

세포학적으로 진단이 불확실한 갑상선결절의 분자진단

건국대학교 의학전문대학원 병리학교실

황태숙

Molecular Diagnosis for Cytologically Indeterminate Thyroid Nodules

Tae Sook Hwang

Department of Pathology, Konkuk University School of Medicine, Seoul, Korea

An accurate diagnosis of cancer or benign disease is important for the effective clinical management of the patients. Thyroid fine needle aspiration cytology (FNAC) is a safe and cost effective technic for evaluating thyroid nodules. However, 20-30% of thyroid FNAC specimens are indeterminate and fall into one of the following categories; AUS/FLUS (atypical cells of undetermined significance/follicular cells of undetermined significance), FN/SFN (follicular neoplasm/suspicious for follicular neoplasm), and SMC (suspicious for malignant cells). The AUS/FLUS, FN/SFN, and SMC diagnostic category is associated with a 5-15%, 15-30%, and 60-75% risk of malignancy, respectively. Of the indeterminate thyroid nodules that are surgically resected, 10-40% were confirmed to be malignant. A significant progress has been made in the development of molecular tests for cancer diagnosis in thyroid nodules. Most common molecular alteration in thyroid cancer is the activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. Activation of this pathway in thyroid cells results from point mutation of BRAF and RAS genes and rearrangement of RET/PTC and NTRK genes and these genetic alterations are mutually exclusive. Preoperative molecular diagnostic techniques could be applied in FNAC specimen when optimum dissection techniques are provided to collect sufficient numbers of target cells without contamination of blood cells, inflammatory cells including histiocytes, and stromal cells. The optimum number of cells for PCR is about 100 although as few 50 cells has been successful. To obtain a good DNA yield from a very limited number of target cells, avoid DNA loss as much as possible.

Key Words: Molecular diagnosis, FNAC, Indeterminate nodule, Thyroid cancer

서 론

갑상선암은 모든 암 중 약 1% 정도를 차지하며 우리나라의 여성에서 가장 흔하게 발생하는 암이다. 대부분의 갑상선암은 소포세포에서 기원하며 일부는 C세포에서 기원한다. 갑상선암은 최근 들어 우리나라뿐만 아니라 서구에서도 증가하고 있으며 2011년 보건복지부 중앙암등록본부의 통계에 따르면 우리나라 갑상선

에서 발생하는 악성 종양 중 가장 흔한 유형은 유두암종(papillary carcinoma)으로 갑상선암의 약 95%를 차지한다.¹⁾ 그 외에 빈도는 낮으나 소포암종(follicular carcinoma), 수질암종(medullary carcinoma), 분화 나쁜 암종(poorly differentiated carcinoma), 역형성암종(anaplastic carcinoma) 등의 유형이 있는데 일부 유형 사이에는 조직학적 유사성이 높아 감별이 어려운 경우가 있다. 특히 유두암종은 10가지 이상의 아형이 있는데 이 중 대부분이 평범한 형(conventional 혹은 classical)이고 소포

Received July 13, 2015 / Revised August 5, 2015 / Accepted August 6, 2015

Correspondence: Tae Sook Hwang, MD, PhD, Department of Pathology, Konkuk University School of Medicine, 120-1 Neungdong-ro, Gwangjin-gu, Seoul 05029, Korea

Tel: 82-2-2030-5641, Fax: 82-2-2030-5629, E-mail: tshwang@kuh.ac.kr

Copyright © 2015, the Korean Thyroid Association. All rights reserved.

© This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

형(follicular variant), 큰 키 세포형(tall cell variant)이 그 다음으로 흔하다고 알려져 있다. 갑상선암종은 조직학적 유형뿐 아니라 각각의 아형에 따라 재발, 전이 혹은 방사성요오드 치료에 대한 반응 등 임상적 양상에 차이가 있어 정확한 진단이 요구된다.

