



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학박사 학위논문

35세 미만 여성에서 발생한
호르몬 수용체 양성 유방암에서의
유전자 발현 분석

**Gene expression analysis of hormone receptor
positive breast cancer under the age of 35**

2016년 2월

서울대학교 대학원

의학과 외과 전공

유 종 한

의학과 박사학위논문

35 세 미만 여성에서 발생한
호르몬 수용체 양성 유방암에서의
유전자 발현 분석

Gene expression analysis of hormone receptor
positive breast cancer under the age of 35

2016 년 2 월

서울대학교 대학원

의학과 외과전공

유 종 한

35 세 미만 여성에서 발생한
호르몬 수용체 양성 유방암에서의
유전자 발현 분석

Gene expression analysis of hormone receptor
positive breast cancer under the age of 35

지도교수 노 동 영

이 논문을 의학박사 학위논문으로 제출함
2015 년 10 월

서울대학교 대학원

의학과 외과전공

유 중 한

유중한의 박사학위논문을 인준함
2016 년 1 월

위 원 장 _____ 인

부위원장 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

초 록

35 세 미만에서의 유방암은 서양보다는 동양에서 상대적으로 빈도가 높다. 그리고 이 경우 일반적으로 예후가 나쁘며, 특히 여성호르몬 수용체 양성 유방암에서는 항호르몬치료를 받은 경우라도 다른 연령의 같은 경우에 비해 예후가 좋지 않다. 그럼에도 이러한 임상 결과에 대한 기전은 잘 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 이와 같이 나쁜 예후의 임상적 결과를 보여 주는 35 세 미만 여성호르몬 수용체 양성 유방암에서의 특징적인 유전자 발현 양상을 보고자 한다.

본 연구에서는 35 세 미만의 여성호르몬 수용체 양성 유방암 조직과 40 세 이상 폐경 전 여성에서의 여성호르몬 수용체 양성 유방암 조직을 이용하여 cDNA microarray 를 시행하였고, 이를 통해 두 군간 유의한 발현의 차이를 보이는 유전자들을 확인하고, 이들 유전자들을 이용하여 pathway analysis 를 하였다. 그리고 120 명의 유방암 조직을 이용한 whole transcriptome sequencing 을 수행하여 이로부터 얻어진 데이터에서 에스트로젠 수용체 양성 유방암 및 세포 주기와 관련된 유전자들을 선정하였다. 그 다음, 웹 기반의 프로그램 (Kaplan-Meier plotter, SurvExpress)을 통해 이 유전자들의 임상적 결과들에 대한 예측력을 오픈 소스 유전자 발현 데이터들을 이용하여 검증하였다. 최종적으로 35 세 미만의 여성호르몬 수용체 양성 유방암 조직과 그에 대응하는 40 세

이상 49 세 이하의 여성호르몬 수용체 양성 유방암 조직을 이용하여, 선정된 유전자군의 발현을 RNA sequencing 을 통해 비교 확인하였다.

cDNA microarray 결과상 세포 증식과 관련된 유전자들의 발현이 35 세 미만의 여성호르몬 수용체 양성 유방암 조직에서 높게 나왔고, 이들 유전자들을 이용한 pathway analysis 결과, 세포 주기와 관련된 pathway 가 유의하게 나타났다. 이 결과와 Whole transcriptome sequencing 결과를 이용하여 에스트로겐 수용체 양성 유방암에서 발현이 높은 상위 40 개의 유전자들과 세포 주기와 관련하여 주요한 유전자인 *CCNBI* 과 발현 상 높은 상관성을 보여준 상위 40 개의 유전자들을 선정하여 총 80 개의 유전자군을 만들었다. Kaplan-Meier plotter 와 SurvExpress 로 오픈 소스 데이터를 통해 예후 연관성에 대해 검증하였는데 Kaplan-Meier plotter 에서는 유전자군의 평균 발현으로 나눈 두 군에서 세포 주기 관련 유전자들의 발현이 높은 경우 recurrence-free survival 에 대한 Hazard ratio 가 2.66(log rank p=8.4e-11)로 나왔으며, SurvExpress 로 시행한 검증에서도 유전자군의 발현에 따른 위험도를 나눈 두 군을 4 개의 오픈 소스 데이터에서 본 결과, 유방암 환자들의 예후를 유의하게 나눌 수 있었다. 그리고 targeted RNA sequencing 결과 35 세 미만의 여성호르몬 수용체 양성 유방암 조직에서 같은 조건의 40 대에 비해 높은 발현을 보이는 세포 주기 관련 유전자들이 많았다.

정리하면 35 세 미만의 여성호르몬 수용체 양성 유방암은 그 이상 연령의 폐경 전 여성호르몬 수용체 양성 유방암에 비해 세포 주기와

관련된 유전자 발현이 높고, 이러한 특징이 임상적으로 나쁜 예후를 나타내는 원인이 될 수 있다.

주요어: 유방암, 유전자, 젊은 여성

학번: 2010-30529

List of Tables

표 1. cDNA microarray를 시행한 대상 환자군들의 임상병리학적 특징 -----	23
표 2. 35 세 미만 유방암 조직에서 발현이 높은 유전자들에 대해 DAVID 프로그램을 이용한 Pathway analysis 에서 유의한 의미를 나타낸 pathway. -----	26
표 3. 에스트로젠 수용체 양성 유방암에서 에스트로젠 수용체 음성 유방암에 비해 발현이 높은 40 개 유전자 (<i>p-value</i> 가 가장 유의한 순으로 정리) -----	29
표 3-1. 에스트로젠 수용체 양성 유방암에서 에스트로젠 수용체 음성 유방암에 비해 발현이 높은 40개 유전자들의 기능 요약 (<i>p-value</i> 가 가장 유의한 순으로 정리) -----	30
표 4. Cell cycle과 관련되어 선정된 40개 유전자와 관련 pathway 분석 (발현에 있어 <i>CCNBI</i> 과의 correlation coefficient가 높은 순으로 정리) -----	32

표 4-1. Cell cycle 과 관련되어 선정된 40 개 유전자들의 기능 요약
(발현에 있어 *CCNBI* 과의 correlation coefficient 이 높은 순으로 정리) --- 34

표 5. Targeted RNA sequencing 을 시행한 대상 환자군들의 임상병리학적
특징 ----- 41

List of Figures

그림 1. 35 세 미만의 여성호르몬 수용체 양성 유방암 환자 조직과 40 세 이상 폐경 전 여성에서의 여성호르몬 수용체 양성 유방암 환자 조직으로부터 얻은 mRNA 에 대한 microarray 의 Hierarchical clustering heatmap (YA(young age): 35 세 미만, OA(old age): 40 세 이상 폐경 전, 붉은색은 up-regulation 된 경우, 초록색은 down-regulation 된 경우) ----- 24

그림 2. cDNA microarray 결과를 이용한 Principal Component Analysis (붉은 점: 35 세 미만 환자, 회색 점: 40 세 이상 폐경 전 환자) ----- 25

그림 3. 35 세 미만 유방암 조직에서 발현이 높은 유전자들에 대해 Ingenuity Pathway Analysis 한 결과의 networks 그림과 이들 유전자들과 관련된 기능 ----- 27

그림 4. Cell cycle 관련 40 개 유전자군의 발현을 이용한 Kaplan-Meier Plotter 결과 (붉은색 선: cell cycle 관련 40 개 유전자군의 발현이 높은 군; 검정색 선: cell cycle 관련 40 개 유전자군의 발현이 낮은 군) ----- 36

그림 5. 80 개 유전자군을 이용하여 TCGA 데이터 베이스에서 SurvExpress 를 통해 분석한 여성호르몬 수용체 양성 유방암에서의 예후 결과. A) 80 개 유전자군의 발현에 따라 위험도를 두 군으로 나누는 경우(붉은색 선은 고위험군, 초록색 선은 저위험군); B) 80 개 유전자군의 발현에 따라 위험도를 세 군으로 나누는 경우(붉은색 선은 고위험군, 초록색 선은 중간위험군, 파란색 선은 저위험군) ----- 37

그림 6. 3 개의 데이터베이스를 바탕으로 SurvExpress 를 이용하여, 80 개 유전자군의 발현에 따른 위험도 분류에 의해 두 개의 군으로 나누어서 분석한 예후 결과 (A) Wang Foekens Breast GSE2034 데이터를 이용한 경우 (B) Ivshina Miller Breast GSE4922 데이터를 이용한 경우, (C) Kao Huang Breast GSE20685 데이터를 이용한 경우 (세 그래프 모두 붉은색 선은 고위험군, 초록색 선은 저위험군) ----- 39

그림 7. Targeted RNA sequencing 결과를 바탕으로 세포 주기 관련 40 개 유전자들의 35 세 미만 군과 40 세 이상 49 세 이하의 군 간 유전자 별 상대발현량 평균의 차 (mean diff.(difference) 가 0 인 경우 두 군간의 상대발현량이 같음을 의미하고 0 초과인 경우 35 세 미만 군에서 40 대 군에 비해서보다 높은 상대발현량을 가짐을 의미함) ----- 42

그림 8. Targeted RNA sequencing 결과를 바탕으로 에스트로젠 수용체 양성 유방암 관련 40 개 유전자들의 35 세 미만 군과 40 세 이상 49 세 이하의 군 간 유전자 별 상대발현량 평균의 차 (mean diff.(difference) 가 0 인 경우 두 군간의 상대발현량이 같음을 의미하고 0 초과인 경우 35 세 미만 군에서 40 세 이상 49 세 이하의 군에 비해서보다 높은 상대발현량을 가짐을 의미함) ----- 43

그림 9. Cell cycle과 관련된 유전자들의 상대발현량을 서로 상대 환자군 내에서의 발현 정도로 표현한 그림 (가로 행은 하나의 유전자를 표시하며 *CCNB1*과의 correlation coefficient가 높은 순서로 위로부터 아래로 배열되었고, 세로 행은 하나의 샘플을 나타냄. 각 cell 색의 의미: 상대발현량이 상대방 group에서 상위 몇 %에 해당하는지에 대한 의미, 붉은색계통은 55%이상인 경우, 초록색계통은 45%이하인 경우를 의미함.) ----- 45

그림 10. 에스트로젠 수용체와 관련된 유전자들의 상대발현량을 서로 상대 환자군 내에서의 발현 정도로 표현한 그림 (가로 행은 하나의 유전자를 표시하며 *p-value*가 유의하게 의미 있는 순서대로 위로부터 아래로 배열되었고, 세로 행은 하나의 샘플을 나타냄. 각 cell 색의 의미: 상대발현량이 상대방 group에서 상위 몇 %에 해당하는지에 대한 의미, 붉은색계통은 55%이상인 경우, 초록색계통은 45%이하인 경우를 의미함.) ----- 46

목 차

국문초록	-----	i
List of tables	-----	iv
List of figures	-----	vi
목 차	-----	ix

Contents

서론	-----	1
연구방법	-----	16
연구결과	-----	22
고찰	-----	47
참고문헌	-----	57
Abstract	-----	65

서 론

유방암의 현황

유방암은 현재 여성암 중에서 전세계적으로 흔하게 발생하는 암이다. 2012년에도 전세계적으로 160여만명의 새로운 환자들이 발생하였고, 유방암으로 52여만명이 사망하였다(1). 그리고 대부분의 서양인에서는 폐경 이후 여성들에서 발병이 흔하여, 미국과 같은 경우, 2008년에서 2011년 사이의 유방암에 대한 미국 국립암연구소의 SEER data에 의하면, 유방암 환자의 진단 시 중간 연령은 61세였고, 55세 이상의 폐경 후 여성이 67.4%를 차지하고 있었으며, 35세 미만의 유방암 환자는 단 1.8% 였다(2).

서양에서는 상대적으로 젊은 여성에서의 유방암 발병은 적게 나타나며, 특히, 35세 미만의 유방암 환자는 매우 드물다. 그러나 한국에서의 2012년도 국가암등록사업 연례보고서에 따르면, 40세 미만의 유방암 환자가 12.1%를 차지하고 있으며, 35세 미만은 4.4%로 보고되어 미국에 비해 젊은 연령, 특히 35세 미만의 유방암 환자가 전체 유방암 환자에서 차지하는 비율이 높았다(3).

유방암의 생존율은 조기 검진을 통한 조기 유방암의 증가와 항암제, 표적치료제, 항호르몬제, 방사선치료 등 기타 국소영역 및 전신치료의 발

전으로 점차 높아지고 있다. 한국인 유방암 환자의 생존율을 보더라도 1996년도부터 2000년도의 환자에서는 5년 생존율이 83.2% 였지만, 2008년도부터 2012년도까지의 환자에서는 5년 생존율이 91.4%로 나타났다(4). 하지만, 많은 여성암 환자들 중 유방암으로 사망하는 경우도 적지 않은데, 미국에서는 2015년도에 4만명의 유방암 사망자 수가 예측되며 이는 사망의 원인 암 중 14.0%를 차지할 것으로 예상되고 있다. 한국에서도 유방암으로 인한 사망자 수는 2014년도에 2,254명으로 전체 여성 암사망자 중 7.8%를 차지하였다(2,4).

이와 같은 암 사망과 관련하여 잘 알려진 유방암에서의 예후 인자에는 침윤성 원발암의 크기, 림프절 전이, 핵등급, 조직학적 등급, 여성호르몬 수용체 발현, HER2단백 과발현, 림프혈관침범 등과 함께 연령도 포함되며, 특히 젊은 연령은 유방암에서 나쁜 예후 인자로 알려져 있다.

35세 미만의 여성에서 발생한 유방암의 나쁜 예후

Fowble BL 등의 연구에 의하면, 35세 이하의 조기 유방암 환자들을 36세에서 50세 이하와 50세 초과와 환자들과 예후를 비교해 보았을 때, 35세 이하의 유방암 환자 수가 전체 대상 환자 980명중에 65명이었지만, 낮은 8년 무병생존율(53% vs. 67% vs. 74%, $p = 0.009$) 과 암 특이생존율

(73% vs. 84% vs. 90%, $p = 0.02$)을 보여주었고 이는 림프절 전이가 없는 경우에 유의하게 나타났다(5). 그리고 Nixon AJ 등도 35세 미만의 조기 유방암 환자들의 재발률과 전신 전이율이 그 보다 연령이 많은 환자들에 비해 높음을 발표했으며, 다변량 분석을 통해서 35세 미만의 연령은 재발에 대해 1.7배 높은 Hazard ratio와 사망에 대해 1.5배 높은 Hazard ratio를 갖는다는 것을 보여줌으로써, 35세 미만의 연령을 유방암에서 독립적인 예후인자로 분석하였다(6).

