

갑상선 미세침흡인세포검사 슬라이드에서 BRAF Mutation 검출을 통한 갑상선 유두암의 진단

¹경희대학교 의과대학, ²서울대학교 의과대학, ³가톨릭대학교 의과대학, ⁴고려대학교 의과대학 외과학교실,
⁵서울대학교 암연구소

박원서¹ · 이규언² · 송정윤¹ · 정유승³ · 김훈엽⁴ · 고석환¹ · 윤여규^{2,5}

Diagnosis of Papillary Thyroid Cancer via Detection of BRAF Mutation on Fine Needle Aspiration Cytology Slides

Won Seo Park, M.D.¹, Kyu Eun Lee, M.D.², Jeong Yoon Song, M.D., Ph.D.¹, Yoo Seung Chung, M.D.³, Hoon Yub Kim, M.D.⁴, Suck Hwan Koh, M.D., Ph.D.¹ and Yeo-Kyu Youn, M.D., Ph.D.^{2,5}

Purpose: The prevalence rate of the BRAF mutation in papillary thyroid cancer (PTC) is as high as about 52 to 83% in Korea. Preoperative detection of BRAF mutation on fine needle aspiration cytology (FNAC) slides may help the surgeon make better therapeutic decisions. The present study aims to assess the feasibility of the mutant allele specific amplification (MASA) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) method with using conventional FNAC slides and we also wanted to evaluate the clinical role of preoperatively detecting BRAF mutation.

Methods: We extracted the genomic DNA from 59 FNAC slides and performed direct sequencing (DS) for detecting BRAF mutation. We could use only 17 slides for the MASA method and 6 slides for the RFLP method due to the shortage of extracted DNA. Additionally, we retrospectively analyzed the cases for which a histological diagnosis could be made.

Results: Genomic DNA was extracted from 23 out of the 59 FNAC slides. The BRAF mutation status could be assessed via DS in 33 out of the 59 FNAC slides. The concordance between the MASA method and DS and the RFLP method and DS was 36.3% and 66.7% respectively. The positive and negative predictive value of the 13 indeterminate nodules was 87.5% and 20%, respectively. We

could not find any association between the BRAF mutations and the alleged risk factors of PTC.

Conclusion: We believe that the purity and the amount of the DNA template must be increased to detect BRAF mutation with using a FNAC slide. Preoperative detection of the BRAF mutation on a FNAC slide may refine the cytological diagnosis, but the application of assessing BRAF mutation as a prognostic marker is debatable. (Korean J Endocrine Surg 2010;10:12-18)

Key Words: Papillary thyroid cancer, BRAF mutation, Fine needle aspiration cytology

중심 단어: 갑상선 유두암, BRAF 돌연변이, 미세침 흡인세포검사

Department of Surgery, ¹Kyung Hee University School of Medicine, ²Seoul National University College of Medicine, Seoul, ³The Catholic University of Korea, St. Vincent's Hospital, Suwon, ⁴Korea University College of Medicine, ⁵Seoul National University Cancer Research Institute, Seoul, Korea

서론

BRAF 돌연변이가 인간의 암 발생에 관여하는 것이 처음 보고된 이후로,⁽¹⁾ 수십 가지의 돌연변이 양식이 발견되었고, 그 중에서 뉴클레오티드 1799번에서 thymine이 adenine으로 치환되는 BRAF T1799A 점 돌연변이가 가장 흔하고, 갑상선암에서 발견되는 실질적으로 유일한 돌연변이 양식으로 알려져 있다.⁽²⁻⁴⁾ 갑상선암중에서도 오직 갑상선 유두암 또는 유두암 기원의 역형성암에서만 BRAF 돌연변이가 관찰되고, 여포암 등 다른 갑상선암에서는 나타나지 않는다.⁽²⁾ 그리고 갑상선 유두암에서 흔한 RET/PTC 또는 RAS 변이와는 동시에 발현되지 않는다.⁽⁵⁾ 또한 BRAF 돌연변이가 갑상선 유두암의 임상병리학적 고위험 인자, 재발 및 방사성 요오드 섭취능 소실 등과 관련되어 있다고 알려져 있다.⁽⁶⁾

우리나라 갑상선암의 90~95%는 갑상선 유두암(papillary

책임저자 : 윤여규, 서울시 종로구 연건동 28번지
☎ 110-744, 서울대학교 의과대학 외과학교실
Tel: 02-2072-3447, Fax: 02-766-3975
E-mail: ykyoun@plaza.snu.ac.kr