갑상선암은 대부분 갑상선결절로 나타나게 되는데 실제 갑상선결절의 일부만이 수술 후 갑상선암으로 판명된다. 갑상선결절의 양상을 평가하는 데 가장 중요한 수단인 초음파유도하 세침흡인세포검사(ultrasonography guided fine needle aspiration cytology)는 임상소견이나 영상소견에 비하여 상당히 높은 예측도(predictive value)를 제공할 수 있는 간편하고도 안전한 검사이다. 그러나 그간 세침흡인세포검사 후 세포판독결과를 보고하는 양식이 다양하여 병리의사와 임상사의, 심지어는 병리의사들 사이에도 의사소통이 명확하지 않다는 문제점들이 여러 차례 제기된 바 있었다. 이러한 이유로 2009년 갑상선세포검사 보고를 위한 베데스타 체계(Bethesda system)가 발표되었고 이후 대부분의 병원에서 이에 기반을 두어 판독을 하고 있다.²⁾ 갑상선결절의 세침흡인세포검사는 악성 종양을 진단하는 데 매우 중요한 정보를 제공하나 이 검사의 25% 정도에서 갑상선암과 양성 결절성 증식을 감별하지 못하는 “불확실한(indeterminate)” 소견을 보여 재검사를 하거나 진단을 위한 수술이 불가피하게 된다.^{3,4)} 베데스타 체계에 의하면 양성도 악성도 아닌 “불확실한(indeterminate)” 카테고리에는 AUS/FLUS (atypical cells of undetermined significance/follicular cells of undetermined significance), FN/SFN (follicular neoplasm/suspicious for follicular neoplasm)과 SMC (suspicious for malignant cells)가 해당되나 우리나라의 경우 SMC는 거의 악성으로 간주하는 경향이 있다. Cibas 등⁵⁾의 보고에 의하면 AUS/FLUS로 진단된 결절의 약 5-15%, FN/SFN으로 진단된 결절의 15-30%, SMC로 진단된 결절의 60-75%가 수술 후 조직학적 검사에서 악성으로 판명될 가능성이 있다고 하였다. 실제 “불확실한” 세포 소견을 보였던 결절을 수술로 절제한 경우 10-40% 정도에서만 악성으로 확인되어,^{6,7)} 대부분 환자가 진단을 위해 불필요한 수술을 하게 되며 이로 인해 치료 방침 결정이 지연되고, 환자의 정신적 불안 및 반복적인 검사와 불필요한 수술 등에 의한 의료비 지출 증가 등 이차적인 문제들이 수반되고 있는 실정이다. 반면에 진단을 목적으로 엽절제술을 받은 환자의 경우 상당수에서 남아 있는 갑상선조직을 제거하기 위한 이차 수술이 불가피하다.

최근 형태학적 변화에 의거한 진단의 한계점을 보완하여 갑상선암을 진단하는 데 도움을 주고 예후에 영향을 미치는 요인들을 찾아내고자 분자유전학적인 연구가 활발하게 진행되어 약 90% 정도의 갑상선암에서 발생과 진행에 관여하는 분자학적 변화가 확인되었으며, 이러한 분자유전학적 지식을 통해 암의 조기 진단과 표적치료제의 개발 및 예방이 가능하게 되었다.

갑상선암의 발암과정에 관여하는 분자학적 변화

갑상선암의 발생과 관련된 가장 흔한 기전은 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 경로의 활성화이며 *BRAF*와 *RAS* 유전자의 점 돌연변이 및 *RET/PTC* 유전자 재배열이 대표적인 변화이고 이들은 서로 중복되어 발생하지 않는다.⁸⁾ 이 중에서도 *BRAF* 유전자가 가장 널리 연구되었으며 또한 가장 흔한 유전적 변화이다.

BRAF 점 돌연변이

이 중 *BRAF* 유전자 돌연변이는 유두암종에서 가장 흔히 관찰되는 유전적 변화로 대부분이 1799 뉴클레오타이드 부위에 발생하여 thymine을 adenine으로 치환시켜 valine을 glutamate로 바꾸는 *BRAF* V600E 돌연변이이며 갑상선암에서 발생하는 *BRAF* 돌연변이의 98-99%를 차지한다.⁹⁾ 유두암종에서 *BRAF* K601E의 빈도는 45% 정도로 보고되어 왔으나^{10,11)} 미국의 경우 최근 그 빈도가 75% 이상으로 높아졌다는 보고들이 있으며,^{12,13)} 한국은 그 빈도가 70-90% 정도로 서구에 비해 비교적 높다.¹⁴⁻¹⁸⁾ 이 돌연변이는 유두암종에서 주로 관찰되나⁸⁾ 유두암종 외에는 유두암종에서 발생한 분화 나쁜 암종이나 역형성암종에 국한되어 관찰된다.^{10,11)} 유두암종에서는 평범한 형이나 큰 키 세포형에서 주로 관찰되고 소포형에서는 비교적 드물게 관찰되며 다른 유형의 종양이나 비종양성 병변에서는 관찰되지 않아 갑상선유두암종의 진단적 표지자로 여겨진다.^{10,19)} 유두암종에서 관찰되는 다른 *BRAF* 변이는 *BRAF* K601E 점 돌연변이, 코돈 600 근처의 작은 삽입(in-frame insertion) 혹은 결손(deletion)과 방사능에 노출되어 생긴 유두암종에서 흔히 관찰되는 *AKAP9-BRAF* 유전자 재배열 등이 있다.^{20,21)} 이 중 *BRAF* K601E 돌연변이는 소포형 유두암종에서만 거의 특이적으로 관찰되는데 이 종양의 약 9% 정도까지 나타나 그 진단적 가치는 그리 높지 않다.^{22,23)}

