7% (4/232) and positive in 3.5% (8/232) of cases. *HER2* protein expression was heterogeneous in 75% (9/12) of IHC 2+/3+ cancers. Gene amplification was observed in 6.5% (15/230) by SISH and the same 15 cases were also FISH-positive. We observed *HER2* amplification in 1.4%, 27.3%, 25%, and 100% of IHC 0, 1+, 2+, and 3+ gastric adenocarcinomas, respectively. The concordance rate between IHC and SISH results was 95.7%. **Conclusions :** *HER2* overexpression and amplification were less frequent in gastric adenocarcinomas than breast carcinomas. Compared to breast carcinoma, (1) there may be IHC-negative but gene amplification-positive cases for *HER2* and (2) frequent intratumoral heterogeneity of IHC for *HER2* in gastric adenocarcinomas.

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

접 수 : 2010년 5월 13일
게재승인 : 2010년 7월 5일

책임저자 : 배 영 경
우 705-717 대구시 남구 대명5동 317-1
영남대학교 의과대학 병리학교실
전화: +82-53-620-3336
Fax: +82-53-622-8432
E-mail: ykbae@ynu.ac.kr

*본 연구는 2009학년도 영남대학교 학술연구
구조성비에 의한 것임.

위암은 우리나라에서 가장 흔히 발생하는 암으로, 2006-2007년 동안 암으로 진단받은 환자들을 대상으로 발생률을 조사한 결과, 남자의 경우 전체 암 발생 중 1위를 차지하였고 여자에서는 3위를 차지하였다.¹ 이러한 위암의 5년 생존율은 꾸준히 증가하고 있지만, 2003-2007년 동안 진단받은 위암 환자의 5년 생존율은 약 61.2%로 초기에 발견된 조기 위암은 비교적 예후가 좋으나, 진행성 위암은 항암화학요법이나 방사선 치료를 시행한다 하더라도 예후가 좋지 않았다. 또한 2007년 암으로 인한 전체 사망 가운데 위암의 연령표준화 사망률이 남자는 3위, 여자는 2위였다.^{1,2}

Human epidermal growth factor receptor 2 (*HER2*)는 침윤성 유방암에서 중요한 예후인자인 동시에 예측인자이며, 유방

암의 20-25%에서 유전자 증폭이 관찰되고 그 결과 *HER2* 단백질 과발현이 나타난다.³ *HER2* 유전자의 증폭 또는 과발현이 있는 유방암 환자는 나쁜 예후를 나타내지만, *HER2* 단백질에 대한 단클론 항체인 trastuzumab (Herceptin®, Genentech, South San Francisco, CA, USA)을 이용한 표적치료의 대상이 된다.⁴

이러한 *HER2* 유전자의 증폭 또는 과발현은 유방암 외에도 난소암, 전립샘암, 대장암, 췌장암, 위암 등에서도 보고되고 있는데,^{3,5-8} 최근 *HER2* 양성인 진행성 위암 환자에게 trastuzumab을 기존 항암제(5-fluorouracil 또는 capecitabine과 cisplatin)와 병용 투여하였더니 기존 항암제만 투여한 군보다 환자의 생존 기간이 유의하게 증가하였다는 다기관 임상 3상 연구(ToGA trial) 결과가 발표됨으로써, *HER2*의 상태가 유방암 뿐만 아니

라 위암에서도 중요한 치료 예측인자가 되고 있다.^{8,9}

환자의 조직에서 *HER2* 유전자의 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. 위암에서는 주로 IHC를 이용한 연구가 이루어졌는데, *HER2* 단백 과발현율은 연구자마다 매우 다양하게 보고되고 있다.^{9,10} 국내에서 시행한 연구에서 위암의 *HER2* 과발현(IHC 2+/3+) 빈도는 15.9%와 22.6%였으며, 유전자 증폭은 3.8%와 7.7%에서 관찰되었다.^{11,12}

이에 저자들은 최근 국내에서 trastuzumab을 *HER2* 양성인 진행성 위암 환자에게 사용하는 것이 승인됨에 따라 조만간 모든 진행성 위암을 대상으로 *HER2* 유전자 검사가 시행될 가능성이 있다고 판단하였다. 따라서 이제까지 유방암에서 *HER2* 유전자 검사를 시행했던 경험을 바탕으로 위암 조직을 대상으로 IHC, FISH, 그리고 유전자 증폭을 검사하는 새로운 방법인 은제자리부합법(silver-enhanced *in situ* hybridization, SISH)을 이용하여 *HER2* 과발현 및 유전자 증폭의 빈도를 조사하여 보았다. 그리고 현재 유방암에 적용하고 있는 *HER2* 검사의 흐름도¹³가 위암에서도 적용가능한지, 또한 유방암에서와 마찬가지로 SISH가 유전자 증폭을 관찰하는 데 FISH를 대체할 수 있는 검사법¹⁴⁻¹⁶이 될 수 있는지에 대해서도 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

연구 대상

2000년 1월부터 12월까지 일 년 동안 영남대학교 의과대학 부속병원과 대구 파티마병원에서 위암으로 진단받고 근처적 절제술을 시행한 232명의 환자 조직을 이용하여 연구를 수행하였으며, 연구 대상 환자의 임상병리학적 특성은 Table 1에 정리하였다.

환자의 조직은 10% 중성 포르말린에 고정된 후 파라핀에 포매된 조직으로 통상적인 병리조직검사가 끝난 뒤 병리과에 보관되어 있던 검체를 이용하였으며, 각 환자당 병변의 대표 파라핀 블록 1개와 림프절 전이가 있는 경우는 림프절 블록 1개를 선정하여 조직배열블록(tissue microarray, TMA)을 제작하였다. Quick-Ray™ (Unitma, Seoul, Korea) 기구를 이용하여 증례당 직경 2 mm 조직 3개를 파내 새로운 파라핀 블록에 심었으며, 림프절 전이가 있는 경우는 병변에서 2개, 림프절에서 1개의 조직을 얻었다. 결과적으로 232명의 환자 조직에서 총 13개의 TMA 블록을 제작하였으며, 각 블록에서 4 μ m 두께의 연속 절편을 얻어 hematoxylin & eosin, IHC, SISH를 시행하였고 FISH는 2 μ m 두께의 조직 절편을 사용하였다.