게재승인일 : 2010년 3월 18일

본 논문의 요지는 2009년 대한갑상선-내분비외과학회 춘계 학술대회에서 구연되었음.

thyroid cancer, PTC)이 차지하며, (7) 우리나라 갑상선 유두암의 BRAF 돌연변이 발현율은 52~83%로 다른 서구 나라의 보고(36~65%)보다 훨씬 높다.(2,8,9)

미세침흡인세포검사(fine needle aspiration cytology, FNAC)는 갑상선 결절의 악성 여부를 가리는데 가장 믿을 만한 검사법이지만, 시행자의 숙련도에 좌우되며 약 5~10%에서는 불충분한 검체로 인해 진단이 불가능할 때도 있고, 15~20%에서는 결과가 중간형(indeterminate)으로 나와서 수술 여부를 결정하기 어렵게 만든다.(10)

한국인의 갑상선암 대부분은 갑상선 유두암이며, BRAF 돌연변이 발현율이 높다는 점은 우리나라에서 BRAF 돌연변이를 쉽게 파악할 수 있는 방법의 정립을 필요로 한다.

한편 점 돌연변이를 확인하는데 있어서 Mutant allele specific amplification (MASA)법과 Restriction fragment length polymorphism (RFLP)법은 검사 당일에 결과를 확인할 수 있고 시행이 비교적 간단하여 대규모 검체의 선별검사에 유용하다.(11) 이 연구를 통하여 결과가 나오기까지 이틀 이상 걸리는 direct sequencing을 MASA법이나 RFLP법이 대체할 수 있는지 효용성을 알아보려 하였다. 그리고 이전 정등(12)의 연구를 바탕으로 미세침흡인세포검사 슬라이드에 서 DNA를 손상 없이 얻기 위한 방법을 도모하였다.

또한 세포검사 진단과 무관하게 BRAF 돌연변이를 검사하여, 최종 병리 결과 및 갑상선 유두암에서 알려진 임상병리학적 위험인자들과의 상호 관련성을 분석하였다.

방 법

갑상선 결절로 수술을 의뢰 받고 서울대학교병원 외과를 방문한 57명의 환자에게 초음파유도 미세침흡인세포검사를 시행하여 59개의 슬라이드를 확보하였다. 통상적인 23~25 gauge의 바늘을 이용하였고, 흡인물은 유리 슬라이드에 도말 후 100% 에탄올 통에 넣어 고정하였다.

검체 슬라이드로부터 세포를 확보하기 위하여 100%, 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40% 에탄올로 각각 1분씩 순차적으로 처리하여 재수화하였다. Cell scraper로 세포를 수집한 뒤에 phosphate buffered saline으로 세척하였다. MagneSil[®] Genomic kit (Fixed Tissue System; Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 genomic DNA를 추출하였다.

Human BRAF 유전자의 15번째 exon 내 600번째 아미노산 돌연변이(V600E) 여부를 확인하기 위하여 DNA direct sequencing을 수행하였고, genomic DNA가 불충분하게 얻어진 검체도 함께 PCR을 시행하였다. PCR 반응물 조성은 template 500 ng/ μ l, rTaq polymerase (Takara, Japan) 0.5 unit, dNTPs 10 mM, MgCl₂ 1.5 mM, primer 10 pmol, 10X buffer로 하고, 총 20 μ l로 하여 PCR을 시행하였다. Forward primer는 5'-GCTTGCTCTGATAGGAAATGAG-3', reverse primer는

5'-GATACTCAGCAGCATCTCAGG-3'의 primer sequence였다. PCR은 95°C에서 5분간 완전히 denaturation한 다음에, 95°C에서 30초간 denaturation, 60°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 30초 extension의 조건으로 35 cycle을 시행하였다. 마지막으로 72°C에서 7분간 추가적으로 final extension 반응을 거쳤다.

얻어진 PCR산물은 QIAquick[®] PCR Purification kit (Qiagen, Hilden, Germany)으로 primer dimer를 제거하고, 정제후 sequencing 반응을 의뢰하였다. Sequencing 과정은 ABI Prism[®] Bigdye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA)을 이용하여 시행한 후에, Montage[®] Cleanup kit (Millipore, Woburn, MA, USA)으로 purification하고, 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystem)로 T1799A점 돌연변이를 관찰하였다.