RAS 점 돌연변이

조직학적으로 소포형 패턴을 보이는 갑상선종양에서 흔히 발견되는 RAS 유전자 점 돌연변이는 갑상선암에서 *BRAF* 돌연변이 다음으로 흔히 관찰되는 유전적 변화이다. RAS 돌연변이는 평범한(conventional) 소포암종의 40-50%, 평범한 소포샘종의 20-40% 정도에서 관찰되며^{24,25)} 소포샘종에서 RAS 유전자 돌연변이가 있는 경우 소포암종이나 소포형 유두암종으로 전환될 가능성이 있다고 한다.²⁶⁻²⁸⁾ 이 돌연변이는 유두암종에서도 관찰되는데 대부분이 소포형(follicular variant)인 경우에 해당된다.^{25,29-31)} RAS 유전자 돌연변이는 소포세포에서 기원한 종양에서는 *NRAS*, *HRAS* 및 *KRAS* 유전자의 12, 13 및 61번 코돈에서 흔히 일어나며 *NRAS* 61번 코돈 부위의 변이가 가장 흔하고 다음으로 *HRAS* 61번 코돈 변이이며 다른 부위의 변이는 드문 것으로 알려져 있다.^{32,33)} 반면에 수질암에서는 *HRAS* 유전자나 *KRAS* 유전자의 돌연변이가 흔하다고 한다.³⁴⁾

RET/PTC 재배열

RET/PTC 재배열은 *RET* 유전자의 receptor tyrosine kinase (RTK)를 코딩하는 3'-말단부와 *PTC* 유전자의 5'-말단부가 융합되어 만들어지며 *RET/PTC1* 재배열이 60-70%를 차지하고 *RET/PTC3* 재배열이 20-30%를 차지한다.^{35,36)} *RET/PTC* 유전자는 정상 갑상선의 소포세포에서는 발현되지 않으나 재배열에 의해 발현되고 활성화되어 MAPK 경로를 활성화시키게 된다. 이 유전자변화의 빈도는 지리적 요인이나 검색방법에 따라 차이가 있으며 갑상선유두암종의 약 10-20% 정도에서 관찰된다고 보고되었으나 그 빈도가 점차 감소하고 있으며,^{12,37,38)} 어린아이에서 발생하는 유두암종이나 방사능에 노출된 과거력이 있는 환자에서 발생한 유두암종의 경우에 높은 빈도로 보고되고 있다.^{39,40)} 또한 유두암종의 한 아형인 미만성 경화형(diffuse sclerosing variant)에서 흔하며,⁴¹⁾ 분화 나쁜 암종이나 역형성암종에서는 아주 드물게 발견된다.⁴²⁾

PAX8/PPAR γ 재배열

PAX8/PPAR γ 재배열은 t(2;3)(q13;p25) 전위에 의해 일어나며 그 결과로 *PAX8* 전사인자와 스테로이드/갑상선 핵수용체의 일종인 *PPAR γ* 유전자의 접합(fusion)을 일으킨다. 이 유전자 재배열은 평범한 소포암종의 약 35%에서 관찰되며 호산성형(oncocytic variant)에서는 좀 더 낮은 빈도로 관찰된다.^{43,44)} 소포샘종의 약 2-

10% 정도에서 관찰되긴 하나 주로 소포암종에만 국한되어 관찰되므로 악성 종양을 진단하는 데 활용할 수 있다.^{43,44)} 또한 소포샘종에서 *PAX8/PPAR γ* 재배열이 관찰되는 경우는 침습 전 단계의 상피 내 소포암종이거나 침습형 소포암종인데 침습부위를 확인하지 못한 경우라는 의견이 제시되고 있다.²⁸⁾ *PAX8/PPAR γ* 재배열은 전통적으로 소포암종에서 관찰되는 것으로 알려져 왔으나 최근 연구 결과에 의하면 이 유전자 재배열의 대부분이 소포형 유두암종에서 발견된다고 한다.⁴⁵⁾ 이런 결과로 볼 때 이 유전자 변화가 확인되는 결절은 수술로 제거하는 것이 좋을 것으로 생각한다.

분자진단검사의 현재와 미래

우리나라에서 현재는 연구목적으로만 시행할 수 있는 분자진단검사

1) mRNA나 miRNA마커 발현

mRNA 발현 양상이나 miRNA의 정량적 검사는 미래에 활용될 전망이 밝다. 대부분의 중요한 miRNA는 mRNA에 비하여 변성이 잘 일어나지 않기 때문에 진단적 활용 가치가 더 크다.⁴⁶⁾ 최근 연구 결과에 의하면 유두암종이나 소포암종의 경우 miRNA 발현 양상이 양성 결절의 발현 양상과는 차이가 있다고 하였으며,⁴⁷⁻⁴⁹⁾ Pallante 등⁴⁷⁾은 유두암종과 양성 결절의 세침흡인검사 검체에서 miR-221, -222와 -181b의 발현 양상이 현저히 다르다고 하였다.

2) 차세대염기서열분석(targeted next generation sequencing)

최근에 연구에 의하면 *BRAF*, *RAS* 등을 비롯한 13개 유전자의 점 돌연변이와 *PAX8/PPAR γ* 나 *RET/PTC*를 포함한 42개의 접합유전자를 차세대염기서열분석법으로 확인한 결과 145예의 갑상선암 중 68%에서 점 돌연변이가 확인되었고 유전자접합까지 포함할 경우 80% 정도에서 적어도 하나의 유전자변화가 확인되었다고 하여 이 검사법은 향후 세포학적으로 진단이 불확실한 갑상선결절의 분자진단법으로 자리매김할 가능성이 높아 보인다.⁵⁰⁾ 이 분석을 위해서는 5-10 ng 정도의 DNA만 필요하기 때문에 세침흡인검사 검체로도 분석이 가능하다.

