

유방암종의 HER2 종양단백의 면역조직화학적 발현

계명대학교 의과대학 병리학교실

정혜라 · 권선영 · 강유나 · 권건영 · 김상표 · 이상숙

Immunohistochemical Expression of HER2 Oncoprotein in Breast Carcinoma

Hye Ra Jung, M.D., Sun Young Kwon, M.D., Yu Na Kang, M.D.,
Kun Young Kwon, M.D., Sang Pyo Kim, M.D., Sang Sook Lee M.D.

*Department of Pathology, Keimyung University School of Medicine,
Daegu, Korea*

Abstract : Immunohistochemistry (IHC) is very simple method to evaluate the HER2 status in breast carcinoma. The aim of this study was to determine the potential value of the immunohistochemistry(IHC) using CB11 monoclonal antibody as a first-line screening of HER2 overexpression. The HER2 status of 198 consecutive cases of breast carcinoma was studied. Tissue arrays made from the representative portion of each breast carcinoma specimen were used for conventional IHC using CB11 monoclonal antibody and HercepTest. Expression of HER2 of both methods was assessed by HercepTest scoring system of 0, 1+, 2+, and 3+. The result of IHC using CB11 monoclonal antibody correlated significantly with the HercepTest (concordance: 84.3%, kappa=0.704). It is highly suggested that IHC of CB11 monoclonal antibody can be used as a first-line test to explore the overexpression of HER2 by HercepTest.

Key Words : Breast carcinoma, HER2, Immunohistochemistry

서론

분자생물학의 발전에 따라 유방암종 환자의 예

후를 예측할 수 있는 인자들이 발견되고 있다. 그 중 human epidermal growth factor receptor-2 는 가장 특징적인 인자로서 HER-2/neu/c-

erbB-2로도 불리어진다[1]. HER2 암 유전자는 185 kDa의 세포막에 존재하는 성장 인자 수용체로서 티로신 키나아제 작용을 가지고 있으며 세포의 성장을 자극한다[2]. 유방암종에서 HER2 발현율은 20-30%로 겨드랑 림프절 전이 여부에 관계없이 중요한 예후 인자로 알려져 왔다[3,4]. Slamon 등[5]은 유방암종 환자에서 HER2가 증폭되어 있는 경우 예후가 불량하다고 보고하였다. 또한 HER2의 발현 유무로 항암치료의 약제 선택에 영향을 줄 수 있으므로[6,7] 2000년도에 개정된 ASCO (American Society of Clinical Oncology)의 지침에서는 모든 유방암종 환자에서 HER2 발현을 검사할 것을 권장하고 있다[8]. 최근 HER2에 대한 단클론 항체 제제인 trastuzumab (Herceptin; Genentech, Inc., South San Francisco, CA, U.S.A.)이 개발되어 유방암종 치료에 이용되고 있다. Herceptin은 HER2 수용체의 과발현이나 HER2 유전자의 증폭이 높은 전이성 유방암종 환자에서 좋은 치료효과를 나타내어 유방암종 환자에서 Herceptin 치료 대상을 선정하기 위해 HER2 수용체의 과발현이나 HER2 유전자 증폭의 측정이 더욱 중요해 졌다[9-11]. HER2 유전자와 유전자 산물의 발현을 측정하기 위해 면역조직화학염색, 형광제자리부합화 (fluorescence in situ hybridization), 효소면역측정법 (enzyme-linked immunosorbent assay) 서던 블롯 (Southern blot), 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction) 등의 여러 가지 방법이 사용되고 있다. 그 중 면역조직화학 염색과 형광제자리부합화가 조직이 소량이라도 가능하고, 검색할 조직의 구조가 쉽게 보존되며, 검사를 자동화할 수 있다는 장점을 가져 다른 검사 방법보다 더욱 많이 이용되고 있다[12,13]. 면역조직화학 염색은 시행 방법이 비교적 간단하고, 시약 및 장비가 비교적 저렴하여 형광제자리부합화보다 많이 이용되지만 사용한 항체의 특이도와 판정 기준에 따라서 결과가 다양하게 나타날 수 있다. 면역조직화학 염색으로 HER2 종양단백을 검색할 때 사용가능한 항체 중 A0485 단클론 항체, CB11 단클론 항체, TAB 250 단클론 항체가 가장 널리 사용되고 있다. Seidman 등[14]

