

한국인 갑상선 여포종양의 *RAS* 변이와 *PAX8/PPAR γ* 재배열의 빈도

김혜정 · 장혜원 · 손서영 · 최윤라¹ · 김희진² · 오영륜¹ · 김선욱 · 정재훈

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 내분비대사내과, 병리과¹, 진단검사의학과²

Frequency of *RAS* Mutations and *PAX8/PPAR γ* Rearrangement in Follicular Thyroid Tumors in Korea

Hye Jeong Kim, Hye Won Jang, Seo Young Sohn, Yoon-La Choi¹, Hee-Jin Kim², Young Lyun Oh¹, Sun Wook Kim, Jae Hoon Chung

Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Medicine, Departments of Pathology¹, Laboratory Medicine and Genetics², Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

Background: Follicular thyroid tumors harbor several genetic alterations such as *RAS* mutations and *PAX8/PPAR γ* rearrangement. The aims of our study were to investigate the prevalence of *RAS* mutations and *PAX8/PPAR γ* rearrangement in follicular thyroid tumors and to correlate *RAS* mutations and/or *PAX8/PPAR γ* rearrangement with clinicopathologic features in Korean patients with follicular thyroid carcinomas.

Methods: *RAS* mutations were investigated by polymerase chain reaction and DNA sequencing in surgical specimens of 37 follicular thyroid carcinomas (FTCs) and 16 follicular thyroid adenomas (FTAs). *PAX8/PPAR γ* rearrangement was analyzed by fluorescence *in situ* hybridization in surgical specimens of 31 FTCs and 13 FTAs.

Results: *RAS* mutations were detected in 30% (11 of 37) of FTCs and 19% (three of 16) of FTAs. Three of 11 FTC patients with *RAS* mutations died of thyroid cancer, but none of the 26 FTC patients without *RAS* mutations. *PAX8/PPAR γ* rearrangement was found in 10% (three of 31) of FTCs, but in none of the 13 FTAs. All three FTC patients with *PAX8/PPAR γ* rearrangement remained in complete remission during follow-up. There were no FTC patients with both *RAS* mutations and *PAX8/PPAR γ* rearrangement.

Conclusion: The prevalence of *RAS* mutations in our series of follicular tumors was similar to previous studies. The frequency of *PAX8/PPAR γ* rearrangements in our group of FTC was lower than previous western reports, but higher than Japanese reports. *RAS* mutations may be associated with hematogeneous metastasis and poor survival while *PAX8/PPAR γ* rearrangement may be related to more favorable prognosis in Korean patients with FTCs. (*Endocrinol Metab* 27:45-53, 2012)

Key Words: Mutations, PAX8-PPARgamma fusion protein, Ras, Follicular thyroid cancer

서론

갑상선 여포암은 한국인 갑상선 암의 약 5% 내지 15%를 차지한다 [1,2]. 여포암은 세포 모양이 여포선종과 매우 유사하여 피막이나 혈관의 침윤 여부에 따라 감별 진단되므로 [3], 유두암과 달리 수술 전 세침흡인검사나 수술 중 동결절편검사만으로 정확한 진단이 불가

능하다. 따라서 세침 흡인 검사에서 여포성 종양이 의심되면 대부분의 환자는 수술을 받게 되고, 이 중 일부 환자(8-17%)에서 여포암이 진단된다 [4].

최근 갑상선암과 관련된 많은 유전자 변이가 연구되고 있으며, 여포암에서는 *RAS* 변이나 *PAX8/PPAR γ* 재배열이 가장 흔한 것으로 알려져 있다 [5]. *RAS* 유전자(*HRAS*, *KRAS*, *NRAS*)는 세포막 표면 안

Received: 21 November 2011, Accepted: 1 February 2012

Corresponding author: Jae Hoon Chung

Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Medicine, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, 81 Irwon-ro, Gangnam-gu, Seoul 135-710, Korea

Tel: +82-2-3410-3434, Fax: +82-2-3410-3849, E-mail: thyroid@skku.edu

※ 본 연구는 대한암연구재단 암연구지원사업(CB-2011-03-02)과 삼성생명과학연구소 (SBRI C-B0-233-3) 연구비의 보조로 이루어졌음.

Copyright © 2012 Korean Endocrine Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

쪽에 위치하는 G-단백을 합성하는 데 관여하고, 세포막 수용체 티로신 키나아제(cell membrane receptors tyrosin kinase)와 G-단백 결합 수용체(G-protein-coupled receptor)에서 발생하는 신호를 전달하는 데 중요한 역할을 한다. *RAS*의 코돈 12나 13에 변이가 발생하면 *RAS*-GTP의 친화도가 증가하게 되며, 코돈 61에 변이가 일어나면 내인성 GTPase의 기능이 불활성화되면서 지속적으로 갑상선 세포 증식의 신호를 전달시켜 갑상선 암 발생에 관여하게 된다[6]. *PAX8/PPAR γ* 재배열은 t(2;3)(q13;p25) 전치(translocation)로 갑상선의 분화, 성장, 기능 조절에 중요한 역할을 하는 thyroid-specific transcription factor paired box gene (*PAX8*)과 리간드-의존성 핵 전사 인자인 peroxisome proliferator-activated receptor γ (*PPAR γ*)의 DNA 결합 도메인이 융합되면서 나타난다. Kroll 등[7]은 *PAX8/PPAR γ* 재배열이 여포암의 63%에서 나타나고 여포선종이나 유두암에서는 관찰되지 않으므로, 여포암과 여포선종의 수술 전 감별진단 표지자로서 유용할 것으로 제시하였다. 다른 연구들에서도 여포암에서의 *PAX8/PPAR γ* 재배열이 확인되었고, 여포선종에서도 일부 존재함이 보고되었다[8-10].