한국인 유방암 환자를 대상으로 한 연구 결과에서도, 35세 미만의 유방암은 5년간 재발률이 30.4%로 35세 이상 환자에서의 18.7%보다 높았다. 10년간의 재발률에서도 35세 미만의 경우 40.1%로 35세 이상의 28.6%보다 높게 나타났다. 따라서, 5년 생존율에서도 35세 미만은 80.0%를 보여 35세 이상에서의 88.5%에 비해 나쁜 예후를 보여주었다. 그리고 이 연구에서는 림프절 전이가 있는 경우에, 35세 미만은 낮은 무병생존율을 보여주었으며, 35세 미만의 연령은 재발과 관련한 다변량 분석에서도 Hazard ratio가 1.7 ($p = 0.01$)로 나타났다. 즉, 35세 미만의 연령이 한국인 유방암 환자에서도 독립적인 나쁜 예후인자임을 보여준 결과였다(7). 그리고 전체 한국인 유방암 데이터베이스를 이용하여 2,303명의 35세 미만 유방암 환자와 35세 이상 유방암 환자 29,369명을 대상으로 하여 분석한

연구에서도 35세 미만 환자군의 5년 무병생존율이 72.8%로 35세 이상 환자군의 86.2%에 비해 유의하게 낮게 나타났다($p < 0.001$). 그리고 다변량 분석 결과에서도 유방암 특이 생존율과 전체 생존율에 대한 Hazard ratio가 각각 1.79 ($p < 0.001$) 및 1.42($p < 0.001$)로 나타나, 35세 미만의 연령이 전체 한국인 유방암 데이터베이스에서도 유의미한 독립적인 나쁜 예후인자임을 보여주었다(8). 그리고 한 등의 연구에서 진단 시 연령과 사망에 대한 Hazard ratio의 관계를 분석한 결과에서도, 한국인 유방암 환자가 35세 이상에서는 사망에 대한 Hazard ratio가 연령 변화에 따라 유의한 변화를 보이지 않았지만, 35세 미만에서는 Hazard ratio가 높아지면서 35세 미만부터 이보다 1세씩 나이가 낮아질수록 유방암으로 인한 사망의 위험이 5%씩 증가하였다(9).

35세 미만 여성에서의 유방암에서 나쁜 예후와 관련된 임상병리 인자들

많은 연구자들이 젊은 연령의 유방암 환자들이 나쁜 예후의 결과를 갖게 되는 원인들을 찾기 위한 연구들을 하였다.

Walker 등은, 25세에서 29세, 30세에서 34세, 35세에서 39세, 40세에서 44세로 나눈 젊은 연령의 유방암 환자군의 임상병리학적인 특징을 50세에

서 67세의 유방암 환자군을 대조군으로 하여 비교 연구하였다. 그 결과 44세까지의 젊은 여성의 경우 대조군에 비해 높은 조직학적 등급을 보이는 경우가 많았는데, 특히 35세 미만의 유방암 환자군에서는 Grade 3의 조직학적 등급을 보이는 경우가 69%로 대조군의 37%에 비해 월등히 높았다. 그리고 35세 미만에서는 그 보다 높은 연령에 비해 상대적으로 여성호르몬 수용체의 발현이 낮게 나왔고 연령이 낮아질수록 세포 증식과 관련된 MIB-1 index는 높게 나타났다. 이러한 세포 증식과 관련된 MIB-1 index가 높게 나오는 경우가 24세에서 29세의 유방암 환자군에서는 72%까지 차지하여 대조군의 40%와 많은 차이를 보였다(10). 그리고 Colleoni 등의 연구에서는 35세 미만과 35세 이상부터 50세 미만으로 나누어 비교해 보았는데, 원발암의 크기나 전이된 림프절 개수에서는 유의미한 차이가 없었으나, 역시 35세 미만의 유방암에서는 의미 있게 여성호르몬 수용체 발현이 낮게 나왔고, Ki67의 발현이 높았으며, 림프혈관 침윤과 높은 조직학적 등급의 빈도가 높았다(11).

또한 35세 미만의 총 497명의 유방암 환자들만을 대상으로 하여 특징을 살펴본 연구에서는, 환자군을 연령에 따라 25세 미만과 25세에서 29세, 30세에서 34세의 3군으로 나누어 비교하여 30세보다도 더 낮은 연령까지 포함하여 보았는데, 연령이 가장 낮은 환자군인 25세 미만의 유방

암이 30에서 34세의 유방암 보다 통계적으로 유의하게 원발암의 크기가 크고, 조직학적으로 등급이 나쁜 경향을 많이 보였고, Ki67의 발현도 높게 나타났다. 하지만 35세 미만 유방암 환자들만의 비교에서 여성호르몬 수용체 발현 유무의 차이는 의미 있게 나타나지 않았다(12). 앞서 언급한 전체 한국인 유방암 데이터베이스를 이용한 연구에서도 35세 미만의 유방암 환자군은 35세 이상의 유방암 환자군에 비해 원발암의 크기가 컸고, 림프절 전이가 있는 경우가 높았으며, 높은 핵등급 및 조직학적 등급을 가지고 있으면서 Ki67의 발현이 높았고, 여성호르몬 수용체 발현이 적은 특징을 보여주었다. 즉 35세 미만의 유방암 환자들은 나쁜 예후와 관련된 임상병리학적 인자들을 35세 이상의 유방암 환자군에 비해 많이 가지고 있었고, 이로 인해 낮은 생존율을 보였다고 설명하였다(8). 같은 아시아권인 중국인을 대상으로 한 연구에서도 35세 미만의 유방암은 35세 이상의 유방암과 비교 시 원발암의 크기가 큰 경우와 여성호르몬 수용체 음성의 경우가 유의하게 많았으며 일반적으로 예후가 나쁜 HER2단백 과 발현 아형과 삼중음성 아형의 비율이 각각 22% 와 27.1%로 나와 35세 이상에서의 17%와 20.1%보다 높았고, 그와 일치하게도 35세 미만의 유방암은 의미 있게 낮은 무병생존율과 전체생존율을 보여주었다(13).

따라서 기존의 연구 결과들을 정리해 보면, 35세 미만의 유방암은 일반

적으로 원발암의 크기가 크고, 림프절 전이를 동반하는 경우도 많으면서, 높은 조직학적 등급을 가지고, 여성 호르몬 수용체가 음성인 경우 등의 나쁜 예후 인자로 알려진 임상병리학적 특징을 가지고 있기 때문에, 그보다 연령이 높은 유방암과 비교 시 높은 재발률과 낮은 생존율을 갖는 것으로 설명할 수 있다.

35세 미만 여성에서의 여성호르몬 수용체 양성 유방암의 나쁜 예후

앞서의 연구 결과들에 의해, 35세 미만의 연령에서 발생한 유방암일수록, 여성호르몬 수용체 음성의 아형이 많아 나쁜 예후를 보이는 원인이 될 수 있음을 설명하였지만, 한편으로 좋은 예후를 일반적으로 보여주는 여성호르몬 수용체 양성 유방암에 대한 연구들에서도 젊은 연령에서 발생한 경우에는 수술 후 같은 항호르몬치료를 받음에도 재발률이 상대적으로 높고 생존율도 상대적으로 나쁜 결과들이 나타났다.

The International Breast Cancer Study Group의 폐경 전 여성의 유방암을 대상으로 보조적 항암제 치료에 대한 임상시험의 결과 분석에 의하면, 10년 전체생존율이 35세 미만의 환자들은 49%로 35세 이상의 환자들의 62%보다 유의하게 낮았는데, 여성호르몬 수용체 음성의 환자군에서는

각각 45%와 46%로 비슷한 결과였으나 여성호르몬 수용체 양성인 환자군에서는 각각 25%와 47%로 나타나 35세 미만의 환자군에서 나쁜 예후를 보여주었다(14,15). 비록 항호르몬치료가 포함이 되지 않은 임상시험이었지만, 같은 항암제에 대한 치료 결과에서 여성호르몬 수용체 양성인 유방암에서만 35세 미만의 연령이 나쁜 생존율과 관련이 있음을 보여주는 결과였다.

그리고 한국유방암학회의 한국인 유방암 데이터베이스를 바탕으로, 여성호르몬 수용체 양성인 폐경 전 유방암에 대해 연령에 따른 생존율의 차이를 비교한 연구에서도, 35세 미만의 유방암 환자군에서는 여성호르몬 수용체 양성인 경우, 35세 이상 50세까지의 유방암 환자군에 비해 전체생존율이 나빴으며 (Hazard ratio = 2.3, $p < 0.001$), 특히 항호르몬치료를 한 경우에도 전체생존율이 나빴다(Hazard ratio = 2.6, $p < 0.001$). 또한 35세 이상 50세까지의 유방암 환자들은 항암제 치료 이후 항호르몬치료의 추가가 생존율의 증가를 유의하게 보여주었으나, 35세 미만의 유방암 환자들에서는 항호르몬치료의 추가가 유의한 생존율 증가를 보여주지 못했다(16). 즉 35세 미만의 여성에서 발생한 여성호르몬 수용체 양성 유방암은 그보다 높은 연령의 같은 폐경 전 여성의 여성호르몬 수용체 양성 유방암에 비해 나쁜 예후를 보여주었으며, 항호르몬치료에 대한 반응도 낮음

을 보여주었다.

특히, 에스트로젠 수용체 발현을 cDNA microarray를 바탕으로 측정한 연구 결과, 여성호르몬 수용체 양성의 유방암을 의미하는 에스트로젠 수용체의 유전자 발현이 높은 유방암에서는 세포 증식과 관련된 유전자들의 발현이 높아서 나쁜 예후를 가지는 군으로 분류가 된 경우 10년 metastasis-free probability가 24%로 세포 증식과 관련된 유전자들의 발현이 낮아서 좋은 예후를 가지는 군으로 분류된 경우의 85%에 비해 매우 높게 나왔고, 그에 따른 10년 전체생존율도 나쁜 예후의 환자군에서는 46%, 좋은 예후의 환자군에서는 96%를 보여 세포 증식과 관련된 유전자의 높은 발현은 에스트로젠 수용체 양성 유방암에서 예후와 밀접한 관련을 가지고 있음을 보여주었다(17). 그리고 qRT-PCR에 따른 유방암 아형을 연구한 결과에서도 *ESR1* 발현이 상대적으로 높은 luminal subtype에서 세포 증식과 관련된 유전자 발현이 높은 경우에 세포 증식과 관련된 유전자 발현이 낮은 경우와 비교 시 재발과 관련된 위험도가 19배 높게 나타나, 역시 에스트로젠 수용체 양성 유방암에서는 HER2-enriched subtype이나 basal-like subtype에 비해 세포 증식이 높게 되면, 의미 있게 나쁜 예후를 보여주는 것을 알 수 있었다(18).

또한, 실제 Tamoxifen치료를 받은 에스트로젠 수용체 양성 유방암을

대상으로 하여 21개 유전자를 바탕으로 한 Oncotype Dx[®] Breast assay에서 Recurrence Score를 측정하고 이를 연령대별로 비교한 연구를 살펴보면, 나쁜 예후와 관련이 높은 high score가 나온 경우가 40세 미만에서는 55.9%를 차지하였는데, 40세 이상 50세 미만에서는 29.6%, 50세 이상 60세 미만에서는 25.4%, 60세 이상에서는 21.3%로 나타나 연령이 낮을수록 나쁜 예후를 보여주는 high risk의 높은 Recurrence Score를 나타내는 경우가 많았다(19). Recurrence Score와 관련한 유전자들 중, 세포 증식과 관련된 유전자들의 발현 정도가 Recurrence Score에 많은 영향을 주게 되기 때문에, 젊은 연령의 유방암일수록 세포 증식과 관련된 유전자들의 발현이 높은 것이 위와 같은 결과를 나타냈을 것이다. 따라서 젊은 여성 유방암에서는 여성호르몬 수용체 양성 유방암이어도 세포 증식이 높아서 좀더 예후가 나쁜 luminal-B subtype이 차지 하는 비중이 높다는 의미가 될 수 있다. 실제 Cancell 등의 연구에서는 Ki67의 발현이 14% 초과 혹은 HER2단백 과발현이 있는 여성호르몬 수용체 양성 luminal-B subtype으로 고려할 수 있는 경우가 35세 미만의 여성호르몬 수용체 양성 유방암에서 90%까지 차지했다고 보고하였다(12). 다른 연구들에서도 luminal-B subtype으로 고려될 수 있는 경우가 40세 이하에서는 51%~ 61%까지 나타났다고 보고하였다(20-22).

젊은 여성 유방암의 분자 생물학적 특징

예후와 관련된 임상병리학적인 인자들을 규명하는 연구 외에 최근에는 분자생물학적인 접근법의 비약적인 발달로 암 조직으로부터 DNA 혹은 RNA를 얻어 그 정보들을 분석하는 것이 훨씬 용이해졌다. 아직은 젊은 여성 유방암에 국한시켜 발표한 연구 결과가 아주 드물지만, 위와 같은 방법들을 기반으로 하여 젊은 여성 유방암의 특징을 규명하고자 하는 연구들이 있었다.

Azim 등은 2012년 발표한 연구에서 유방암 환자를 40세 이하, 41세에서 52세, 53세에서 64세, 65세 이상의 연령 기준으로 나누어 분류하고 각 군의 유방암 조직으로부터 mRNA를 추출하여, 기존의 발표된 연구 결과들로부터 도출한 16개의 유전자와 유전자군들의 발현을 각 군간에 비교 분석하였다. 그 결과 12개의 유전자와 유전자군이 40세 이하 유방암군에서 의미 있게 나타났는데, 5개의 유전자(*c-kit*, *RANKL*, *BRCA1*, *PDPK1*, *MAPK*)와 4개의 유전자군(luminal progenitor geneset, mammary stem cell geneset, *BRCA1* mutant geneset, *PIK3CA* geneset)이 40세 이하의 군에서 의미 있게 높은 발현을 보였다. 그리고 주로 apoptosis와 관련된 *FAS*, *CASP3*, *BAD* 유전자는 40세 이하에서 발현이 감소된 양상을 보여주었다(22). 또한 2015년에 발표된 Azim의 연구에서는 유방암군을 각각 45세 이하, 46

세에서 69세, 70세 이상으로 분류하여 분석한 결과, somatic mutation에서는 *GATA3*의 돌연변이가 45세 이하에서 유의하게 자주 나왔고, somatic Copy Number Variation에서는 암의 공격적인 면과 관련이 있다고 알려진 변이인 chromosome 6q24의 deletion이 45세 이하에서 유의하게 나타났다. 같은 연구에서 시행한 transcriptome profile에서는 주로 proliferation, stem cell 및 endocrine resistance와 관련된 유전자들의 발현이 연령이 낮을수록 높게 나왔다(23).