은 HercepTest, Pab1 단클론 항체, TAB250 단클론 항체, CB11 단클론 항체를 이용한 면역조직화학 염색 결과 중 CB11 단클론 항체를 이용한 결과가 형광제자리부합화의 결과와 가장 일치한다고 보고하였다. HercepTest (DAKO, Carpinteria, CA, USA)는 A0485 단클론 항체를 사용한 면역조직화학 염색 방법으로써 세척액을 제외한 모든 시약을 포함하고 있으며 구체적인 염색 방법과 판독 기준 및 정도 관리 방법까지 제공하여 결과에 영향을 미치는 인자들을 최소화하여 면역조직화학검사 방법으로는 유일하게 Herceptin 치료 대상을 선정하기 위한 검사로 FDA에서 인정을 받았다. 그러나 HercepTest는 CB11 단클론 항체를 이용한 면역조직화학 염색 방법에 비해서 가격이 매우 높다. 또한, 침윤성 유방암종에서 HER2 발현율은 20-30%에 불과하므로[3] HercepTest를 모든 유방암종 환자에게 적용하는 것은 효율적이지 못하다.

이 연구에서는 유방암종에서 HER2의 과발현을 검색하기 위해 CB11 단클론 항체를 이용한 면역조직화학 염색 결과와 HercepTest에 의한 결과를 비교해 보고, CB11 단클론 항체를 이용한 면역조직화학 염색 결과가 HercepTest시행 전 선별검사로 사용할 수 있는지 평가해 보고자 하였다.

재료 및 방법

연구 대상

1998년 1월부터 2003년 1월까지 계명대학교 동산의료원 병리과에서 유방암종으로 진단한 198예를 무작위로 선택하였다. 선택한 증례의 슬라이드를 재판독하여 유방암종으로 진단된 슬라이드에서 암세포가 밀집되어 있는 부위를 선택하여 사방 5 mm의 정사각형 모양으로 표시하였다. 파라핀 블록에서 슬라이드의 표시한 부위에 해당하는 부위를 칼날을 이용하여 도려내었다. 도려낸 파라핀 조직을 65 °C로 가열하여 파라핀 성분을 녹인 후 스무조각의 유방암종 조직을 4열로 배열하고 파라핀으로 다시 포매하여 조직 배열 블록을 제작하였다

(Fig. 1).



Fig. 1. Tissue array block consists of 20 cases of breast cancer.

연구 방법

1. CB11 단클론 항체를 이용한 면역조직화학 염색 방법

4 μm 두께로 박절한 조직 절편을 3-aminopropyltriethoxysilane이 도포된 유리슬라이드에 부착한 후 실온(20–25 $^{\circ}\text{C}$)에서 100% xylene에 5분간 2번 부관하여 탈파라핀화 시킨 후 100%, 95%, 90%, 80% 알코올에서 차례대로 각각 5분간 함수 과정을 거친 후 증류수에서 5분간 수세하였다. 내인성 과산화효소의 억제를 위하여 15 mmol/L의 sodium azide (NaN_3)를 함유한 0.3% 과산화수소수로 10분간 처리하고 증류수로 수세하였다. 항원성 회복을 위하여 citrate buffer (0.01 M, pH 6.0)에 담가 6분간 두 차례 극초단파 (microwave)로 가열하여 실온에서 냉각시킨 후 PBS (phosphate buffered saline)로 5분간 2번 수세하였다. 일차 항체인 CB11 단클론 항체 (Novocastra, New Castle, U.K.)를 1 : 40으로 희석하여 슬라이드 당 40 μL 을 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간동안 반응시킨 후 PBS로 5분간 2번 수세하였다. 이차 항체인 biotinylated link antibody (DAKO, Carpinteria, CA, U.S.A.)로 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 반응시켜서 PBS로 수세하고 streptavidin biotin

complex (DAKO, Carpinteria, CA, USA)로 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15분동안 반응시켰다. Imidazole buffer와 3,3-diaminobenzidine tetrachloride (DAB) chromogen (DAKO, Carpinteria, CA, USA)을 1 : 1로 혼합하여 발색시킨 후 수세하고 Mayer's hematoxylin으로 대조염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