현재까지 한국인 여포종양에서 *RAS* 변이에 대한 연구는 제한적인 대상(여포암 5예, 여포선종 8예)에서 이루어졌고[11], *PAX8/PPAR γ* 재배열에 대해서는 보고된 바가 없다. 이에 본 연구에서는 한국인의 여포종양에서 *RAS* 변이와 *PAX8/PPAR γ* 재배열의 빈도를 조사하고, *RAS* 변이 혹은 *PAX8/PPAR γ* 재배열과 관련이 있는 임상적 특징에 대해 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

1999년 1월부터 2004년 12월까지 삼성서울병원에서 수술 후 병리학적으로 갑상선 여포종양으로 진단된 53명의 환자를 대상으로 하였다. 전형적인 여포암 37명(70%), 여포선종 16명(30%)을 포함하였고, 휘틀세포종양은 대상에서 제외하였다. 환자들의 나이는 여포암의 경우 평균 41 ± 14 세(13-68세)이었고, 여포선종의 경우 평균 37 ± 12 세(12-60세)이었다. 남녀 수는 여포암의 경우 여자 28명, 남자 9명 이었고, 여포선종의 경우 여자 14명, 남자 3명이었다. 대상 환자들의 임상정보는 후향적으로 의무기록을 분석하였으며, 여포암의 tumor, node, metastasis (TNM) 병기는 American Joint Committee on Cancer의 2009년 권고안을 따라 분류하였다[12]. 각각의 조직에서 H&E 염색한 슬라이드는 숙련된 2인의 갑상선 병리학자(Y.L.O., Y.C.)에 의해 재검토되었으며, 2003년 세계보건기구 분류체계에 따라 분류하였다[13].

모든 환자들에게 *RAS* 변이와 *PAX8/PPAR γ* 재배열 분석에 대한 조직 표본의 사용에 대한 정보를 제공하고 동의를 얻었으며, 본 연구는 삼성서울병원 임상연구심의위원회의 심의를 통과하였다.

포르말린 고정, 파라핀 함몰 조직 53예(여포암 37예, 여포선종 16예)에서 *RAS* 변이 분석을 시행하였고, 44예(여포암 31예, 여포선종 13예)에서 *PAX8/PPAR γ* 재배열 분석을 시행하였다.

2. *RAS* 변이의 검색

1) 종양 조직에서 DNA 추출

갑상선 여포종양으로 진단된 파라핀 블록에서 각각 10 μ m 두께의 연속절편 10매를 얻어 50 mL 용기에 넣은 다음 xylene을 처리하여 파라핀을 제거하였다. 회수된 조직에서 Tissue SV (plus) mini kit (General Biosystem, Seoul, Korea)를 이용하여 제조회사의 권고 방법에 따라 게놈 DNA를 추출하였다.

2) 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction)

KRAS, *HRAS*, *NRAS* 변이를 검색하기 위한 시발체는 엑손 1번의 코돈 12, 13과 엑손 2번의 코돈 61을 포함하도록 제작하였고, 각각 시발체의 유전자 서열은 Table 1에 기술하였다. 중합효소연쇄반응은 94°C에서 10분간 초기 변성(denaturation)을 한 후, 94°C에서 30초 변성, 48-60°C에서 45초간 담금질(annealing), 73°C에서 45초 확장(extension)하는 과정을 35회 실시하고 73°C에서 10분간 최종 확장하였다. 음성 대조로는 주형(template) DNA를 가하지 않은 반응액을 사용하였다.

3) 유전자 염기서열 분석(DNA sequencing)

유전자 염기서열 분석은 ABI 3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) DNA 자동분석기를 사용하였다. 모든 검체에서 변이의 유무와 그 확인을 위하여 양쪽 가닥이 함께 검색되었다(Fig. 1).

3. *PAX8/PPAR γ* 재배열 검색

1) Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) probes

FISH 분석을 위한 게놈 클론은 human male bacterial artificial

Table 1. Primers used for PCR

<i>RAS</i> gene exon	Codons	Primer sequence (sense/antisense)
<i>HRAS</i> exon-1	12/13	5'-TGGGCTGGCTGAGCAGG -3' 5'-CAGCAGCTGCTGGCACCT -3'
<i>HRAS</i> exon-2	61	5'-CCAGGGAGAGGCTGGCTG -3' 5'-GGTTCACCTGTACTGGTGGG -3'
<i>KRAS</i> exon-1	12/13	5'-GACATGTTCTAATATAGTCAC -3' 5'-CTGTATCAAAGAATGGTCTCT -3'
<i>KRAS</i> exon-2	61	5'-GACTGTGTTTCTCCCTTCT -3' 5'-ACTATAATTACTCCTTAATGTC -3'
<i>NRAS</i> exon-1	12/13	5'-ATGGAAGGTCACACTAGG -3' 5'-GGGCCTCACCTCTATGGTG -3'
<i>NRAS</i> exon-2	61	5'-TTGCATTCCCTGTGGTTTTT -3' 5'-TCCGCAAATGACTTGCTATT -3'

PCR, polymerase chain reaction.

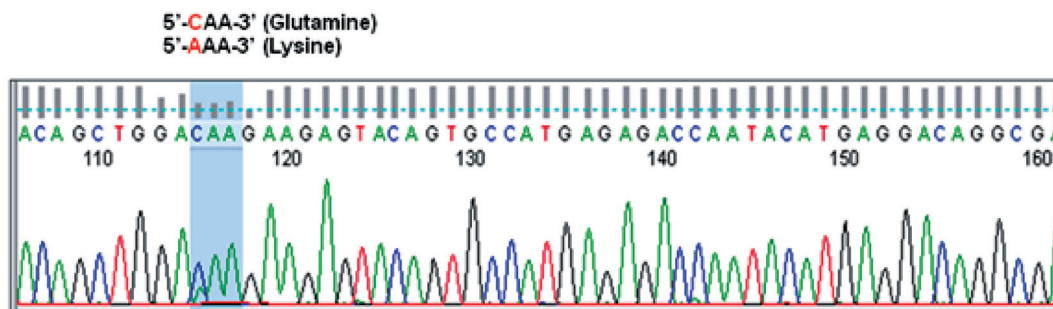


Fig. 1. Sequence chromatogram of *NRAS* exon-2 encompassing codon 61 shows a heterozygosity composed of an altered nucleotide 'A' and a wild-type nucleotide 'C', resulting in Q61K mutation.

chromosome (BAC) library RPCI-11 (<http://bacpac.chori.org/>)에서 고안된 것을 사용하였다. Fusion assay는 2q13에 위치한 *PAX8*로부터 하나의 클론과 3p25에 위치한 *PPAR γ* 로부터 또 다른 클론을 얻어 cohybridization된 *PAX8/PPAR γ* fusion gene을 찾아내기 위한 것으로, *PAX8/PPAR γ* fusion gene은 구체적으로 *PAX8*의 BAC147_H15 혹은 BAC83_K08과 *PPAR γ* 의 BAC171_F07 혹은 BAC26_O22가 결합되는 것을 나타내었다(Fig. 2). Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 제조회사의 권고 방법에 따라 BAC 클론에서 DNA를 분리하고, fluorescein-12-dUTP 혹은 Texas Red-5-dUTP (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA)에 의해 표지되었다. 대조 실험으로, 네 개의 BAC 클론에 대한 정확도와 특이도는 normal male human metaphase chromosomes (Promega, Madison, WI, USA)의 hybridization에 의해 확인되었다.