한편 Johnson 등이 2015년 발표한 연구에서는 40세 미만과 40세 이상의 유방암으로 분류하여 각 군의 조직으로부터 mRNA를 추출한 후, 기 발표된 연구 결과들에서 선정된 17개의 유전자에 대한 cDNA microarray 결과를 보았고, 분석 결과 *BUB1*, *KRT5*, *MYCN*의 유전자들이 40세 미만에서는 발현이 높았고, *CXCL12*는 낮은 발현을 보였다. 그리고 유전자발현들에 따른 무병생존율을 분석한 결과, 모든 아형에서 *ANGPTL4*, *KRT5*, *KRT6A*, *KRT6B*, *MYBL2*, *VEGFA*의 발현이 높으면 40세 미만에서의 무병생존율에 대한 Hazard ration가 1 이상으로 높게 나타나 나쁜 예후와 관련이 있는 것으로 나타났다. 특히 basal-like subtype에서는 *ANGPTL4*의 발현이, HER2-enriched subtype에서는 *KRT5*, *KRT6A*, *KRT6B*, *MYBL2*, *SNAI1*의 발현이 높은 경우에 나쁜 무병생존율을 보여주었다(24).

그러나 위와 같은 방법으로 수행된 연구 결과들은 서양의 유방암 환자만을 대상으로 한 것이었고, 젊은 연령의 기준과 비교가 되는 군들도 각기 달라서 40세 미만, 45세 이하의 유방암 환자들의 조직을 이후의 다양한 연령대의 유방암 조직과 비교하여 나온 결과들이었으며, 대부분 세포 증식과 관련된 유전자들이 젊은 연령에서 돌연변이 내지는 발현의 정도가 달리 나타나서, 이러한 특징이 임상적인 나쁜 예후와도 관련이 있을 것으로 추정하였다. 하지만 몇 사례가 되지 않는 연구 결과에서도 연구마다 각기 다른 유전자들의 돌연변이나 발현들이 발표되었기 때문에, 아직 젊은 연령의 유방암에서는 유전자 돌연변이 및 발현 수준에서의 생물학적인 특징을 규정할 수는 없는 상태이다. 그리고 이러한 genomic data를 기반으로 하여, 특히 35세 미만의 젊은 한국인 유방암 환자에 대한 특징을 보고한 연구 결과는 현재까지 거의 없는 상태이다.

본 연구의 목적

앞서 기술한 대로, 젊은 여성 유방암은 우리나라 및 아시아에서 그 발생 빈도가 높고 유방암의 임상병리적인 특징도 다르며 나쁜 예후를 가지고 있다. 하지만 여전히 젊은 연령에 대한 기준은 연구마다 다르게 정의되고 있다. 앞서 기술한 대로 대부분 서양의 연구에서는 젊은 연령을 폐

경 전 또는 45세, 혹은 40세 이하를 기준으로 연구가 이루어졌는데, 이는 젊은 연령에서의 유방암 발생률이 낮기 때문일 것이다. 그럼에도 앞서 살펴 본, 서양의 유방암 환자들에 대해 35세 미만 환자들을 대상으로 한 연구들에서는 그 보다 연령이 많은 유방암 환자들에 비해 낮은 무병생존율과 전체생존율을 보여주었다(5,6). 그리고 한국인 유방암을 대상으로 한 연구에서도, 35세 미만에서 예후와 관련해서 그보다 높은 연령대에 비해 나쁜 예후를 보였으며, 35세 미만에서는 유방암 사망에 대한 위험도가 연령이 낮아져도 1.5배 이상으로 계속 유지되었고, 35세 이상부터 감소하기 시작하여, 폐경 전까지의 40대에서는 비슷한 정도의 유방암 사망 위험도를 보여주었다(9).

그리고 전체 한국인 여성 유방암 환자 대상의 결과에서도 35세 미만인 경우, 특히 여성호르몬 수용체 양성 유방암에서는 항호르몬치료에도 불구하고 나쁜 예후를 명확하게 보여주고 있었다. 따라서 본 연구에서는 그러한 임상적인 결과와 결부하여 그 기전을 규명하고자 하였기에, 예후가 나쁜 35세 미만을 기준으로 하여 상대적으로 예후가 좋으며 같은 종류의 항호르몬치료를 받는 40대의 폐경 전, 여성호르몬 수용체 양성 유방암과 비교하여 분자생물학적인 특징을 밝히고자 하였다. 다시 말하자면, 아직까지 한국인 여성의 유방암 조직으로부터의 연구 결과가 없고,

임상적으로 나쁜 예후를 보이는 35세 미만에서 발생한 여성호르몬 수용체 양성 유방암의 분자생물학적인 특징을 40대의 여성호르몬 수용체 양성 유방암과 유전자발현의 비교 분석을 통해 규명하고자 하였다.

연구 방법

cDNA microarray

35세 미만의 여성호르몬 수용체 양성 유방암의 신선동결조직(N=21)과 40세 이상 폐경 전의 여성호르몬 수용체 양성 유방암의 신선동결조직 (N=33)으로부터 mRNA를 표준적인 방법으로 추출하였다. 조직은 수술 시 제거된 직후 영하 80도 하의 액체 질소 보관함에 보관되었다.

모든 대상 조직은 50% 이상의 유방암세포들을 포함함을 확인하였다. 여성호르몬 수용체 유무는 면역조직화학염색법을 통해 확인하였고 HER2 단백 과발현 또는 *HER2*유전자 증폭은 면역조직화학염색법 결과상 3+이거나 결과상 2+이면서 형광제자리부합법 결과상 양성으로 판정된 경우로 정하였다. 상기의 두 군은 HER2단백 과발현 또는 *HER2*유전자 증폭과 조직학적 등급으로 동일하게 분배되도록 선정하였다. RNA는 RNAeasy Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) 를 이용하여 추출하였고 RNA 처리, 분리, 전사 및 hybridization 은 표준적으로 수행되었다. Gene expression microarray 실험은 Illumina HumanRef-8 v3 Expression BeadChip (Illumina, Inc., San Diego, CA)을 이용하여 54개의 조직샘플을 대상으로 수행되었다. 두 군간 발현의 차이가 나는 유전자들은 SAM software (Significance Analysis

of Microarrays)을 이용하여 확인하였고, 주요한 pathway를 찾기 위해 DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>)와 Ingenuity pathway analysis (IPA, <http://www.ingenuity.com>)을 통해 발현의 차이를 보이는 유전자들을 이용하여 경로 분석을 하였다.

Whole transcriptome sequencing

120명의 유방암 환자의 신선조직으로부터 RNA를 추출하였고 전체 transcriptome을 차세대염기서열기술(Illumina HiSeq 2000)을 이용하여 sequencing하였다. 이들 data로부터 에스트로젠 수용체 양성인 유방암과 에스트로젠 수용체 음성인 유방암에서의 유전자 발현차이를 FPKM (fragments per kilobase per million reads) 값으로 비교하여 Fold change가 2배 초과인 경우이면서 Benjamini-Hochberg p-value가 유의한 값 순으로 상위 40개를 선정하였다. 그리고 cell cycle과 관련된 유전자를 발굴하기 위해 대표적인 cell cycle 관련 유전자인 *CCNBI*과의 발현상 상관성을 분석하여 correlation-coefficient가 가장 높은 유전자 상위 40개를 선정하였다. 그리고 선정된 유전자들에 대한 pathway 분석을 통해 상위 40개의 유전자에 대해 세포 주기, 세포 분열 등과의 기능적 관련성을 확인하였다.

In silico validation

기 발표된 유전자 발현 데이터를 이용하여 예후 연관성을 분석하는 web 기반의 도구인 Kaplan-Meier Plotter(kmplot.com)를 이용하였다. Kaplan-Meier Plotter는 생존자료가 연결되어 있는 1,809명의 유방암 환자와 그 암조직으로 Affymetrix HGU133A 와 HGU133+2 microarrays를 이용하여 획득한 22,277 개의 유전자 발현 정보가 있는 데이터베이스를 바탕으로 한 것으로 생존자료는 중위 무병 재발 생존율이 6.43년이다(25). 그리고 이 후에 계속 관련 데이터가 보충되고 있다. 이 데이터베이스를 이용하여, *CCNBI*과 발현상 상관성이 가장 높았던 상위 40개 유전자군의 평균 발현 정도를 바탕으로 두 군으로 나누고 각군의 예후를 비교하였다.

그리고 다른 web 기반의 도구로서 기 발표된 여러 암들에 대한 유전자 발현과 임상 정보를 바탕으로 다양한 데이터베이스를 이용하여 유전자 발현에 따른 위험도를 기준으로 분류하고, 각 군들의 예후 차이를 보여 주는 프로그램인 SurvExpress (<http://bioinformatica.mty.itesm.mx>)도 이용하였다(26). 그리고 이 프로그램을 이용하여 TCGA 데이터, Kao Huang Breast GSE20685, Ivshina Miller Breast GSE4922 및 Wang Foekens Breast GSE2034, 총 4개의 데이터베이스에서 80개 유전자군의 예후 예측력을 분석하였다.

Targeted RNA sequencing

35세 미만의 여성호르몬 수용체 양성, HER2단백 과발현이 없는 유방암의 신선동결조직(N=32)과 40세 이상 49세 이하의 여성호르몬 수용체 양성, HER2단백 과발현이 없는 유방암의 신선동결조직(N=28)으로부터 mRNA를 표준적인 방법으로 추출하였다. 조직은 수술 시 제거된 직후 영하 80도하의 액체 질소 보관함에 보관되었다.

준비된 RNA 와 Probe master mix 를 혼합하여 thermal cycler (C1000 Touch, Bio-RAD) 에서 반응시켰다. 반응이 끝난 후, RNase H Digestion master mix 를 추가하여 thermal cycler 37°C 에서 30 min 동안 반응 시켰으며, DNase I Digestion master mix 를 추가하여 thermal cycler 37°C 에서 30 min 동안 반응시킨 후 RNA sample 과 Agencourt RNAClean XP (Beckman Coulter, Inc., Cat. #A63987) Beads를 섞어 정제하였다. Purified mRNA (50-250 ng)에 mRNA Fragmentation mix 를 혼합하여 94°C 에서 5 min 동안 반응시킨 후, RNA Fragmentation Stop solution을 넣었다. 여기에 Ethanol 을 추가한 후 -80°C 에서 60 min 동안 반응시키고 정제하였다. 정제한 mRNA 에 First Strand cDNA mater mix 를 혼합하여 반응시키고, First Strand cDNA 에 Second Strand cDNA mater mix 를 넣고 16°C 에서 2.5 hours 반응시킨 후, MagBead (TopQ XSEP MagBead, Celemics) 를 사용하여 double-stranded

cDNA 를 정제하였다. 이렇게 정제된 double-stranded cDNA 에 End Repair mater mix 를 혼합하여 20℃ 에서 30 min 동안 반응시켰다. MagBead를 사용하여 end-repaired cDNA 를 정제한 후, 정제된 end-repaired cDNA에 dA-Tailing mater mix 를 혼합하여 37℃ 에서 30 min 동안 반응시키고, 이후 MagBead를 사용하여 dA-Tailed cDNA 를 정제하였다. dA-Tailed cDNA에 Adaptor Ligation mater mix 를 혼합하여 room temperature 에서 15 min 동안 반응시키고 MagBead를 사용하여 Adaptor ligated cDNA 를 정제하였으며, Adaptor ligated DNA에 대해 MagBead를 이용하여 180~200bp 로 size selection 하였다. Size Selected cDNA와 PCR mater mix를 혼합하여 DNA를 증폭시킨 후, MagBead를 사용하여 PCR product를 정제하였고, 2200 Tapestation (Agilent)를 이용하여 만들어진 cDNA library의 size peak (270~290 bp)를 확인하였다. Target enrichment를 위해 Celeomics target enrichment panel Probe를 이용하여 capture준비를 하였다. cDNA product를 3.4 µl 안에 100ng 준비하여 target capture probe를 이용하여 thermal cycler, 65℃ 에서 24 hours 동안 반응시킨 후 T1 bead (Dynabeads MyOne Streptavidin T1, Life Technologies)로 capture하였다. Capture한 DNA와 PCR mater mix를 혼합하여 DNA를 증폭시키고, MagBead를 사용하여 증폭시킨 PCR product를 정제하였다. 2200 Tapestation(Agilent)를 이용하여 만들어진

target captured library를 QC 하였다.

Raw FASTQ는 tophat2 2.0.13 버전을 이용하여 hg19에 refseq gene 정보를 사용해서 align 한 후 cufflinks 2.2.1 버전으로 hg19 refseq gene 정보를 이용하여 FPKM을 계산하였다. 그리고 coverage 분석은 RSeQC-2.6.1 버전을 이용해서 분석하였다. 이번 분석에서는 housekeeping gene (*ACTB*, *GAPDH*, *GUSB*, *RPLPO*, *TFRC*)중 본 분석 결과상 가장 변이가 적었던 *TFRC* 유전자를 기준으로 하여 FPKM을 계산하였다.

본 연구는 대상환자로부터 조직 및 임상정보에 대한 사용에 대해 동의서를 받았으며, 서울대학교병원과 서울아산병원의 유방암 환자로부터의 조직을 이용하여 수행된 연구로 각각의 기관별 임상연구심의위원회의 승인을 받았다(IRB No.1410-150-623, IRB No.2014-0931)

연구 결과

Analysis of cDNA microarray

cDNA microarray에는 21명의 35세 미만의 여성호르몬 수용체 양성 유방암 환자의 조직과 33명의 40세 이상 폐경 전의 여성호르몬 수용체 양성 유방암 환자의 조직을 이용하였는데, 원발암의 크기, 림프절 침범 유무, HER2단백 발현의 정도, 핵등급 및 조직학적 등급과 Ki67 발현 정도 등의 임상병리학적 특징들을 비교했을 시, 두 군간에는 유의한 차이를 보이지 않았다(표 1)

cDNA microarray 결과에서는 35세 미만 환자들의 여성호르몬 수용체 양성 유방암 조직에서 40세 이상 폐경 전 환자들의 여성호르몬 수용체 양성 유방암 조직에 비해 355 genes 이 up-regulation (>1.5 fold) 되었고 209 genes 이 down-regulation 되어 있었다(그림 1). 이러한 microarray결과를 이용하여 본 실험에서의 35세 미만 환자군과 40세 이상 폐경 전 환자군에 대해 Principal Component Analysis를 시행한 결과, 이러한 gene들 발현의 차이는 두 군을 대비할 수 있는 수준의 결과였다(그림 2).