Table 1. Case characteristics

Factors	Characteristics	Total
Median age (yr)	59 (28-83)	232 (100)
Gender	Male	147 (63.4)
	Female	85 (36.6)
Tumor location	Upper	12 (5.2)
	Middle	84 (36.2)
	Lower	135 (58.2)
	Whole stomach	1 (0.4)
Histology	Well differentiated	36 (15.7)
	Moderately differentiated	79 (34.3)
	Poorly differentiated	72 (31.3)
	Signet ring cell	38 (16.5)
	Mucinous	5 (2.2)
pT classification	pT1	112 (48.3)
	pT2	81 (34.9)
	pT3	34 (14.7)
	pT4	5 (2.2)
Lauren classification	Intestinal	31 (26.1)
	Diffuse	48 (40.3)
	Mixed	40 (33.6)
Lymph node metastasis	Present	104 (45)
	Absent	127 (55)

Values are presented as number (%).

면역조직화학염색

HER2 면역염색은 PATHWAY® anti-*HER2*/neu (4B5) rabbit monoclonal antibody (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA)와 UltraView™ Universal DAB detection kit (Ventana Medical Systems)를 이용하여 자동화 면역염색기(Benchmark® XT, Ventana Medical Systems)로 시행하였다. 이때 양성 및 음성 대조군으로 IHC 0과 3+로 판독된 유방암 조직을 각 슬라이드마다 부착하여 염색을 시행하였다.

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. 그리고 발색 반응을 위해서는 rabbit anti-DNP primary antibody와 ultraView™ SISH detection kit (Ventana Medical Systems)를 이용하였다.

한편 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 증례당 약 20개의 암세포에서 나타나는 발색 신호를 세었다.

형광제자리부합법

FISH는 PathVysion® *HER2* DNA probe kit (Abbott/Vysis, Abott Park, IL, USA)를 이용하여 자동화장비(Discovery®, Ventana Medical Systems)로 시행하였다. 각 검사 단계를 간략하게 정리하면 다음과 같다. 즉 2 μm 두께의 조직 절편을 EZ Prep™ (Ventana Medical Systems)을 이용하여 탈과라핀한 후, RiboMap® kit (Ventana Medical Systems)의 RiboPrep™ reagent를 37°C에서 32분간 그리고 RiboClear™ reagent를 37°C에서 16분간 전처리하고, 37°C에서 40분간 protease 3 (Ventana Medical Systems)와 반응시켰다. 그 후 20 μL 의 PathVysion® LSI *HER2*/CEP probe를 적용시킨 뒤 커버슬립을 덮고 75°C에서 6분간 변성시킨 다음 37°C에서 12시간 유지하여 부합 반응을 시켰다. 또 커버슬립을 제거하고 Ribo-Wash™ bulk reagent (Ventana Medical Systems)로 세척한 후, RiboMap® kit의 RiboFix™ reagent로 고정을 한 다음 말렸으며, 20 μL 의 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)로 핵막염색을 한 다음 관독할 때까지 슬라이드는 -20°C에서 보관하였다. 그리고 결과 관독을 위해 형광현미경 1,000배 시야에서 DAPI/Spectrum Green/Orange에 대한 단 필터와 삼중 필터를 이용해 각 증례당 약 20개의 암세포에서 형광신호를 세었다.

관독 기준

검사 결과 관독은 다른 검사 결과를 모르는 상태에서 한 명의 병리의사가 관독하였다. 이때 SISH와 FISH는 적어도 20개의 암세포를 관찰하였고, 종양의 불균질성(tumor heterogeneity)이 있다고 판단되면 형광 또는 발색 신호가 높은 곳에서 관찰하였다. IHC와 FISH의 결과 관독은 American Society of Clinical Oncology (ASCO)/College of American Pathologists (CAP) 기준¹³에 따랐으며, 이는 Table 2에 기술하였다. 단, IHC의 경우 조직배열블록을 만들어 연구를 시행하였기 때문에 종양의 30% 미만에서 강양성을 보이더라도 3+로 관독하였으며, Hofmann 등¹⁷이 제시한 관독기준을 참조하여 샘 구조의 내강 쪽이 염색이 안 되더라도 나머지 세포막이 강양성으로 염색된 경우는 3+로 관독하였다. SISH 결과 관독은 제조사인 Ventana Medical Systems (<http://www.her2sish.com/training.php>)

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 ^a
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 ^b > 2.2
Equivocal	FISH ratio 1.8-2.2
Negative	FISH ratio < 1.8
SISH ^c	
Positive	<i>HER2</i> gene copy > 6.0 or <i>HER2</i> /Chr17 > 2.2
Equivocal	<i>HER2</i> gene copy 4.0-6.0 or <i>HER2</i> /Chr17 1.8-2.2
Negative	<i>HER2</i> gene copy < 4.0 or <i>HER2</i> /Chr17 < 1.8

^aBasolateral membranous immunoreactivity of glandular cells was considered to be same as complete membranous staining according to the consensus panel recommendations on *HER2* scoring for gastric cancer¹⁷; ^bFISH ratio means *HER2* gene signals to chromosome 17 signals; ^cThis is manufacturer's guideline.

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

에서 제공하는 온라인 교육을 이수하고 제조사가 제시하는 기준에 따라 관독하였는데, 이는 Table 2에 기술하였다. 또한 마지막으로 IHC와 SISH 그리고 SISH와 FISH 간 결과 일치율을 조사하였다.