2) Interphase FISH analysis

갑상선 여포종양으로 진단된 파라핀 블록에서 각각 4 μ m 두께의 연속절편을 얻어 60°C 건조 오븐에 30분간 두어 파라핀을 녹이고, 곧바로 5분간 xylene을 처리하는 과정을 4회 반복하여 파라핀을 제거하였다. 실온의 100%, 95%, 70% 에탄올에 각각 1분씩 탈수시키고, 흐르는 물에 씻은 후 DW에 다시 한 번 씻어내었다. 이후 실온의 0.2 N HCl에 20분간, DW에 3분간 처리하고, 80°C 8% sodium thiocyanate (50 mL conical tube에 40 mL 제조, sodium thiocyanate 3.2 g/DW 40 mL)에 30분간 처리 후, 실온의 2x saline sodium citrate에 3분간 처리하였다. 이후 조직은 37°C의 0.05% pepsin/0.2 N HCl에 30분간 처리하여 digestion하고, washing 후 실온의 1% formaldehyde/PBS에 10분간 처리되어 실온의 70%, 95%, 100% 에탄올에 각각 1분씩 처리하여 탈수, 건조하였다.

Salmon sperm DNA 1 μ L, Human Cot-1 DNA 2 μ L, red probe 2 μ L (147_H15와 171_F07), green probe 2 μ L (83_K08와 26_O22), hybridization mixture 10 μ L를 잘 혼합한 후 슬라이드에 떨어뜨리고, 80°C 건조 오븐에 슬라이드를 5분간 두어 변성(denaturation)한 후, 30% formamide/1x SSC로 적신 moist chamber에서 넣어 37°C에서

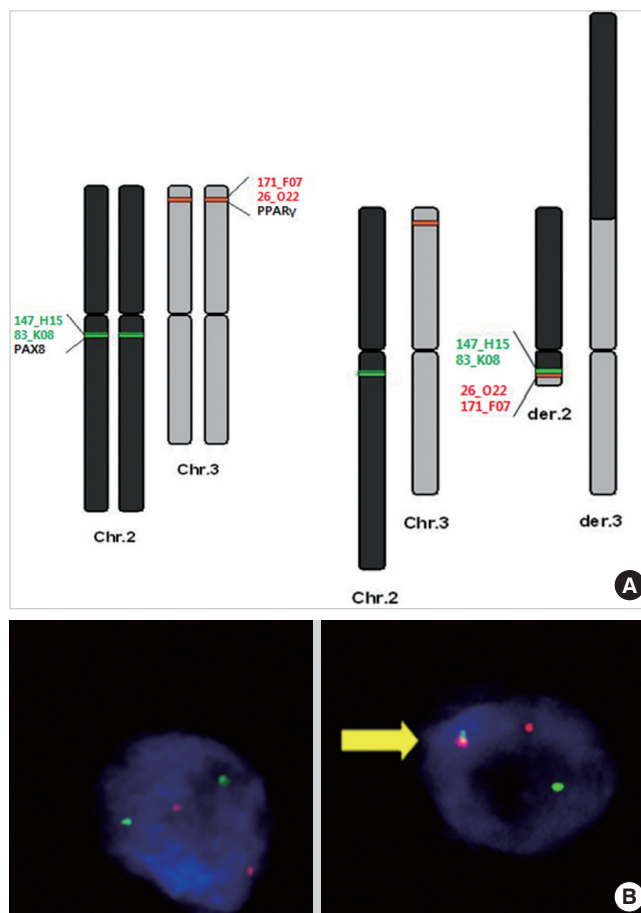


Fig. 2. Interphase fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis demonstrating the absence of a t(2;3)(q13;p25) translocation and its presence in a follicular thyroid carcinoma (FTC). The locations of the BAC probes used for the FISH fusion assays are shown in relation to *PAX8* and *PPAR γ* next to the ideograms of normal chromosomes 2 and 3. A 2q13 probe (83_K08), centromeric of *PAX8*, was labeled with fluorescein-12-dUTP (green), and a 3p25 probe (26_O22), telomeric of *PPAR γ* , was labeled with Texas Red-5-dUTP (red). Nuclei from a follicular thyroid adenoma in which t(2;3)(q13;p25) is absent are shown in A, whereas B demonstrates nuclei from an FTC in which t(2;3)(q13;p25) is present (arrow), as demonstrated by the adjacently located green (83_K08) and red (26_O22) hybridization signals.

16시간 이상 hybridization을 시행하였다. 슬라이드를 0.5x SSC/0.1% SDS에 5분간 처리하여 씻어내고, 실온의 70%, 95%, 100% 에탄올에 각각 1분씩 처리 후 암실에서 자연 건조하였다. 4,6-diamino-2-phenylindole/antifade solution 10 μ L를 떨어뜨려 counterstaining 후 DMRXA2 (Leica, Wetzlar, Germany) fluorescence microscope와 Photometrics Coolsnap (Roper Scientific, Ottobrunn, Germany)을 이용하여 결과를 확인하였다. 두 개의 프로브가 융합되거나 가까이 있을 경우(distance \leq 1 probe signal) *PAX8/PPARY* 재배열 양성으로 판단하였다.

4. 통계적 분석

임상적 특징에 대한 자료는 평균 \pm 표준편차 또는 비율(%)로 표현하였다. *RAS* 변이 혹은 *PAX8/PPARY* 재배열과 관련이 있는 임상적 특징의 상관 관계는 분할표와 카이제곱 검정 통계 또는 Fisher의 정확검정법을 이용하여 분석하였다. 환자의 나이나 종양의 크기와 같은 연속변수는 Student's t-test를 이용하여 비교하였다. 통계적인 유의성은 *P* 값으로 표현하였으며 양측으로 0.05 미만인 경우에 유의한 차이를 보이는 것으로 간주하였다. 통계 분석은 SPSS version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였다.

