

삼중음성유방암에서 Foxp3 양성 조절 T세포와 종양 침윤 T림프구의 의의

강한나 · 정하린 · 조민선 · 구혜수
한운섭 · 이경은¹ · 문병인² · 성순희

이화여자대학교 의학전문대학원 의과학 연구소
병리학교실, ¹내과학교실 및 ²외과학교실

Significance of Foxp3 Positive Regulatory T Cell and Tumor Infiltrating T Lymphocyte in Triple Negative Breast Cancer

Hanna Kang · Harin Cheong · Min Sun Cho · Heasoo Koo · Woon Sup Han
Kyung Eun Lee¹ · Byung In Moon² · Sun Hee Sung

Departments of Pathology, ¹Internal Medicine, and ²Surgery, Ewha Medical Research Institute, Ewha Womans University School of Medicine, Seoul, Korea

Background: Triple negative breast cancer (TNBC) is defined as a lack of the expression of estrogen receptor, progesterone receptor and human epidermal growth factor receptor 2 in breast cancer. Many TNBCs show a profound infiltration of tumor infiltrating lymphocytes (TILs). It is still uncertain whether these TILs are protumoral or antitumoral. Regulatory T cells (Tregs) play a role in inducing immune tolerance to antigens, and they may be selectively recruited by cancer cells. This study was conducted to evaluate the significance of TILs with an emphasis on forkhead box p3 (Foxp3), which is a marker for CD25+CD4+ Treg in TNBC. **Methods:** We investigated the Foxp3, CD8 and CD4 expressions in 100 cases of TNBC by immunohistochemistry and using a tissue microarray. The Foxp3 expression was divided as the high and low infiltration groups (cut-off value=20). **Results:** The high infiltration group was correlated with higher histologic and nuclear grades. However, Foxp3+ Tregs were decreased in the T3 and T4 TNBCs as compared to that of the T1 and T2 TNBCs. No significant differences were found for the nodal status, lymphovascular invasion, stage, recurrence and overall survival. **Conclusions:** High Foxp3+ Treg infiltration in TNBC is correlated with the nuclear and histologic grades, but there was no relation to recurrence and overall survival.

Key Words: Breast; Carcinoma; Foxp3 protein, human; T-lymphocytes, regulatory; Lymphocytes, tumor-infiltrating

접 수: 2010년 9월 15일
게재승인: 2010년 11월 12일

책임저자: 성 순 희
우 158-710 서울시 양천구 목동 911-1
이화여자대학교 의학전문대학원 병리학교실
전화: +82-2-2650-5734
Fax: +82-2-2650-2635
E-mail: sunhsung@ewha.ac.kr

악성 종양의 성장은 종양세포 자체의 유전자 이상 뿐만 아니라 기질세포나 숙주의 면역세포와 종양세포 간의 상호작용에 의해 조절된다. 악성 종양에서의 림프구의 침윤은 숙주의 항종양성 종양 면역 기전의 하나로 좋은 예후인자로 작용하는 것으로 간주되어 왔으나, 최근 조절 T세포의 면역관용과 관련하여 오히려 나쁜 예후 인자로서의 측면이 부각되고 있다.^{1,3}

유방암은 다양한 형태적, 생물학적 특성을 갖는 질환으로 최근 분자생물학적 분석의 발달은 유방암을 그 생물학적 특성에 따라 기능적으로 분류하는 것을 가능하게 하였다. Perou 등⁴은 유방암을 유전자 발현 양상(gene expression profile)에 기초하여 다섯 군으로 분류할 수 있다고 제안하였다. 이 중 기저형군은 기저세포와 유사한 일련의 유전자 발현 양상을 보이는 군으로, 이들은 흔히 기저 세포의 표지자인 cytokeratin 5/6, c-kit, epidermal growth factor receptor 등의 면역조직화학염색에서 양성을 보이며, 에스트로겐 수용체(estrogen receptor, ER), 프로게스테론 수용체(progesterone receptor, PR), human epidermal growth factor receptor 2 (Her2/neu)

등은 모두 음성인 경우가 많다. 통상적으로 ER, PR, Her2/neu가 모두 음성인 삼중음성유방암(triple negative breast cancer, TNBC)은 유전자 발현 양상을 기준으로 분류한 기저형 유방암과 상당 부분 중복되지만 반드시 일치하지는 않아서, 기저형 유방암의 약 90%가 TNBC인 반면, TNBC에서의 기저형은 약 80-90%라고 알려져 있다.^{4,7}

TNBC는 유방암 분류 중 약 10-20%를 차지하는데, 흑인종의 경우에는 24.6%로 좀 더 비율이 높고,⁸⁻¹⁰ 한국인의 경우는 9.2-15.9%^{11,12}의 분포를 보인다. 이들은 좀 더 젊은 연령층에서 발생하고, 폐경 전 연령에 많으며, 국소 및 원격 재발률이 높고, 림프절 전이보다는 혈행성 전이를 잘 하며, 다른 유형에 비해 핵등급과 조직등급이 높고, 종양의 크기가 크다는 특성을 보이는데 이런 것들은 모두 불량한 예후와 관련이 있다.^{2,10}

TNBC는 다른 유방암에 비해 효과적인 분자 표적치료제나 항암제가 없어 다각적인 종양생물학적 규명이 필요하며,⁷ 다른 유형에 비해 *BRCA1* 유전자 변이와 관련성이 높고¹⁰ 발생변화를 잘 동반하며¹³ 수질암 및 비전형 수질암이 대부분 포함되어 많은 예에서 타

유방암의 유형에 비해 종양세포 주위에 많은 림프구의 침윤을 동반한다. Kuroda 등³은 이들 수질암종의 경우 통상적인 관암종에 비하여 높은 핵등급, 조직등급을 보임에도 불구하고 비교적 예후가 좋은 이유가 CD8 양성 T세포 등의 종양면역세포가 종양세포의 침윤과 전이를 억제하기 때문이라고 주장하였다.