표 1. cDNA microarray를 시행한 대상 환자군들의 임상병리학적 특징

	35세 미만 (N=21)		40세 이상 폐경전 (N=33)		<i>p-value</i>	
	N	%	N	%		
T stage						
	1	5	23.8	3	9.1	0.426
	2	11	52.4	24	72.7	
	3	4	19	4	12.1	
	4	0	0	1	3	
	unknown	1	4.8	1	3	
N stage						
	0	6	28.6	14	42.4	0.718
	1	10	47.6	11	33.3	
	2	2	9.5	3	9.1	
	3	3	14.3	5	15.2	
Nuclear grade						
	1	0	0	3	9.1	0.186
	2	14	66.7	13	39.4	
	3	6	28.6	14	42.4	
	unknown	1	4.8	3	9.1	
Histologic grade						
	1	0	0	3	9.1	0.159
	2	12	57.1	11	33.3	
	3	6	28.6	16	48.5	
	unknown	3	14.3	3	9.1	
HER2 IHC						
	0	8	38.1	11	33.3	0.805
	1+	4	19	7	21.2	
	2+	7	33.3	9	27.3	
	3+	1	4.8	1	3	
	unknown	1	4.8	5	15.2	
Ki67						
	<14%	19	90.5	28	84.8	0.548
	≥14%	2	9.5	5	15.2	

(HER2 IHC: HER2단백에 대한 면역조직화학염색법)

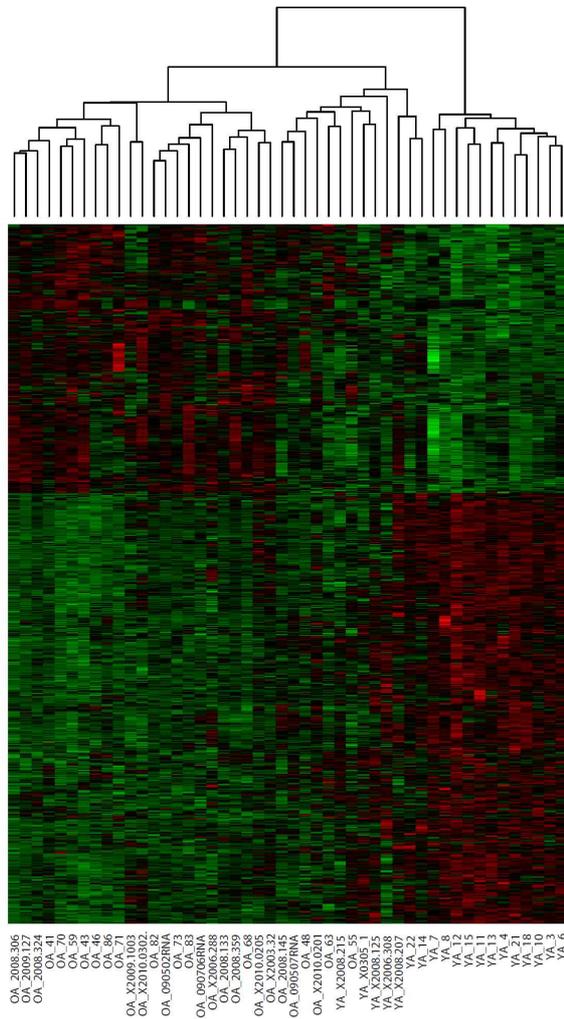


그림 1. 35세 미만의 여성호르몬 수용체 양성 유방암 환자 조직과 40세 이상 폐경 전 여성에서의 여성호르몬 수용체 양성 유방암 환자 조직으로부터 얻은 mRNA에 대한 microarray의 Hierarchical clustering heatmap. (YA(young age): 35세 미만, OA(old age): 40세 이상 폐경 전, 붉은색은 up-regulation된 경우, 초록색은 down-regulation된 경우)

Young Age (Red) vs. Old Age (gray) PCA

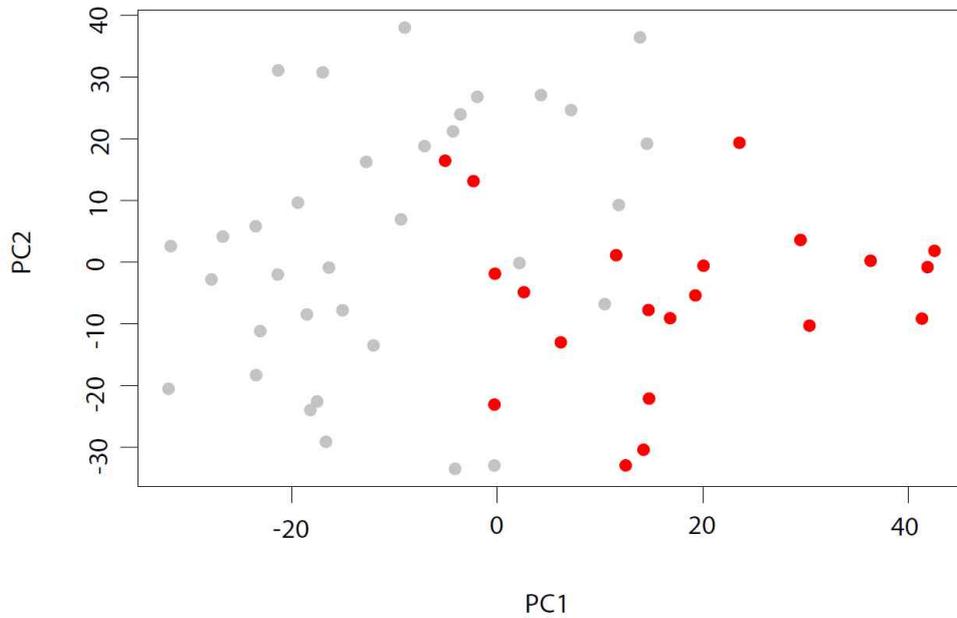


그림 2. cDNA microarray결과를 이용한 Principal Component Analysis (붉은 점: 35세 미만 환자, 회색 점: 40세 이상 폐경 전 환자)

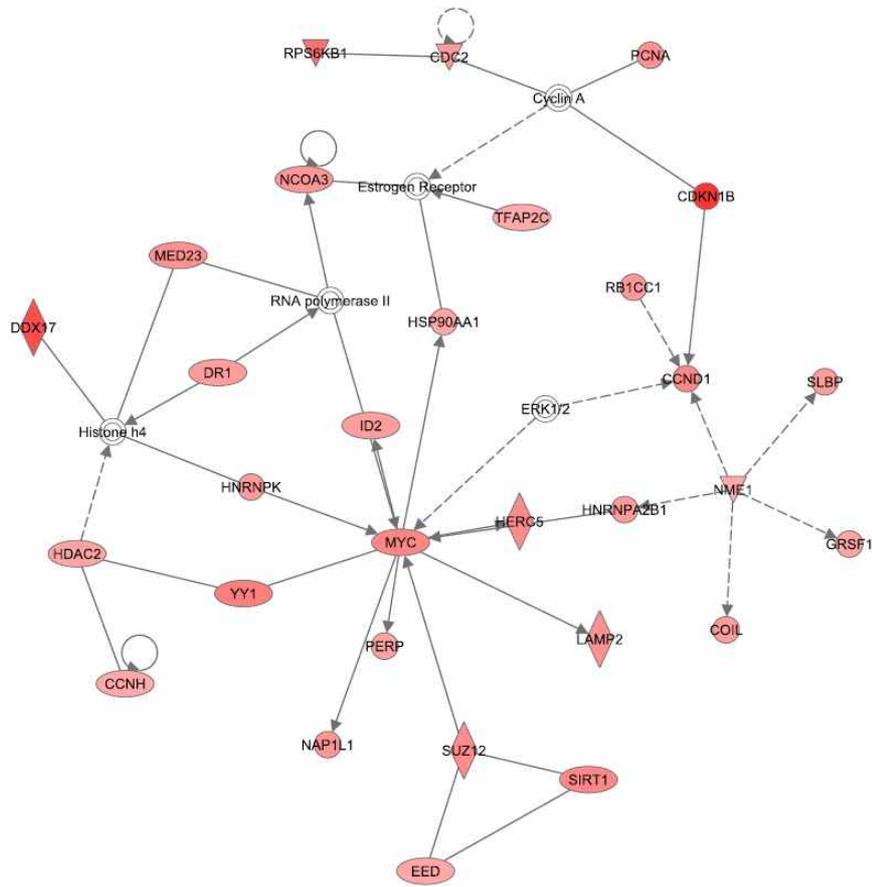
따라서 35세 미만의 유방암 조직에서 발현이 높았던 유전자들을 이용하여 pathway analysis를 시행하여 보았는데, DAVID를 이용한 pathway 분석에서는 cell cycle과 ubiquitin mediated proteolysis와 관련된 pathway가 유의하게 나왔다(표 2).

표 2. 35세 미만 유방암 조직에서 발현이 높은 유전자들에 대해 DAVID 프로그램을 이용한 Pathway analysis 에서 유의한 의미를 나타낸 pathway.

Category	Term	P-Value
KEGG_PATHWAY	Cell cycle	0.0149
KEGG_PATHWAY	Ubiquitin mediated proteolysis	0.0235

그리고 ingenuity pathway analysis에서는 35세 미만의 유방암 조직으로부터 얻어진 up-regulated gene들은 주로 cell cycle, cellular development 및 cellular growth 와 proliferation 과 관련된 기능을 가진 pathway에 있으며, 유의하게 활성화되어 있었다(그림 3).

두 pathway 분석 결과를 고려하면, 35세 미만의 에스트로젠 호르몬 수용체 양성 유방암에서는 cell cycle pathway 상의 유전자들이 40세 이상 폐경 전 여성에서의 같은 조건의 유방암보다 높게 발현되어 있음을 알 수 있었다.



Molecular and Cellular Functions

Name	p-value	# Molecules
Cell Cycle	2.90E-05 - 1.71E-02	23
Cellular Development	7.40E-05 - 1.72E-02	25
Cellular Growth and Proliferation	7.82E-05 - 1.66E-02	28
Cell Morphology	1.39E-04 - 1.69E-02	17
RNA Post-Transcriptional Modification	2.64E-04 - 2.64E-04	6

그림 3. 35세 미만 유방암 조직에서 발현이 높은 유전자들에 대해 Ingenuity

Pathway Analysis 한 결과의 networks 그림과 이들 유전자들과 관련된 기능

Selection of genes by whole transcriptome sequencing data

120명 유방암 환자의 조직으로부터 얻은 whole transcriptome sequencing 데이터로부터 에스트로젠 수용체 양성인 유방암과 음성인 유방암으로 나누어, 두 군 간의 유전자 발현 차이를 분석하여 에스트로젠 수용체 양성 유방암에서 발현이 가장 유의하게 높게 나온 40개의 유전자를 선정하였다(RNA-seq data의 FPKM값 비교 및 fold change>2.0, Benjamini-Hochberg *p-value* 유의순). 유전자에 따른 단백질의 간단한 기능을 요약하였으나 *DNAL11*, *C6orf211*, *TPRG1* 은 명확하게 그 기능이 밝혀져 있지 않았다(표 3, 표 3-1).

표 3. 에스트로젠 수용체 양성 유방암에서 에스트로젠 수용체 음성 유방암에 비해 발현이 높은 40개 유전자 (*p-value* 가 가장 유의한 순으로 정리)

Gene	Fold change	bh.p value	Gene	Fold change	bh.p value
ESR1	8.613048	5.64E-12	ZNF552	2.456377	1.25E-05
AGR3	16.64908	3.81E-10	NAT1	3.968839	2.83E-05
TBC1D9	4.032516	4.91E-10	FAM134B	2.123584	2.83E-05
DNAJC12	4.980084	5.20E-08	MAGED2	3.559443	3.30E-05
ANXA9	3.25019	6.74E-07	CLSTN2	2.309303	4.12E-05
NKAIN1	3.093068	8.52E-07	BCAM	2.826416	4.45E-05
SUSD3	3.768186	1.14E-06	ACADSB	2.447808	4.65E-05
PARD6B	2.610353	1.14E-06	FSIP1	2.248298	4.65E-05
RERG	3.495378	1.89E-06	BMPR1B	4.348326	4.71E-05
BCAS4	2.349927	1.90E-06	MYB	2.550959	8.87E-05
DNALI1	3.6221	1.91E-06	DOK7	2.04176	9.06E-05
GATA3	4.424286	2.02E-06	RIMS4	2.114063	1.05E-04
CA12	5.613585	2.28E-06	XBP1	2.270703	1.14E-04
SLC39A6	3.868733	2.29E-06	LMX1B	2.069978	1.15E-04
C6orf211	2.816403	2.29E-06	AFF3	2.348905	1.24E-04
TFF1	10.64851	4.32E-06	DACH1	2.115944	1.25E-04
BNIP1	2.411877	5.02E-06	SIGIRR	2.058825	1.25E-04
TCEAL1	2.45499	6.44E-06	TPRG1	2.123778	1.62E-04
SLC7A8	2.946641	6.60E-06	C19orf21	2.054524	2.03E-04
TFF3	7.035883	1.16E-05	GREB1	3.0651	2.41E-04

표 3-1. 에스트로젠 수용체 양성 유방암에서 에스트로젠 수용체 음성 유방암에 비해 발현이 높은 40개 유전자들의 기능 요약 (*p-value* 가 가장 유의한 순으로 정리)