3) 유전자 발현 프로파일

(1) Microarray/Immunohistochemistry

CK-19, glectin-3, HBME-1, CD 56을 비롯한 다양한

마커들이 알려져 있고 이러한 마커들을 이용한 면역조직화학기법이 시행되고 있다. 그러나 현재로서는 유두암종이나 소포암종 혹은 양성 결절에만 특이적으로 발현되는 마커는 관찰되지 않아 여러 가지 마커를 조합해서 진단에 보조적으로 활용하고 있기는 하나 “불확실한” 소견을 보이는 세침흡인검사 검체에서 수술 전 진단에 적용하는 데에는 어려움이 많다.

(2) Gene Expression Classifier

상기한 검사법들이 세포학적으로 양상이 “불확실한” 결절에서 악성의 가능성을 제시할 수 있는 검사라면 Gene Expression Classifier는 양성 결절을 확인함으로써 불필요한 수술은 줄이고자 하는 접근법이다. Alexander 등⁵¹⁾은 256예의 “불확실한” 세침흡인검사 검체를 대상으로 유전자 발현을 확인한 결과 AUS/FLUS; FN/SFN; SMC 카테고리에서 음성예측도, 민감도, 특이도가 각각 95%, 90%, 53%; 94%, 90%, 49%; 85%, 94%, 52%로 확인되었고 AUS/FLUS와 FN/SFN의 경우 음성예측도가 94% 이상으로 높아 갑상선결절이 악성임을 배제할 수 있다고 하였다.

우리나라에서 현재 시행할 수 있는 분자진단검사

가장 흔하게 사용되고 임상적으로 유용한 검사는 *BRAF* 점 돌연변이 검사이며 세침흡인세포검사 검체와 조직 검체에 시행할 수 있다. 다음으로 *RAS* 점 돌연변이 검사인데 현재 우리나라에선 갑상선결절의 진단 목적으로는 *NRAS* 점 돌연변이 검사만 가능하고 *RAS* 점 돌연변이 중 두 번째로 흔한 *HRAS* 유전자검사는 시행할 수 없는 상태이다. 드물기는 하나 가족성 갑상선수질암(familial medullary thyroid carcinoma)의 95% 이상에서 관찰되는 *RET* 유전자 돌연변이검사도 시행할 수 있다. *PAX8/PPAR γ* 나 *RET/PTC* 재배열검사는 현재로서는 시행할 수 없다.

세침흡인세포검사 검체를 이용한 분자진단검사에 대한 제언

앞에서 언급한 바와 같이 갑상선유두암종은 전체 갑상선암의 95%를 차지하며 가장 흔한 아형인 평범한 형 유두암종의 80-85% 정도와 큰 키 세포형의 대부분에서 *BRAF* 점 돌연변이가 발생한다.⁵²⁾ 두 번째로 흔한 소포형 유두암종은 전체 유두암종의 약 10-20%로 생각되며 소포형의 경우 60-70% 정도에서 *BRAF* 혹은 *RAS* 점 돌연변이가 확인되는데,^{12,32,53)} 각각의 돌연변이가 차지하는 비율은 보고자마다 차이가 있다. *RET/PTC* 재배

열은 유두암의 10-20% 정도에서 확인된다고 보고된 바 있지만 점차 줄어드는 추세이며 지역에 따라 그 빈도에 차이를 보이고 과도한 방사선에 노출된 병력이 없는 경우엔 드물게 나타나며 우리나라에서 발생하는 암에선 훨씬 적게 나타나는 것으로 추정된다. 저자의 예비실험결과에 의하면 *BRAF*와 *RAS* 돌연변이가 음성인 유두암종의 약 1/3 정도에서 *RET/PTC1* 유전자재배열을 확인할 수 있었다(not published).

갑상선결절의 양상을 확인하기 위해 통상적으로 시행하는 세침흡인세포검사 검체를 이용한 분자진단검사는 세포학적으로 “불확실한” 소견을 보이는 갑상선결절의 악성도를 훨씬 정확하게 예측함으로써 좀 더 정확한 치료 가이드라인을 제공할 수 있다. Nikiforov 등⁵⁴⁾은 세침흡인세포검사결과만으로 AUS/FLUS군의 14%, FN/SFN군의 27%, SMC의 54%에서 암을 예측할 수 있었으나 *BRAF* 돌연변이, *RAS* 돌연변이, *RET/PTC* 재배열 및 *PAX8/PPAR γ* 재배열을 시행하였을 때 암 예측도는 88%, 87%, 95%로 증가하였다고 하였다. 저자의 경험에 의해서도 비슷한 결과를 보여 세침흡인세포검사 검체를 이용하여 *BRAF*와 *RAS* 유전자검사를 보조적으로 시행한 경우 AUS/FLUS 환자의 84.1%와 FN/SFN 환자의 58.9%에서 수술 후 악성으로 판명되었다(not published).