통계 분석

HER2 상태와 임상병리학적 인자들과의 관련성은 윈도우용 SPSS ver. 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여 카이제곱검정으로 유의성을 평가하였다. 이때 p값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

면역조직화학염색에 의한 *HER2* 단백질 발현

연구 결과 232예 중 230예에서 결과를 얻을 수 있었는데, 정상 위점막 조직의 점액분비세포와 일부 종양세포의 세포질이 염색된 것이 관찰되었다. 그러나 결과관독은 종양세포의 세포막을 따라 염색된 부위에서만 시행하였다. 그 결과 230예 중 207예(90%)가 0, 11예(4.8%)가 1+, 4예(1.7%)가 2+ 그리고 8예(3.5%)가 3+로 관독되었다. IHC에서 2+ 또는 3+로 관독되었

Table 3. Results of immunohistochemistry (IHC), silver-enhanced *in situ* hybridization (SISH) and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for 18 cases with IHC 2+/3+ or human epidermal growth factor receptor 2 (*HER2*) gene amplification

Case No.	IHC			SISH	FISH	SISH/FISH ratios
	Core 1	Core 2	Core 3			
35	3+	2+	3+ (LN)	Amp	Amp	4.6/4.7
67	0	2+	1+	Amp	Amp	7.2/13.9
120	NA	1+	3+	Amp	Amp	5.8/6.1
145	3+	3+	3+	Amp	Amp	9.5/14.7
179	3+	3+	3+	Amp	Amp	12.9/15.2
182	1+	1+	2+	No amp	No amp	1.7/1.7
193	2+	2+	0	No amp	No amp	1.5*/1.2
206	3+	3+	2+ (LN)	Amp	Amp	10.7/12.5
210	2+	2+	1+	Equivocal	No amp	1.9*/1.7
225	0	0	3+ (LN)	Amp	Amp	11.3/18
227	3+	3+	3+	Amp	Amp	13.5/15.8
228	0	0	3+ (LN)	Amp	Amp	10.7/11.5
49	0	0	0 (LN)	Amp	Amp	3.6/3.0
50	1+	0	0	Amp	Amp	9.9/8.6
92	NA	0	0	Amp	Amp	2.7/2.5
95	1+	1+	1+	Amp	Amp	4.8/4.2
143	0	0	0 (LN)	Amp	Amp	3.8/2.9
209	1+	0	1+ (LN)	Amp	Amp	2.3/2.5

*Polysomy.

NA, not available; LN, lymph node; Amp, amplification.

던 12예 가운데 3예에서만 중앙세포 전체에 걸쳐 균질한 염색 양상이 관찰되었고, 2예는 원발 중앙은 음성이었지만 림프절로 전이된 중앙세포가 양성을 나타내었다(Table 3, Fig. 1).

SISH로 관찰한 *HER2* 유전자 증폭

SISH를 이용하여 *HER2* 유전자의 증폭 유무를 검사한 결과, 232예 위암 환자 조직 중 230예에서 결과를 얻을 수 있었는데, 그 결과 213예(92.6%)는 음성이었으며, 2예(0.9%)는 불확실(equivocal)하였고 15예(6.5%)에서는 유전자 증폭이 관찰되었다. *HER2* 유전자 증폭은 IHC 0인 군의 1.4% (3/207), 1+군의 27.3% (3/11), 2+군의 25% (1/4), 그리고 3+군의 100% (8/8)에서 관찰되었다(Table 4). 한편 유전자 증폭이 관찰된 15예 가운데 IHC 0/1+인 증례의 SISH ratio는 2.3-9.9였고, IHC 2+/3+인 증례의 SISH ratio는 4.6-13.5였다. 또한 7예에서 못염색체(polysomy)가 관찰되었는데, 이 중 1예는 불확실(SISH ratio, 1.9)하였고 6예는 음성으로 판독된 증례였다. 못염색체로 나타난 7예의 IHC 결과는 2예가 0, 4예가 1+, 그리고 나머지 1예가 2+였다. SISH 결과를 IHC 결과와 비교하였을 때 결과 일치율(concordance rate)은 95.7% (220/230)였으며, IHC에서 2+인 증례를 제외하고 음성 또는 양성인 증례만을 대상으로 하였을 때 IHC와 SISH의 결과 일치율은 96.9% (219/226)였다.

Table 4. Comparison between immunohistochemistry (IHC) and silver-enhanced *in situ* hybridization (SISH) results for human epidermal growth factor receptor 2 status

IHC	SISH			Total
	Negative	Equivocal	Positive	
Negative (0)	203	1	3	207 (90)
(1+)	8	0	3	11 (4.8)
Equivocal (2+)	2	1	1	4 (1.7)
Positive (3+)	0	0	8	8 (3.5)
Total	213 (92.6)	2 (0.9)	15 (6.5)	230 (100)

Values are presented as number (%).

FISH와 SISH 결과의 비교

FISH는 IHC 2+/3+인 증례와 SISH에서 유전자 증폭이 관찰된 IHC 0/1+ 증례에서만 시행하였다. 그 결과 22예에서 FISH를 시행하였으며, 15예에서 *HER2* 유전자 증폭이 관찰되었는데 이들은 SISH에서도 증폭이 관찰된 예였다(Fig. 2). 한편 SISH에서 불확실(SISH ratio, 1.9)로 판독되었던 1예가 FISH에서 음성(FISH ratio, 1.7)으로 나온 것 외에 나머지 21예의 결과는 SISH 결과와 일치하였다(Table 3). SISH 결과를 FISH 결과와 비교하였을 때 결과 일치율은 95.5% (21/22)였다.