Gene	Location	Function
ESR1	6q25.1	estrogen receptor
AGR3	7p21.1	related with differentiation and metastasis genes in ER(+) breast cancer
TBC1D9	4q31.21	associated with a shorter progression-free survival and all survival in gastric cancer
DNAJC12	10q22.1	associated with complex assembly, protein folding, and export
ANXA9	1q21	family of calcium-dependent phospholipid-binding proteins
NKAIN1	1p35.2	associated with alcohol dependence in subjects of European descent.
SUSD3	9q22.31	promoter of estrogen-dependent cell proliferation/regulator of migration in breast cancer
PARD6B	20q13.13	involved in asymmetrical cell division
RERG	12p12.3	inhibits cell proliferation and tumor formation
BCAS4	20q13.13	amplification, overexpression, and fusion in breast cancer.
DNAL1	1p35.1	<i>The precise function of this gene is not known</i>
GATA3	10p15	important regulator of T-cell development/ important role in endothelial cell biology
CA12	15q22	participate in respiration, calcification, acid-base balance, bone resorption, et al.
SLC39A6	18q12.2	involved in protein, nucleic acid, carbohydrate, and lipid metabolism
C6orf211	3	<i>The precise function of this gene is not known</i>
TFF1	21q22.3	protect the mucosa from insults, stabilize the mucus layer, and affect healing of the epithelium
BNIP1	1q21.3	function as a bridge molecule between BCL2 and ARHGAP1/CDC42 in promoting cell death
TCEAL1	Xq22.1	function as nuclear phosphoproteins that modulate transcription in a promoter context-dependent manner
SLC7A8	14q11.2	SLC7A8 and CD98 were reduced in fetal cortex at different gestational ages
TFF3	21q22.3	protect the mucosa from insults, stabilize the mucus layer, and affect healing of the epithelium
ZNF552	19q13.43	overexpression of ZNF552 in the COS-7 cells inhibited the transcriptional activities of AP-1 and SRE
NAT1	8p22	transfer of an acetyl group from acetyl-CoA to various arylamine and hydrazine substrates
FAM134B	5p15.1	necessary for the long-term survival of nociceptive and autonomic ganglion neurons
MAGED2	Xp11.2	involved in several types of cancer, including breast cancer and melanoma
CLSTN2	3q23	Interactive effects of KIBRA and CLSTN2 polymorphisms on episodic memory in old-age unipolar depression
BCAM	19q13.2	play a role in epithelial cell cancer and in vaso-occlusion of red blood cells in sickle cell disease
ACADSB	10q26.13	catalyze the dehydrogenation of acyl-CoA derivatives in the metabolism of fatty acids or branch chained AA
FSIP1	15q14	association between the variants in FSIP1 and aspirin intolerant asthma occurrence in a Korean population
BMPR1B	3	functions as a receptor for bone morphogenetic proteins (BMPs)
MYB	10	promote the development of lymphomas
DOK7	4p16.3	essential for neuromuscular synaptogenesis
RIMS4	20q13.12	linked to microtubule stability, apoptosis and protein degradation in the human brain
XBP1	22q12	regulates MHC class II genes
LMX1B	2	associated with skeletal development.
AFF3	2q11.2-q12	function in lymphoid development and oncogenesis
DACH1	13q22	regulate gene expression and cell fate determination during development
SIGIRR	11p15.5	association was found in the SIGIRR rs7396562 polymorphism and SLE susceptibility in a Chinese population
TPRG1	3q28	<i>The precise function of this gene is not known</i>
C19orf21	19p13.3	involved in mitotic spindle positioning in human cells
GREB1	2p25.1	early response gene in the estrogen receptor-regulated pathway

동일한 연구의 whole transcriptome sequencing 데이터에서 cell cycle과 관련된 유전자를 발굴하기 위해 대표적인 cell cycle관련 유전자인 *CCNBI*과의 발현 correlation을 분석하여 correlation coefficient가 가장 높은 순으로 유전자 40개를 선정하였고, Pathway 분석을 통해 이 40개의 유전자가 대부분 Cell cycle, Mitosis에 관계됨을 확인하였으며(GeneAnalytics: ga.genecards.org), 각 유전자에 해당되는 단백질의 기능을 간략하게 요약하였다(표 4, 표 4-1).

표 4. Cell cycle과 관련되어 선정된 40개 유전자와 관련 pathway 분석 (발현에

있어 *CCNB1*과의 correlation coefficient가 높은 순으로 정리)

Gene	Correlation coeff	Gene	Correlation coeff
CCNB1	1	NDC80	0.702598
DEPDC1B	0.775522	UBE2C	0.701318
BUB1B	0.770129	FAM83D	0.695056
CKS2	0.754076	PLK4	0.69184
PBK	0.750199	CDCA5	0.687702
CDK1	0.745293	KIF2C	0.687533
MELK	0.743334	NCAPG	0.684262
SKA3	0.740616	HJURP	0.683499
CCNB2	0.739845	PCNA	0.68234
GINS1	0.736509	TOP2A	0.681719
KIF11	0.730844	NEK2	0.679521
DLGAP5	0.729363	BIRC5	0.673604
PTTG1	0.726934	NUF2	0.666893
MAD2L1	0.720674	TTK	0.662272
KIF15	0.718614	CCDC99	0.658729
FBXO5	0.712902	KIF23	0.6573
TPX2	0.711182	CENPF	0.655939
SPC25	0.71081	CCNA2	0.654745
MYBL2	0.709569	PLK1	0.654105
BUB1	0.708197	AURKA	0.645461

Pathways: 59, Matching Gene(s): 34

Score	Name
134.10	Cell Cycle, Mitotic
87.64	Mitotic Prometaphase
78.17	Cell cycle Role of APC in cell cycle regulation
70.74	Mitotic Metaphase and Anaphase
59.72	Cell Cycle / Checkpoint Control
57.77	PLK1 signaling events
55.56	Cell cycle Spindle assembly and chromosome separation
55.28	Cell cycle
51.42	Regulation of PLK1 Activity at G2/M Transition
50.42	CDK-mediated phosphorylation and removal of Cdc6
38.61	Oocyte meiosis
45.48	Cell cycle Chromosome condensation in prometaphase
43.80	Aurora B signaling
43.80	FOXM1 transcription factor network
43.05	Gastric cancer network 1
42.26	RB in Cancer
33.33	Cyclin A/B1 associated events during G2/M transition
31.85	G0 and Early G1
30.14	E2F mediated regulation of DNA replication
28.35	Mitotic Roles of Polo Like Kinases

표 4-1. Cell cycle과 관련되어 선정된 40개 유전자들의 기능 요약 (발현에 있어

CCNB1과의correlation coefficient이 높은 순으로 정리)

Gene	Location	Function
CCNB1	5q12	regulatory protein involved in mitosis /expressed predominantly during G2/M phase
DEPDC1B	5q12.1	coordinates de-adhesion events and cell-cycle progression at mitosis
BUB1B	15q15	kinase involved in spindle checkpoint function
CKS2	9q22	essential for their biological function of the cyclin dependent kinases
PBK	8p21.2	protein kinase related to the dual specific mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) family
CDK1	10q21.1	essential for G1/S and G2/M phase transitions of eukaryotic cell cycle
MELK	9p13.2	novel regulator in cell cycle control, embryonic development, and cancer
SKA3	13q12.11	component of the spindle and kinetochore-associated protein complex
CCNB2	15q22.2	essential components of the cell cycle regulatory machinery
GINS1	20p11.21	essential for the initiation of DNA replication in yeast and Xenopus egg extracts
KIF11	10q24.1	involved in various kinds of spindle dynamics
DLGAP5	14q22.3	engaged in the regulation of cyclin E1 expression
PTTG1	5q35.1	homolog of yeast securin proteins, which prevent separins from promoting sister chromatid separation
MAD2L1	4q27	component of the mitotic spindle assembly checkpoint that prevents the onset of anaphase
KIF15	3p21.31	important role for antagonistic motors in chromosome segregation
FBXO5	6q25.2	inhibits the anaphase promoting complex
TPX2	20q11.2	for DNA damage response
SPC25	2q31.1	involved in kinetochore-microtubule interaction and spindle checkpoint activity
MYBL2	20q13.1	phosphorylated by cyclin A/cyclin-dependent kinase 2 during the S-phase
BUB1	2q14	phosphorylating members of the mitotic checkpoint complex and activating the spindle checkpoint
NDC80	18p11.32	organize and stabilize microtubule-kinetochore interactions
UBE2C	20q13.12	required for the destruction of mitotic cyclins and for cell cycle progression
FAM83D	20q11.23	novel oncogene in breast cancer development
PLK4	4q28	regulates centriole duplication during the cell cycle
CDCA5	11q12.1	Phosphorylation and activation of cell division cycle
KIF2C	1p34.1	depolymerize microtubules at the plus end, thereby promoting mitotic chromosome segregation
NCAPG	4p15.33	responsible for the condensation and stabilization of chromosomes during mitosis and meiosis
HJURP	2q37.1	involved in the chromosomal stability and immortality of cancer cells
PCNA	20pter-p12	helps increase the processivity of leading strand synthesis during DNA replication
TOP2A	17q21.2	involved in processes such as chromosome condensation, chromatid separation
NEK2	1q32.3	involved in mitotic regulation
BIRC5	17q25	negative regulatory proteins that prevent apoptotic cell death
NUF2	1q23.3	regulatory role in chromosome segregation
TTK	6q14.1	essential for chromosome alignment at the centromere during mitosis
CCDC99	5q35.1	novel role of farnesylation in targeting a mitotic checkpoint protein, human Spindly, to kinetochores
KIF23	15q23	transport organelles within cells and move chromosomes during cell division
CENPF	1q41	play a role in chromosome segregation during mitosis
CCNA2	4q27	binds and activates CDC2 or CDK2 kinases, and thus promotes both cell cycle G1/S and G2/M transitions
PLK1	16p12.2	Therapeutic PLK1 inhibition results in mitotic arrest
AURKA	20q13	involved in microtubule formation and/or stabilization at the spindle pole during chromosome segregation

In silico validation

상기의 선정된 유전자들의 유방암에서 예후 관련 예측력을 평가하기 위해서, 기 발표된 데이터를 이용하여 예후 연관성을 분석하는 web 기반의 도구들을 사용하여 검증해 보았다.

이에 Kaplan-Meier Plotter을 이용하여 에스트로젠 수용체 양성이면서 항호르몬치료를 받은 유방암 환자의 예후를, 본 연구에서 선정된 cell cycle관련 40개 유전자의 평균 발현에 따라 분석한 결과, cell cycle과 관련된 유전자들의 발현을 기준으로 낮은 군이 높은 군 보다 Recurrence-free survival이 매우 유의하게 좋은 것을 알 수 있었다(Hazard ratio 2.66, log rank, $p=8.4e-11$)(그림 4).

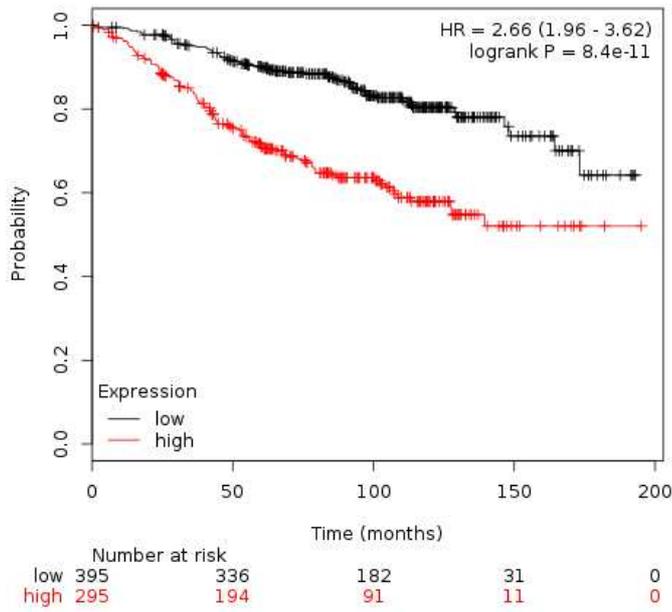
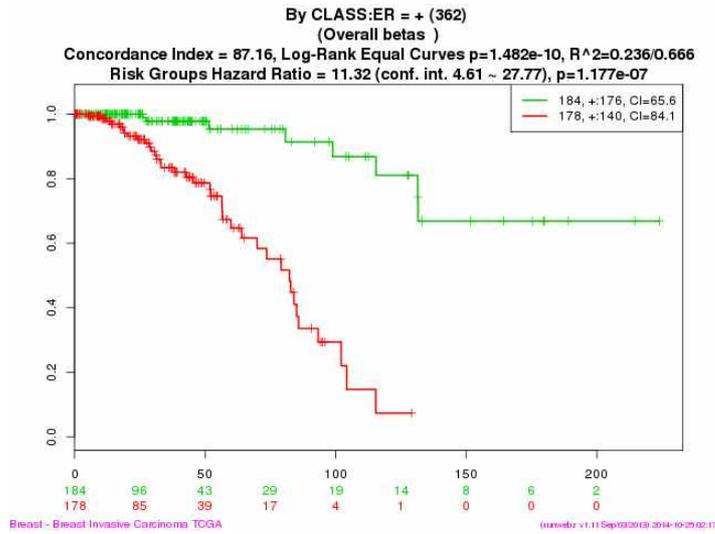


그림 4. Cell cycle 관련 40개 유전자군의 발현을 이용한 Kaplan-Meier Plotter 결과 (붉은색 선: cell cycle 관련 40개 유전자군의 발현이 높은 군; 검정색 선: cell cycle 관련 40개 유전자군의 발현이 낮은 군)

다른 web 기반의 도구인 SurvExpress를 이용하여, 유방암 TCGA 데이터에서 전체 80개 유전자군의 예후 예측력을 분석하였는데 TCGA 데이터의 에스트로젠 양성 유방암 362명에서 최적의 모델에 의한 고위험군 환자는 저위험군 환자에 비해 예후와 관련해서 Hazard ratio 11.32($p=1.177e-07$)로 유의하게 낮은 전체 생존율을 보임을 알 수 있었고, 위험도에 따라 세 군으로 나누었을 때에도 예후가 잘 나뉠 수 있었다(그림 5).