우리나라의 경우에는 소포암종이 1.5% 정도로 드물고¹⁾ 유두암에서 *RET/PTC* 재배열이 일어나는 빈도가 낮기 때문에 *BRAF*와 *RAS* 점 돌연변이 확인만으로도 대부분의 갑상선암을 진단할 수 있을 것으로 생각한다. *BRAF* 점 돌연변이와 *RAS* 점 돌연변이는 상호배타적으로 존재하고 유두암종의 대부분에서 *BRAF* 변이가 관찰됨으로 세포학적 검사결과 “불확실한” 소견(우리나라의 경우는 AUS/FLUS와 FN/SFN만 포함시키면 될 것임)으로 진단된 환자에서 *BRAF* 점 돌연변이 검사를 시행하고, 검사결과 음성인 환자를 대상으로 *RAS* 유전자검사를 시행한다면 상당 수의 유두암종이나 소포형 종양을 확인할 수 있으리라 생각한다. 또한 소포형 유두암종에서 확인된 *RAS* 유전자 변이의 60% 이상이 *NRAS* 61번 코돈에 위치해 있으므로^{53,55)} *NRAS* 61번 코돈만을 확인한다면 경제적인 부담도 줄 것으로 생각한다.

수술 전 세침흡인세포검사 검체를 이용하여 시행한 유전자검사결과를 보조적 진단 기법으로 활용하기 위해서는 다음과 같은 사항을 염두에 두는 것이 좋으리라 생각한다.

어떤 분자세포진단을 하는 경우라도 수준 높은 세포 검사판독이 근간이 되어야 한다.

대부분 연구자들은 갑상선결절의 양상을 확인하는데 도움이 되는 분자진단을 독립적으로 사용하기보다는 형태학적 소견에 근거한 세포학적 진단의 보조적 기법으로 사용하는 것을 권장하고 있어 분자진단을 시행하기 전에 세포병리의사가 세침흡인세포 검체를 판독한 후 다음 단계로 분자검사를 시행하는 것이 바람직하다.

점 돌연변이나 유전자 재배열과 같은 분자학적 검사는 공기 중에서 말리거나(air dried) 혹은 알코올에 고정된 세침흡인 도말을 이용하여 시행할 수 있다.

이 경우 분자검사를 위하여 따로 검체를 채취해야 하는 번거로움과 비용을 절약할 수 있으며 분자검사의 타겟이 되는 비정상 세포를 현미경 하에서 확인할 수 있다는 것이 큰 장점이다.

목적에 맞는 검사방법의 선택이 중요하다.

갑상선암의 분자유전학적 변화를 확인하는 다양한 검사법들이 소개되고 있으나 임상에서 환자의 진료목적으로 시행하는 검사는 정확하고 재연성이 높아야 하며 임상적으로 도움이 되는 정보를 줄 수 있어야 한다. 일반적으로 검사방법은 검사결과를 사용하기 위한 목적에 따라 선택되어야 한다. 어떤 검사결과로 갑상선결절이 악성일 가능성을 배제하고자 한다면 민감도와 음성예측도가 높은 방법을 선택하는 것이 바람직하나 검사결과와 양성여부가 암의 가능성을 높이는 경우에는 특이도와 양성예측도가 높은 방법을 선택하는 것이 바람직하다. *BRAF*나 *RAS* 점 돌연변이는 비교적 간단해서 conventional polymerase chain reaction (PCR)을 비롯하여 Sanger sequencing, pyrosequencing, real-time PCR amplification and post-PCR melting curve analysis, and allele-specific PCR 등 다양한 기법으로 쉽게 확인할 수 있다. 다만 한가지 주의할 점은 세포주를 대상으로 분석해 보았을 때 최소한 타겟 세포가 1%가 넘는 경우에만 양성으로 확인되는 방법을 선택하는 것이 바람직하다. 저자의 경우는 타겟 세포가 10% 이상이 되는 경우를 cutoff value로 사용하고 있다.

타겟 세포를 선별적으로 충분히 확보하고 DNA 혹은 RNA 소실을 최소화하는 것이 중요하다.

모든 검사에 있어서 가장 중요한 과정은 DNA나

RNA 추출과정인데 이 중에서도 유전자변화를 알고자 하는 타겟 세포를 선별적으로 충분히 확보하는 것이 가장 중요한 단계이다. 갑상선 세침흡인세포검사 검체는 대부분 혈액세포, 조직구를 비롯한 염증세포 및 기질세포(stromal cell)들이 섞여 있으며 세포검사에서 “불확실한” 소견을 보이는 경우에는 타겟 세포의 비율이 10% 이하인 경우가 흔하다. 따라서 검사의 정확도를 높이기 위해서는 분자학적 변화를 확인하고자 하는 타겟 세포를 다른 세포가 섞이지 않게 채집하는 것이 중요하다. 저자의 실험실에서는 세포병리의사가 세포학적 진단을 한 후에 펜을 이용하여 타겟 세포를 표시하고 다이아몬드펜으로 슬라이드 뒷면에 표시한 후 슬라이드를 xylene 용액에 담가두었다가 커버슬라이드를 벗긴 후 슬라이드가 마르지 않고 세포가 잘 보이도록 DNA 혹은 RNA 추출 용액을 한 두 방울 떨어뜨리고 광학현미경하에서 26-gauge 바늘로 세포를 긁어내어 DNA 혹은 RNA를 추출한다. 점 돌연변이 검사를 시행하는데 필요한 DNA를 확보하기 위해서는 100개 정도의 세포를 채집하는 것이 바람직하나 경험에 따르면 50개 정도의 세포로도 가능하다. 유전자 재배열 검사를 시행하기 위한 RNA를 확보하기 위해서는 100개 정도의 세포가 필요하다.