조절 T세포(regulatory T cell, Treg)는 자가 항원 및 외부 항원에 대한 면역반응을 억제함으로써 자가 관용(self tolerance)의 유지 및 정상 면역반응을 억제하는 역할을 하는 T세포로, 최근 들어 자가 면역 질환, 이식편 대 숙주반응, 만성 간염 등 감염질환에서 면역반응을 일으켜 임상 경과에 중요한 역할을 한다는 연구결과가 보고되었다.¹⁴

또 난소암,¹⁵ 위암¹⁶을 포함한 여러 종류의 악성 종양에서 조직 내 Treg의 침윤이 증가하거나 말초혈 내 Treg이 증가해 있는 소견을 볼 수 있으며, 최근 유방암을 대상으로 한 여러 연구에서도 높은 핵등급, 조직등급, 삼중음성암, 불량한 생존율, 항암치료에 관한 불량한 반응, 높은 후기 재발률 등 나쁜 예후 인자와의 관련을 볼 수 있다.^{2,17,18}

따라서 다양한 종류의 세포 표면 및 세포내 항원을 이용한 Treg 연구가 진행 중에 있으며,^{19,20} 보다 특이적인 항원을 찾고자 하는 노력이 계속되고 있다. 최근에는 forkhead/winged helix family에 속하며 Treg의 발달과 분화에 필수 역할을 하는 전사인자인 forkhead family transcription factor (forkhead box p3, Foxp3)가 새로 밝혀져 Treg의 분석에 활발히 이용되고 있다.²¹

이에 저자들은 아직까지 표적치료제가 확립되어 있지 않으며 예후가 불량한 것으로 알려진 TNBC를 대상으로, 종양 조직 내에 침윤한 Treg를 정량 분석하여 여러 임상 및 병리학적 예후인자를 비교함으로써 TNBC에서 Treg 침윤의 의의를 알고자 하였으며, 그 침윤 정도가 예후인자에 어떤 영향을 미치는지를 분석하여 TNBC에서 Treg를 표적으로 한 종양면역치료의 가능성을 타진하고자 하였다.

Foxp3는 림프구 중 Treg에 선택적으로 발현되는 표지자이므로,²² 저자들은 Treg의 정량에 Foxp3 면역조직화학염색을 사용하기로 하였다. 아울러 종양침윤 T림프구 중 CD4 양성 T세포와 CD8 양성 T세포의 침윤 정도를 함께 분석하여 타 유방암 유형에 비해 종양 침윤 림프구의 침윤이 많은 TNBC에서 이들의 침윤과 여러 예후인자와의 관계를 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

연구 대상

2000년 1월부터 2008년 12월까지 이대목동병원 병리과에서 조직검사를 통해 진단한 929예의 유방암 중 ER과 PR에 음성이면서, c-erbB2에 음성이거나 혹은 Her2/neu 형광제자리부합법(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)에 음성이었던 126예를 TNBC로 정의하였다. 이 중 관내암종은 제외하였으며, 추가 면역조직화학염

색이 가능하였던 100예를 연구대상으로 선정하였다.

음성의 기준은 ER, PR의 경우 Allred 등급²³ 기준 중에서 음성 또는 10% 이하의 세포에서 양성을 보이는 경우로 하였고, c-erbB2의 경우 세포막에 염색되는 정도에 따른 Dako 등급체계에 따라 0, 1+, 2+, 3+로 분류하였으며, 0과 1+인 경우는 음성으로 판정하였고 2+, 3+인 경우는 추가적인 Her2/neu FISH 결과에서 Her2 부위와 염색체 17번 중심체의 비율이 1.8 미만인 경우를 음성으로 판정하였다.

연구 방법

임상 소견 및 병리 소견 분석

환자의 임상 기록을 검토하여 나이, 추적기간, 재발 유무, 무병 생존 기간, 원격전이 유무 및 사망 여부를 확인하였다. 병리진단지와 병리조직 슬라이드의 재검토를 통해 TNBC의 조직학적 아형을 재분류하였으며, 종양의 크기, 림프절 전이, 수정된 Bloom-Richardson 등급체계에 의한 조직등급과 핵등급, 림프관의 침범 여부를 조사하였다.

임상병기는 2010년 American Joint Committee on Cancer의 tumor, node and metastasis 병기에 따라 분류하였으며, 병리진단지와 면역조직화학염색 슬라이드를 토대로 ER, PR, c-erbB2, MIB-1 세포 증식지수에 대한 결과를 분석하였다. MIB-1 세포증식지수는 핵에 발현을 보이는 종양세포의 백분율을 반정량적인 방법으로 측정하였으며, 측정 결과의 중간값인 25%를 기준으로 나누었다.

면역조직화학염색

수술로 절제된 종양 조직의 파라핀포매 표본에 대해 80예는 한 증례당 3코어씩 3 mm 크기의 tissue microarray를 제작하였고, 코어는 헤마톡실린-에오신 슬라이드의 재판독을 통해 침윤하는 림프구가 많은 부위를 선택하였다. 종양의 크기가 작아 파라핀포매 표본의 손괴가 불가피한 20예에 대해서는 tissue microarray를 제작하지 않았다.

먼저 블록을 박절하고 Foxp3 (clone 236A/E7, Abcam, Cambridge, UK), CD8 (clone 4B11, Leica microsystems, Wetzlar, Germany) 및 CD4 (clone 4B12, Leica microsystems)에 대한 단클론 항체로 면역조직화학염색을 시행하였다. Microarray 블록 및 파라핀 블록은 4 µm 두께로 박절해 슬라이드에 붙인 후 60°C에서 한 시간 동안 건조시켰다. 그리고 적절한 완충액에 슬라이드를 넣고 극초단파로 20 분간 가열한 뒤 천천히 식힌 다음 항원성 회복을 위해 Foxp3 및 CD8 염색에는 citrate (pH 6.0) 완충액을, CD4 염색에는 Tris-EDTA (pH 9.0) 완충액을 사용하였다. 이후 Bond polymer detection system (Leica Microsystems)과 Bond-X 자동 면역조직화학염색 기계 (Leica Microsystems)를 이용하여 염색하였다. 또 내인성 과산화 효소 활성을 억제하기 위한 30분간의 0.3% 과산화수소수 용액 처리 단계, 각각의 일차 항체(Foxp3 [1:100], CD8 [1:80] 및 CD4 [1:60])로 실온에서 30분간 처리하는 단계, 그리고 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride 발색과 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색하는 단

계를 거쳤다. 이때 CD4염색의 경우에는 항원성 소실 방지를 위해 과산화수소수 용액으로 처리하는 과정은 제외하였고, Foxp3, CD8, CD4의 양성 대조군으로는 편도 조직을, 음성 대조군으로는 일차 항체가 없는 완충액을 사용했다.