A)



B)

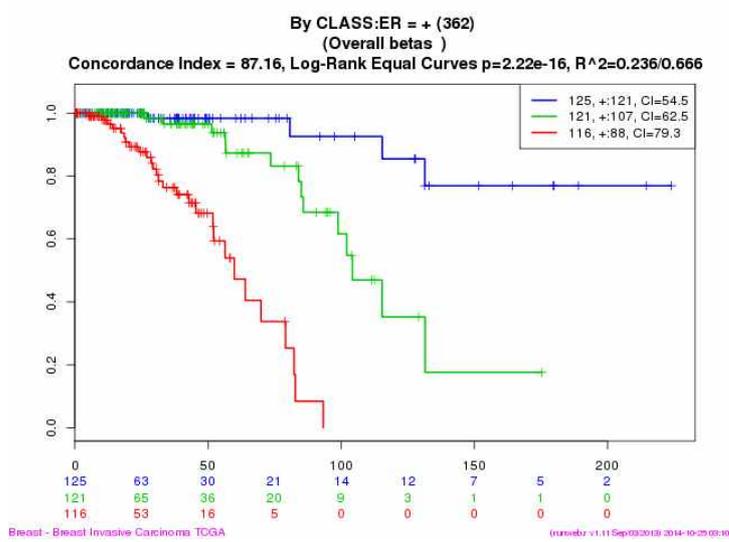
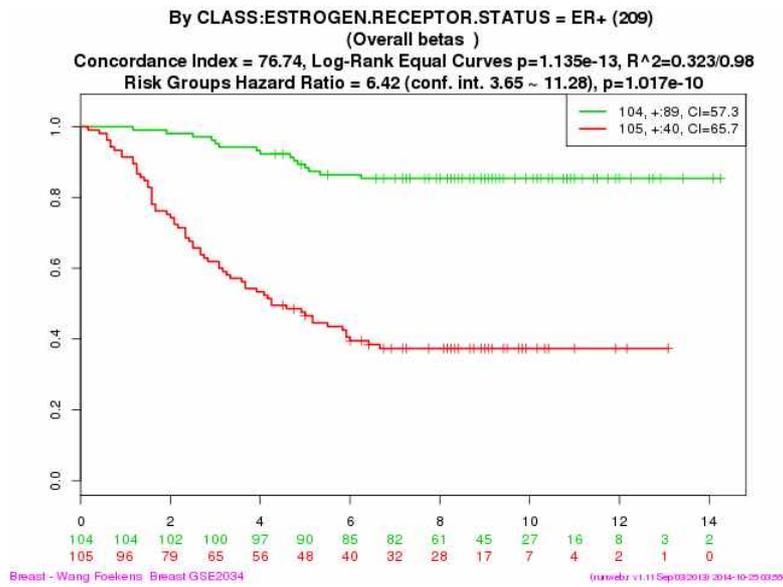


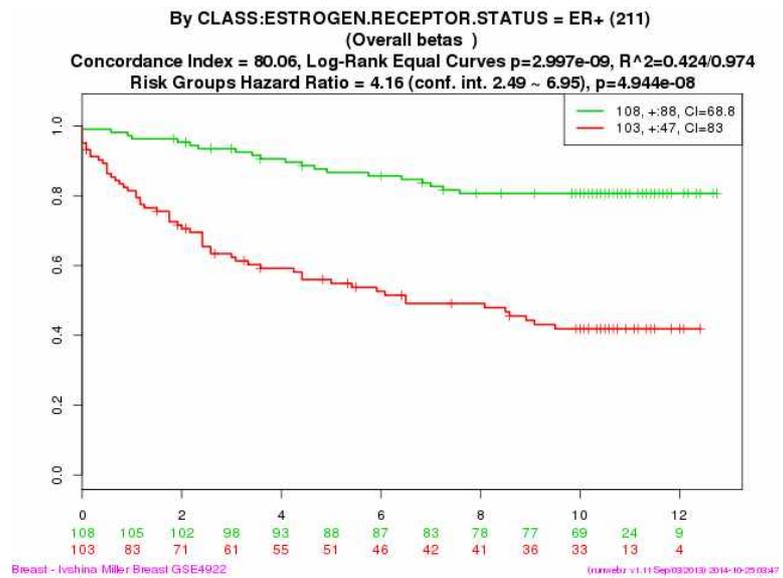
그림 5. 80개 유전자군을 이용하여 TCGA 데이터베이스에서 SurvExpress를 통해 분석한 호르몬수용체 양성 유방암에서의 예후 결과. A) 80개 유전자군의 발현에 따라 위험도를 두 군으로 나눈 경우(붉은색 선은 고위험군, 초록색 선은 저위험군); B) 80개 유전자군의 발현에 따라 위험도를 세 군으로 나눈 경우(붉은색 선은 고위험군, 초록색 선은 중간위험군, 파란색 선은 저위험군)

그리고 다른 세 개의 기 발표된 유전자 발현 데이터베이스인 Wang Foekens Breast GSE2034, Ivshina Miller Breast GSE4922, Kao Huang Breast GSE20685 에서도 80개의 유전자군의 발현을 이용하여 위험도에 따라 두 군으로 나누어 보았다. Wang Foekens Breast GSE2034에 대해서는, 에스트로젠 양성 유방암을 대상으로 한 경우 고위험군이 저위험군에 비해 유의하게 나쁜 metastasis-free survival을 보였다(Hazard ratio 6.42(log rank, $p=1.017e-10$))(그림 6A). Ivshina Miller Breast GSE4922 데이터베이스를 이용하여 분석했을 때에도 에스트로젠 양성 유방암 대상으로 고위험군이 저위험군에 비해 4.16배 나쁜 recurrence-free survival을 나타냈다(log rank, $p=4.944e-08$)(그림 6B). 여성호르몬 수용체 발현과는 관계없이 유방암 환자를 대상으로 본 Kao Huang Breast GSE20685 데이터베이스를 사용한 분석 결과 역시, 고위험군이 저위험군에 비해 낮은 recurrence-free survival을 보였다(Hazard ratio 17.39(log rank, $p=1.907e-11$))(그림 6C). 즉, 80개 유전자군은 세 개의 다른 데이터베이스를 바탕으로 분석한 결과, 유방암에서 매우 유의하게 예후를 잘 구분하였다.

A)



B)



C)

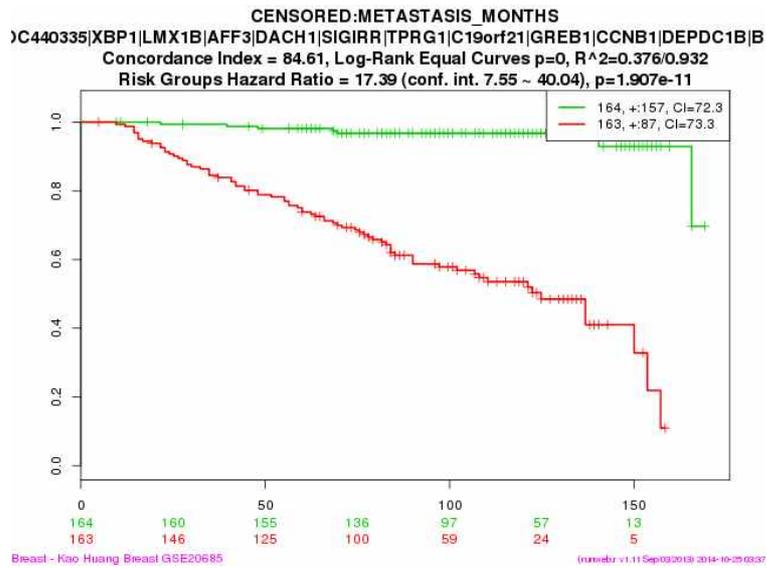


그림 6. 3개의 데이터베이스를 바탕으로 SurvExpress를 이용하여, 80개 유전자 군의 발현에 따른 위험도 분류에 의해 두 개의 군으로 나누어서 분석한 예후 결과. (A) Wang Foekens Breast GSE2034 데이터를 이용한 경우 (B) Ivshina Miller Breast GSE4922 데이터를 이용한 경우, (C) Kao Huang Breast GSE20685 데이터를 이용한 경우 (세 그래프 모두 붉은색 선은 고위험군, 초록색 선은 저위험군)

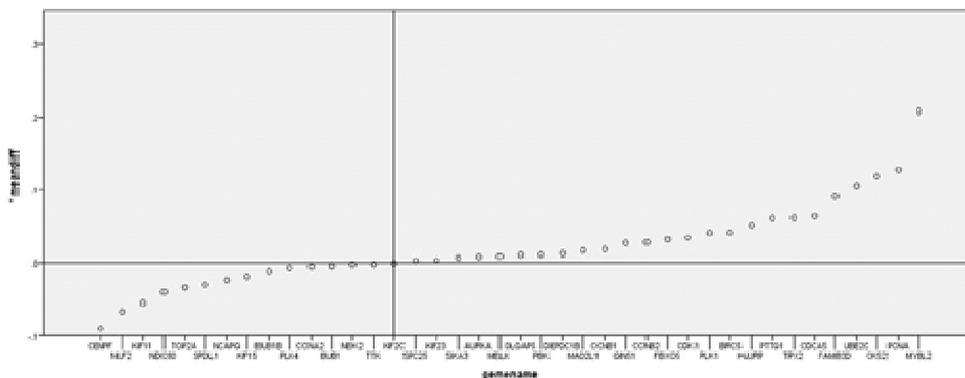
Targeted RNA sequencing

targeted RNA sequencing 의 대상이 된 32명의 35세 미만 여성호르몬 수용체 양성 유방암 환자군과 28명의 40세 이상 49세 이하의 여성호르몬 수용체 양성 유방암 환자군에 대해 임상병리학적 특성을 비교해 본 결과, 35세 미만의 환자군에서 유의하게 원발암의 크기가 작았으나, Ki67의 발현은 높은 경향을 보여주었고, 그 외 두 군간 차이는 없었다. (표 5).

표 5. Targeted RNA sequencing을 시행한 대상 환자군들의 임상병리학적 특징

	35세 미만(N=32)		40세~49세(N=28)		<i>p-value</i>
	N	%	N	%	
T stage					
					0.006
1	12	37.5	1	3.6	
2	18	56.3	24	85.7	
3	2	6.3	3	10.7	
N stage					
					0.970
0	11	34.4	8	28.6	
1	14	43.8	13	46.4	
2	5	15.6	5	17.9	
3	2	6.3	2	7.1	
Nuclear grade					
					0.601
1	1	3.1	1	3.6	
2	19	59.4	13	46.4	
3	12	37.5	14	50.0	
Histologic grade					
					0.302
1	0	0.0	2	7.1	
2	18	56.3	14	50.0	
3	14	43.8	12	42.9	
Ki67					
					0.022
<14%	15	46.9	21	75.0	
≥14%	11	34.4	7	25.0	
unknwon	6	18.8	0	0.0	

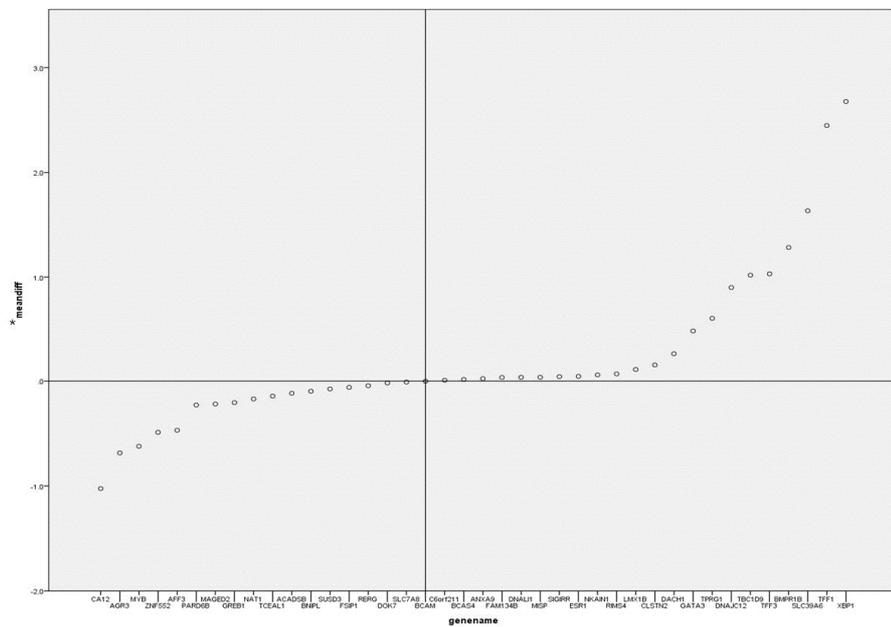
그리고 선정된 80개의 유전자들에 대해 위의 환자군을 대상으로 하여 새로운 독립적인 유방암 조직에서 시행한 **targeted RNA sequencing** 결과, 세포 주기 관련 40개의 유전자의 발현에서는 35세 미만의 여성호르몬 수용체 양성 유방암 조직에서 40세 이상 49세 이하의 여성호르몬 수용체 유방암 조직 유방암 조직보다 25개 유전자에서 발현이 높게 나왔다. 그 중에 상대발현량의 평균값이 10% 이상 높았던 유전자들은 *UBE2C*, *CKS2*, *PCNA*, *MYBL2* 였다(그림 7). 이들은 CDK 혹은 cyclin등과 작용하여 cell cycle에 관련하거나 DNA repair 와 관련된 유전자들이었다.



* mean diff. = mean expression level of young group - mean expression level of old group

그림 7. Targeted RNA sequencing 결과를 바탕으로 세포 주기 관련 40개 유전자들의 35세 미만 군과 40세 이상 49세 이하의 군 간 유전자별 상대발현량 평균의 차 (mean diff.(difference) 가 0인 경우 두 군간의 상대발현량이 같음을 의미하고 0초과인 경우 35세 미만 군에서 40대 군에 비해서보다 높은 상대발현량을 가짐을 의미함)

그러나 whole transcriptome sequencing 결과로부터 나왔던 에스트로젠 수용체 양성 유방암에서 에스트로젠 수용체 음성 유방암에 비해 높게 발현되는 40개의 유전자들은 35세 미만에서 22개의 유전자들만 40세 이상 49세 이하의 여성호르몬 수용체 양성 유방암에서보다 발현이 높게 나타났다(그림 8).



* mean diff. = mean expression level of young group - mean expression level of old group

그림 8. Targeted RNA sequencing 결과를 바탕으로 에스트로젠 수용체 양성 유방암 관련 40개 유전자들의 35세 미만 군과 40세 이상 49세 이하의 군 간 유전자별 상대발현량 평균의 차 (mean diff.(difference) 가 0인 경우 두 군간의 상대발현량이 같음을 의미하고 0초과인 경우 35세 미만 군에서 40세 이상 49세 이하의 군에 비해서보다 높은 상대발현량을 가짐을 의미함)

그리고 각 샘플마다 유전자들의 상대발현량을 서로 상대 환자군의 샘플들의 상대발현량과 비교하여 상대 환자군 내에서 발현의 정도가 어느 정도인지를 계산하여 상대 환자군의 샘플들에서 상위 55% 이상의 정도를 차지하는, 상대적으로 높은 발현 정도와 45% 이하의 정도를 차지하는 낮은 발현 정도를 각각 붉은색과 초록색으로 표시해 본 결과, cell cycle 과 관련된 유전자들의 발현 정도는 35세 미만의 유방암군에서 40세 이상 49세 이하의 유방암군보다 상대적으로 높게 나타났다. 그리고 35세 미만의 유방암군에서는 cell cycle 관련 유전자들이 동시에 여러 개가 높은 발현을 보인 경우들이 40세 이상 49세 이하의 유방암군에서 보다 현저히 많았다. 40세 이상 49세 이하의 유방암군에서는 cell cycle 관련 유전자들의 발현이 산발적으로만 높게 나타나는 경향을 보여 주었다(그림 9). 하지만 에스트로젠 수용체 관련 유전자들의 발현 정도는 두 군간에 비슷한 양상이었다(그림 10).