세침흡인세포검사 검체 중에서도 세포학적으로 “불확실한 소견”으로 진단되었을 경우는 타겟 세포의 수가 충분하지 않은 경우가 대부분이므로 DNA 혹은 RNA 소실을 최대한 막을 수 있도록 하는 것이 무엇보다도 중요하다. 저자의 실험실에서는 ammonium sulfate DNA extraction 방법을 사용하고 있는데 소량의 검체에서 DNA를 추출하는 데 효율적이다.⁵⁶⁾ 추출이나 전처리 과정에서 튜브의 벽에 묻은 양을 줄이기 위해 최대한 작은 튜브를 이용하고 필터링이나 튜브를 옮기는 과정을 최소화하는 것도 도움이 된다.

결 론

갑상선암은 대부분 갑상선결절로 나타나게 되는데 실제 갑상선결절의 일부만이 수술 후 갑상선암으로 판명된다. 갑상선결절의 양상을 평가하는 데 가장 중요한 수단인 초음파유도하-세침흡인세포검사(ultrasonography guided fine needle aspiration cytology)는 임상소견이나 영상소견에 비하여 상당히 높은 예측도(predictive value)를 제공할 수 있는 간편하고도 안전한 검사이다. 그러나 이 검사의 25% 정도에서 갑상선암과 양성 결절성 증식을 감별하지 못하는 “불확실한(indeter-

minate)” 소견을 보여 재검사를 하거나 진단을 위한 수 술이 불가피하게 된다.

최근 형태학적 변화에 의거한 진단의 한계점을 보완 하여 갑상선암을 진단하는 데 도움을 주고 예후에 영 향을 미치는 요인들을 찾아내고자 분자유전학적인 연 구가 활발하게 진행되어 약 90% 정도의 갑상선암에서 발생과 진행에 관여하는 분자학적 변화가 확인되었으 며, 이러한 분자유전학적 지식을 통해 암의 조기 진단 과 표적치료제의 개발 및 예방이 가능하게 되었다.

이 중에서도 *BRAF*와 *RAS* 유전자 돌연변이가 중요 한 역할을 하며 특히 우리나라에서 가장 흔한 유두암 종과 소포형 종양에서 상기 유전자의 돌연변이가 흔히 일어나는 것이 확인되어 수술 전 세침흡인세포검사 검 체를 대상으로 한 분자검사가 널리 이용되고 있다.

갑상선절절에서 세침흡인세포검사를 시행하고 그 결과가 AUS/FLUS 혹은 FN/SFN으로 보고된 경우 같 은 세침흡인검사 검체를 이용하여 *BRAF* V600E 돌연 변이 검사를 시행하고 돌연변이가 확인되면 수술로 절 제하고 돌연변이가 확인되지 않는 경우는 *NRAS* 61번 코돈 부위에 대한 돌연변이를 확인하여 치료방침을 결 정한다면 갑상선암의 발견과 치료에 도움이 되리라 생 각한다.

중심 단어: 분자진단, 세침흡인세포검사, 불확실한 결 절, 갑상선암.