HER2 상태와 임상병리학적 인자들과의 관련성

HER2 단백 발현과 유전자 증폭 유무에 따른 임상 병리학적 인자들 - 성별, 중앙의 위치, 조직학적 분화도, 침윤의 깊이, Lauren 분류, 림프절 전이 상태 - 과의 관련성을 살펴보았을 때 *HER2* 단백 발현(IHC 2+/3+)은 Lauren 분류의 장형(intestinal type)에서 유의하게 높았다($p=0.04$). 또한 SISH로 측정된 *HER2* 유전자의 증폭은 고분화 샘암종에서 유의하게 높게 관찰되었으며($p=0.005$), 장형에서 미만형이나 혼합형보다 높았으나 통계학적으로 유의한 차이는 아니었다(Table 5). 조기위암과 진행성 위암으로 나누어 *HER2* 단백 발현과 유전자 증폭의 빈도를 조사하였을 때 두 군 사이의 차이는 없었다($p>0.05$).

고 찰

1986년에 처음으로 위암에서 *HER2* 유전자 증폭과 단백 과발현이 보고되었고,^{18,19} 이후 많은 연구자들이 위암을 대상으로 연구를 시행하여 다양한 빈도의 *HER2* 단백 과발현(6-53.4%)과 유전자 증폭(16-27%)을 보고하였다.^{8,10} 최근 위암을 대상으로 시행한 전향적 임상 3상 연구(ToGA trial)에서 *HER2* 양성 유방암 환자에게 표적치료 약물로 사용하던 trastuzumab을 *HER2* 양성(IHC 3+ 또는 FISH 양성)인 위암 환자에게 기존에 사용하던 항암제와 함께 투여했을 때 기존 항암제만 투여한 환자에

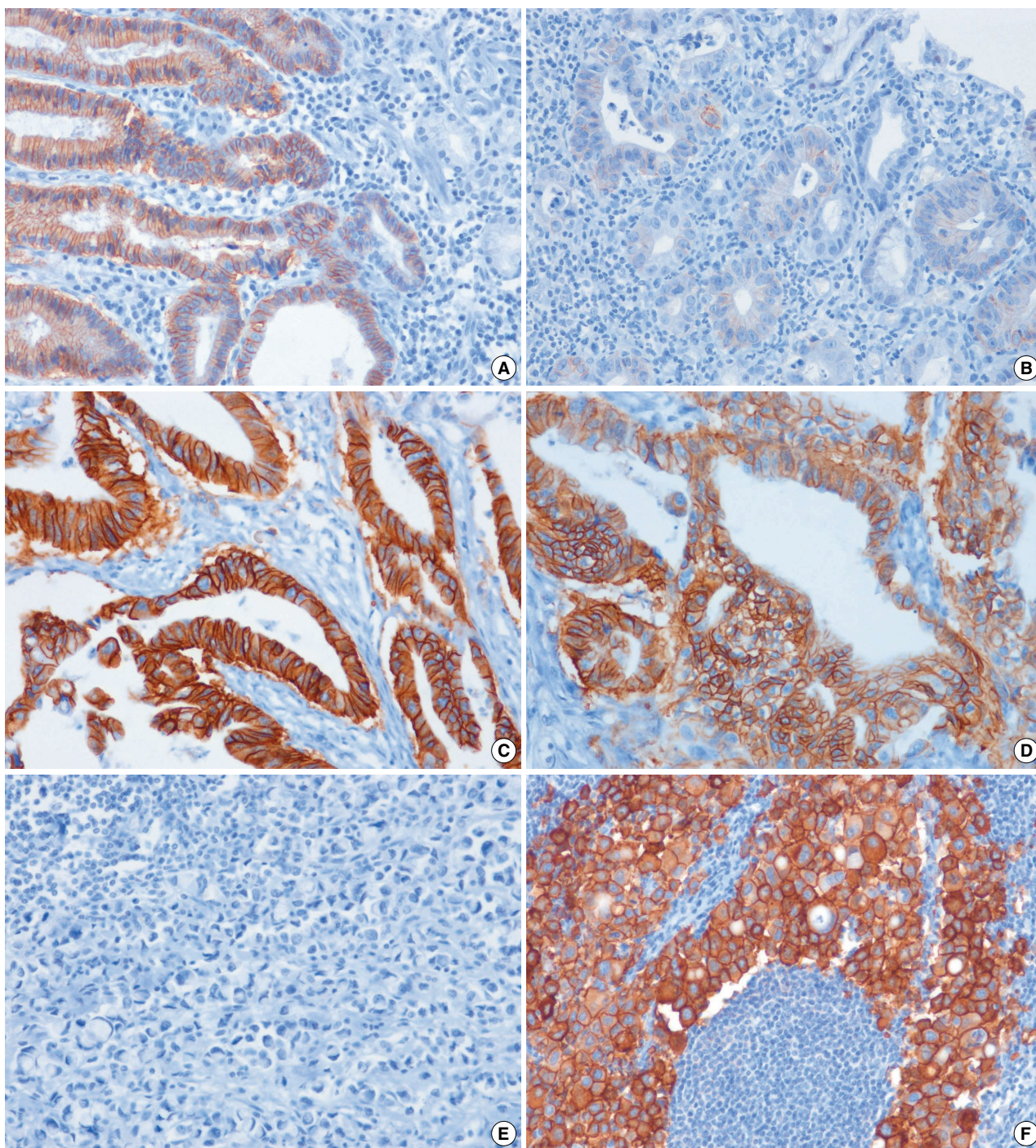


Fig. 1. Representative immunohistochemistry (IHC) results for human epidermal growth factor receptor 2 (*HER2*) in gastric cancer. Case 120 shows heterogeneous *HER2* staining within the tumor. One tissue microarray core exhibits 3+ (A) and another core exhibits 1+ on IHC (B). Case 179 shows homogeneous staining results in different cores (C, D). Case 228 shows negative IHC result in primary gastric cancer (E), but positive staining in a metastatic tumor of a regional lymph node (F).