결 과

1. *RAS* 변이의 빈도와 *RAS* 변이 유무에 따른 임상적 특징

여포암 37명 중 11명(30%), 여포선종 16명 중 3명(19%)에서 *RAS* 변이가 관찰되었다. 여포암 환자 중에서 *NRAS* 코돈 61 변이가 관찰된 환자는 총 8명으로 가장 빈도가 높았으며, *HRAS* 코돈 61과 *HRAS*

Table 2. Spectrum of *RAS* point mutations identified in follicular cell tumors

		FTCs (n = 37)	FTAs (n = 16)
<i>NRAS</i> codon 61	CAA \rightarrow AAA	5	1
	CAA \rightarrow CGA	3	1
<i>HRAS</i> codon 61	CGA \rightarrow CGG	2	1
<i>KRAS</i> codon 13	GGT \rightarrow CGT	1	0
<i>KRAS</i>		0	0
Total <i>RAS</i> mutations, n (%)		11 (30)	3 (19)

FTA, follicular thyroid adenoma; FTC, follicular thyroid carcinoma.

코돈 13 변이는 각각 2명, 1명에서 관찰되었다. 여포선종 환자에서는 *NRAS* 코돈 61, *HRAS* 코돈 61 변이가 각각 2명, 1명에서 관찰되었다. 한편, *KRAS* 변이가 관찰된 종양은 없었다(Table 2).

여포암에서 *RAS* 변이 유무에 따른 임상적 특징을 살펴보기 위해, *RAS* 변이가 관찰된 11명과 *RAS* 변이가 관찰되지 않은 26명을 비교하였다(Table 3). 진단 당시 환자의 나이나 성별, 종양의 크기, 국소 림프절 전이나 원격 전이 유무, 조직학적 침범 정도에 있어 그룹 간 통계학적으로 유의한 차이를 나타내는 인자는 없었다. *RAS* 변이가 있었던 환자 11명을 중앙값 68개월(범위, 48-141개월) 동안 추적 관찰하였을 때, 7명의 환자는 완전 관해에 도달하였고, 1명의 환자는 지속적인 질병 상태를 보였으며, 3명의 환자가 여포암으로 사망한 것으로 나타났다. 한편, *RAS* 변이가 관찰되지 않았던 환자 26명을 중앙값 67개월(범위, 10-108개월) 동안 추적 관찰하였을 때, 21명의 환자가 완전 관해에 도달하였고, 4명의 환자는 지속적인 질병 상태, 1명의 환자에서 질병 재발이 있었으나 사망한 환자는 없었다(Fig. 3). 여포암으로 사망한 환자 3명은 모두 *NRAS* 코돈 61 변이가 관찰되었으며, 진단 당시 나이가 모두 45세 이상이고, 조직학적 소견에서 종양 주위로 광범위 침윤이 관찰되며, 원격 전이가 동반된 공통점이 있었다(Table 4).

Table 3. Comparison of clinicopathologic features of 37 FTC patients according to *RAS* point mutations

	<i>RAS</i> mutations (+) (n = 11)	<i>RAS</i> mutations (-) (n = 26)	<i>P</i> value
Age (yr)	45 \pm 14	39 \pm 14	NS
Male/Female	3/8	6/20	NS
Tumor size (cm)	3.9 \pm 1.8	3.7 \pm 2.4	NS
LN invasion	2 (18)	0	NS
Distant metastasis	3 (27)	3 (12)	NS
Stage III/IV	10 (91)	26 (100)	NS
Invasiveness			NS
Minimally	5 (50)	17 (65)	
Widely	5 (50)	9 (35)	
Capsular invasion	9 (82)	26 (100)	NS
Vascular invasion	6 (55)	14 (54)	NS

Values are presented as mean \pm SD or number (%).

FTC, follicular thyroid carcinoma; LN, lymph node; NS, not significant; *RAS* mutations (+), positive for *RAS* mutations; *RAS* mutations (-), negative for *RAS* mutations.

Table 4. Summary of clinicopathologic features of died of FTC patients with *RAS* point mutations

No.	Sex	Age (yr)	Size (cm)	Capsular invasion	Vascular invasion	Invasiveness	LN metastasis	Distant metastasis	TNM stage	Mutation type
1	F	49	6.5	Yes	Yes	Widely	Yes	Lung, bone	IV	<i>NRAS</i>
2	F	48	2.0	Yes	Yes	Widely	No	Bone	IV	<i>NRAS</i>
3	M	54	6.5	Yes	No	Widely	Yes	Brain, bone	IV	<i>NRAS</i>

FTC, follicular thyroid carcinoma; LN, lymph node; TNM, tumor, node, metastasis.

2. PAX8/PPAR γ 유전자 재배열 빈도와 임상적 특징

여포암 31예 중 3예(10%)에서 PAX8/PPAR γ 재배열이 관찰된 반면, 여포선종에서는 PAX8/PPAR γ 재배열이 관찰되지 않았다(Table 5, Fig. 4). PAX8/PPAR γ 재배열이 관찰된 환자는 모두 남성이었고 나이가 50세 미만으로 젊었으며, 수술 후 병리소견에서 피막 전이와 혈관 전이가 관찰되었으나, 국소 림프절 전이나 원격 전이는 동반되지

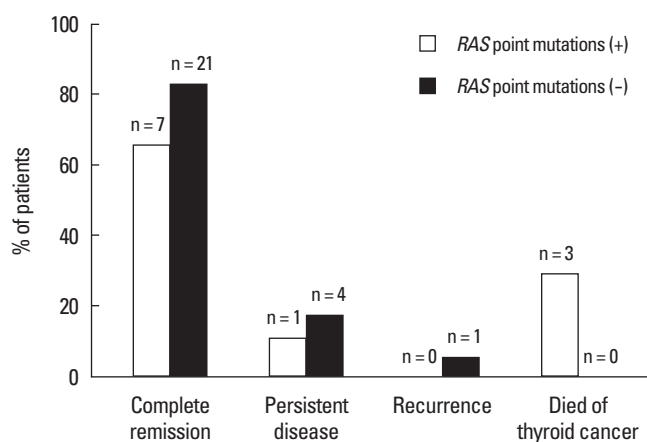


Fig. 3. Clinical outcomes at last follow-up between RAS point mutations (+) and RAS point mutation (-) in patients with follicular thyroid carcinomas.

않았고, 경과 관찰 기간 동안 완전 관해를 보였다(Table 6).

3. RAS 변이와 PAX8/PPAR γ 재배열 빈도와 임상적 특징

RAS 변이와 PAX8/PPAR γ 재배열을 모두 살펴본 44명의 환자에서 RAS 변이 단독, PAX8/PPAR γ 재배열 단독, 혹은 RAS 점 돌연변이와 PAX8/PPAR γ 재배열을 동시에 보이는 빈도를 확인하였다(Table 7). RAS 변이만 발생된 환자는 여포암 7명, 여포선종 2명이었다. PAX8/PPAR γ 재배열은 여포암 중 3명에서만 관찰되었다. RAS 변이와 PAX8/PPAR γ 재배열이 동시에 발생된 환자는 없었다.