2. HercepTest kit를 이용한 면역조직화학 염색 방법

4 μm 두께로 박절한 조직 절편을 부착한 슬라이드를 탈파라핀하여 95–99 $^{\circ}\text{C}$ 의 전처리용액 (HercepTest kit; DAKO, Carpinteria, CA, USA)에 40분 처리한 후 실온에서 20분간 식혔다. 완충액으로 세척한 후 과산화효소차단제 (HercepTest kit; DAKO, Carpinteria, CA, USA)를 30분간 반응시킨 후 200 μL 의 일차 항체를 30분간 조직에 반응시킨 다음 세척하였다. 200 μL 의 발색 시약 (HercepTest kit; DAKO)을 30분간 적용하고 수세하였다. 200 μL 의 diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)를 10분간 반응시킨 후 Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 시행하였다.

3. 결과 판독

CB11 단클론 항체를 이용하여 염색한 슬라이드와 HercepTest kit를 이용하여 제작한 슬라이드를 암 세포의 세포막에 갈색으로 염색되는 정도에 따라 HER2 과발현을 네 가지 등급으로 나누었다. 전혀 염색되는 암 세포가 없거나 10% 미만의 암 세포에서 약하게 염색되는 경우를 0, 암 세포의 10% 이상에서 염색은 되었으나 세포막의 일부가 약하게 염색된 경우는 1+, 암 세포의 10% 이상에서 세포막의 전체가 중등도로 염색된 경우를 2+, 암 세포의 10% 이상에서 세포막의 전체가 강하게 염색된 경우를 3+로 판독하였다. 판독 결과 0과 1+는 음성으로, 2+와 3+는 양성으로 하였다 (Fig. 2).

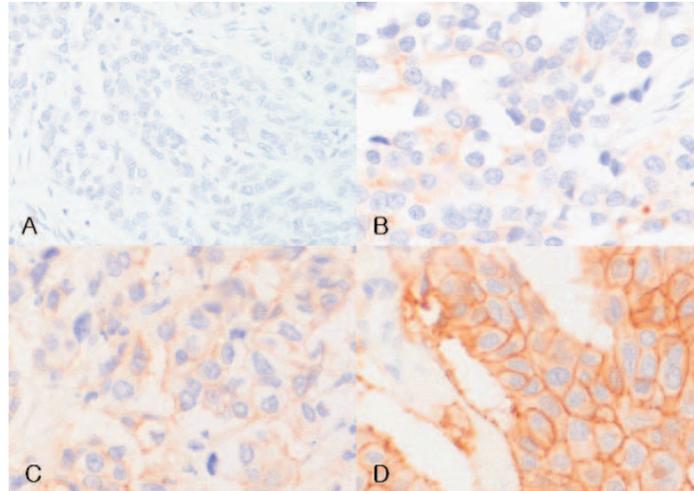


Fig. 2. Scores for HER2 overexpression range from 0 to 3+. (A) 0: Negative; No staining. (B) 1+: Negative; A faint membrane staining is detected in less than 10% of tumor cells. The cells are only stained in part of their membrane. (C) 2+: Weak positive; A weak to moderate complete membrane staining is observed in more than 10% of tumor cells. (D) 3+: Strong positive; A strong complete membrane staining is observed in more than 10% of tumor cells.

4. 통계 분석

각각의 증례에 대한 면역조직화학 염색 판독 결과와 조직학적 분화도를 Statistical Package for the Social Science (SPSS) 10.0 (Systat, Chicago, U.S.A.) 통계 프로그램을 이용하여 비교하였다. 각각의 통계값에서 p 값이 0.05 미만인 경우에 의미가 있다고 해석하였다. Chi-square법을 사용하여 CB11을 이용한 면역조직화학 염색과 HercepTest kit를 이용한 면역조직화학 염색 결과의 일치성에 대한 상관관계를 구하였다. Kappa 계수가 1에 근접할수록 완전한 일치에 가깝고, 0.4 이하의 일치도가 불량한 것으로 평가하였다.