비해 생존율이 유의하게 증가(13.5개월 vs 11.1개월, $p=0.0048$) 하였다는 중간 연구결과 발표가 있었고,⁹ 이에 따라 *HER2*가 위암에서 최초의 표적물질로 인식되었으며, 위암 조직에서 *HER2* 유전자 상태 측정이 매우 중요한 과제가 되었다.

국내에서 시행한 연구에서는 *HER2* 과발현(2+ 또는 3+) 빈도를 15.9%와 22.6%로 보고하였으나, 유방암에서처럼 IHC 3+만 *HER2* 양성으로 본다면 위암의 *HER2* 발현 양성률은 각각 6%와 4%에 불과하다.^{11,12} 또한 이들 연구에서 FISH를 이용한

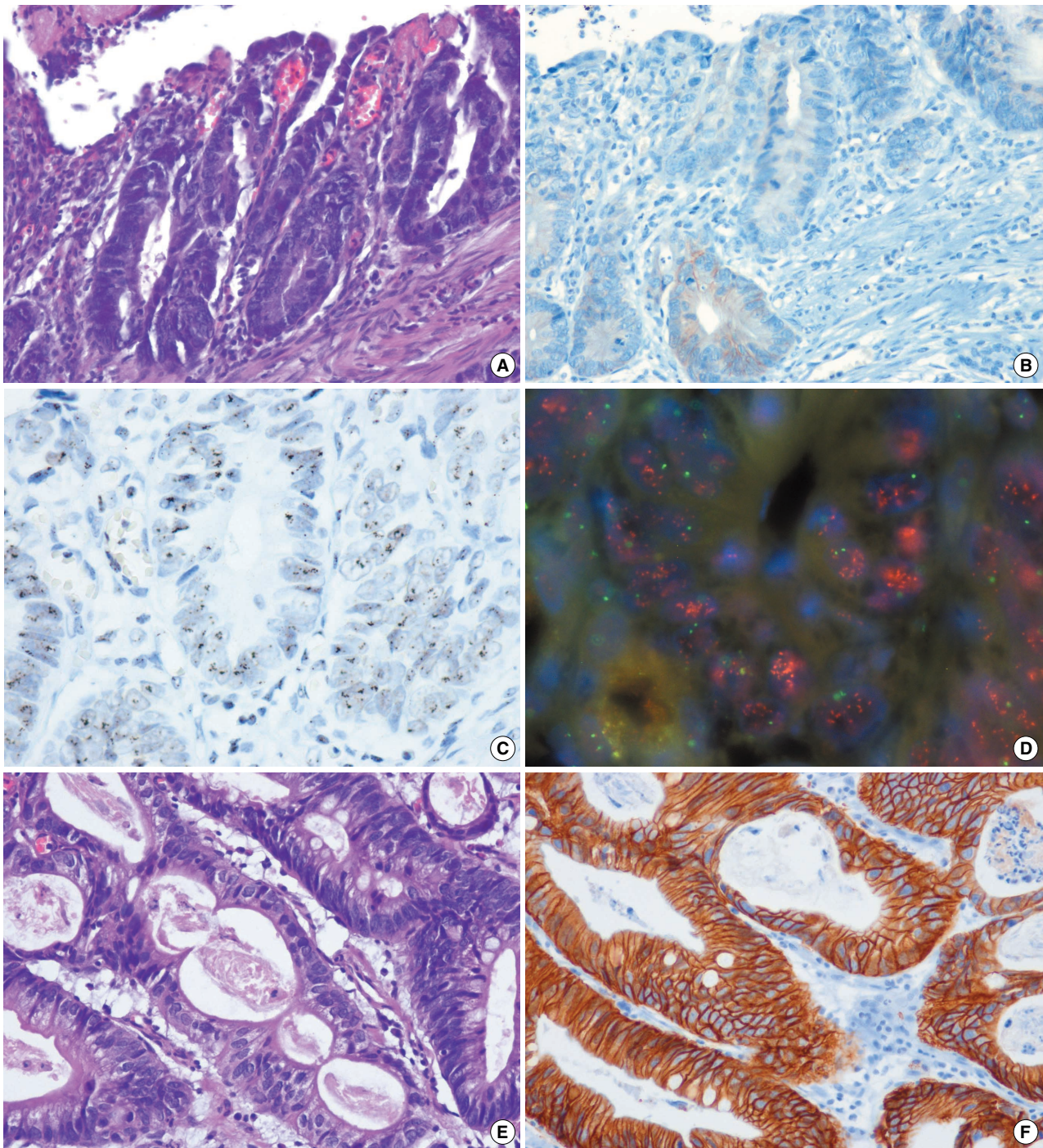


Fig. 2. Comparison between immunohistochemistry (IHC), silver-enhanced *in situ* hybridization (SISH) and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) results. Case 67, a well differentiated tubular adenocarcinoma (A), is negative (IHC 0/1+) for human epidermal growth factor receptor 2 (*HER2*) in two of three cores (B). (C) SISH show clusters of *HER2* signals in tumor cells. (D) Positive FISH result with clusters of *HER2* signals and one or two chr17 signals per tumor cell. Case 145 (E) shows homogeneous 3+ staining for *HER2* IHC (F) (*Continued to the next page*)

HER2 유전자 증폭은 각각 3.8%와 7.7%로 나타났는데,^{11,12} 본 연구에서도 IHC 3+ 및 SISH에 의한 유전자 증폭은 연구 대상 증례의 3.5%와 6.5%에서 관찰되어 국내 연구와 유사한 결과를

보여주었다.