염색 결과 Foxp3는 핵에 강양성으로 염색되었고, CD8, CD4는 림프구의 세포막을 따라 염색되었다.

Foxp3, CD4, CD8 양성 세포 정량 분석

Foxp3 양성 세포와 CD8 양성 세포는 각각 400배 고배율 시야에서 arc4000c digital camera system (arcViewer ver. 1.21, Baumer Optronik, Radeberg, Germany)을 이용하여 대표적인 다섯 장의 중앙 부위 사진을 찍었으며, 양성으로 염색되는 림프구의 수를 두 명의 병리학자가 세어 각각의 평균을 구하였다.² CD4의 경우는 열 개의 400배 시야에서 관찰되는 CD4 양성 세포의 수를 같은 시야에서 보이는 세포 전체의 수로 나눈 퍼센트를 구하여 중앙 전체에서 CD4 양성 림프구가 차지하는 비율(%)을 측정하였다.

통계 분석

통계 분석은 SPSS ver. 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였다. 각각의 임상 및 병리학적 지표들에 따른 Foxp3 양성 세포, CD8 양성 세포, CD4 양성 세포의 평균값과의 비교는 t-검정 및 ANOVA 분석으로 검정하였다. 유의수준은 p값이 0.05 이하인 경우로 정하였다. Foxp3 양성 세포의 경계값(cut-off value)은 최소유의 확률법(minimum p-value approach)을 사용하여 20개를 기준으로 하였고, 20개 이하인 경우는 저침윤군(low Foxp3+ Treg group)으로, 20개를 초과하는 경우는 고침윤군(high Foxp3+ Treg group)으로 나누었으며, 이들에 대한 각각의 임상 및 병리학적 지표 간의 차이는 Pearson chi-square법으로 검정하였다. 이때 유의수준은 p값이 0.05 이하인 경우로 하였다. 또 고침윤군과 저침윤군의 생존 기간 비교는 Kaplan-Meier 생존 분석을 사용하였고, 유의수준은 p값이 0.05 이하인 경우로 정하였다.

결 과

연구 대상 환자들의 임상 및 병리학적 지표 분석

100명의 TNBC 환자는 모두 여성이었고, 이들의 평균 연령은 48.9±11.7세로, 28세에서 80세까지의 연령 분포를 보였다. 또 폐경 전 여성은 57명, 폐경 후 여성은 43명으로, 폐경 전 여성이 많았다. 각 임상 및 병리학적 지표를 Table 1에 정리하였다.

유방암 조직 내 Foxp3 양성 세포의 발현 양상과 세포수, 임상 및 병리학적 지표 간의 관계 분석

면역조직화학염색 결과 Foxp3는 주로 종양세포와 섞여 있는 중

양침윤 림프구의 일부에서 핵에 강양성으로 발현되었으며, 양성 세포는 종양의 변연부에 더 많이 분포하는 경향을 보였다. 또 림프구가 군집을 이루는 부위에 집중하여 분포하거나 산발적으로 흩어져 분포하기도 하였다. 한편 소수의 종양세포에서도 Foxp3가 발현되었으나, 이는 양성 세포수의 측정에서 제외하였다(Fig. 1).

TNBC는 핵등급이 3등급인 경우 Foxp3 양성 세포수가 증가하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었고, 조직등급은 Foxp3 양성 세포가 3등급에서 36.5±24.7로 의미 있게 증가하였다(p=0.027). 그러나 림프절 전이 유무와 림프관 침범 유무, 병기와는 의미있는 차이가 없었다.

TNBC를 조직학적 아형에 따라 나누었을 때, 통상적인 관암종에 속하는 유방암 증례는 모두 56예(56%)였는데 이들은 30.1±22.2의 Foxp3 양성 세포 침윤을 보였다. 또 특정 아형으로 분류되는 증례는 모두 44예(44%)로 이 중 수질암종이 3예(3%), 비정형 수질암종이 14예(14%), 화생암종이 18예(18%)였다. 수질암종은 통상적인 관암종에 비해 높은 Foxp3 양성 세포 침윤을 보여 세포수가 61.7±30.9에 달하였으며, 비정형 수질암종과 화생암종은 Foxp3 양성 세포수가 각각 44.4±23.8, 33.3±25.4로 관암종에 비해 다소 높은 침윤을 보였으나, 의미있는 차이는 없었다(p=0.056, p=0.637).

Table 1. Clinical and pathological features of the TNBC cases

Parameters		n
Clinical features		
Age (yr)	Mean ± SD	48.9 ± 11.7
	Range	28-80
Sex	Female	100
	Male	0
Premenopause vs menopause	Premenopause	57
	Menopause	43
Pathological features		
Tumor size	T1, T2	94
	T3, T4	6
Nodal involvement	N0	62
	N1	23
	N2, N3	15
Histologic grade	Grade 1, 2	39
	Grade 3	61
Nuclear grade	Grade 1, 2	42
	Grade 3	58
Lymphovascular invasion	Absent	67
	Present	33
Stage	I	29
	II	55
	III, IV	16
Recurrence	Absent	84
	Present	16
Subtype of tumor	IDC, NOS	56
	Medullary	3
	Atypical medullary	14
	Metaplastic	18
	Other special subtype	9

TNBC, triple negative breast cancer; SD, standard deviation; IDC, invasive ductal carcinoma; NOS, not otherwise specified.