결 과

1. 조직학적 분류

조직배열 파라핀 블록을 4 μ m 두께로 박절하여 제작한 슬라이드를 hematoxylin-eosin 염색을 하여 암조직의 적합성을 검색하였다. 침윤성 유방암

종은 192례였고 관내유방암종이 6례였다. 대상 조직 중 7례가 핵등급 1이었고, 71례가 핵등급 2였고, 120례가 핵등급 3이었다. 침윤성 유방암종을 수정된 Bloom-Richardson 조직학적 등급에 따라 나누었을 때, 17례가 등급 1이었고, 60례가 등급 2였으며, 112례가 등급 3이었다.

2. HER2 단백질 과발현

동일한 조직배열 파라핀 블록에서 얻은 2 장의 조직 절편에 각각 CB11 단클론 항체를 이용한 면역조직화학 염색과 HercepTest를 시행하였다. 육안으로 동일한 증례의 염색 양상을 비교하였을 때 CB11 단클론 항체를 이용하여 염색한 조직이 HercepTest를 시행한 조직보다 배경 염색이 더 진하였다 (Fig. 3). 염색한 슬라이드를 HercepTest의 판독기준에 따라서 평가하였다. CB11 단클론 항체를 이용한 면역조직화학 염색에서 149례가 음성으로 그 중 125례가 0이었고, 24례가 1+였다. 49례는 양성으로 각각 10례와 39례가 2+와 3+였다. HercepTest를 이용하여 염색한 경우에는 0과 1+가 각각 132례와 17례로



Fig. 3. Comparison of the immunohistochemistry result using CB11 monoclonal antibody (A) with that of HercepTest (B) from the same tissue array block. Background stain of the slide (A) is stronger than slide (B).

149례가 음성이었다. HercepTest 염색 결과 양성 이었던 49례 중 13례가 2+였고 36례가 3+였다. 두 가지 검색 방법 모두에서 HER2의 발현 정도가

같았던 증례는 167례로 두 검사 간에 일치율은 84.3%였다(Table 1). 동질성 검증을 시행하여 이 두 가지 검사방법의 결과는 동질성이 있음을 확인 하였다(kappa=0.704).

HER2의 발현을 음성과 양성으로 평가하였을 때 두 검사 모두에서 양성을 나타낸 경우가 44례였고, 음성인 경우는 144례였다. CB11 단클론 항체를 이용한 방법에서 양성을 나타내었으나 HercepTest에서 음성이었던 5례 중 2례는 CB11 단클론 항체에 대한 염색에서는 3+였으나 HercepTest에서는 1+로 판정되었다. 또한 CB11 단클론 항체에 대한 염색에서 2+였으나 HercepTest에서 0이었던 경우도 2례 관찰되었다. CB11에서 HER2 발현 음성이었으나 HercepTest에서 양성인 례가 5례 있었는데 이들 모두의 HercepTest 결과는 2+이었다(Fig. 4).

3. HER2 단백질의 과발현과 유방암종의 조직학적 분화도의 관계:

192례의 침윤성 유방암종 중 조직학적 등급 1이 17례였고, 등급 2는 61례였으며, 등급 3인 경우가 114례였다. CB11 단클론 항체에 대한 면역조직화학 염색과 HercepTest 모두에서 음성이었던

Table 1. Results of immunohistochemistry using CB11 monoclonal antibody versus Hercep Test

CB11	HercepTest				Total
	0	1+	2+	3+	
0	119	5	1	0	125
1+	11	9	4	0	24
2+	2	1	5	2	10
3+	0	2	3	34	39
Total	132	17	13	36	198

0: no staining (negative); 1+: a faint membrane staining detected in less than 10% of tumor cells (negative); 2+: a weak to moderate complete membrane staining observed in more than 10% of tumor cells (positive); 3+: a strong complete membrane staining observed in more than 10% of tumor cells (positive).