35세 미만

40세~49세



그림 9. Cell cycle과 관련된 유전자들의 상대발현량을 서로 상대 환자군 내에서의 발현 정도로 표현한 그림 (가로 행은 하나의 유전자를 표시하며 *CCNB1*과의 correlation coefficient가 높은 순서로 위로부터 아래로 배열되었고, 세로 행은 하나의 샘플을 나타냄. 각 cell 색의 의미: 상대발현량이 상대방 group에서 상위 몇 %에 해당하는지에 대한 의미, 붉은색계통은 55%이상인 경우, 초록색계통은 45%이하인 경우를 의미함.)



그림 10. 에스트로젠 수용체와 관련된 유전자들의 상대발현량을 서로 상대 환자 군내에서의 발현 정도로 표현한 그림 (가로 행은 하나의 유전자를 표시하며 p-value가 유의하게 의미 있는 순서대로 위로부터 아래로 배열되었고, 세로 행은 하나의 샘플을 나타냄. 각 cell 색의 의미: 상대발현량이 상대방 group에서 상위 몇 %에 해당하는지에 대한 의미, 붉은색계통은 55%이상인 경우, 초록색계통은 45%이하인 경우를 의미함.)

고 찰

임상적으로 나쁜 예후를 보여준 35세 미만의 여성호르몬 수용체 양성 유방암에 국한하여 유전자 발현을 살펴 본 연구들은 매우 드물다. 따라서 본 연구는 이러한 여성호르몬 수용체 양성의 35세 미만 유방암에서 유전자 발현의 특징을 35세 미만과 폐경 전인 40세 이상 49세 이하의 호르몬 수용체 양성 유방암을 대상으로 규명하고자 하였다.

본 연구의 cDNA microarray 결과, 35세 미만의 여성호르몬 수용체 양성 유방암에서는 cell cycle 관련 기능 및 경로와 관련된 유전자들의 발현이 여성호르몬 수용체 양성의 40세 이상 폐경 전 유방암에서 보다 높게 나타났다. 이후 whole transcriptome sequencing 결과를 통해 선정한 cell cycle와 관련된 유전자군은 *in silico* 검증 상 여성호르몬 수용체 양성 유방암에서의 예후와도 관련성을 보였고, targeted RNA sequencing 결과에서도 35세 미만의 여성호르몬 수용체 양성 유방암에서 40대의 여성호르몬 수용체 양성 유방암에서보다 발현이 높게 나왔다. 즉, 35세 미만의 여성호르몬 수용체 양성의 유방암에서는 cell cycle와 관련된 유전자들의 발현 정도가 40대에 비해 높고, 이는 나쁜 예후와도 관련이 있을 수 있음을 확인해주었다.

본 연구에서 cDNA microarray 및 targeted RNA sequencing의 대상이 된 환자군들 비교에서는 각 대상 환자들의 수가 적은 이유로 인하여 35세 미만의 경우 40세 이상에서와 비교 시 유의하게 차이를 보이는 인자들이 없거나, 오히려 35세 미만에서 원발암의 크기가 작으면서 Ki67 발현은 높은 양상을 보여 주기도 하였다. 하지만 35세 미만의 유방암을 대상으로 좀 더 많은 환자들을 대상으로 한 연구들에서의 결과들을 보았을 때, 일반적으로 그 이상 연령의 유방암과 비교 시 큰 종양 크기, 림프절 전이, 높은 조직학적 등급 그리고 낮은 호르몬수용체 발현 등 나쁜 병리학적 인자들을 보여주었는데(8,10-13), M.D. Anderson cancer center의 자료를 바탕으로 2005년에 발표한 연구결과에서도 총 452명의 35세 이하 환자만을 대상으로 분석한 결과, 69%의 환자에서 Grade 3의 조직학적 등급을 보였고, 에스트로젠 수용체 발현이 없는 경우가 47.7%, 프로게스테론 수용체 발현이 없는 경우가 52.5%로 나왔으며, 이와 같은 병리학적인 인자들은 낮은 생존율과 관련이 있었다(33). 2006년 Colleoni 등이 발표한 연구에서는 림프절 전이 음성 유방암에 국한시켜 연령에 따른 유방암의 특징과 예후를 총 841명의 폐경 전 유방암 환자를 대상으로 살펴본 결과, 역시 35세 미만의 유방암 환자군에서는 원발암의 크기가 2cm 초과인 경우, Grade 3 인 경우, Ki67이 높은 경우가 의미 있게 높은 비율로 차지하

고 에스트로젠 수용체 음성인 경우가 41.6%, 프로그스테론 수용체 음성인 경우가 47.5%로 35세 이상의 폐경 전 유방암 환자군에서의 각각 17.4%, 23.2%에 비해 매우 높게 나타났다. 그리고 예후 분석 결과에서도 전체적으로 35세 미만의 환자군이 나쁜 무병생존율과 전체생존율을 보여주었다. 에스트로젠 수용체 양성 및 음성 유방암으로 나누어 분석한 결과에서도 35세 미만의 환자군은 다른 임상병리인자들을 보정한 후에도 나쁜 예후를 보여주었으나 에스트로젠 수용체 음성 유방암에서는 전체생존율을 비교한 결과, 35세 이상의 환자군과 의미 있는 차이를 보여주지는 않았다. 반면 에스트로젠 수용체 양성 유방암에서는 전체생존율에서도 35세 미만의 환자군이 35세 이상의 환자군에 비해 나쁜 예후를 보여주었다(Hazard ratio = 4.71(95% CI 1.09-20.4))(34).

하지만, 본 연구에서는 위와 같이 임상적인 표현형 혹은 단백질 발현 등으로부터 알 수 있는 병리인자들이 아니라, 나쁜 예후를 보이는 35세 미만의 젊은 여성에서의 유방암에 대해, 분자생물학적인 기법을 통해 그 이상의 연령의 유방암과 유전자 발현의 차이를 분석해 보았고, 그 결과 cell cycle 관련 유전자들의 발현이 35세 미만의 여성 호르몬 양성 유방암에서 의미 있게 높게 나왔음을 보여주었다.

이와 같은 cell cycle 관련 유전자들의 발현 증가는 낮은 연령에서의 유

방암에서 세포 증식이 활발함으로 해석할 수 있는데, 이는 14만명이상의 에스트로젠 수용체 양성 환자를 대상으로 시행한 Oncotype DX[®] Breast assay 결과를 바탕으로 분석한 결과, 40세 이하 환자군(n=5,794)에서 나쁜 예후와 관련 있는 high score의 환자가 14.9%를 차지하여, 41세부터 69세까지의 환자군(n=117,744)에서의 9.6% 와 70세 이상의 환자군(n=21,702)에서의 10.4%에 비해 많음을 보여준 결과를 통해서 알 수 있으며, 이 assay를 구성하는 21개 유전자들을 군별로 나누어 분석했을 때에는 invasion index(*MMP11*, *CTSL2*)와 HER2유전자 증폭은 연령에 따라 비슷하였으나, proliferation index(*Ki67*, *STK15*, *Survivin*, *CCNB1*, *MYBL2*)는 40세 이하의 환자군에서 높았고, 에스트로젠 수용체의 발현은 상대적으로 낮았음을 통해서도 알 수 있다. 따라서 proliferation index가 높게 나타남으로써 나쁜 예후인자와 관련된 high score의 Recurrence score를 갖는 경우가 40세 이하에서 그 보다 높은 연령의 환자에서보다 많았다는 이 연구 결과는(27), 본 연구에서의 cell cycle 관련 유전자들의 발현이 35세 미만에서의 여성호르몬 수용체 양성 유방암에서 높게 나타난 것과 비슷한 의미를 가진다고 하겠다. 그리고 세포 증식과 관련하여 대표적인 단백질인 Ki67 발현을 서로 다른 세 기관에서 총 9321명의 여성호르몬 수용체 양성 유방암을 통해 확인해 본 연구 결과에서도, 진단 시 연령을 40세 미

만과 40세 이상으로 나누어 비교 분석하였을 때, 서로 다른 기관에서의 결과들 모두에서 유의하게 40세 미만의 환자군에서 의미 있게 높은 Ki67 발현을 보여주었다(28). 하지만 이들 연구 모두 세포 증식이 젊은 연령에서 발병한 여성호르몬 수용체 양성 유방암에서 높게 나타나는 것을 보여주는 것이었으나, 여성호르몬 수용체 양성 유방암에서 세포 증식을 높이는 기전은 여전히 잘 알려져 있지 않았다.

결국, 본 연구에서는 그러한 기전을 규명하고자 유전자발현을 살펴보았던 것이고, cDNA microarray결과를 바탕으로 35세 미만의 여성호르몬 수용체 양성의 유방암에서 유의하게 나타났던 cell cycle pathway에 집중하여 관련 유전자들을 선정하였고, 선정된 유전자들을 대상으로 한 targeted RNA sequencing을 한 결과에서도 이러한 cell cycle과 관련된 유전자들의 발현이 유의하게 35세 미만의 여성호르몬 수용체 양성 유방암에서 높음을 보여주었다. 이는 여성호르몬 수용체 양성만이 아닌 모든 아형에 대한 연구이긴 하지만, 본 연구에서 선정된 유전자군에도 포함되었던 *BUB1*, *AURKA* 같은 cell cycle과 관련된 유전자 발현이 단변량 분석 상 40세 미만의 유방암 조직에서 40세 이상의 유방암 조직보다 높게 나타난 것을 보여준 연구 결과와 일치하는 면이 있다(24). 그리고 Perreard 등이 qRT-PCR을 이용하여 특정 유전자들의 발현에 따라 유방암을 임상적인

위험도로 분류한 연구 결과에서 세포 증식과 관련된 유전자들의 높은 발현은 나쁜 예후를 나타냈는데, 이 연구에서 유의하게 나쁜 예후와 관련이 있는 14개의 유전자들 중 9개 유전자들이(*BIRC5*, *BUB1*, *CKS2*, *MYBL2*, *NEK2*, *PCNA*, *TOP2A*, *CENPF*, *TTK*) 본 연구에서의 cell cycle 관련 유전자 40개에 포함되어 있었다(18). 그리고 앞서 언급한 Oncotype Dx[®] Breast assay 상 high score의 Recurrence score와 관련이 높은 proliferation index를 구성하는 5개의 유전자 중 *CCNBI*, *MYBL2*는(19,27), 본 연구에서의 cell cycle 관련 40개 유전자 중에 포함되어 있었고, 특히 *CCNBI*은 cell cycle 관련 40개 유전자를 선정했을 때 기준이 되었던 유전자였다. 따라서 본 연구에서 선정된 cell cycle 관련 유전자들은 기존 연구들을 바탕으로 고찰해보면, 젊은 유방암 조직에서 의미 있게 발현이 높게 나타나고 나쁜 예후와도 관련이 있는 유전자들이라고 할 수 있다.

한편, 에스트로젠 수용체 관련 유전자들의 결과를 살펴본다면, 폐경 전 연령의 여성호르몬 수용체 양성 유방암만을 대상으로 한 본 연구에서 35세 미만에서의 targeted RNA sequencing 상 에스트로젠 수용체 양성 유방암 관련 유전자들은 40대에서와 비슷한 발현을 보여주었다. 본 연구의 이러한 결과와는 반대로, 기존의 연구들에서는 40세 혹은 45세 기준으로 하여 이보다 젊은 연령 유방암에서 에스트로젠 수용체와 관련된 유전자

들의 발현 감소로 인해 basal-like subtype의 유방암이 좀더 많은 부분을 차지하는 것으로 나타났다. 4046명을 대상으로 면역화학염색법을 이용하여 연구한 결과 및 이를 다시 분석한 결과에서도 40세 미만에서는 의미 있게 여성호르몬 수용체 음성 유방암의 비율이 높으며, 특히 HER2단백의 과발현도 없는 삼중음성유방암 및 CK5/6의 발현도 없는 경우의 유방암 비율이 다른 연령에 비해 의미 있게 높았다. 그리고 이러한 유방암의 경우 60% 이상이 Grade 3의 유방암을 가지며 나쁜 예후를 보이는 것으로 나타났다(30,35). 그리고 기존의 cDNA microarray 결과가 발표된 데이터베이스를 이용하여 이를 45세 이하와 65세 이상으로 나누어 아형들을 비교 분석한 결과, 여러 임상병리인자들을 보정한 후에는 두 군간에 의미 있게 발현되는 특별한 유전자는 없었지만, 다른 연구 결과들과 마찬가지로 45세 미만의 환자군에서는 cDNA microarray 결과를 바탕으로 한 아형인 basal-like subtype이 65세 이상의 환자군과 비교시 12.27배(95% CI, 3.96-45.0)나 높은 비율로 나타났고, 독립된 다른 데이터베이스를 이용하여 분석한 결과에서도 45세 이하 환자군에서 65세 이상 환자군에서 보다 5.1배(95% CI, 2.43-11.11) 높게 basal-like subtype이 차지하였다(31,32). 앞서 언급했듯이 대규모 환자들의 결과를 바탕으로 Oncotype DX® Breast assay 결과를 분석한 결과에서도, 본 연구처럼 에스트로젠 수용체 양성 환자만

을 대상으로 하였지만 40세 이하의 환자군에서의 에스트로젠 수용체 발현량은 그 이상 연령의 환자군에서의 발현량과 비교 시 더 낮게 나타났다(27). 이러한 연구 결과들은 젊은 연령의 유방암에서는 에스트로젠 수용체 양성의 유방암에서도 basal-like subtype과 비슷한 생물학적 특징을 갖고 있을 수 있다는 가능성을 보여주는 것이고, 본 연구 결과에서는 동일한 결과를 얻지 못했지만, 이러한 측면도 항호르몬치료에 대한 결과가 35세 미만에서의 여성호르몬 수용체 양성의 유방암에서 나쁜 예후를 보여주는 기전에 대한 또 다른 측면에서의 근거로서 제시될 수 있을 것이다. 따라서 향후에 본 연구에서보다 연령이 더 높은 50대 이상의 여성호르몬 수용체 양성 유방암을 대상으로, 본 연구에서의 에스트로젠 양성 유방암 관련 40개 유전자들의 발현을 살펴보고 이를 35세 미만의 여성호르몬 수용체 양성 유방암에 대한 결과와 비교해 보는 추가 연구가 필요하다.