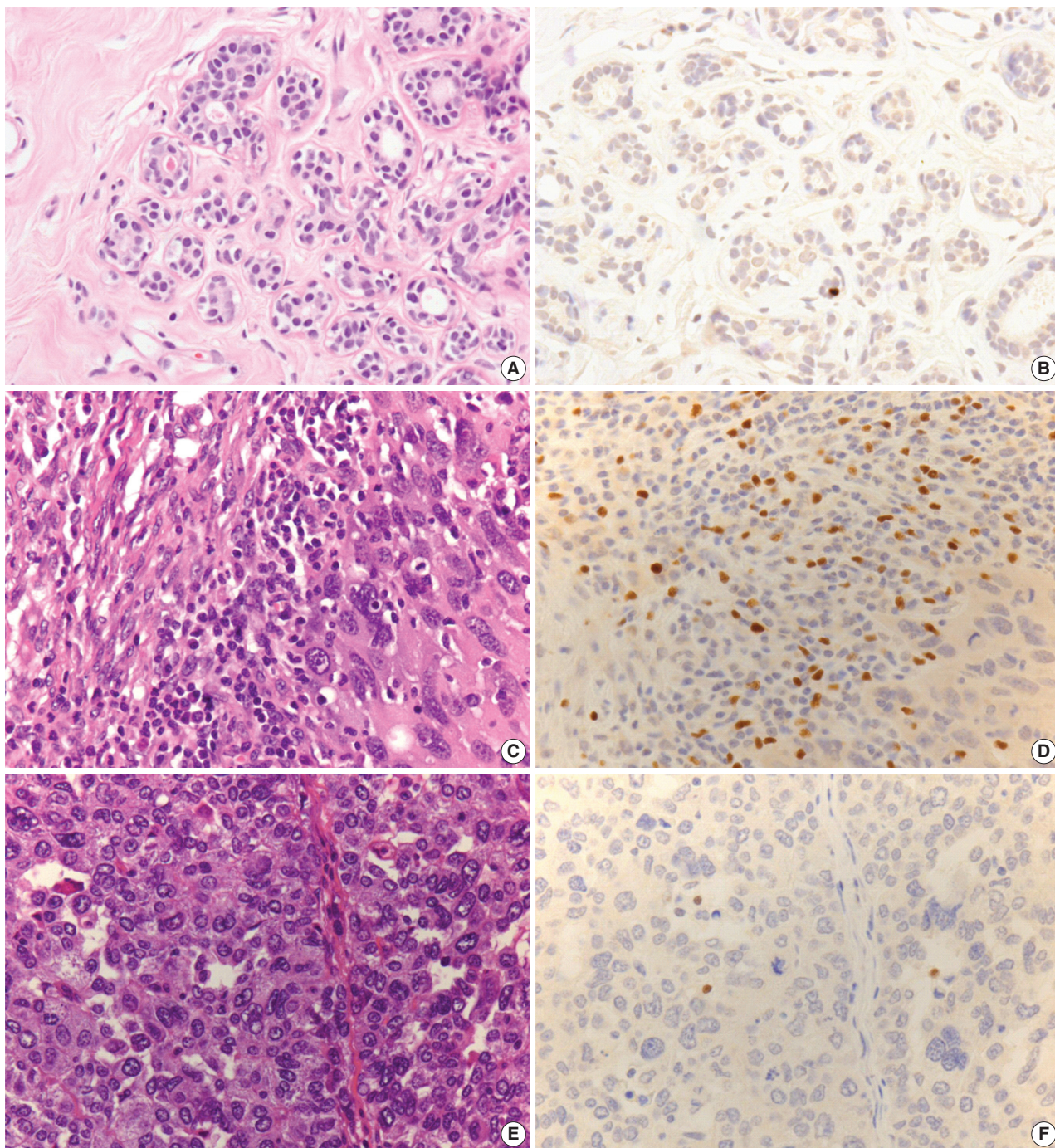


Fig. 1. Immunohistochemical stains (IHC) for Foxp3 in triple negative breast cancer (TNBC). (A, B) The histology and IHC for forkhead box p3 (Foxp3) in normal breast tissue. (C, D) The histology and IHC for Foxp3 in the TNBC showing the high density of Foxp3 positive regulatory T cells (Foxp3+ Tregs). (E, F) The histology and IHC for Foxp3 in the TNBC showing the low density of Foxp3+ Tregs.

또 종양의 크기가 T1, T2 인 경우는 Foxp3 양성 세포수가 33.7 ± 24.0 , 종양의 크기가 5 cm 이상인 T3이거나 T4 병기인 경우는 Foxp3 양성 세포수가 9.8 ± 6.1 로서 큰 차이를 보였다($p = 0.017$) (Table 2).

Foxp3 양성 세포 침윤 등급과 임상 및 병리학적 지표 간의 상관 관계

Foxp3 양성 세포의 침윤 수 20개를 경계값으로 저침윤군과 고침윤군으로 나누어 비교하였을 때 높은 조직등급과 핵등급은 고침

Table 2. Number of Foxp3+ Tregs/HPF according to the clinicopathological parameters

Clinicopathological parameters		n	Foxp3+ Treg (mean \pm SD)	p-value ^a
Tumor size	T1, T2	94	33.7 \pm 24.0	0.017
	T3, T4	6	9.8 \pm 6.1	
Nodal involvement	N0	62	31.0 \pm 23.5	0.762
	N1	23	35.1 \pm 23.6	
	N2, N3	15	33.5 \pm 27.7	
Histologic grade	Grade 1, 2	39	25.7 \pm 21.7	0.027
	Grade 3	61	36.5 \pm 24.7	
Nuclear grade	Grade 1, 2	42	27.8 \pm 23.3	0.065
	Grade 3	58	35.5 \pm 24.2	
Lymphovascular invasion	Absent	67	30.5 \pm 21.3	0.282
	Present	33	36.0 \pm 28.8	
Stage	I	29	31.4 \pm 22.5	0.959
	II	55	32.9 \pm 24.1	
	III, IV	16	31.8 \pm 27.7	
Recurrence	Absent	84	32.2 \pm 22.8	0.933
	Present	16	32.9 \pm 30.5	
Subtype of tumor	IDC, NOS	56	30.1 \pm 22.2	0.216
	Medullary	3	61.7 \pm 30.9	
	Atypical medullary	14	44.4 \pm 23.8	
	Metaplastic	18	33.3 \pm 25.4	
	Other special subtype	9	15.6 \pm 16.7	

^aAnalysis by t-test or ANOVA was applied. Each special subtype of tumor was compared with IDC, NOS.

Foxp3+ Treg, forkhead box p3 positive regulatory T cell; HPF, high power field; SD, standard deviation; IDC, invasive ductal carcinoma; NOS, not otherwise specified.