BRAF 돌연변이를 MASA법으로 검출하기 위하여, PCR 반응물 조성은 template 500 ng, rTaq polymerase (Takara, Japan) 0.5 unit, dNTPs 10 mM, MgCl₂ 1.5 mM, primer 10 pmol, 10X buffer였으며, forward primer는 5'-GGTGATTTTGGTCTAGCTACAGA-3'이었고, reverse primer는 5'-GAT-ACTCAGCAGCATCTCAGG-3'이었다. PCR은 28 cycle로 시행하였는데, 각 cycle은 95°C에서 30초간 denaturation, 58°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 30초 extension으로 조건화하였다.

그리고 BRAF 돌연변이를 RFLP법으로 알아보고자, template을 1,000 ng으로 하여 10X buffer, TspRI restriction enzyme (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) 6 unit, Bovine serum albumin과 30분간 반응시켰다.

세포병리결과가 갑상선 유두암, 유두암 또는 여포성 종양이 의심되는 경우와 양성 또는 불충분 검체이지만 영상학적으로 악성이 의심되는 경우에 수술을 권유하였다. 57명의 환자(59개의 검체) 중에서 46명의 환자가(48개의 검체) 본원에서 수술을 시행 받았고, 세포병리검사 결과 및 수술 후 임상병리학적 특징에 대하여 의무기록을 분석하였다.

결 과

59개의 미세침흡인세포검사 슬라이드 중에서 MagneSil[®] Genomic kit로 23개에서만 실험을 진행할 수 있을 정도의 genomic DNA를 추출할 수 있었다(Fig. 1).

추출된 DNA의 양이 극히 적더라도 순수한 DNA가 있다면 PCR증폭과 sequencing이 가능할 수 있으므로 모든 슬라이드를 대상으로 human BRAF exon 15 부분을 PCR 증폭 후 direct sequencing을 시행하였고, 전기영동 겔에서 보여지는 것만으로 sequencing에 성공할지 여부를 알 수 없었다(Fig. 2). 59개의 슬라이드 중에서 33개에서만 sequencing에 성공하였다. 그 중 23개에서 BRAF mutation이 관찰되었고,

10개에서는 관찰되지 않았다(Table 1).

17개의 슬라이드로 MASA법을 이용한 BRAF 돌연변이 검출 실험을 시행하였고, direct sequencing결과 야생형(wild type)으로 나타난 검체들은 MASA법으로도 일치된 결과를

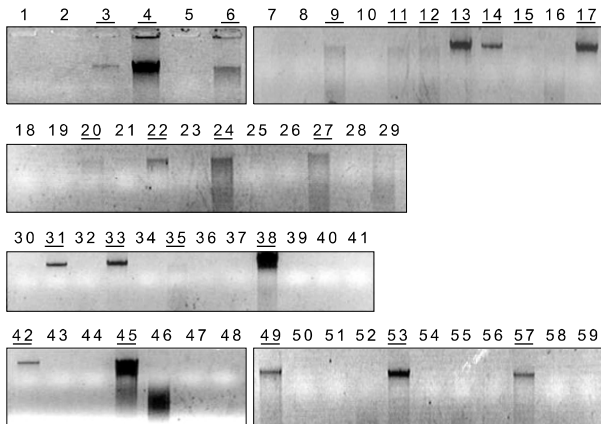


Fig. 1. Underlined number of slides could be extracted genomic DNA with MagneSil[®] Genomic kit.



Fig. 2. BRAF exon15 PCR amplification. Which samples have enough and pure DNA to be sequenced might not be determined on electrophoresis gel.

보였지만, 돌연변이형(mutant type)으로 보여야 할 총 11개의 검체 중에서(1~4번, 6, 7번, 9~11번, 13, 16번) 4개(1번, 3번, 13번, 16번)에서만 돌연변이로 보여져 MASA법의 민감도는 direct sequencing법을 절대표준(golden standard)으로 가정하면, 36.3%로 낮게 측정되었다(Fig. 3).

총 6개의 슬라이드로 RFLP법을 이용한 BRAF 돌연변이 검출 실험을 시행하였고, direct sequencing에서 돌연변이형으로 판명된 1~3번 검체에서는 밴드의 해상도가 떨어지지만 일관된 결과를 보였으며, 야생형으로 보여야 할 14, 15번 검체에서는 star activity로 인해 밴드가 나타나지 않았다(Fig. 4).