References

- 1) <http://www.cancer.go.kr> [cited September 23, 2015]
- 2) Cibas ES, Ali SZ, Conference NCITFSotS. *The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology*. *Am J Clin Pathol* 2009;132(5):658-65.
- 3) Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, et al. *Management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer*. *Thyroid* 2006;16(2):109-42.
- 4) Greaves TS, Olvera M, Florentine BD, Raza AS, Cobb CJ, Tsao-Wei DD, et al. *Follicular lesions of thyroid: a 5-year fine-needle aspiration experience*. *Cancer* 2000;90(6):335-41.
- 5) Cibas ES, Ali SZ. *The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology*. *Thyroid* 2009;19(11):1159-65.
- 6) Baloch ZW, LiVolsi VA, Asa SL, Rosai J, Merino MJ, Randolph G, et al. *Diagnostic terminology and morphologic criteria for cytologic diagnosis of thyroid lesions: a synopsis of the National Cancer Institute Thyroid Fine-Needle Aspiration State of the Science Conference*. *Diagn Cytopathol* 2008;36(6):425-37.
- 7) Mazzaferri EL. *Management of a solitary thyroid nodule*. *N Engl J Med* 1993;328(8):553-9.
- 8) Bhajee F, Nikiforov YE. *Molecular analysis of thyroid tumors*. *Endocr Pathol* 2011;22(3):126-33.
- 9) Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. *High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma*. *Cancer Res* 2003;63(7):1454-7.
- 10) Xing M. *BRAF mutation in thyroid cancer*. *Endocr Relat Cancer* 2005;12(2):245-62.
- 11) Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, et al. *BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas*. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(11):5399-404.
- 12) Jung CK, Little MP, Lubin JH, Brenner AV, Wells SA Jr, Sigurdson AJ, et al. *The increase in thyroid cancer incidence during the last four decades is accompanied by a high frequency of BRAF mutations and a sharp increase in RAS mutations*. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99(2):E276-85.
- 13) Mathur A, Moses W, Rahbari R, Khanafshar E, Duh QY, Clark O, et al. *Higher rate of BRAF mutation in papillary thyroid cancer over time: a single-institution study*. *Cancer* 2011;117(19):4390-5.
- 14) 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(3):364-8.
- 15) 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(5):660-6.
- 16) Kim SK, Hwang TS, Yoo YB, Han HS, Kim DL, Song KH, et al. *Surgical results of thyroid nodules according to a management guideline based on the BRAF(V600E) mutation status*. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(3):658-64.
- 17) Hong AR, Lim JA, Kim TH, Choi HS, Yoo WS, Min HS, et al. *The frequency and clinical implications of the BRAF(V600E) mutation in papillary thyroid cancer patients in Korea over the past two decades*. *Endocrinol Metab (Seoul)* 2014;29(4):505-13.
- 18) Ahn D, Park JS, Sohn JH, Kim JH, Park SK, Seo AN, et al. *BRAFV600E mutation does not serve as a prognostic factor in Korean patients with papillary thyroid carcinoma*. *Auris Nasus Larynx* 2012;39(2):198-203.
- 19) Nikiforov YE, Ohori NP. *Papillary carcinoma*. In: Nikiforov YE, Biddinger PW, Thompson LDR, editors. *Diagnostic pathology and molecular genetics of the thyroid*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2012. p.183-246.
- 20) Cho U, Oh WJ, Bae JS, Lee S, Lee YS, Park GS, et al. *Clinicopathological features of rare BRAF mutations in Korean thyroid cancer patients*. *J Korean Med Sci* 2014;29(8):1054-60.
- 21) Ciampi R, Nikiforov YE. *Alterations of the BRAF gene in thyroid tumors*. *Endocr Pathol* 2005;16(3):163-72.
- 22) Trovisco V, Vieira de Castro I, Soares P, Maximo V, Silva P, Magalhaes J, et al. *BRAF mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma*. *J Pathol* 2004;