여포암 환자에서 RAS 변이가 발생된 환자(n = 7)와 PAX8/PPAR γ 재배열이 발생된 환자(n = 3)의 임상적, 병리학적 특징을 살펴보았

Table 5. Spectrum of PAX8/PPAR γ rearrangement identified in follicular cell tumors

	PAX8/PPAR γ rearrangement (+)	PAX8/PPAR γ rearrangement (-)
FTCs (n = 31)	3 (10)	28 (90)
FTAs (n = 13)	0	13 (100)

Values are presented as number (%).

FTA, follicular thyroid adenoma; FTC, follicular thyroid carcinoma; PAX8/PPAR γ rearrangement (+), positive for PAX8/PPAR γ rearrangement; PAX8/PPAR γ rearrangement (-), negative for PAX8/PPAR γ rearrangement.

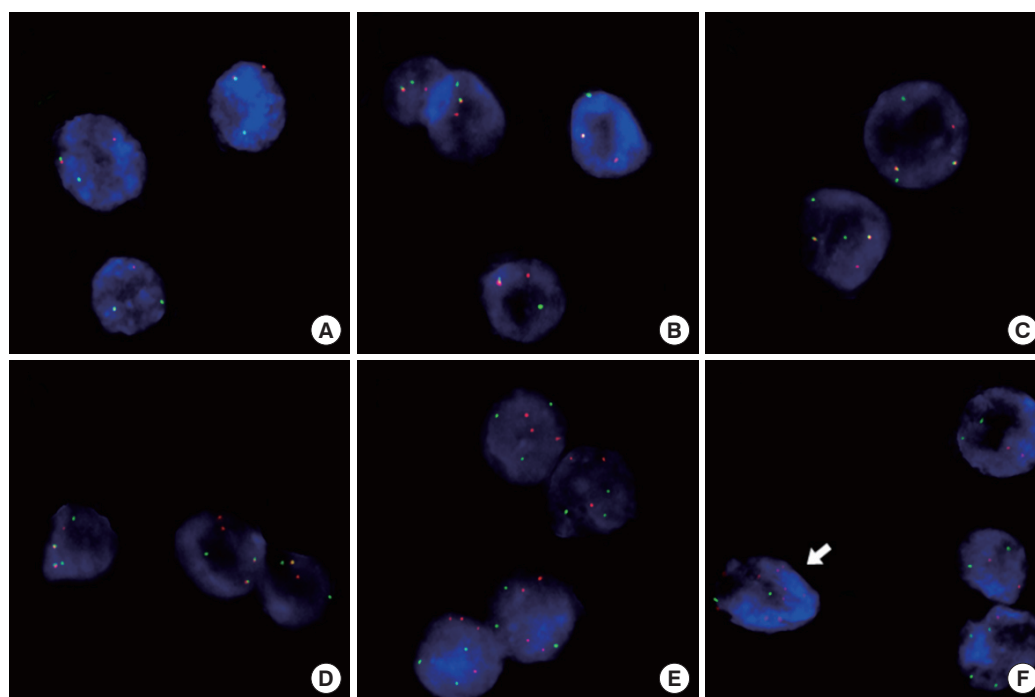


Fig. 4. PAX8/PPAR γ rearrangement with or without other aberrant signal patterns revealed by fluorescence *in situ* hybridization (F, fusion signal; G, green signal; O, orange signal). A. PAX8/PPAR γ rearrangement with the 1F1G10 signal. B. PAX8/PPAR γ rearrangement with the 1F1G10 signal. C. PAX8/PPAR γ rearrangement with the 2F2G10 signal pattern. D. PAX8/PPAR γ rearrangement along with different numerical gains (2F1G10 [left], 2F2G10 [middle], and 2F1G10 [right]). E. PAX8/PPAR γ rearrangement with the gains of signals, showing 3G30 (upper two cells), and 3G40 (lower two cells) signal patterns. F. PAX8/PPAR γ rearrangement with the gains of signals showing multiple O signals (white arrow), indicating the amplification of the PPAR γ .

Table 6. Summary of clinicopathologic data of 3 FTC patients with *PAX8/PPAR γ* rearrangement

No.	Sex	Age (yr)	Size (cm)	Capsular invasion	Vascular invasion	Invasive-ness	LN metastasis	Distant metastasis	TNM stage	Out-come
1	M	47	7.0	Yes	Yes	Widely	No	No	III	CR
2	M	47	5.0	Yes	Yes	Minimally	No	No	III	CR
3	M	35	2.2	Yes	Yes	Minimally	No	No	III	CR

CR, complete remission; FTC, follicular thyroid carcinoma; LN, lymph node; TNM, tumor, node, metastasis.

Table 7. Prevalence of *RAS* mutations and *PAX8/PPAR γ* rearrangement

	FTCs (n = 31)	FTAs (n = 13)
<i>RAS</i> (+)	7	2
<i>PAX8/PPARγ</i> (+)	3	0
<i>RAS</i> (+)/ <i>PAX8/PPARγ</i> (+)	0	0
<i>RAS</i> (-)/ <i>PAX8/PPARγ</i> (-)	21	11

FTA, follicular thyroid adenoma; FTC, follicular thyroid carcinoma; *PAX8/PPAR γ* (+), positive for *PAX8/PPAR γ* rearrangement; *RAS* (+), positive for *RAS* mutations; *RAS* (+)/*PAX8/PPAR γ* (+), positive for both *RAS* mutations and *PAX8/PPAR γ* rearrangement; *RAS* (-)/*PAX8/PPAR γ* (-), negative for both *RAS* mutations and *PAX8/PPAR γ* rearrangement.

다(Table 8). 환자의 평균 나이는 47세로 그룹 간 차이는 없었고, *RAS* 변이가 발생한 환자는 여자 6명, 남자 1명으로 여자가 많았던 반면 *PAX8/PPAR γ* 재배열이 발생한 환자 3명은 모두 남자였다($P = 0.03$). 종양의 크기나 국소 림프절 전이 원격 전이 유무, 종양 주위 조직으로의 침윤 정도, 피막 혹은 혈관 전이 유무 등 조직병리소견에서 그룹 간 통계학적으로 유의한 차이를 나타내는 인자는 없었다. *RAS* 변이가 발생한 여포암 환자 중 6명은 치료 후 완전 관해 상태였고, 1명은 지속적 질병 상태로 경과 관찰 중이었으며, *PAX8/PPAR γ* 재배열을 나타낸 환자는 모두 치료 후 완전 관해에 도달하였다.