Table 3. Comparison of clinicopathological parameters according to a low and high Foxp3+ Treg expression (cut-off value = 20)

Clinicopathological parameters		Low Foxp3+ Treg group (n=39)	High Foxp3+ Treg group (n=61)	p-value ^a
		n (%)	n (%)	
Tumor size	T1, T2	34 (87.2)	60 (98.4)	0.022
	T3, T4	5 (12.8)	1 (1.6)	
Nodal involvement	N0	26 (66.7)	36 (59.0)	0.625
	N1	7 (17.9)	16 (26.2)	
	N2, N3	6 (15.4)	9 (14.8)	
Histologic grade	Grade 1, 2	21 (53.8)	18 (29.5)	0.015
	Grade 3	18 (43.6)	43 (70.5)	
Nuclear grade	Grade 1, 2	22 (56.4)	20 (32.8)	0.020
	Grade 3	7 (43.6)	41 (67.2)	
Lymphovascular invasion	Absent	28 (71.8)	39 (63.9)	0.415
	Present	11 (28.2)	22 (36.1)	
Stage	I	10 (25.6)	19 (31.1)	0.809
	II	22 (56.4)	33 (54.1)	
	III, IV	7 (17.9)	9 (14.8)	
Recurrence	Absent	32 (82.0)	52 (85.2)	0.688
	Present	7 (18.0)	9 (14.8)	
Subtype of tumor	IDC, NOS	22 (39.3)	34 (60.7)	0.022
	Medullary	0 (0)	3 (100)	
	Atypical medullary	3 (21.4)	11 (78.6)	
	Metaplastic	7 (38.9)	11 (61.1)	
	Other special subtype	7 (77.8)	2 (22.2)	

^aAnalysis by χ^2 test was applied. Each special subtype of tumor was compared with IDC, NOS.

Foxp3+ Treg, forkhead box p3 positive regulatory T cell; IDC, invasive ductal carcinoma; NOS, not otherwise specified.

윤균과 관련이 있었다($p = 0.015$, $p = 0.020$). 그러나 림프절 전이 유무와 림프관 침범 유무, 병기는 저침윤군과 고침윤군 간의 차이가

없었다(Table 3).

재발한 예는 총 16예(16%)였는데, 이 중 국소 재발이 9예(9%), 원

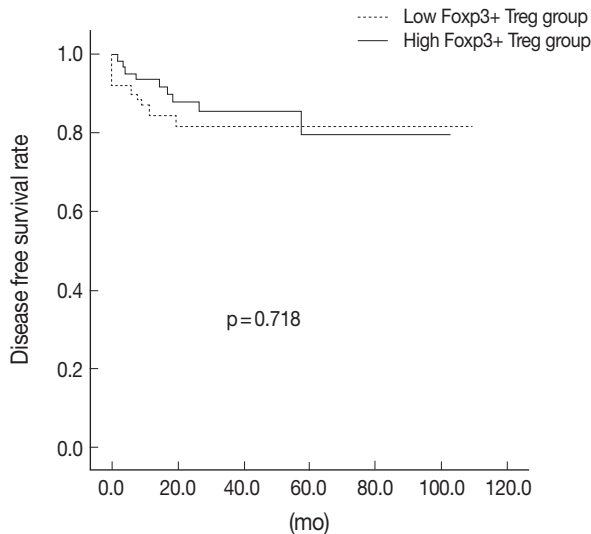


Fig. 2. The disease free survival curve according to the forkhead box p3 positive regulatory T cell (Foxp3+ Treg) expression ($p = 0.718$).

격전이가 7예(7%)로 원격전이가 43.8%의 비교적 높은 비율을 차지하였다. 원격전이는 뇌 혹은 뇌수막 등 중추신경계에 재발한 예가 2예, 간에 재발한 예가 1예, 폐에 재발한 예가 1예, 그리고 뼈에 재발한 예가 1예 있었으며, 다발성 전이도 2예 있었다.

Foxp3+ Treg 침윤 빈도에 따라 재발된 증례를 나누어 보니, Foxp3+ Treg 저침윤군은 7예(17.9%), 고침윤군은 9예(14.8%)에서 재발하였다. 원격전이는 저침윤군에서 5예(12.8%), 고침윤군에서 2예(3.3%)가 발생하였는데 두 군 간의 유의한 차이는 없었으나, 저침윤군에서 원격전이의 빈도가 높고 국소 재발의 빈도가 낮은 경향을 보였다. 재발 예 중 세 증례는 편평세포 화생이 있는 화생암종이었고, 한 증례는 수질암종이었으나, 나머지 대부분을 차지하는 10개의 증례(62.5%)는 특정 분류에 속하지 않는 관암종으로, 이들이 좀 더 재발이 많은 경향을 보였다. 특히 고침윤군에서는 재발한 9예 중 7예(77.8%)가 관암종이었으며, 저침윤군에서 재발한 7예 중에는 화생암종이 3예(42.8%), 관암종이 3예(42.8%), 그리고 관암종 이외에도 화생암종의 비중이 상대적으로 높았다.

전체 환자의 평균 무병 생존 기간(disease free survival)은 92.5개월이었고, 저침윤군의 평균 무병 생존 기간은 91.2개월, 고침윤군은 87.1개월로, 각 군 간 통계적으로 유의한 무병 생존 기간의 차이는 없었다($p = 0.718$) (Fig. 2).

TNBC로 인한 사망은 5명(5%)이었는데 저침윤군과 고침윤군에서 각각 3명과 2명씩 발생하였고, 평균 생존 기간은 저침윤군이 102.0개월, 고침윤군이 97.4개월로 의미있는 차이는 없었다($p = 0.523$) (Fig. 3). 재발률과 사망률은 추적 관찰 기간이 짧은 환자가 많아 구할 수 없었다.

CD8, CD4 양성 세포와 임상 및 병리학적 지표 간의 상관관계

CD8 양성 세포의 침윤 수는 Foxp3 양성 세포의 침윤 양상과 유

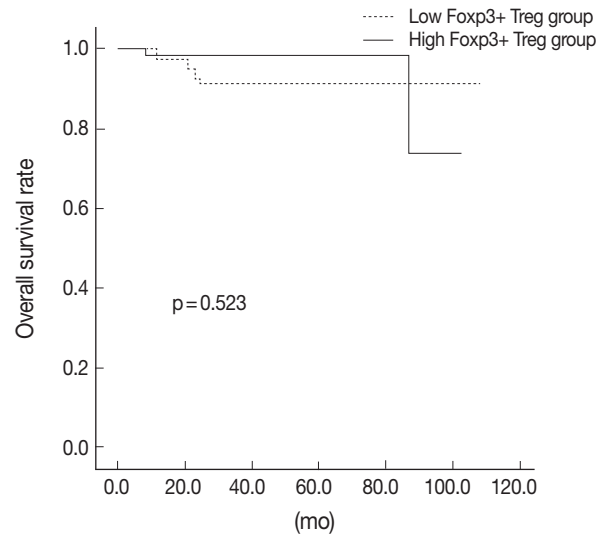


Fig. 3. The overall survival curve according to the forkhead box p3 positive regulatory T cell (Foxp3+ Treg) expression ($p = 0.523$).