본 연구는 적은 수를 대상으로 한 연구로서 더 많은 환자들을 대상으로 하여 본 연구에서 선정한 유전자군의 발현을 확인할 필요가 있으나, 여성호르몬 수용체 양성 유방암에 대해서 35세 미만의 경우와 40세 이상의 같은 폐경 전 여성에서의 경우를 조직에 대한 cDNA microarray 뿐 아니라 whole transcriptome sequencing을 통해 유전자군을 선정하고 *in silico*

검증을 통해 예후와의 관련성을 확인한 후, 독립된 다른 환자군에서 선정된 유전자들에 대해 **targeted RNA sequencing**을 시행하여, 같은 폐경 전 상태인 35세 미만 여성호르몬 수용체 양성 유방암과 40세 이상 49세 이하의 여성호르몬 수용체 양성 유방암을 비교 검증해 본 연구였으므로, 35세 미만 여성호르몬 수용체 양성 유방암의 나쁜 예후에 대한 기전을 규명할 수 있는 근거가 될 수 있을 것이다. 그리고 소수의 세포 증식 관련 유전자들의 발현이 연령에 따라 서로 다르게 나타남을 보여 준 기존의 연구들과는 달리, 많은 수의 유전자들을 하나의 유전자군으로 묶어서 발현을 보고자 하였다. 특히 세포 증식에서의 중심인 **cell cycle**에 집중하여, 이와 관련된 많은 수의 유전자들로 구성하여 분석하는 것은 35세 미만의 여성호르몬 수용체 양성 유방암에서 세포 증식과 관련된 발현의 상태들을 좀 더 잘 반영할 수 있는 방법이 될 수 있을 것이다. 따라서 이를 통해 항호르몬치료에 대해서 좋은 반응이 예상되지 않는 적절한 대상을 잘 선택하는 데에 이용될 수 있는 가능성과 더 나아가 **cell cycle pathway**의 전반적인 상태를 고려한 적절한 표적 치료를 고려할 수 있는 예측 방법을 개발하는 데에 바탕이 될 수 있을 것이다. 다시 말하면, 단일 유전자의 발현 유무가 아닌 특정 기능(**cell cycle**)과 관련된 유전자들의 전체적인 **pathway** 중심의 발현 정도를 기준으로 하여, 표적 치료제의 개발과

이의 적용 대상을 선정하는 것이 유용할 것 같고, 이와 같은 방법과 본 연구 결과는 35세 미만의 여성호르몬 수용체 양성 유방암 치료에 대한 앞으로의 연구들에 도움이 될 수 있을 것이다.

요약하면, 35세 미만의 여성호르몬 수용체 양성 유방암은 cell cycle과 관련된 유전자들의 발현이 유의하게 높으며, 이러한 분자생물학적인 특징은 35세 미만의 여성호르몬 수용체 양성 유방암 환자들이 보이는 상대적으로 나쁜 예후를 설명해주고, 이러한 결과는 향후 이를 극복하기 위한 치료의 근거로서 이용될 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 18/12/2013.
2. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2012, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/, based on November 2014 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2015.
3. Korea Central Cancer Registry, National Cancer Center. Annual report of cancer statistics in Korea in 2012, Ministry of Health and Welfare, 2014.
4. Kyu -Won Jung, Young- Joo Won, Hyun- Joo Kong, Chang-Mo Oh, Hyunsoon Cho, Duk Hyoung Lee, Kang Hyun Lee. Cancer Statistics in Korea: Incidence, Mortality, Survival, and Prevalence in 2012. *Cancer Res Treat.* 2015; 47(2): 127-141.

5. Fowble BL, Schultz DJ, Overmoyer B, Solin LJ, Fox K, Jardines L, Orel S, Glick JH. The influence of young age on outcome in early stage breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1994 Aug 30;30(1):23-33.
6. Nixon AJ, Neuberg D, Hayes DF, Gelman R, Connolly JL, Schnitt S, Abner A, Recht A, Vicini F, Harris JR. Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer. *J Clin Oncol*. 1994 May; 12(5):888-94.
7. Wonshik Han, Seok Won Kim, In Ae Park, Daehee Kang, Sung-Won Kim, Yeon-Kyu Youn, Seung Keun Oh, Kuk Jin Choe, Dong-Young Noh. Young age: an independent risk factor for disease free survival in women with operable breast cancer. *BMC Cancer* 2004; 4:82.
8. Eun-Kyu Kim, Woo Chul Noh, Wonshik Han, Dong-Young Noh. Prognostic Significance of Young Age (<35 Years) by Subtype Based on ER, PR, and HER2 Status in Breast Cancer: A Nationwide Registry-Based Study *World J Surg* 2011; 35:1244–1253.
9. Han W, Kang SY. Korean Breast Cancer Society. Relationship between age at diagnosis and outcome of premenopausal breast cancer: age less than 35 years is a reasonable cut-off for defining young age-onset breast cancer. *Breast Cancer Res*

Treat 2010; 119:193-200.

10. Walker RA, Lees E, Webb MB, Dearing SJ. Breast carcinomas occurring in young women (< 35 years) are different. *Br J Cancer* 1996; 74:1796- 800.

11. M. Colleoni, N. Rotmensz, C. Robertson, L. Orlando, G. Viale, G. Renne, A. Luini, P. Veronesi, M. Intra, R. Orecchia, G. Catalano, V. Galimberti, F. Nolé, G. Martinelli, A. Goldhirsch. Very young women (<35 years) with operable breast cancer: features of disease at presentation. *Ann Oncol* 2002; 13:273-9.

12. Canello G, Maisonneuve P, Mazza M, Montagna E, Rotmensz N, Viale G, Pruneri G, Veronesi P, Luini A, Gentilini O, Goldhirsch A, Colleoni M. Pathological features and survival outcomes of very young patients with early breast cancer: How much is “very young”? *The Breast* 2013; 22:1046-1051.

13. Wei XQ, Li X, Xin XJ, Tong ZS, Zhang S. Clinical Features and Survival Analysis of Very Young(Age<35) Breast Cancer Patients. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2013; 14:5949-5952.

14. Goldhirsch A, Gelber RD, Yothers G, Gray RJ, Green S, Bryant J, Gelber S, Castiglione-Gertsch M, Coates AS. Adjuvant therapy for very young women with breast cancer: need for tailored treatments. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2001;44-51.

15. The International Breast Cancer Study Group. Duration and reintroduction of adjuvant chemotherapy for node-positive premenopausal breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1996;14:1885-94.
16. Ahn SH, Son BH, Kim SW, Kim SI, Jeong J, Ko SS, Han W; Korean Breast Cancer Society. Poor outcome of hormone receptor positive breast cancer at very young age is due to tamoxifen resistance: nationwide survival data in Korea a report from the Korean Breast Cancer Society. *J Clin Oncol*. 2007 Jun 10; 25(17):2360-8.
17. Dai H, van't Veer L, Lamb J, He YD, Mao M, Fine BM, Bernardis R, van de Vijver M, Deutsch P, Sachs A, Stoughton R, Friend S. A cell proliferation signature is a marker of extremely poor outcome in a subpopulation of breast cancer patients. *Cancer Res* 2005; 65:4059-66.
18. Perreard L, Fan C, Quackenbush JF, Mullins M, Gauthier NP, Nelson E, Mone M, Hansen H, Buys SS, Rasmussen K, Orrico AR, Dreher D, Walters R, Parker J, Hu Z, He X, Palazzo JP, Olopade OI, Szabo A, Perou CM, Bernard PS. Classification and risk stratification of invasive breast carcinomas using a real-time quantitative RT-PCR assay. *Breast Cancer Res* 2006; 8(2):R23.
19. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T, Hiller W, Fisher ER, Wickerham DL, Bryant J, Wolmark N.

A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351:2817-26.

20. Collins LC, Marotti JD, Gelber S, Cole K, Ruddy K, Kereakoglow S, Brachtel EF, Schapira L, Come SE, Winer EP, Partridge AH. Pathologic features and molecular phenotype by patient age in a large cohort of young women with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 131(3):1061e6.

21. Morrison DH, Rahardja D, King E, Peng Y, Sarode VR. Tumour biomarker expression relative to age and molecular subtypes of invasive breast cancer. *Br J Cancer* 2012; 107(2):382e7.

22. Azim HA Jr, Michiels S, Bedard PL, Singhal SK, Criscitiello C, Ignatiadis M, Haibe-Kains B, Piccart MJ, Sotiriou C, Loi S. Elucidating prognosis and biology of breast cancer arising in young women using gene expression profiling. *Clin Cancer Res* 2012; 18(5):1341e51.

23. Hatem A, Azim Jr, Bastien Nguyen, Sylvain Brohée, Gabriele Zoppoli, Christos Sotiriou. Genomic aberrations in young and elderly breast cancer patients. *BMC medicine* 2015; 13:266.

24. Rebecca H. Johnson, Pingzhao Hu, Cheng Fan, Carey K. Anders. Gene expression in “young adult type” breast cancer: a retrospective analysis. *Oncotarget*

6(15) 13688-13702.

25. Balazs Györfy, Andras Lanczky, Aron C Eklund, Carsten Denkert, Jan Budczies, Qiyuan Li, Zoltan Szallasi. An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Res Treat* 2010;123:725–731.

26. Aguirre-Gamboa R, Gomez-Rueda H, Martínez-Ledesma E, Martínez-Torteya A, Chacolla-Huaranga R, Rodriguez-Barrientos A, Tamez-Peña JG, Treviño V. SurvExpress: An Online Biomarker Validation Tool and Database for Cancer Gene Expression Data Using Survival Analysis. *Plos one* 2013; 8(9) e74250.

27. Shak S, Baehner FL, Stein M, Lewis S, Chen I, Yoshizawa C, Watson D, Swain S. Quantitative gene expression analysis in a large cohort of estrogen receptor-positive breast cancers: characterization of the tumor profiles in younger patients (≤ 40 yrs) and in older patients (≥ 70 yrs). 33rd Annual San Antonio Breast Cancer Symposium. 2010. Abstract #P3-10-01.

28. Kim J, Han W, Jung SY, Park YH, Moon HG, Ahn SK, Lee JW, Kim MK, Kim JJ, Lee ES, You TK, Kang HS, Lee ES, Ro J, Lee JE, Nam SJ, Yim YH, Park IA, Noh DY. The Value of Ki67 in Very Young Women with Hormone Receptor-Positive Breast Cancer: Retrospective Analysis of 9,321 Korean Women *Ann Surg*

Oncol 2015 Oct; 22(11):3481-8.

29. Anders CK, Fan C, Parker JS, Carey LA, Blackwell KL, Klauber-DeMore N, Perou CM. Breast carcinomas arising at a young age: unique biology or a surrogate for aggressive intrinsic subtypes? J Clin Oncol 2011, 29(1):e18-e20.

30. G. A. Thomas, R. C. F. Leonardy. How Age Affects the Biology of Breast Cancer Clinical Oncology 2009; 21: e81-e85.

31. Han-Byoel Lee, Wonshik Han. Unique Features of Young Age Breast Cancer and Its Management J Breast Cancer 2014 December; 17(4): 301-307.

32. Carey K. Anders, Cheng Fan, Joel S. Parker, Lisa A. Carey, Kimberly L. Blackwell. Breast Carcinomas Arising at a Young Age: Unique Biology or a Surrogate for Aggressive Intrinsic Subtypes? J Clin Oncol. 2011 Jan; 29(1):e18-20.

33. Gonzalez-Angulo AM, Broglio K, Kau SW, Eralp Y, Erlichman J, Valero V, Theriault R, Booser D, Buzdar AU, Hortobagyi GN, Arun B. Women age < or = 35 years with primary breast carcinoma: disease features at presentation. Cancer 2005; 103:2466-72.

34. Colleoni M, Rotmensz N, Peruzzotti G, Maisonneuve P, Orlando L, Ghisini R, Viale G, Pruneri G, Veronesi P, Luini A, Intra M, Cardillo A, Torrisi R, Rocca A, Goldhirsch A. Role of endocrine responsiveness and adjuvant therapy in very

young women (below 35 years) with operable breast cancer and node negative disease. *Ann Oncol* 2006; 17:1497-503.

35. Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, Perou CM, Nielsen TO. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res* 2008; 14:1368-1376.

Abstract

Gene expression analysis of hormone receptor positive breast cancer under the age of 35

Jong Han Yu

Medicine, Dept. of Surgery

The Graduate School

Seoul National University

Breast cancer patients under 35 years are more common in Asian than in western country relatively and the prognosis of them is generally worse than older premenopausal and postmenopausal breast cancer patients. In hormonal receptor positive breast cancer, breast cancer patients under 35 years has worse prognosis even after anti-hormonal therapy. However, the biologic mechanism related with poor prognosis has not been known well. This study was done for revealing the characteristics of gene expression in breast cancer under 35 years.

To check the differential expressed genes, cDNA microarray was done using the breast cancer tissue of <35 year and premenopausal patients over 40 year old and more and then marked differential expressed genes were analyzed by pathway

analysis software. The candidate geneset related with breast cancer with positive estrogen receptor and cell cycle was made through the whole transcriptome sequencing from 120 breast cancer tissues. For *in silico* validation, Kaplan-Meier plotter and Survexpress were used. Finally the expression of candidate geneset was validated by targeted RNA sequencing in the breast cancer tissue of <35 year and 40~49 year old patients with positive hormonal receptor.

The result of cDNA microarray and pathway analysis showed the activated genes in <35 year breast cancer tissue related with cell cycle function and pathway. Therefore, we selected the 80 genes related with breast cancer with positive estrogen receptor and representative cell cycle gene(*CCNB1*) through whole transcriptome sequencing result. In the result of Kaplan-Meier plotter, two risk groups divided by mean expression of cell-cycle related geneset showed significantly different prognosis(Hazard ratio 2.66(log rank, $p=9.43e-11$)). The results of SurvExpress in the four independent published gene expression database showed that 80 geneset could separate significantly low-risk and high-risk groups. The number of genes with relatively higher expression level among the cell cycle-related genes in <35 year old breast cancer was more than 40~49 year old patients according to the result of targeted RNA sequencing.

In conclusion, genes related with cell cycle function and pathway were expressed highly in breast cancer patient with positive hormonal receptor under 35 years. This result may explain their poor prognosis.

Keywords: Breast neoplasm, Genes, Young woman

Student Number: 2010-30529