고 찰

본 연구는 갑상선 여포종양에서 진단 및 예후와 관련이 있다고 알려진 *RAS* 변이와 *PAX8/PPAR γ* 재배열 분석을 동시에 시행하여, 그 빈도와 임상적 특징에 대해 살펴본 국내 첫 연구이다.

RAS 변이는 여포암에서 24-53%의 빈도로 관찰되고[14-17], 여포선종에서는 0-52%의 빈도로 보고되고 있다[14,16-19]. 요오드 섭취가 충분한 지역에 비하여 요오드 결핍 지역에서 더 높은 빈도로 나타나고[20], 검사 방법에 따라서도 양성률이 다르게 나타나는 것으로 알려져 있다[21]. 본 연구에서는 SSCP와 염기서열을 직접 분석하여 *RAS* 변이를 살펴보고, 여포암 37명 중 11명(30%)에서, 여포선종 16명 중 3명(19%)에서 관찰되어 외국의 보고와 비슷한 빈도를 나타내었다. 또한 갑상선 종양에서는 *NRAS* 코돈 61, *HRAS* 코돈 61과 관련된 변이가 가장 흔한 것으로 알려져 있는데[21], 본 연구에서도 *NRAS* 코돈 61과 관련된 변이가 여포암 8명, 여포선종 2명의 환자에

Table 8. Clinicopathologic features of FTC patients with *RAS* point mutations and *PAX8/PPAR γ* rearrangement

	<i>RAS</i> (+)/ <i>PAX8/PPARγ</i> (-) (n = 7)	<i>RAS</i> (-)/ <i>PAX8/PPARγ</i> (+) (n = 3)	<i>P</i> value
Age (yr)	47 (24-68)	47 (35-47)	NS
Male/Female	1/6	3/0	0.03
Tumor size (cm)	3.5 (0.5-5.0)	0.5 (2.2-7.0)	NS
LN invasion	1	0	NS
Distant metastasis	1	0	NS
Stage III/IV	6	3	NS
Invasiveness			NS
Minimally	4	2	
Widely	3	1	
Capsular invasion	6	3	NS
Vascular invasion	3	3	NS
Disease status			
Remission	6	3	
Persistence	1	0	
Recurrence	0	0	
Died of thyroid cancer	0	0	

FTC, follicular thyroid carcinoma; LN, lymph node; NS, not significant; *RAS* (+)/*PAX8/PPAR γ* (-), positive for *RAS* mutations and negative for *PAX8/PPAR γ* rearrangement; *RAS* (-)/*PAX8/PPAR γ* (+), negative for *RAS* mutations and positive for *PAX8/PPAR γ* rearrangement.

서 발견되어 가장 빈도가 높았으며, *HRAS* 코돈 61과 관련된 변이가 여포암 2명, 여포선종 1명에서 발견되어 그 다음으로 빈도가 높아 외국의 보고와 크게 다르지 않았다.

RAS 변이 유무에 따른 여포암의 임상적 특징 및 수술 후 병리학 적 특징을 살펴보기 위해 *RAS* 변이가 관찰된 11명과 *RAS* 변이가 관찰되지 않은 26명을 비교하였을 때, 진단 당시 환자의 나이나 성별, 종양의 크기, 국소 림프절 전이 원격 전이 유무, 조직학적 침범 정도에 있어 그룹 간 통계학적으로 유의한 차이를 나타내는 인자는 없었다. 그러나 여포암으로 사망한 환자 3명을 분석하여 보았을 때, 공통적으로 *RAS* 변이가 관찰되었으며, 광범위 침윤이 있고, 원격 전이, 특히 골 전이가 동반되어 있었는데, 이는 한국인 여포암에서 *RAS* 변이가 혈행 전이 및 낮은 생존율과 관련이 있음을 시사한다. *RAS* 변이가 분화된 갑상선암에서는 낮은 생존율을 예측하는 독립적인 인자라고 보고한 Garcia-Rostan 등[22]의 연구와 *RAS* 변이가 여포암에

서 원격 전이, 특히 골 전이와 유의한 관계가 있음을 보고한 Karga 등[23]의 연구에 부합하는 소견이라 할 수 있다. 그러나 본 연구의 RAS 변이 유무에 따른 환자들의 평균 추적 관찰 기간에 차이가 있으며, RAS 변이가 있는 환자에서는 완전 관해에 도달한 환자 비율이 적고 갑상선 여포암으로 인한 사망자의 빈도가 높은 반면 RAS 변이가 없는 환자에서 지속적 질병 상태 혹은 재발이 있었던 환자의 빈도가 상대적으로 높아, RAS 변이의 예후와의 관련성에 대해서는 좀 더 많은 환자를 대상으로 장기간 추적 관찰이 필요할 것으로 사료된다.

한편, RAS 변이가 갑상선 여포종양의 초기 단계에 발생되어 또 다른 유전체 돌연변이에 선행하므로[24,25], RAS 변이가 있을 경우 비록 양성 여포선종이라고 해도 여포암으로의 진행을 예방하기 위해 수술적으로 제거되어야 하는 것이 옳은 선택일 수 있다는 보고도 있으나[26], 여포선종이 여포암으로 진행할 수 있을지에 대해서는 아직 정확히 알려진 바가 없어 여포선종에서 RAS 변이가 갖는 임상적 의의에 대해서는 좀 더 많은 연구가 필요하다.