Sequencing 결과가 나온 검체에서 세포병리결과와 BRAF

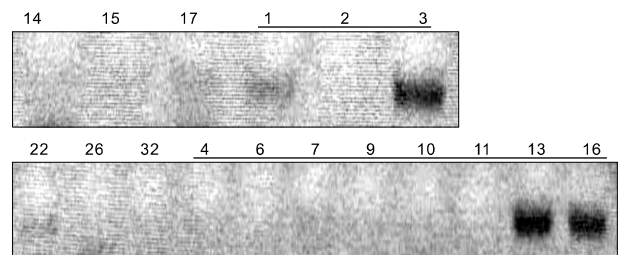


Fig. 3. MASA products showing low sensitivity for BRAF mutation. Faint bands on No. 1, 3, 16 and 17 indicate the presence of BRAF mutation (Underlined numbers of samples have been proved for positive BRAF mutation by direct sequencing).

Table 1. Results of direct sequencing with fine needle aspiration cytology slides

No.*	Direct sequencing	No.	Direct sequencing	No.	Direct sequencing
1	Mutant type	21	Mutant type	41	X [†]
2	Mutant type	22	Wild	42	Wild
3	Mutant type	23	X	43	X
4	Mutant type	24	Mutant type	44	X
5	X [†]	25	X	45	Mutant type
6	Mutant type	26	Wild	46	X
7	Mutant type	27	Mutant type	47	X
8	X	28	Mutant type	48	X
9	Mutant type	29	Mutant type	49	Mutant type
10	Mutant type	30	X	50	X
11	Mutant type	31	Mutant type	51	X
12	X	32	Wild	52	X
13	Mutant type	33	Wild	53	X
14	Wild	34	Wild	54	Mutant type
15	Wild	35	Wild	55	X
16	Mutant type	36	X	56	X
17	Wild	37	Mutant type	57	Mutant type
18	X	38	Mutant type	58	X
19	X	39	X	59	X
20	X	40	X		

*No. = slide number; [†]X = failed to show result.

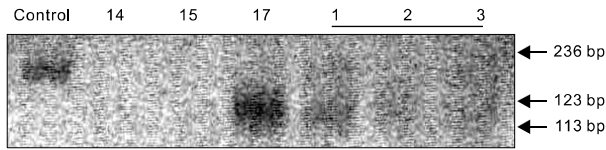


Fig. 4. RFLP products showing insecure results for BRAF mutation (Underlined numbers of samples have been proved for positive BRAF mutation by direct sequencing).

Table 2. Association between cytological diagnosis and BRAF mutation status

Cytological diagnosis	BRAF status*			Total
	Mutant type	Wild type	No information	
Benign	1 [†]	2	4	7
Suspicious for FN [‡]	1 [§]	2	5	8
Suspicious for PTC	8	3	4	15
Malignant (PTC)	13	3	9	25
Inadequate	0	0	4	4
Total	23	10	26	59

*Results of direct DNA sequencing; [†]Absence of histological confirm; [‡]FN = follicular neoplasm; [§]Pathologic diagnosis is nodular hyperplasia; ^{||}PTC = papillary thyroid cancer.

Table 3. Results of the cytological diagnosis and the number of patients who received surgery in Seoul National University Hospital

Cytological diagnosis	Number of patients received surgery (n=46)	Number of lost patients (n=11)
Benign	3	3
Suspicious for FN*	8	0
Suspicious for PTC [†]	12	3
Malignant (PTC)	20	4
Inadequate	3	1

*FN = follicular neoplasm; [†]PTC = papillary thyroid cancer.

돌연변이 유무와의 관계를 살펴보면, 미세침흡인세포검사에서 악성세포가 보여 갑상선 유두암에 합당한 소견을 보인 경우(Compatible with PTC)에는 81.3% (13/16)에서, 유두암이 의심되는 경우(Suspicious for PTC)에는 72.7% (8/11)에서 BRAF 돌연변이가 검출된 반면에, 그 외의 경우(양성, 혹은 여포성 종양 의심)에는 33.3% (2/6)에서만 돌연변이형이었다(Table 2).