Kim 등¹²은 저자들과 마찬가지로 TMA를 제작하여 연구를 시행하였는데, 사용한 항체가 서로 다르고(A0485 vs 4B5) IHC

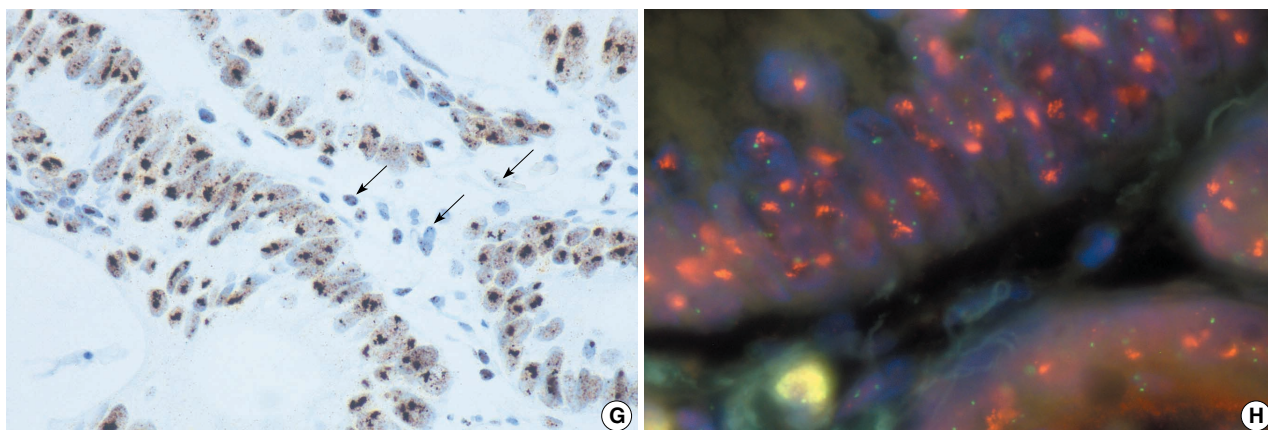


Fig. 2. (Continued from the previous page) and positive SISH (G) and FISH (H) results. The non-neoplastic stromal cells have two signals for *HER2* (arrows).

Table 5. Clinicopathological findings according to human epidermal growth factor receptor 2 (*HER2*) protein expression and gene amplification

	<i>HER2</i> protein expression		p-value	<i>HER2</i> amplification		p-value
	0/1+ (%) (n = 218)	2+/3+ (%) (n = 12)		No (%) (n = 215)	Yes (%) (n = 15)	
Gender			NS			NS
Male	138 (63.3)	7 (58.3)		136 (63.3)	9 (60)	
Female	80 (36.7)	5 (41.7)		79 (36.7)	6 (40)	
Tumor location			NS			NS
Upper	11 (5)	0 (0)		9 (4.2)	2 (13.3)	
Middle	80 (36.7)	4 (33.3)		80 (37.2)	4 (26.7)	
Lower	126 (57.8)	8 (66.7)		125 (58.1)	9 (60)	
Whole	1 (0.5)	0 (0)		1 (0.5)	0 (0)	
Histology			NS			0.005
Well	31 (14.4)	4 (33.3)		28 (13.1)	7 (46.7)	
Moderately	75 (34.7)	4 (33.3)		76 (35.7)	3 (20)	
Poorly	71 (32.9)	1 (8.3)		70 (32.9)	2 (13.3)	
SRC/Mucinous	39 (18.1)	3 (25)		39 (18.3)	3 (20)	
pT			NS			NS
pT1	105 (48.2)	6 (50)		104 (48.4)	7 (46.7)	
pT2	74 (33.9)	6 (50)		74 (34.4)	6 (40)	
pT3	34 (15.6)	0 (0)		32 (14.9)	2 (13.3)	
pT4	5 (2.3)	0 (0)		5 (2.3)	0 (0)	
Lauren classification			0.04			NS
Intestinal	26 (23.2)	4 (66.7)		26 (23.6)	4 (50)	
Diffuse	46 (41.1)	2 (33.3)		45 (40.9)	3 (37.5)	
Mixed	40 (35.7)	0 (0)		39 (35.5)	1 (12.5)	
LN metastasis			NS			NS
Present	98 (45.2)	6 (50)		95 (44.4)	9 (60)	
Absent	119 (54.8)	6 (50)		119 (55.6)	6 (40)	

Values are presented as number (%).

NS, not specific; SRC, signet ring cell carcinoma; LN, lymph node.

판독 기준도 Kim 등¹²이 HercepTest 판정 기준을 따른 데 반해 저자들은 ASCO/CAP 기준을 이용하였으며, IHC 3+에 해당하는 염색 강도를 보일 때 TMA라는 점을 감안하여 종양세

포의 비율에 상관없이 양성으로 판독하는 등 약간 차이가 있었다. 이처럼 사용한 항체나 판독기준의 차이가 있음에도 불구하고 IHC 3+와 유전자 증폭 비율이 두 연구에서 비슷하게 나온 것을 보면 *HER2* 양성 위암의 비율은 유방암에 비해 현저히 낮음을 알 수 있었다.