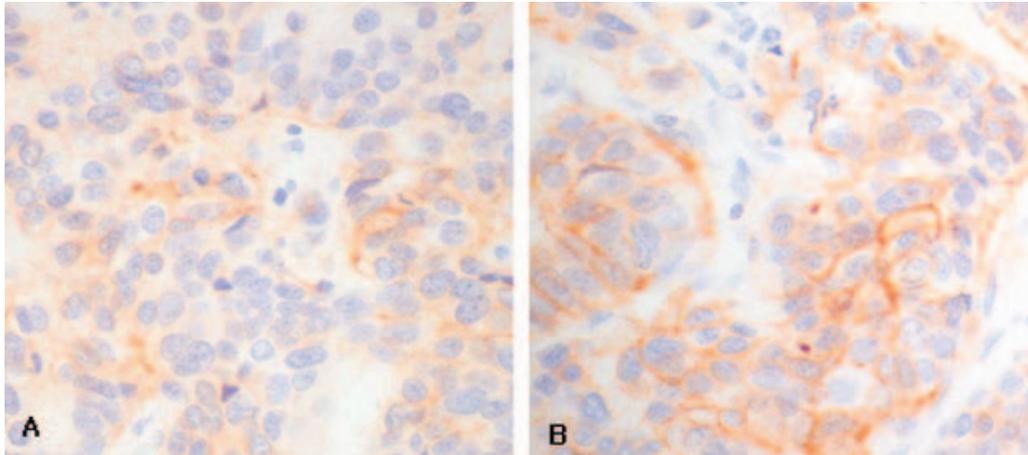


Fig. 4. Comparison of the microscopic findings of a case that discord the result of the immunohistochemistry using CB11 monoclonal antibody (A) with that of the HercepTest (B). (A): Immunohistochemistry of a case of breast carcinoma using CB11 monoclonal antibody is assessed as 1+ by the scoring system. (B): HercepTest of the same tissue with (A) is evaluated as 2+.

Table 2. Relationship between HER2 overexpression and histologic grade

Histologic grade	CB11	HercepTest		Total
		Negative	Positive	
1	Negative	16	0	16
	Positive	0	1	1
2	Negative	45	2	47
	Positive	1	13	14
3	Negative	80	3	83
	Positive	4	27	31
Total		146	46	192

141례의 침윤성 유방암종 중 16례(11.3%)는 조직학적 등급 1, 45례(31.9%)는 조직학적 등급 2, 그리고 80례(56.7%)가 조직학적 등급 3이었다. 침윤성 유방암종 중 CB11 단클론 항체에 대한 면역조직화학 염색과 HercepTest 모두에서 양성으로 판정된 41례 중 조직학적 등급이 1인 경우는 1례(2.4%)였고, 등급 2는 13례(31.7%)였으며, 등급 3인 경우가 27례(65.8%)였다(Table 2).

고 찰

유방암종은 여성에서 가장 흔한 암으로 매년 유방암종의 빈도가 점점 증가하고 있다[15]. 이는 유방촬영술 선별검사의 이용 증가로 인한 조기 발견과 관련되어 있다[16]. HER2는 티로신 키나아제 작용을 가지는 단백질로[17] 세포의 성장 인자로 작용하며 세포의 분화, 부착성 및 운동성에 중요한 역할을 한다[18]. Hynes 등[19]은 유방암종 환자

중 10-34%에서 HER2 과발현이 나타난다고 보고하였다. 이러한 환자들은 질환의 진행 속도가 빠르고 예후도 나쁘다고 알려져 있다[4,5,20]. 최근에 유방암종의 치료제로 개발된 Herceptin® (trastuzumab)은 HER2에 대한 단클론 항체 제제로써 HER2 과발현이 있는 전이성 유방암종에 탁월한 효과를 보인다[21,22].