일부는 타 병원으로 전원 되거나 외래 추적에서 소실되어 57명 중에서 46명이 본원에서 수술을 시행 받았으며(Table 3), 최종병리결과 35명이 갑상선 유두암(tall cell variant

Table 4. BRAF mutation status of fine needle aspiration cytology slides with malignant and indeterminate result on cytology and postoperative histological diagnosis

Cytological diagnosis	BRAF status	Histological diagnosis (Number)
Malignant	Mutant	PTC* (11)
	Wild	PTC (2)
Suspicious PTC	Mutant	PTC (7)
	Wild	PTC (2), Minimal invasive FTC [†] (1)
Suspicious FN [‡]	Mutant	Nodular hyperplasia (1)
	Wild	Minimal invasive FTC (1), Nodular hyperplasia (1)

*PTC = papillary thyroid cancer; [†]FTC = follicular thyroid cancer; [‡]FN = follicular neoplasm.

Table 5. Association between BRAF mutation status and clinicopathological characteristics in 22 papillary thyroid cancer patients

	BRAF mutation (+)	BRAF mutation (-)	P value
Number	18	4	
Female : Male	14 : 4	14 : 1	0.905*
Age (range)	51.3 (34 ~ 74)	43.5 (39 ~ 49)	0.233 [†]
Tumor size (cm)	1.33±0.76	1.05±0.7	0.494 [†]
LN metastasis	6 (33.3%)	2 (50%)	0.602*
Perithyroidal extension	14 (77.8%)	3 (75%)	1.000*
Multiplicity	7 (38.9%)	3 (75%)	0.293*

*Fischer's exact test; [†]Mann-Whitney U-test.

PTC, follicular variant PTC, PTC with focal anaplastic change 각 1예씩 포함)이었고, 7명이 최소 침범 여포암(minimally invasive follicular cancer)이었으며, 4명은 양성이었다. 세포학적 진단이 악성(compatible with PTC)인 경우에는 BRAF 돌연변이 여부와 무관하게 최종 병리 진단도 모두 갑상선 유두암이었다.

수술 시행을 주저하게 만드는 세포병리검사 결과가 중간형(indeterminate, suspicious for PTC 또는 여포성 종양)으로 진단된 경우는 23건이었고, 14개의 검체에서만 sequencing에 성공했고, 이 중 13개에서 수술을 통한 조직학적 확인이 이뤄졌다. 갑상선 유두암 9예, 여포암 2예, 결절성 증식(nodular hyperplasia)이 2예였으며, 유두암 중 77.8% (7/9)는 BRAF 돌연 있었고, 유두암이 아닌 것 중에서는 단 한 개의 결절성 증식에서 BRAF 돌연변이가 관찰되었고 여포암에서는 모두 BRAF 돌연변이가 없었다(Table 4). 따라서 BRAF 돌연변이의 진단 정확도는 76.9% (10/13)였다.

수술로 병리학적으로 진단이 확인되고, 미세침흡인세포검사에서 슬라이드에서 sequencing에 성공한 경우들만 보면, 갑상선

유두암에서는 BRAF 돌연변이가 81.8% (18/22)에서 발견되었고, 유두암이 아닌 경우에는 16.7% (여포암 2예 중 0예, 결절성 증식 4예 중 1예)에서만 BRAF 돌연변이가 관찰되었다. BRAF 돌연변이 여부와 임상병리학적 위험인자와의 상관관계를 분석하였다(Table 5). 증례수가 적은 제한점은 있지만, 통계적으로 유의한 차이점은 없었다.

고 찰

미세침흡인세포검사 슬라이드에서 BRAF 돌연변이를 확인하기 위한 연구였다. MASA법과 RFLP법을 적용하기 위해 genomic DNA를 추출해 보았고, 59개 중에서 23개에서만 적정량의 DNA를 얻을 수 있었다. 이중 17개의 슬라이드로 MASA법을, 6개의 슬라이드로 RFLP법을 적용하여 BRAF 돌연변이 검출을 시도하였고, 비교를 위해 59개 모든 슬라이드로 direct sequencing을 하였다.

36개의 통상적인 미세침흡인세포검사 슬라이드를 크실렌으로 처리 한 후 재수화 과정을 거쳐 위와 동일한 kit로 DNA 추출을 시도한 연구에서는 모두 DNA가 손상되어 젤에서 관찰하는데 실패한 반면에, (12) 이번 실험에서는 크실렌을 DNA 손상의 원인으로 추정하고, 슬라이드를 100% 에탄올에 넣고, 크실렌 처리를 생략하여 59개 검체 중에서 23개에서 genomic DNA를 추출하는데 성공하였다.