PAX8/PPAR γ 재배열은 여포암의 26-63%에서 나타나는 것으로 보고되는데[7-9,27], 그 빈도는 인종적, 환경적 차이나 방사선 조사력, 검사방법 등에 따라 차이를 보인다. 우리나라와 지역적으로 가까운 일본의 연구에서는 PAX8/PPAR γ 재배열이 한 예에서도 관찰되지 않았고[28], Nikiforova 등[29]의 연구에서는 방사선 조사의 과거력이 있었던 여포암 환자 모두에서 PAX8/PPAR γ 재배열이 관찰되었다. 또한 Dwight 등[10]은 동일한 갑상선 여포종양 총 87예에서 웨스턴 블롯, RT-PCR, FISH를 이용하여 PAX8/PPAR γ 재배열을 분석하였고, 웨스턴 블롯 방법으로는 11예에서 PAX8/PPAR γ 재배열이 확인된 반면, FISH 분석과 RT-PCR에 의한 mRNA 분석으로는 각각 7예, 5예에서 PAX8/PPAR γ 재배열이 확인되어 검사 방법 간에도 PAX8/PPAR γ 재배열 빈도가 다르게 나타남을 보고하였다[10]. 본 연구에서 과거력상 방사선 조사를 받았던 환자는 없었으며, FISH 분석으로 PAX8/PPAR γ 재배열을 확인한 결과 여포암 31명 중 3명(10%)에서 관찰되어, 그 빈도가 서구[7-9,27]에 비해 상대적으로 낮고, 일본[28]에 비해 높음을 알 수 있었다. PAX8/PPAR γ 재배열이 관찰된 3명의 환자들은 나이가 50세 미만으로 젊고, 수술 후 병리소견에서 피막 침범과 혈관 전이가 관찰되었으나, 국소 림프절 전이나 원격 전이는 동반되지 않았으며, 경과 관찰 기간 동안 완전 관해를 보이는 공통점이 있었다. Dwight 등[10]의 연구에서도 PAX8/PPAR γ 재배열이 관찰된 환자 10명 중 6명이 관해 상태에 이르고, 2명은 다른 질환으로 사망하였으며, 한 명은 추적 관찰이 되지 않았고, 폐 전이가 동반되었던 한 명의 환자만이 갑상선암으로 인해 사망하였는데, 이는 PAX8/PPAR γ 재배열은 비교적 좋은 예후와 관련이 있음을 시사하는 소견이라 할 수 있다. 한편, 본 연구에 포함된 여포선종에서는 Kroll 등[7]과 French 등[27]의 연구에서와 마찬가지로 PAX8/PPAR γ 재배열은 관찰되지 않았다. Marques 등[9]의 연구에서는 여포선종의 13%에서 PAX8/PPAR γ 재배열이 보고되었고, Dwight 등[10]의 연

구에서는 비전형적인 여포선종 1예에서 PAX8/PPAR γ 재배열이 관찰되어 피막이나 혈관 전이가 조직병리학적으로 여포암을 시사하는 소견이 나타나기 전 초기 암 발생과 관련이 있을 것이라고 제시하였다. 따라서 PAX8/PPAR γ 재배열이 관찰되는 여포종양의 경우 여포암으로 진단될 가능성이 높으나, 수술 전 여포암과 여포선종을 감별하는 데 있어 표지자로 사용하기에는 한계가 있으며, PAX8/PPAR γ 재배열이 여포선종에서 여포암으로의 발전 가능성을 시사하거나 나쁜 예후를 암시하는 증거는 현재까지 보고된 바가 없어 이에 대해서는 보다 많은 연구가 필요하다.

RAS 변이 혹은 PAX8/PPAR γ 유전자 재배열은 각각의 분자적 경로를 통해 상호배제적으로 여포암 발생에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 같은 종양 조직에서 RAS 변이와 PAX8/PPAR γ 재배열이 동시에 나타나는 경우는 매우 드문 것으로 보고되었다[8]. 본 연구에서도 PAX8/PPAR γ 재배열이 동시에 나타난 예는 없었으며, RAS 변이(30%) 혹은 PAX8/PPAR γ 재배열(10%)이 발견된 경우는 여포암 환자의 약 40%에 해당되었다. 이는 Nikiforova 등[8]이 보고한 RAS 변이(58%) 혹은 PAX8/PPAR γ 재배열(30%)에 비해 현저히 낮은 빈도로 한국인 갑상선 여포암의 발생에 또 다른 발병기전이 존재할 가능성을 시사한다.

결론적으로, 한국인 갑상선 여포암에서 RAS 변이는 외국의 보고와 빈도가 크게 다르지 않았으며, PAX8/PPAR γ 재배열은 서구에 비해서는 낮은 빈도를 나타내고 일본의 보고에 비해서는 높은 빈도를 나타내었다. RAS 변이와 PAX8/PPAR γ 재배열이 상호배제적으로 발현함을 확인하였고, RAS 변이는 혈행 전이 및 낮은 생존율과 관련이 있고, PAX8/PPAR γ 재배열은 비교적 좋은 예후와 관련이 있음을 알 수 있었다. 그러나 본 연구는 1개의 병원에서 일정 기간 동안 수술받은 환자를 대상으로 하였기 때문에 한국인의 갑상선 여포암의 유전자 변이 빈도와 임상적 특징에 대해 다기관으로 더 많은 환자들을 대상으로 RAS 변이 및 PAX8/PPAR γ 재배열을 확인해 볼 필요성이 있다. 또한 여포암 발생에 있어 RAS 변이 혹은 PAX8/PPAR γ 재배열 이외 또 다른 유전자가 관여되어 있을 가능성에 대한 연구가 필요하다.

요 약

배경: RAS 변이와 PAX8/PPAR γ 재배열은 갑상선 여포암의 가장 흔한 발병 기전으로 알려져 있다. 현재까지 한국인 갑상선 여포종양에서 RAS 변이는 제한적인 대상에서 이루어졌고, PAX8/PPAR γ 재배열에 대해서는 보고된 바가 없다. 본 연구에서는 갑상선 여포종양에서 RAS 변이와 PAX8/PPAR γ 재배열의 빈도를 조사하고, RAS 변이 혹은 PAX8/PPAR γ 재배열과 관련이 있는 임상적 특징에 대해 알아보고자 하였다.

방법: 갑상선 여포암 37예, 여포선종 16예의 조직을 대상으로 RAS

변이 검색을 위해 중합효소연쇄반응과 유전자 염기서열 분석을 차례로 시행하였다. 또한 *PAX8/PPARY* 재배열 검색을 위해 갑상선 여포암 31예, 여포선종 13예의 조직에서 fluorescent *in situ* hybridization (FISH)을 시행하였다.

결과: *RAS* 변이는 여포암의 30% (37예 중 11예), 여포선종의 19% (16예 중 3예)에서 관찰되었다. *RAS* 변이가 있었던 11명의 환자 중 3명의 환자가 여포암으로 사망한 반면, *RAS* 변이가 없었던 환자에서 사망한 환자는 없었다. *PAX8/PPARY* 재배열은 여포암 31예 중 3예 (10%)에서 관찰되었고, 여포선종 13예에서는 관찰되지 않았다. *PAX8/PPARY* 재배열이 관찰된 3명의 환자는 경과 관찰기간 동안 완전 관해를 보였다. *RAS* 변이와 *PAX8/PPARY* 재배열이 동시에 나타난 종양은 없었다.