사하여 T3, T4에서 침윤한 세포가 감소하였고($p = 0.011$), 핵등급과 조직등급이 3등급인 경우에서 침윤 세포의 수가 유의하게 많았다($p = 0.004$, $p = 0.001$) (Table 4).

CD8 양성 세포수에 대한 Foxp3 양성 세포수의 비율을 비교하였을 때 종양의 크기가 크면 비율이 감소하는 경향을 보였다($p = 0.011$). 그러나 그 밖의 여러 변수 간의 유의한 차이는 없었다(Table 4).

한 시야에서 관찰되는 CD4 양성 세포의 수를 같은 시야에서 보이는 세포 전체의 수로 나눈 비율, 즉 종양 전체에서 CD4 양성 림프구가 차지하는 비율(%)은 핵등급, 조직등급에 있어 CD8 양성 세포의 침윤 양상과 비례하였으나, 이외의 변수와는 의미있는 차이가 없었다(Table 4).

Foxp3, CD8, CD4 양성 세포와 MIB-1 세포 증식 지수 간의 상관 관계

MIB-1 세포증식지수가 25% 이상인 TNBC는 MIB-1 지수가 25% 미만인 TNBC에 비해 Foxp3, CD8, CD4 양성 T세포수가 높았고, CD8 양성 및 CD4 양성 T세포의 경우는 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p = 0.020$, $p = 0.014$) (Table 5).

고 찰

여러 악성 종양의 조직 내에 림프구를 위시한 여러 면역 관련 세포의 침윤이 흔히 동반되고, 면역결핍 환자에게서 암 발생이 증가한다는 사실 등으로부터 종양침윤 림프구는 종양세포에 대한 면역 감시의 역할을 할 것으로 간주되어 왔다.^{24,25} 생체 내 항종양 기전에는 세포매개면역이 우세한 작용을 하며, 세포독성 T림프구 외에 자연살세포, 대식세포, 항체가 관련된다. 그러나 대부분의 암은 면역

Table 4. Comparison of CD8+ T cells/HPF, Foxp3+ Tregs/CD8+ T cells and the percentage of CD4+ T cells according to the clinicopathological parameters

Clinicopathological parameters		n	CD8+ T cell (mean ± SD)	p-value ^a	Foxp3+ Treg/CD8+ T cell (mean ± SD)	p-value ^a	% of CD4+ T cell (mean ± SD)	p-value ^a
Tumor size	T1, T2	94	54.8 ± 30.0	0.011	0.75 ± 0.96	0.011	26.5 ± 18.8	0.053
	T3, T4	6	26.3 ± 18.6		0.43 ± 0.16		13.2 ± 13.0	
Nodal involvement	N0	62	53.0 ± 31.4	0.970	0.74 ± 1.12	0.261	24.9 ± 18.1	0.839
	N1	23	54.2 ± 30.0		0.72 ± 0.54		26.3 ± 18.2	
	N2, N3	15	51.7 ± 26.5		0.71 ± 0.54		28.0 ± 22.8	
Histologic grade	Grade 1, 2	39	42.3 ± 25.3	0.004	0.63 ± 0.50	0.429	18.3 ± 16.2	0.001
	Grade 3	61	60.0 ± 31.1		0.79 ± 1.13		30.7 ± 18.6	
Nuclear grade	Grade 1, 2	42	41.7 ± 25.1	0.001	0.67 ± 0.49	0.426	18.5 ± 16.5	0.001
	Grade 3	58	61.4 ± 30.9		0.77 ± 1.16		30.9 ± 18.5	
Lymphovascular invasion	Absent	67	54.9 ± 32.0	0.397	0.69 ± 1.06	0.317	25.5 ± 18.4	0.855
	Present	33	49.5 ± 26.0		0.81 ± 0.62		26.2 ± 19.6	
Stage	I	29	49.2 ± 26.2	0.511	0.94 ± 1.60	0.305	23.1 ± 15.9	0.678
	II	55	56.3 ± 32.8		0.63 ± 0.43		26.7 ± 19.1	
	III, IV	16	49.2 ± 27.6		0.69 ± 0.51		27.2 ± 22.3	
Recurrence	Absent	84	54.5 ± 30.7	0.240	0.72 ± 1.00	0.880	25.3 ± 17.9	0.694
	Present	16	45.6 ± 26.6		0.75 ± 0.54		27.7 ± 22.9	

^aAnalysis by t-test or ANOVA was applied.

HPF, high power field; Foxp3+ Treg, forkhead box p3 positive regulatory T cell; SD, standard deviation.

Table 5. Number of Foxp3+ Tregs and CD8+ T cells and the percentage of CD4+ T cells according to the MIB-1 proliferation index

Clinicopathological parameters		n	Foxp3+ Treg (mean ± SD)	CD8+ T cell (mean ± SD)	% of CD4+ T cell (mean ± SD)
MIB-1 proliferation index	0-25%	46	28.1 ± 24.6	45.4 ± 32.1	20.8 ± 18.0
	> 25%	54	35.8 ± 23.1	59.6 ± 27.0	30.0 ± 18.3
	p-value ^a		0.111	0.020	0.014

^aAnalysis by t-test was applied.

Foxp3+ Treg, forkhead box p3 positive regulatory T cell; SD, standard deviation.

결핍이 없는 사람들에게서 발생한다. 이러한 점은 종양세포가 면역계를 회피하는 기전을 발달시키거나, 역으로 종양 주위의 활성화된 림프구와 대식세포가 성장인자를 분비하여 종양의 성장을 촉진시키고 단백질분해효소를 생산해 냄으로써 역으로 종양의 침습을 돕는 역할을 할 수 있다는 가정을 가능하게 하는데, 실제적으로도 이를 뒷받침하는 연구결과를 찾을 수 있다.²⁵⁻²⁷

한편 최근 Treg 세포에 의한 면역반응 억제가 여러 질환에서 주목을 받고 있는데,¹⁴ 여러 악성 종양에서도 Treg 세포가 면역반응을 조절함으로써 종양의 침습, 전이에 관여한다는 연구결과들이 보고되고 있다.^{15,16} Treg 세포는 다양한 종류의 세포 표면 및 세포 내에서 항원을 발현하는데, 대표적인 것으로 CD25 (interleukin-2 수용체의 알파 체),¹⁹ cytotoxic T-lymphocyte antigen 4,²⁰ Foxp3²¹ 등이 있다. 이 중 CD25의 경우, 항원 자극을 받은 림프구는 종류를 불문하고 약간의 CD25를 발현하기 때문에 그 발현 정도의 차이로 Treg을 구분하는 데는 어려움이 있으나,¹⁹ 반면 Foxp3는 림프구 중에서 Treg 세포에 선택적으로 발현이 되기 때문에²² 면역조직화학염색을 통한 양성 세포의 정량적 측정이 가능하다.