전기영동장치를 이용하여 genomic DNA를 젤에 loading 하여 보았을 때, DNA가 검출되지 않은 것처럼 보일지라도, 오염되지 않은 DNA가 소량이라도 존재한다면 PCR 증폭과 sequencing이 가능할 것이므로 59개 모든 검체에 대하여, PCR 후 sequencing을 하였다. 33개의 검체에서 sequencing 결과를 얻을 수 있었고, 실제로 MagneSil[®] Genomic kit에서 DNA 검출이 되지 않았던 36개의 검체 중 18개에서 sequencing에 성공하였다. 반면에 DNA가 추출되었던 23개의 검체에서는 15개만이 sequencing에서 결과를 보여주었다.

본 연구에서 BRAF 돌연변이를 판정하는데 있어서, 복잡하고 시간이 오래 걸리는 direct sequencing을 대처할 MASA법과 RFLP법의 타당성을 알아보려 하였다. MASA는 Taq 중합효소가 template와 primer의 배열이 일치하면 빠른 증폭 반응을 시작하지만, 한 개의 nucleotide가 다른 경우엔 증폭 반응이 지연되는 특성을 이용하여, 돌연변이형의 유전자만을 선택적으로 증폭시키는 방법으로서 신속하고, 저렴하며, 재현성이 좋아서 선별검사에도 활용할 수 있다. (13,14) 17개의 슬라이드로 MASA를 시행하였고 sequencing에서 돌연변이로 입증된 11개의 검체 중 4개에서만 일치된 돌연변이형으로 나타나서 36.3%의 민감도를 보였다. MASA법으로 BRAF 돌연변이를 검출하여 direct sequencing보다 더 높은 민감도를 보인 연구가 있었는데, 이는 수술장에서 신선 조직으로부터 얻은 검체로 실행한 실험이었으며, 통상적인 미세침흡인세포검사 슬라이드가 아니었다. (15) 즉 신선 조

직에서 흡인된 검체 보다, 슬라이드 검체에서는 template DNA의 양이 더 많이 필요하리라 추정된다. 또한, 본 실험을 위한 예비 실험에서는 template으로 냉동절편 조직에서 얻은 genomic DNA를 사용하였던 것에 반해, 실제 실험에서는 미세침흡인세포검사 슬라이드에서 얻어진 genomic DNA를 대상으로 실험을 했으므로 DNA의 질에 문제가 있는 것으로 보여지며, MASA를 진행하기 전에 정화 과정을 더 거친다면 충분히 개선될 것으로 여겨진다.

RFLP법은 TspRI restriction enzyme에 검체를 반응시키면 BRAF 돌연변이 유무에 따라 잘려진 길이가 달라지는데, 이것을 전기영동장치로 시각화한다. 예비실험 결과에서 genomic DNA양이 MASA법에서보다 훨씬 많은 1,000 ng 이상이어야 RFLP법이 적용 가능하였으므로, 6개의 검체에서만 RFLP법으로 BRAF 돌연변이 검출을 시도하였다. 희미하게 번지는 듯한 결과를 보이긴 했지만, 4개의 검체에서 direct sequencing과 일관된 결과를 보였고, 14, 15번 검체에서는 제한효소가 시간 상의 이유로 무작위적으로 DNA cutting을 진행해 버리는 이른바 star 현상이 보인 것으로 생각된다. 슬라이드에 고정된 검체를 사용하지 않고, 미세침흡인세포검사를 시행한 주사바늘을 phosphate buffered saline으로 세척 후 세포들만 튜브에 모아, RFLP법으로 BRAF 돌연변이를 검출한 보고에서는 237개의 결절에서 단 6개만이 결과를 얻는데 실패하였다. (16) BRAF 돌연변이 검출을 direct sequencing과 RFLP 방법으로 각각 83%, 78.6%의 민감도를 보고한 연구에서는, 갑상선절제술을 시행한 후에 체외에서 결절에 대하여 미세침흡인을 시행하고 그 주사바늘을 1 ml 식염수로 세척한 것으로 실험을 시행하였다. (17) 본 연구에서 RFLP 실험 또한 본 실험을 위한 예비 실험과는 template이 달라져, 선명하지 못한 결과를 나타낸 것으로 보이며, 개선을 위해 전기영동 과정에서 일반 agarose 젤 대신에 촘촘한 pore를 지닌 acrylamide 젤을 이용해 볼 수 있겠다.