HER2의 과발현을 검색하기 위해 사용되는 면역조직화학 염색에는 CB11 단클론 항체, A0485 다클론 항체 등을 이용할 수 있는데 항체와 염색 조건에 따라 결과가 다를 수 있어 실험 조건과 판독기준을 표준화한 HercepTest가 개발되었다. 이 연구에서 CB11 단클론 항체를 이용한 면역조직화학 염색과 HercepTest 염색결과를 비교하였을 때 일치율은 84.3%였고, kappa 값이 0.704로 통계학적으로 두 가지 검사방법이 동일한 결과를 나타내었다. 판정 기준을 음성과 양성으로 나누었을 때 일치율은 95%로 두 가지 검사 결과가 매우 연관성이 있었다. CB11 단클론 항체를 이용한 면역조직화학 염색에서 2+ 이상으로 판정된 49례 중 5례는 HercepTest를 시행하였을 때 HER2의 과발현이 나타나지 않았다. 이러한 경우는 CB11단클론 항체를 이용한 면역조직화학 염색을 시행하여 HercepTest의 대상으로 선정된 환자군 중 HercepTest를 시행하였을 때 Herceptin 치료의 대상에서 제외되는 환자군으로 해석하였다. CB11 단클론 항체를 이용한 면역조직화학 염색에서 음성이었던 149례 중 0이었던 125례 중 1례와 1+였던 24례 중 4례가 HercepTest에서 2+를 나타내어 CB11을 이용한 면역조직화학 염색을 HercepTest의 선별검사로 이용할 때 3.4%에서 위음성이 나타났다. 불일치를 보이는 증례의 대부분이 1+와 2+에 집중되어 있어 CB11에 대한 면역조직화학 염색을 HercepTest의 선별검사로 이용한다면 1+와 2+를 판정하는 데 좀 더 주의가 기울여야 할 것으로 생각된다. CB11을 이용한 면역조직화학 염색과 HercepTest 모두에서 양성이었던 44례 중 34례(77.3%)가 두 검사 모두에서 3+이었고, 두 검사 모두에서 음성을 나타낸 144례 중 119례(82.6%)가 0으로 판정되어 0과 3+에서

일치율이 높았다. 이 연구에서 조직학적 등급과 면역조직화학 검사 결과를 비교하여 보았을 때 조직학적 등급과 HER2 발현 사이에 유의한 관계는 없었다. HER2 유전자 증폭은 겨드랑 림프절 전이[5,23,24], 호르몬 수용체의 결핍[5,23,25-27], 종양의 크기[5,23,24] 등과 같은 불량한 예후와 상관성이 있다고 알려져 있다. 그러나 Claus 등[25]과 Bartkova 등[28]은 이 연구에서와 같이 HER2 증폭과 조직학적 등급 사이에 전혀 관계가 없다고 보고하였다.

이 연구 결과 CB11 단클론 항체에 대한 면역조직화학 염색은 HercepTest 시행 전의 선별 검사로 적합하다고 생각된다. 모든 절제된 유방암종에서 일차적 선별 검사로 CB11에 대한 면역조직화학 염색을 한 후, 2+ 이상의 결과를 나타내는 환자에서 HercepTest를 시행하면 보다 경제적으로 HER2 종양단백에 대한 검색을 실시할 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

유방암종으로 진단된 198례의 환자의 병리조직 파라핀블록을 대상으로 하여 CB11 단클론항체를 이용한 면역조직화학염색과 HercepTest를 시행하여 HER2의 발현율을 비교분석하였다. 염색된 슬라이드를 HercepTest의 판정기준에 따라 판독하여 비교한 결과 CB11을 이용한 면역조직화학염색과 HercepTest는 음성인 경우 95%의 일치율을 보였으며 3+인 경우에서도 87%의 일치율을 나타내었다. 이 연구 결과 Herceptin 치료 대상을 선정하기 위하여 HER2 종양단백질의 과발현을 측정할 때 CB11 단클론 항체에 대한 면역조직화학염색이 HercepTest시행 전의 선별검사로 적합하다고 생각된다.