Foxp3+ Treg이 면역세포의 기능을 어떻게 억제하는지에 대한 정확한 기전은 아직 정확하게 밝혀지지 않았다. 그러나 세포-세포 간

접촉을 통한 직접적 억제와 interleukin-10이나 transforming growth factor β와 같은 항염증 매개체 분비를 통한 간접적 억제가 모두 Foxp3+ Treg을 통한 면역세포 기능 억제에 관여하는 것으로 알려져 있다.²²

최근 여러 연구에서 Treg이 종양 관련 항원 특이 면역을 억제하는 데 중요한 역할을 할 것이라는 연구결과가 있는데,²⁷ 유방암,^{2,17} 난소암,¹⁵ 위암¹⁶을 위시한 여러 악성 종양에서 말초 혈액이나 종양 조직 내에 Treg의 증가가 발견되었으며, 이는 일반적으로 나쁜 예후와 관련이 있었다.

또한 최근에 Desai 등²⁸은 신세포암종 환자를 대상으로 tyrosine kinase inhibitor인 sorafenib을 투여했을 때, 투여군의 Treg이 원발 종양과 전이 부위, 복수에서 sorafenib을 투여하지 않은 비투여군에 비해 의미있게 감소함을 발견하였다(28.1% vs 17.3%, p = 0.046). 또 Lodenkemper 등²⁹은 동물실험에서 자궁경부의 상피내암과 자궁경부암이 다른 기관의 암(대장암, 흑색종, 폐의 기관지암)과 비교했을 때 유의하게 많은 Treg을 가지며, 항글루코코르티코이드 유발 종양 괴사인자 수용체군 관련(glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein) 단백질의 전신 투여 시 단 한 번 사용으로 Treg를 불활성화하고 CD8 양성 세포의 종양 내 침

윤을 유도하며, 투약을 받은 동물의 70%에서 종양의 완전 관해가 일어난다고 주장하였다. 이러한 사실은 여러 종양에서 Treg이 종양 면역 치료의 표적으로 사용될 수 있음을 보여 준다.

TNBC는 유방암의 다른 유형에 비해 불량한 예후를 보이지만, 다른 유형에 비해 확립된 표적치료제도 없다. TNBC에 대한 종양면역치료의 표적을 찾는 과정에서 저자들은 TNBC가 다른 유형의 유방암에 비해 종양 조직 내에 종양침윤 림프구가 현저히 많음에 주목하였는데, 특히 기존 유방암의 조직학적 분류 중 수질암종 또는 비전형 수질암종의 소견을 가지는 관암종은 대부분 TNBC에 속한다는 점과, 화생을 동반한 관암종의 경우도 대부분 TNBC이면서 많은 종양침윤 림프구가 동반된다는 점에 착안하였다. 이에 저자들은 TNBC에서의 종양침윤 림프구의 역할을 규명하고자 최근 종양면역학적 측면에서 관심의 초점이 되는 Treg 세포를 비롯한 CD8 양성, CD4 양성 종양침윤 림프구 수의 변화를 여러 임상 및 병리학적인 예후인자와 비교하고, 상관관계를 밝힘으로써 그 의미를 알고자 하였다.

유방암에서 Foxp3+ Treg의 역할을 규명하고자 했던 많은 문헌 중, TNBC만을 따로 대상으로 한 문헌은 찾을 수 없었다. 다만 이전에 전체 유방암을 대상으로 한 Bohling과 Allison²의 연구에서는 ER, PR, Her2/neu 음성인 TNBC가 비TNBC에 비해 많은 수의 Foxp3+ Treg을 보였다. 특히 TNBC이면서 Nottingham 등급이 3등급인 종양을 비TNBC 혹은 Nottingham 1, 2등급 종양과 비교했을 때 Foxp3+ Treg 밀도가 유의하게 높았다($p=0.0093$). 본 연구의 결과는 Bohling과 Allison²의 연구 결과와 비교했을 때 Foxp3+ Treg의 높은 침윤 밀도가 높은 조직등급, 핵등급과 상관관계가 있는 점은 유사하였으나, 기대했던 결과와는 달리 종양의 크기와는 오히려 역상관관계를 보였다.

Bates 등¹⁷은 전체 유방암을 대상으로 Foxp3+ Treg 세포의 종양 내 침윤 정도를 많은 군과 적은 군으로 나누어 비교하였을 때, Foxp3+ Treg 세포가 많은 군이 높은 핵과 조직등급, 높은 림프절 전이율, 짧은 무병 생존 기간에서 유의한 상관관계가 있는 것으로 보고하였다. 이들은 Foxp3+ Treg의 수가 많은 유방암은 진단으로부터 5년 이후의 늦은 재발이 많다고 보고하였으며, 종양의 크기와 림프절 전이 여부, 등급, ER 등 기존의 예후 예측 인자들은 5년 이전의 조기 재발을 예측할 수 있으나, 5년 이후의 늦은 재발은 예측할 수 없다는 점에서 Foxp3+ Treg의 침윤 정도는 유방암의 후기 재발을 예측할 수 있는 인자로서 의미가 있다고 발표하였다.

TNBC만을 대상으로 한 본 연구 역시 고침윤군이 저침윤군에 비해 유의하게 높은 핵등급과 조직등급을 보이나, 림프절 전이나 무병 생존 기간에는 각 군 간의 차이가 없었다. 본 연구는 추적 관찰 기간이 짧은 증례가 일부 포함되었기 때문에, 무병 생존 기간의 차이를 분석하는 데에는 다소 한계가 있었다. 따라서 5년 이후의 늦은 재발에 대해서는 추가적인 장기 추적 관찰과 연구가 필요할 것으로 생각한다.