세포학적 진단이 갑상선 유두암에 합당한 소견인 경우에는 모두 최종병리결과가 갑상선 유두암이었으므로 BRAF 돌연변이 여부가 진단에 기여하는 바는 없었다. 하지만 Xing(6)의 보고에 따르면 수술 전 BRAF 돌연변이 여부를 파악하여 수술의 범위(엽절제술 대 갑상선전절제술, 경부 림프절 박출술 포함 여부 등)를 결정하는 데 도움을 주고, 수술 후 초음파 등의 검사 주기, 고용량 방사성 동위원소 치료추가 등을 결정하는데도 기여할 수 있다고 하였다. 그러므로 그 활용성은 추후에 논의되어야 할 것이다.

일반적으로 미세침흡인세포검사서 10~30%가 중간형으로 진단되고, 이중 20~30%에서만 수술 후 악성으로 진단된다는 보고들이 있지만, (18,19) 이번 연구에서는 중간형으로 보고되었고 수술적 병리진단이 확인된 20예에서 17예 (73.9%; 유두암 10예, 여포암 7예)가 악성으로 판명되었다. 양성예측율이 85%에 달하며 이는 경험 있는 병리의사의 중간형 보고는 수술의 당위성을 높인다고 하겠다. 세포검사

결과가 중간형이고 sequencing이 가능한 경우에서 악성 갑상선암에 대한 BRAF 돌연변이의 진단 정확도는 61.5% (8/13), 양성예측율은 87.5% (7/8)이었으나, 음성예측율은 20% (1/5)로 낮아서 진단 도구로 단독 사용에는 제한이 따르지만, 미세침흡인세포검사의 결과에 추가적인 정보를 제공할 수 있겠다.

BRAF 돌연변이형이 갑상선 유두암에서 고위험 요소로 인정되는 갑상선외 침범, 림프절 전이, 3, 4기의 높은 병기와 밀접한 연관성이 있고, (20-22) 재발의 위험 인자이며, (22-24) 방사성 동위원소 섭취능 소실과도 관련되어 있어, (22) 기존의 임상병리학적 기준과 더불어 새로운 예후인자로 대두되고 있다. 이번 연구에서는 BRAF 돌연변이 여부와 기존의 임상병리학적 위험인자들과 통계적 유의성이 없었다. 주로 우리나라 연구에서 비슷한 결과들이 보고되는 데, (8,17,25) 이는 증례 수가 적고, 특히 BRAF 돌연변이가 없는 갑상선 유두암의 증례가 적으며, 크기가 작은 갑상선암의 비율이 높고, 짧은 추적관찰 기간으로 기인된다고 추정된다.

결론

미세침흡인세포검사 슬라이드에서 BRAF 돌연변이를 비교적 간단한 실험으로 검출하기 위한 연구를 수행하였다. 슬라이드 처리과정에서 크실렌 단계를 배제하니, 39% (23/59)에서 MagneSil[®] Genomic kit로 genomic DNA를 추출할 수 있었고, 55.9% (33/59)에서 direct sequencing으로 BRAF 돌연변이 여부를 확인할 수 있었다. 하지만 MASA법과 RFLP법을 통한 BRAF 돌연변이 확인은 본 실험에서는 성공률이 매우 낮았다. 이는 미세침흡인세포검사 슬라이드를 검체로 한 경우에는 신선조직 검체보다 template DNA의 양이 좀 더 필요하거나, 좀 더 purification 과정을 거쳐 DNA 질을 높여야 함을 시사한다.

미세침흡인세포검사 슬라이드에서 BRAF 돌연변이가 direct sequencing으로 확인된 경우에는 최종 병리에서 갑상선 유두암의 양성 예측도가 매우 높아서, BRAF 돌연변이 확인이 수술 전 진단의 정확도를 높일 수 있겠으나, 고위험군 요소로 간주될 수 있는지는 본 연구에서 확인할 수 없었다.