참 고 문 헌

1. Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Isola J, Lebeau A,

- Moreno A, *et al.* Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines. *Mod Pathol* 2003;**16**:173-82.
2. Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, Toyoshima K, Yamamoto T. The product of the human c-erbB-2 gene: A 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science* 1986;**232**:1644-6.
 3. Hanna WM, Kahn HJ, Pienkowska M, Blondal J, Seth A, Marks A. Defining a test for HER2 evaluation in breast cancer in the diagnostic setting. *Mod Pathol* 2001;**14**:677-85.
 4. Ross JS, Fletcher JA. The HER2 oncogene in breast cancer: Prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cells* 1998;**16**:413-28.
 5. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER2 oncogene. *Science* 1987;**235**:177-82.
 6. Dowsett M, Cooke T, Ellis I, Gullick WJ, Gusterson B, Mallon E, *et al.* Assessment of HER2 status in breast cancer: why, when and how? *Eur J Cancer* 2000;**36**:170-6.
 7. Piccart M, Lohrisch C, Di Leo A, Larsimont D. The predictive value of HER2 in breast cancer. *Oncology* 2001;**61**(Suppl 2):73-82.
 8. Bast R, Ravdin P, Hayes DF, Bates S, Fritsche H, Jessup JM, *et al.* 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2001;**19**:1865-78.
 9. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, *et al.* Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;**344**:783-92.
 10. Mass RD, Press M, Anderson S, Murphy M, Salmon D. Improved survival benefit from Herceptin (trastuzumab) in patients selected by fluorescence in situ hybridization (FISH) [abstract]. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001;**20**:22a.
 11. Smith IE. Efficacy and safety of Herceptin in women with metastatic breast cancer: Results from pivotal clinical studies. *Anticancer Drugs* 2001;**12**(Suppl 4):S3-10.
 12. Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ. HER2 protein expression in breast cancer evaluated by immunohistochemistry: A study of interlaboratory agreement. *Am J Clin Pathol* 2000;**113**:251-8.
 13. Ross JS, Fletcher JA. HER2 (c-erbB-2) gene and protein in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1999;**112**(Suppl 1):S53-67.
 14. Seidman AD, Fournier M, Esteva FJ, Tan L, Kaptain S, Bach A, *et al.* Weekly trastuzumab and paclitaxel therapy for metastatic breast cancer with analysis of efficacy by HER-2 immunophenotype and gene amplification. *J Clin Oncol* 2001;**19**:2587-95.
 15. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics 2000. *CA Cancer J Clin* 2000;**50**:7-33.
 16. Mettlin C. Global breast cancer mortality statistics. *CA Cancer J Clin* 1999;**49**:138-44.
 17. Bacus SS, Zelnick CR, Plowman G, Yarden Y. Expression of the erbB-2 family of growth factor receptors and their ligands in breast cancers. Implication for tumor biology and clinical behavior. *Am J Clin Pathol* 1994;**102**(Suppl 1):S13-24.
 18. De Potter CR, Schelfhout AM. The neu-protein and breast cancer. *Virchows Arch* 1995;**426**:107-15.
 19. Hynes NE, Stern DF. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1994;**1198**:165-84.
 20. Slamon D, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, *et al.* Studies of the HER2 proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989;**244**:707-12.
 21. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, *et al.* Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2

- monoclonal antibody in women who have HER-2 overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 1999;**17**:2639-48.
22. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, *et al.* Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;**20**:719-26.
23. Muss HB, Thor AD, Berry DA, Kute T, Liu ET, Koerner F, *et al.* c-erbB-2 overexpression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N Engl J Med* 1994;**330**:1260-6.
24. Ferrero-Pous M, Hacene K, Bouchet C, Le Doussal V, Tubiana-Hulin M, Spyrtos F. Relationship between c-erbB-2 and other tumor characteristics in breast cancer prognosis. *Clin Cancer Res* 2000;**6**:4745-54.
25. Claus EB, Chu P, Howe CL, Davison TL, Stern DF, Carter D, *et al.* Pathobiologic findings in DCIS of the breast: morphologic features, angiogenesis, HER2 and hormone receptors. *Exp Mol Pathol* 2001;**70**:303-16.
26. Clark GM, McGuire WL. Follow-up study of HER2 amplification in primary breast cancer. *Cancer Res* 1991;**51**:944-8.
27. Holland R, Connolly JL, Gelman R, Mravunac M, Hendriks JH, Verbeek AL, *et al.* The presence of an extensive intraductal component following a limited excision correlates with prominent residual disease in the remainder of the breast. *J Clin Oncol* 1990;**8**:113-8.
28. Bartkova J, Barnes DM, Millis RR, Gullick WJ. Immunohistochemical demonstration of c-erbB-2 protein in mammary ductal carcinoma in situ. *Hum Pathol* 1990;**21**:1164-7.