Generali 등¹⁸은 이어서 aromatase 억제제인 letrozole을 수술 전 6개월간 사용한 환자들에게서 종양 내 Foxp3+ Treg이 감소했고 유

방암 조직 절제 후 조직에 남아 있는 Foxp3+ Treg의 숫자와 종양의 임상적 관해가 역 상관관계가 있으며, 치료에 반응이 좋은 환자에게서 Foxp3+ Treg이 더 많이 감소하였음을 밝혔다. 또 이를 바탕으로 aromatase 억제제가 에스트로겐 억제에 의한 효과 이외에 독립적인 Foxp3+ Treg 억제 효과를 가지며, letrozole을 호르몬 수용체 양성인 폐경 후 여성의 유방암 치료만이 아니라 Foxp3+ Treg의 침윤이 증가해 있는 종양에 대한 치료에도 사용할 수 있는 가능성이 있다고 주장하였다.

한편 Ladoire 등³⁰은 유방암 조직에서의 T림프구 침윤에 관한 연구에서 CD3 양성 T세포, CD8 양성 T세포와 Foxp3+ Treg의 침윤이 공히 나쁜 예후인자와 관련이 되며, 수술 전 항암 요법 후의 병리학적인 완전 관해는 CD3 양성 T세포, CD8 양성 T세포와는 무관하고, Foxp3+ Treg의 소실과 의미 있는 상관관계를 보여 Foxp3+ Treg의 감소가 유방암 치료의 치료반응의 예측인자가 될 수 있음을 시사하였다. 반면 Denkert 등³¹은 CD3 양성 T세포와 CD20 양성 B세포의 침윤 정도가 수술 전 보조항암요법에 대한 병리학적인 완전 관해 여부와 관련이 있으며, T세포의 관련 표지자인 CD3D, CXCL9의 RNA 발현이 병리학적인 완전 관해와 상관관계가 있음을 밝혔는데, 이 결과는 유방암에서의 항암제 치료반응의 예측이 Foxp3+ Treg의 침윤에 국한된 것이 아니라 종양침윤 림프구 전반과 관련이 있음을 시사한다.

본 연구의 결과를 토대로 보면, Foxp3+ Treg과 CD8 양성 T세포, CD4 양성 T세포의 침윤 정도가 병리학적인 지표들의 변화에 따라 서로 같은 방향으로 증감하는 경향을 볼 수 있는데, 이 결과는 TNBC의 종양면역에 Foxp3+ Treg뿐 아니라 다른 종류의 종양침윤 림프구도 함께 관여함을 간접적으로 시사하는 것이라고 볼 수 있다.

결론적으로, 유방암의 유형 중 TNBC만을 대상으로 한 본 연구에서 Foxp3+ Treg 침윤 정도는 높은 조직등급, 핵등급과 상관관계가 있었지만 병기, 재발, 사망과는 관련성이 없었다. 아울러 Foxp3+ Treg의 침윤 정도와 CD8 양성, CD4 양성 T세포의 침윤 정도가 비례하는 결과는 TNBC에서 흔히 동반되는 림프구의 종양 침윤과 그에 따른 종양면역 기전에 Treg 이외의 다른 유형의 림프구들 역시 작용할 수 있음을 보여준다.

참고문헌

1. Denkert C, Loibl S, Noske A, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 105-13.
2. Bohling SD, Allison KH. Immunosuppressive regulatory T cells are associated with aggressive breast cancer phenotypes: a potential therapeutic target. *Mod Pathol* 2008; 21: 1527-32.
3. Kuroda H, Tamaru J, Sakamoto G, Ohnishi K, Itoyama S. Immunophenotype of lymphocytic infiltration in medullary carcinoma of the breast. *Virchows Arch* 2005; 446: 10-4.

4. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406: 747-52.
5. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 10869-74.
6. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 8418-23.
7. Rakha EA, Ellis IO. Triple-negative/basal-like breast cancer: review. *Pathology* 2009; 41: 40-7.
8. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer* 2007; 109: 25-32.
9. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, *et al.* Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA* 2006; 295: 2492-502.
10. Reis-Filho JS, Tutt AN. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology* 2008; 52: 108-18.
11. Lee KK, Kim JY, Jung JH, Park JY, Park HY. Clinicopathological feature and recurrence pattern of triple negative breast cancer. *J Korean Surg Soc* 2010; 79: 14-9.
12. Lee JH, Ryu WS, Park PJ, *et al.* The survival analysis of immunohistochemically defined basal and luminal subtype of breast cancer. *J Korean Surg Soc* 2006; 70: 7-13.
13. Lee SA, Lee KE, Moon BI, Han WS, Sung SH. Metaplastic squamous carcinoma of the breast: clinicopathologic analysis of 17 cases. *Korean J Pathol* 2009; 43: 20-5.
14. Bae JY, Kim HK, Kang H, *et al.* Frequency of intrahepatic FoxP3+ regulatory T cells during the natural course of chronic hepatitis B: an immunohistochemical study using needle-biopsied liver tissue. *Korean J Pathol* 2010; 44: 132-40.
15. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, *et al.* Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004; 10: 942-9.
16. Noh SJ, Park SY, Kim KR, *et al.* The prognostic significance of the tumor-infiltrating FoxP3-positive regulatory T cells in gastric carcinoma. *Korean J Pathol* 2010; 44: 9-15.
17. Bates GJ, Fox SB, Han C, *et al.* Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol* 2006; 24: 5373-80.
18. Generali D, Bates G, Berruti A, *et al.* Immunomodulation of FOXP3+ regulatory T cells by the aromatase inhibitor letrozole in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 1046-51.
19. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155: 1151-64.
20. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 2000; 192: 303-10.
21. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299: 1057-61.
22. Jonuleit H, Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol* 2003; 171: 6323-7.
23. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1474-81.
24. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 1970; 13: 1-27.
25. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; 3: 991-8.
26. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 836-48.
27. Curiel TJ. Tregs and rethinking cancer immunotherapy. *J Clin Invest* 2007; 117: 1167-74.
28. Desar IM, Jacobs JH, Hulsbergen-Vandekaa CA, *et al.* Sorafenib reduces the percentage of tumour infiltrating regulatory T cells in renal cell carcinoma patients. *Int J Cancer* 2010 Sep 13 [Epub]. DOI: 10.1002/ijc.25674.
29. Loddenkemper C, Hoffmann C, Stanke J, *et al.* Regulatory (FOXP3+) T cells as target for immune therapy of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Cancer Sci* 2009; 100: 1112-7.
30. Ladoire S, Arnould L, Apetoh L, *et al.* Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating foxp3+ regulatory T cells. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 2413-20.