REFERENCES

- 1) Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417:949-54.
- 2) Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005;12:245-62.
- 3) Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: B-Raf is a human oncogene. *Cancer Cell* 2004;6:313-9.
- 4) Cohen Y, Xing M, Mambo E, Guo Z, Wu G, Trink B, et al. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:625-7.
- 5) Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Lima J, Castro P, Preto A, et al. BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene* 2003;22:4578-80.
- 6) Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev* 2007;28:742-62.
- 7) Shin HR, Jung KW, Won YJ, Park JG. 2002 annual report of the Korea Central Cancer Registry: based on registered data from 139 hospitals. *Cancer Res Treat* 2004;36:103-14.
- 8) Kim TY, Kim WB, Song JY, Rhee YS, Gong G, Cho YM, et al. The BRAF mutation is not associated with poor prognostic factors in Korean patients with conventional papillary thyroid microcarcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005;63:588-93.
- 9) Kim KH, Kang DW, Kim SH, Seong IO, Kang DY. Mutations of the BRAF gene in papillary thyroid carcinoma in a Korean population. *Yonsei Med J* 2004;45:818-21.
- 10) Chow LS, Gharib H, Goellner JR, van Heerden JA. Nondiagnostic thyroid fine-needle aspiration cytology: management dilemmas. *Thyroid* 2001;11:1147-51.
- 11) Usami S, Abe S, Shinkawa H, Inoue Y, Yamaguchi T. Rapid mass screening method and counseling for the 1555A→G mitochondrial mutation. *J Hum Genet* 1999;44:304-7.
- 12) Chung YS, Choe JH, Lee KE, Park WS, Kim HY, Han W, et al. Detection of BRAF mutation on fine needle aspiration biopsy specimens using the colorimetric mutation detection method. *J Korean Surg Soc* 2008;74:25-33.
- 13) Sommer SS, Cassady JD, Sobell JL, Bottema CDK. A novel method for detecting point mutations or polymorphisms and its application to population screening for carriers of phenylketonuria. *Mayo Clin Proc* 1989;64:1361-72.
- 14) Hayashi N, Arakawa H, Nagase H, Yanagisawa A, Kato Y, Ohta H, et al. Genetic diagnosis identifies occult lymph node metastases undetectable by the histopathological method. *Cancer Res* 1994;54:3853-6.
- 15) Sapio MR, Posca D, Troncone G, Pettinato G, Palombini L, Rossi G, et al. Detection of BRAF mutation in thyroid papillary carcinomas by mutant allele-specific PCR amplification (MASA). *Eur J Endocrinol* 2006;154:341-8.
- 16) Kumagai A, Namba H, Akanov Z, Saenko VA, Meirmanov S, Ohtsuru A, et al. Clinical implications of pre-operative rapid BRAF analysis for papillary thyroid cancer. *Endocr J* 2007;54:399-405.
- 17) Chung KW, Yang SK, Lee GK, Kim EY, Kwon S, Lee SH, et al. Detection of BRAFV600E mutation on fine needle aspiration specimens of thyroid nodule refines cyto-pathology diagnosis, especially in BRAF600E mutation-prevalent area. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006;65:660-6.
- 18) Hegedus L. The thyroid nodule. *N Engl J Med* 2004;351:

- 1764-71.
- 19) Oertel YC, Burman K, Boyle L, Ringel M, Wartofsky L, Shmookler B, et al. Integrating fine-needle aspiration into a daily practice involving thyroid disorders: the Washington Hospital Center approach. *Diagn Cytopathol* 2002;27:120-2.
- 20) Lee JH, Lee ES, Kim YS. Clinicopathologic significance of BRAF V600E mutation in papillary carcinomas of the thyroid: a meta-analysis. *Cancer* 2007;110:38-46.
- 21) Lupi C, Giannini R, Ugolini C, Proietti A, Berti P, Minuto M, et al. Association of BRAF V600E mutation with poor clinicopathological outcomes in 500 consecutive cases of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:4085-90.
- 22) Xing M, Westra WH, Tufano RP, Cohen Y, Rosenbaum E, Rhoden KJ, et al. BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:6373-9.
- 23) Kim TY, Kim WB, Rhee YS, Song JY, Kim JM, Gong G, et al. The BRAF mutation is useful for prediction of clinical recurrence in low-risk patients with conventional papillary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006;65:364-8.
- 24) Kebebew E, Weng J, Bauer J, Ranvier G, Clark OH, Duh QY, et al. The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer. *Ann Surg* 2007;246:466-71.
- 25) Park SY, Park YJ, Lee YJ, Lee HS, Choi SH, Choe G, et al. Analysis of differential BRAF(V600E) mutational status in multifocal papillary thyroid carcinoma: evidence of independent clonal origin in distinct tumor foci. *Cancer* 2006;107:1831-8.
-