HER2 IHC는 대부분 유방암을 대상으로 시행된 연구이긴 하지만 FISH와 높은 결과 일치율을 보여주었다.²⁰⁻²³ 그러나 일반적으로 조직에서 *HER2* 상태를 측정할 때는 단백 발현을 관찰하는 IHC보다 유전자 증폭을 직접 관찰하는 FISH가 좀 더 나은 방법으로 인식되고 있다. 이러한 인식의 가장 큰 이유는 IHC 결과가 조직 고정액의 종류, 고정 시간, 항원 노출 방법, 사용한 일차 항체의 종류에 따라 영향을 받으며, 결과 판독도 주관적일 수 있기 때문에 실험실 간 또는 검사자 간 결과의 차이가 크기 때문이다.²⁴ 이에 반해 FISH는 결과가 좀 더 객관적이고 증폭 정도를 정량화할 수 있다는 장점이 있지만 검사에 사용되는 시약이 매우 비싸고 결과 판독을 위해서 고가의 형광현미경과 필터가 필요하며, 형광 신호가 급속히 퇴색한다는 단점을 가지고 있다. 반면 SISH는 가장 최근에 개발된 제자리부합법(*in situ* hybridization, ISH)으로 발색 신호를 광학현미경에서 관찰하기 때문에 FISH에 비해 조직 형태를 알아보기 쉽고, 검사방법이 자동화되어 있어 검사에 소요되는 시간이 FISH나 CISH에 비해 짧기 때문에 당일 검사 및 판독이 가능하며 검사 결과의 일관성을 유지할 수 있다는 장점이 있다. ASCO/CAP는 잘 입증된 검사를 시행한다면 *HER2* 표적 치료제의 이점을 예측하는데 있어 IHC나 ISH 중 어느 검사가 더 우위라고 볼 수 없으며, 새로운 검사는 이전의 입증된 검사와 비교했을 때 95% 이상의 결과 일치율을 보여야 한다고 하였다.¹³ 이에 저자들은 유방암을 대상으로 한 이전 연구¹⁶에서 IHC, FISH, SISH를 이용하여 *HER2* 상태를 측정된 결과 서로 다른 두 검사 간 결과 일치율이 95% 이상임을 확인하였고, 동일한 방법을 위암에 적용하여 이들 검사법이 위암의 *HER2* 측정에도 서로 높은 결과 일치율

을 보이는지 알아보고자 하였다. 저자들의 연구 결과에 의하면 위암에서 IHC와 SISH의 결과 일치율은 95.7%였고, SISH와 FISH를 모두 시행한 예의 결과 일치율은 95.5%로 나타나 어느 검사를 시행하더라도 위암에서 *HER2* 상태를 잘 반영할 수 있을 것으로 생각되었다. 그러나 위암에서 IHC와 FISH 결과를 비교한 연구를 살펴보면 *HER2* 유전자의 증폭은 IHC 0/1+를 보인 증례의 5.1-7.5%에서 관찰되었고,^{25,26} ToGA trial에서도 IHC 0/1+인 위암의 23%에서 유전자 증폭이 관찰되었다.²⁷ 또한 본 연구에서 IHC 0인 종양의 1.4%와 1+ 종양의 27.3% 그리고 2+ 종양의 25%가 유전자 증폭을 나타냈는데, 이는 유방암을 대상으로 동일한 방법으로 *HER2* 유전자 상태를 측정된 연구결과¹⁶와 차이를 보이는 것이다. 유방암에서는 IHC 0/1+였던 모든 증례에서 유전자 증폭이 관찰되지 않았다.

유방암에서는 *HER2* 상태를 검사할 때, IHC를 일차적으로 시행하여 0 또는 1+인 경우 *HER2* 음성 유방암으로, 3+인 경우 *HER2* 양성 유방암으로 판정하고 IHC에서 2+로 판독된 경우에만 유전자 증폭 유무를 검사하는 것을 권장하고 있다.¹³ 하지만 위암에서는 유방암과 동일한 접근을 하기가 곤란할 것으로 생각된다. 왜냐하면 유전자 증폭이 있음에도 불구하고 IHC에서 음성(0/1+)으로 판정되어 표적치료 대상에서 제외될 증례들이 있기 때문이다. 우리나라에서도 최근 유럽에 이어 trastuzumab이 *HER2* 양성인 진행성 위암 환자에게 사용하는 것이 승인됨에 따라 치료 대상 환자군 선별을 위한 가장 효과적인 *HER2* 검사법을 찾을 필요가 있다. 이를 위해서는 IHC 0/1+이면서 유전자 증폭이 있는 군에서의 trastuzumab 투여 효과와 IHC 3+이면서 유전자 증폭이 있는 군에서의 trastuzumab 투여 효과를 비교하여, *HER2* 단백질 발현과 유전자 증폭 중 어느 것이 더 치료 효과를 잘 반영하는지를 밝히는 것이 우선이다. 왜냐하면 두 군 모두 trastuzumab에 효과가 있다면 일차 검사법으로 IHC를 사용하는 것은 문제가 있기 때문이다. 현재 진행되고 있는 ToGA trial에서 이와 관련한 해답을 얻기를 기대한다.

위암에서 *HER2* 단백질 발현이 유방암에 비해 불균질하게 나타난다는 것은 다른 연구자들도 보고하였지만,^{17,26} 저자들의 연구에서도 IHC 3+ 증례의 25%에서만 TMA에 포함된 모든 조직에서 균질한 염색 양상을 보였고, 나머지 증례는 부위마다 발현 정도의 차이를 보였다. 증폭이 관찰된 15예 중 2예(13.3%)에서 원발 종양은 IHC와 SISH에 음성이었으나, 림프절에 전이된 종양세포만 양성을 나타내 림프절 전이가 있는 위암에서 *HER2* 검사를 시행할 때 전이 병소도 포함시켜야 할지 아니면 광범위한 부위의 원발 종양 병소에서 *HER2* 검사를 시행해야 할지에 대해서는 좀 더 많은 증례를 대상으로 한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

한편 저자들의 연구에서 *HER2* 단백질 발현(IHC 2+/3+)은 Lauren 분류의 장형에서 유의하게 높게 나타났고, 유전자 증폭은 고분화 샘암종에서 높게 나타났는데 이러한 결과는 다른 연구에서도 동일하게 나타났으며, 위식도 문합부의 종양이 위에서

발생한 종양에 비해 *HER2* 발현이 높다고 알려져 있다.^{8,27} 그러나 위암에서 *HER2*의 단백질 발현 또는 유전자 증폭이 예후에 미치는 영향에 관해서는 여러 연구들이 일관된 결과를 보여주지 못하였다.^{8,10,11,25} 이는 특히 *HER2* 단백질 발현의 경우 염색 방법이나 판독 기준 등이 통일되지 않아 연구자들마다 과발현군으로 분류한 위암이 이질적인 집단일 가능성이 높기 때문이다. Hofmann 등¹⁷이 유방암에서 사용하는 *HER2* IHC 판독 기준을 근거로 위암에 적용 가능한 판독 기준 수정안을 제시하였는데, 이를 적용한 ToGA trial에서 IHC와 FISH 간 결과 일치율이 87.5%로 유방암에 비해 다소 낮게 나타나,²⁷ 앞으로 위암의 *HER2* IHC 판독 기준에 대한 논의와 검증이 필요할 것으로 생각된다.