결론: 본 연구 결과는 한국인 갑상선 여포암에서 *RAS* 변이의 발생은 외국의 보고와 유사하고, *PAX8/PPARY* 재배열의 빈도는 서구에 비해 낮고 일본에 비해 높으며, *RAS* 변이와 *PAX8/PPARY* 재배열은 상호배제적으로 발생함을 보여주었다. 또한 갑상선 여포암 환자에서 *RAS* 변이는 혈행 전이 및 낮은 생존율과 관련이 있고, *PPARY* 재배열은 비교적 좋은 예후와 관련이 있음을 시사하고 있다.

참고문헌

- Hong EK, Lee JD: A national study on biopsy-confirmed thyroid diseases among Koreans: an analysis of 7758 cases. *J Korean Med Sci* 5:1-12, 1990
- Choi CW, Moon DH, Lee MC, Cho BY, Koh CS, Lee MH, Oh SK, Choi KJ, Park SH, Kim YI: Clinical study on thyroid cancer (the 3rd report). *Korean J Nucl Med* 20:59-65, 1986
- Vini L, Harmer C: Management of thyroid cancer. *Lancet Oncol* 3:407-414, 2002
- Mazzaferri EL: Management of a solitary thyroid nodule. *N Engl J Med* 328:553-559, 1993
- Nikiforov YE: Thyroid carcinoma: molecular pathways and therapeutic targets. *Mod Pathol* 21 Suppl 2:S37-S43, 2008
- Barbacid M: Ras genes. *Annu Rev Biochem* 56:779-827, 1987
- Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ, Mueller E, Spiegelman BM, Fletcher JA: *PAX8-PPARG* fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]. *Science* 289:1357-1360, 2000
- Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander EK, Dorn GW 2nd, Tallini G, Kroll TG, Nikiforov YE: *RAS* point mutations and *PAX8-PPAR* gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2318-2326, 2003
- Marques AR, Espadinha C, Catarino AL, Moniz S, Pereira T, Sobrinho LG, Leite V: Expression of *PAX8-PPAR* gamma 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3947-3952, 2002
- Dwight T, Thoppe SR, Foukakis T, Lui WO, Wallin G, Höög A, Frisk T, Larsson C, Zedenius J: Involvement of the *PAX8/peroxisome proliferator-activated receptor gamma* rearrangement in follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4440-4445, 2003
- Park KY, Koh JM, Kim YI, Park HJ, Gong G, Hong SJ, Ahn IM: Prevalences of *Gs alpha*, *ras*, *p53* mutations and *ret/PTC* rearrangement in differentiated thyroid tumours in a Korean population. *Clin Endocrinol (Oxf)* 49:317-323, 1998
- American Thyroid Association (ATA) Guidelines Taskforce on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer, Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, Mazzaferri EL, McIver B, Paccini F, Schlumberger M, Sherman SI, Steward DL, Tuttle RM: Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 19:1167-1214, 2009
- DeLellis RA, Lloyd RV, Heinz PU: WHO classification of tumours, pathology and genetics of tumours of endocrine organs. pp73-76, Lyon, IARC Press, 2004
- Lemoine NR, Mayall ES, Wyllie FS, Farr CJ, Hughes D, Padua RA, Thurston V, Williams ED, Wynford-Thomas D: Activated *ras* oncogenes in human thyroid cancers. *Cancer Res* 48:4459-4463, 1988
- Suarez HG, du Villard JA, Severino M, Caillou B, Schlumberger M, Tubiana M, Parmentier C, Monier R: Presence of mutations in all three *ras* genes in human thyroid tumors. *Oncogene* 5:565-570, 1990
- Esapa CT, Johnson SJ, Kendall-Taylor P, Lennard TW, Harris PE: Prevalence of *Ras* mutations in thyroid neoplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 50:529-535, 1999
- Manenti G, Pilotti S, Re FC, Della Porta G, Pierotti MA: Selective activation of *ras* oncogenes in follicular and undifferentiated thyroid carcinomas. *Eur J Cancer* 30A:987-993, 1994
- Namba H, Rubin SA, Fagin JA: Point mutations of *ras* oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis. *Mol Endocrinol* 4:1474-1479, 1990
- Shi YE, Zou MJ, Schmidt H, Juhasz F, Stensky V, Robb D, Farid NR: High rates of *ras* codon 61 mutation in thyroid tumors in an iodide-deficient area. *Cancer Res* 51:2690-2693, 1991
- Said S, Schlumberger M, Suarez HG: Oncogenes and anti-oncogenes in human epithelial thyroid tumors. *J Endocrinol Invest* 17:371-379, 1994
- Vasko V, Ferrand M, Di Cristofaro J, Carayon P, Henry JF, de Micco C: Specific pattern of *RAS* oncogene mutations in follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2745-2752, 2003
- Garcia-Rostan G, Zhao H, Camp RL, Pollan M, Herrero A, Pardo J, Wu R, Carcangiu ML, Costa J, Tallini G: *Ras* mutations are associated with aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer. *J Clin Oncol* 21:3226-3235, 2003
- Karga H, Lee JK, Vickery AL Jr, Thor A, Gaz RD, Jameson JL: *Ras* oncogene mutations in benign and malignant thyroid neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab* 73:832-836, 1991
- Saavedra HI, Knauf JA, Shirokawa JM, Wang J, Ouyang B, Elisei R, Stambrook PJ, Fagin JA: The *RAS* oncogene induces genomic instability in thyroid PCCL3 cells via the MAPK pathway. *Oncogene* 19:3948-3954, 2000
- Fagin JA: Minireview: branded from the start-distinct oncogenic initiating events may determine tumor fate in the thyroid. *Mol Endocrinol* 16:903-911, 2002
- Nikiforov YE: Molecular diagnostics of thyroid tumors. *Arch Pathol Lab Med* 135:569-577, 2011
- French CA, Alexander EK, Cibas ES, Nose V, Laguette J, Faquin W, Garber J, Moore F Jr, Fletcher JA, Larsen PR, Kroll TG: Genetic and biological

- cal subgroups of low-stage follicular thyroid cancer. *Am J Pathol* 162:1053-1060, 2003
28. Hibi Y, Nagaya T, Kambe F, Imai T, Funahashi H, Nakao A, Seo H: Is thyroid follicular cancer in Japanese caused by a specific t(2; 3)(q13; p25) translocation generating Pax8-PPAR gamma fusion mRNA? *Endocr J* 51:361-366, 2004
29. Nikiforova MN, Biddinger PW, Caudill CM, Kroll TG, Nikiforov YE: PAX8-PPARgamma rearrangement in thyroid tumors: RT-PCR and immunohistochemical analyses. *Am J Surg Pathol* 26:1016-1023, 2002