- 202(2):247-51.
- 23) 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(11):4085-90.
- 24) Lemoine NR, Mayall ES, Wyllie FS, Williams ED, Goyns M, Stringer B, et al. High frequency of ras oncogene activation in all stages of human thyroid tumorigenesis. *Oncogene* 1989;4(2):159-64.
- 25) Namba H, Rubin SA, Fagin JA. Point mutations of ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis. *Mol Endocrinol* 1990;4(10):1474-9.
- 26) Burns JS, Blaydes JP, Wright PA, Lemoine L, Bond JA, Williams ED, et al. Stepwise transformation of primary thyroid epithelial cells by a mutant Ha-ras oncogene: an in vitro model of tumor progression. *Mol Carcinog* 1992;6(2):129-39.
- 27) Zhu Z, Gandhi M, Nikiforova MN, Fischer AH, Nikiforov YE. Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations. *Am J Clin Pathol* 2003;120(1):71-7.
- 28) Nikiforov YE, Otori NP. Follicular carcinoma. In: Nikiforov YE, Biddinger PW, Thompson LDR, editors. *Diagnostic pathology and molecular genetics of the thyroid*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2012. p.152-82.
- 29) 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* 2003;88(6):2745-52.
- 30) Eszlinger M, Paschke R. Molecular fine-needle aspiration biopsy diagnosis of thyroid nodules by tumor specific mutations and gene expression patterns. *Mol Cell Endocrinol* 2010;322(1-2):29-37.
- 31) Di Cristofaro J, Marcy M, Vasko V, Sebag F, Fakhry N, Wynford-Thomas D, et al. Molecular genetic study comparing follicular variant versus classic papillary thyroid carcinomas: association of N-ras mutation in codon 61 with follicular variant. *Hum Pathol* 2006;37(7):824-30.
- 32) Park JY, Kim WY, Hwang TS, Lee SS, Kim H, Han HS, et al. BRAF and RAS mutations in follicular variants of papillary thyroid carcinoma. *Endocr Pathol* 2013;24(2):69-76.
- 33) Nikiforova MN, Nikiforov YE. Molecular genetics of thyroid cancer: implications for diagnosis, treatment and prognosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2008;8(1):83-95.
- 34) Agrawal N, Jiao Y, Sausen M, Leary R, Bettegowda C, Roberts NJ, et al. Exomic sequencing of medullary thyroid cancer reveals dominant and mutually exclusive oncogenic mutations in RET and RAS. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98(2):E364-9.
- 35) Bongarzone I, Vigneri P, Mariani L, Collini P, Pilotti S, Pierotti MA. RET/NTRK1 rearrangements in thyroid gland tumors of the papillary carcinoma family: correlation with clinicopathological features. *Clin Cancer Res* 1998;4(1):223-8.
- 36) Tallini G, Santoro M, Helie M, Carlomagno F, Salvatore G, Chiappetta G, et al. RET/PTC oncogene activation defines a subset of papillary thyroid carcinomas lacking evidence of progression to poorly differentiated or undifferentiated tumor phenotypes. *Clin Cancer Res* 1998;4(2):287-94.
- 37) Nikiforov YE. RET/PTC Rearrangement--a link between Hashimoto's thyroiditis and thyroid cancer...or not. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(6):2040-2.
- 38) Zhu Z, Ciampi R, Nikiforova MN, Gandhi M, Nikiforov YE. Prevalence of RET/PTC rearrangements in thyroid papillary carcinomas: effects of the detection methods and genetic heterogeneity. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(9):3603-10.
- 39) Nikiforov YE, Rowland JM, Bove KE, Monforte-Munoz H, Fagin JA. Distinct pattern of ret oncogene rearrangements in morphological variants of radiation-induced and sporadic thyroid papillary carcinomas in children. *Cancer Res* 1997;57(9):1690-4.
- 40) Fenton CL, Lukes Y, Nicholson D, Dinanuer CA, Francis GL, Tuttle RM. The ret/PTC mutations are common in sporadic papillary thyroid carcinoma of children and young adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(3):1170-5.
- 41) Adeniran AJ, Zhu Z, Gandhi M, Steward DL, Fidler JP, Giordano TJ, et al. Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2006;30(2):216-22.
- 42) Nikiforov YE. Genetic alterations involved in the transition from well-differentiated to poorly differentiated and anaplastic thyroid carcinomas. *Endocr Pathol* 2004;15(4):319-27.
- 43) Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander EK, Dorn GW 2nd, Tallini G, et al. RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(5):2318-26.
- 44) Dwight T, Thoppe SR, Foukakis T, Lui WO, Wallin G, Hoog A, et al. Involvement of the PAX8/peroxisome proliferator-activated receptor gamma rearrangement in follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(9):4440-5.
- 45) Armstrong MJ, Yang H, Yip L, Otori NP, McCoy KL, Stang MT, et al. PAX8/PPARgamma rearrangement in thyroid nodules predicts follicular-pattern carcinomas, in particular the encapsulated follicular variant of papillary carcinoma. *Thyroid* 2014;24(9):1369-74.
- 46) Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435(7043):834-8.
- 47) Pallante P, Visone R, Ferracin M, Ferraro A, Berlingieri MT, Troncone G, et al. MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas. *Endocr Relat Cancer* 2006;13(2):497-508.
- 48) Weber F, Teresi RE, Broelsch CE, Frilling A, Eng C. A limited set of human MicroRNA is deregulated in follicular thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(9):3584-91.
- 49) He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy R, Volinia S, et al. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(52):19075-80.
- 50) Nikiforov YE, Carty SE, Chiosea SI, Coyne C, Duvvuri U, Ferris RL, et al. Highly accurate diagnosis of cancer in thyroid nodules with follicular neoplasm/suspicious for a follicular neoplasm cytology by ThyroSeq v2 next-generation

- sequencing assay. Cancer* 2014;120(23):3627-34.
- 51) Alexander EK, Kennedy GC, Baloch ZW, Cibas ES, Chudova D, Diggans J, *et al.* Preoperative diagnosis of benign thyroid nodules with indeterminate cytology. *N Engl J Med* 2012; 367(8):705-15.
 - 52) Jung CK, Im SY, Kang YJ, Lee H, Jung ES, Kang CS, *et al.* Mutational patterns and novel mutations of the BRAF gene in a large cohort of Korean patients with papillary thyroid carcinoma. *Thyroid* 2012;22(8):791-7.
 - 53) Hwang TS, Kim WY, Han HS, Lim SD, Kim WS, Yoo YB, *et al.* Preoperative RAS mutational analysis is of great value in predicting follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *Biomed Res Int* 2015;2015:697068.
 - 54) Nikiforov YE, Ohori NP, Hodak SP, Carty SE, LeBeau SO, Ferris RL, *et al.* Impact of mutational testing on the diagnosis and management of patients with cytologically indeterminate thyroid nodules: a prospective analysis of 1056 FNA samples. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(11):3390-7.
 - 55) Lee SR, Jung CK, Kim TE, Bae JS, Jung SL, Choi YJ, *et al.* Molecular genotyping of follicular variant of papillary thyroid carcinoma correlates with diagnostic category of fine-needle aspiration cytology: values of RAS mutation testing. *Thyroid* 2013;23(11):1416-22.
 - 56) Oh SY, Kim WY, Hwang TS, Han HS, Lim SD, Kim WS. Development of an ammonium sulfate DNA extraction method for obtaining amplifiable DNA in a small number of cells and its application to clinical specimens. *Biomed Res Int* 2013;2013:546727.