결론적으로 저자들은 230예의 위암 조직에서 *HER2* 발현 및 유전자 증폭을 조사한 결과, *HER2* 과발현(IHC 3+)은 전체 종양의 3.5%, 유전자 증폭은 6.5%에서 나타나 위암은 유방암에 비해 *HER2* 변이 빈도가 낮음을 알 수 있었다. 또한 *HER2* 발현 음성(IHC 0/1+)인 위암의 일부에서도 유전자 증폭이 발견되므로 위암에서 trastuzumab 투여 대상 환자 선별을 위해서는 현재 유방암에 적용되는 검사 흐름도와는 다른 접근이 필요하며, 특히 유전자 증폭을 검사하는 방법인 SISH와 FISH가 서로 높은 결과 일치율을 보여주므로, SISH나 FISH 중 각 검사실 환경에 적합한 방법을 선택하여 시행하면 될 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Kang KJ, Lee JH. Characteristics of gastric cancer in Korea: with an emphasis on the increase of the early gastric cancer (EGC). J Korean Med Assoc 2010; 53: 283-9.
2. Noh SH. Conventional open surgery in early gastric cancer. J Korean Med Assoc 2010; 53: 306-10.
3. 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.
4. Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, Puzsai L, Ravdin PM, Hortobagyi GN. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. Oncologist 2009; 14: 320-68.
5. Morris MJ, Reuter VE, Kelly WK, et al. HER-2 profiling and targeting in prostate carcinoma. Cancer 2002; 94: 980-6.
6. Schuell B, Gruenberger T, Scheithauer W, Zielinski C, Wrba F. HER-2/neu protein expression in colorectal cancer. BMC Cancer 2006; 6: 123.
7. Safran H, Steinhoff M, Mangray S, et al. Overexpression of the HER-2/neu oncogene in pancreatic adenocarcinoma. Am J Clin Oncol 2001; 24: 496-9.
8. Gravalos C, Jimeno A. HER2 in gastric cancer: a new prognostic

- factor and a novel therapeutic target. *Ann Oncol* 2008; 19: 1523-9.
9. van Cutsem E, Kang Y, Chung H, *et al.* Efficacy results from the ToGA trial: a phase III study of trastuzumab added to standard chemotherapy (CT) in first-line human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) positive advanced gastric cancer (GC). *J Clin Oncol* 2009; 27(Suppl): Abstract LBA4509.
 10. Jørgensen JT. Targeted HER2 treatment in advanced gastric cancer. *Oncology* 2010; 78: 26-33.
 11. Park DI, Yun JW, Park JH, *et al.* HER-2/neu amplification is an independent prognostic factor in gastric cancer. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 1371-9.
 12. Kim MA, Jung EJ, Lee HS, *et al.* Evaluation of HER-2 gene status in gastric carcinoma using immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization, and real-time quantitative polymerase chain reaction. *Hum Pathol* 2007; 38: 1386-93.
 13. 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.
 14. Kang J, Kwon GY, Lee YH, Gong G. Comparison of silver-enhanced in situ hybridization and fluorescence in situ hybridization for HER2 gene status in breast carcinomas. *J Breast Cancer* 2009; 12: 235-40.
 15. Kim TJ, Kim TE, Jung ES, *et al.* The comparison of automated silver in situ hybridization and fluorescence in situ hybridization for evaluating HER2 gene amplification in breast carcinoma. *J Breast Cancer* 2009; 12: 295-301.
 16. Sung WJ, Park SJ, Gu MJ, Bae YK. Automated silver-enhanced in situ hybridization for evaluation of HER2 gene status in breast carcinoma: comparison with fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *Korean J Pathol* 2010; 44: 28-34.
 17. Hofmann M, Stoss O, Shi D, *et al.* Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology* 2008; 52: 797-805.
 18. Fukushima S, Matsubara K, Yoshida M, *et al.* Localization of a novel v-erbB-related gene, c-erbB-2, on human chromosome 17 and its amplification in a gastric cancer cell line. *Mol Cell Biol* 1986; 6: 955-8.
 19. Sakai K, Mori S, Kawamoto T, *et al.* Expression of epidermal growth factor receptors on normal human gastric epithelia and gastric carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1986; 77: 1047-52.
 20. 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.
 21. 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.
 22. 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.
 23. Yaziji H, Goldstein LC, Barry TS, *et al.* HER-2 testing in breast cancer using parallel tissue-based methods. *JAMA* 2004; 291: 1972-7.
 24. 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.
 25. Marx AH, Tharun L, Muth J, *et al.* HER-2 amplification is highly homogenous in gastric cancer. *Hum Pathol* 2009; 40: 769-77.
 26. Bilous M, Osamura RY, Rüschhoff J, *et al.* HER-2 amplification is highly homogenous in gastric cancer. *Hum Pathol* 2010; 41: 304-5.
 27. Bang Y, Chung H, Xu J, *et al.* Pathological features of advanced gastric cancer (GC): relationship to human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) positivity in the global screening programme of the ToGA trial. *J Clin Oncol* 2009; 27(Suppl): Abstract 4556.