

# 악성 흑색종 환자에서 중합효소연쇄반응 기반의 *BRAF* 유전자 돌연변이 검사의 진단적 유효성: 체계적 문헌 고찰

## Diagnostic Effectiveness of PCR-based Tests Detecting *BRAF* Mutation for Treating Malignant Melanoma: A Systematic Review

신해원<sup>1</sup> · 고려진<sup>2</sup> · 이 민<sup>2</sup> · 방희영<sup>2</sup> · 권계철<sup>1</sup> · 박종우<sup>1</sup> · 구선희<sup>1</sup>

Hae-Won Shin, M.P.H.<sup>1</sup>, Ryeo-Jin Ko, M.P.H.<sup>2</sup>, Min Lee, M.P.H.<sup>2</sup>, Hee-Young Bang, M.S.<sup>2</sup>, Kye-Chul Kwon, M.D.<sup>1</sup>, Jong-Woo Park, M.D.<sup>1</sup>, Sun-Hoe Koo, M.D.<sup>1</sup>

충남대학교 의과대학 진단검사의학교실<sup>1</sup>, 한국보건 의료연구원 신의료기술평가사업본부<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Laboratory Medicine, College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon; <sup>2</sup>Department of New Health Technology Assessment Research, National Evidence-based, Healthcare Collaborating Agency, Seoul, Korea

**Background:** We aimed to conduct a systematic review of previously published material to evaluate the diagnostic effectiveness of PCR-based tests in detecting *BRAF* mutation.

**Methods:** Eight Korean databases, including KoreaMed, Ovid-MEDLINE, and Ovid-EMBASE were used to identify relevant published studies. Nine studies describing usage of real-time PCR, dual-priming oligonucleotide (DPO)-multiplex real-time PCR and allele-specific PCR were included in the final assessment. Two reviewers screened all references independently for assessing the quality of the included articles and extracted data.

**Results:** The rate of detection of the *BRAF* mutations was lower in the Korean population (11.1-17.2%) than that in the Western population (36.7-82.2%). The diagnostic accuracy of the *BRAF* mutation tests was assessed on the basis of four previous reports, all of which employed real-time PCR on malignant melanoma. In fact, the diagnostic accuracy of real-time PCR was found to be higher than that of sequencing tests (pooled sensitivity, 0.96; pooled specificity, 0.83; and summary receiver operating characteristic area under the curve, 0.99). In addition, we found that there was no publication bias in meta-analysis. The concordance rate of the *BRAF* mutation tests compared with reference tests was 87.9-98.1%.

**Conclusions:** Real-time PCR for the detection of the *BRAF* gene mutation is an effective technology for determining the appropriateness of treatment with *BRAF* kinase inhibitors in terminal stage cancer as well as metastatic and malignant melanoma.

**Key Words:** *BRAF* mutation, Melanoma, PCR, Systematic review

## 서 론

악성 흑색종은 피부에 발생하는 종양으로 표피 기저층에 산재하는 멜라닌 세포에서 발생하며 예후가 불량한 질환이다. B-type

**Corresponding author:** Sun-Hoe Koo

Department of Laboratory Medicine, Chungnam National University Hospital,  
282 Munhwa-ro, Jung-gu, Daejeon 301-721, Korea  
Tel: +82-42-280-7798, Fax: +82-42-257-5365, E-mail: shkoo@cnu.ac.kr

Received: October 11, 2013

Revision received: January 16, 2014

Accepted: January 22, 2014

This article is available from <http://www.labmedonline.org>

© 2014, Laboratory Medicine Online

© 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.

Raf Kinase (*BRAF*) 유전자는 세포의 성장과 분화, 악성에 관여하는 RAS/RAF/MEK/ERK 신호경로의 중요한 인자로서 흑색종, 대장암, 갑상선암 등 다양한 종류의 종양 발생과 관련이 있다[1].

미국 National Comprehensive Cancer Network (NCCN) [2]에서는 미국 FDA 및 Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA)에서 인증하는 검사실에서 *BRAF* V600E 유전자 돌연변이가 확인된 경우 vemurafenib 치료를 권고하고 있다. 영국 National Health Service (NHS)의 의료기술평가 기관인 National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE) [3]에서 2012년 보고한 권고지침에 따르면 vemurafenib은 적출이 불가능하거나 전이된 악성 흑색종 환자에서 *BRAF* V600 유전자 돌연변이 양성으로 확인된 경우 투여하는 것을 권고하는 등 치료효과가 입증되어 있다.

*BRAF* 유전자 돌연변이 검사에서 실시간 중합효소연쇄반응 (real-time PCR), allele-specific PCR (AS-PCR), PCR-RFLP (restric-

tion fragment length polymorphism) 등의 중합효소연쇄반응 기반의 검사로 돌연변이 검출이 가능하며 주로 갑상선 유두암 의심환자를 대상으로 한 *BRAF* 유전자 돌연변이 검사에서 실시간 중합효소연쇄반응 검사가 폭넓게 이용되고 있다. 실시간 중합효소연쇄반응은 DNA를 증폭시키면서 증폭산물을 동시에 검출할 수 있는 방법으로 *BRAF*V600의 돌연변이형 소식자(probe)와 wild-type의 탐색자(probe)를 사용하여 결합된 상태를 특정 파장의 형광 검출기로 검출하며 중합효소연쇄반응의 과정에 형광표지자를 사용한다. 또한, AS-PCR은 특이적인 시발체(primer)를 제작하여 wild-type allele 또는 *BRAF*-T1799A 돌연변이를 증폭시키는 방법이다[4, 5].

본 연구에서는 악성 흑색종 환자를 대상으로 하여 체계적 문헌 고찰을 토대로 중합효소연쇄반응 기반의 *BRAF* 유전자 돌연변이 검사의 진단적 유효성을 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 진단적 유효성 평가지표

악성 흑색종 환자에서 *BRAF* 유전자 돌연변이 검사의 진단적 유효성은 조직학적 검사로 악성 흑색종이 확진된 환자를 대상으로 한 *BRAF* 유전자 돌연변이 검출률, 진단 정확도, 참고검사와의 일치율로 평가하였다. 또한, 진단 정확도는 진단민감도, 진단특이도, 양성예측도, 음성예측도, 진단교차비를 하위개념으로 보고 이에 대해 평가하였다.

### 2. 체계적 문헌 고찰 방법

악성 흑색종 환자에서 *BRAF* 유전자 돌연변이 검사는 KoreaMed를 포함한 8개 국내 데이터베이스(국립중앙도서관, 국회도서관, 국가자료공동목록시스템, 한국교육학술정보원, 학술데이터베이스, 과학기술학회마을, 한국의학논문데이터베이스)와 Ovid-MEDLINE 및 Ovid-EMBASE를 이용하여 2013년 1월 14일 최종 검색을 완료하였다(Tables 1, 2, 3). 국내문헌은 'BRAF', 'melanoma',

'흑색종'과 같은 관련 검색어를 위주로 검색한 결과 1편의 관련 문헌을 찾을 수 있었다. 또한 국외 문헌은 전략적 검색식을 통해 관련 문헌을 검색하였다. 검색결과 총 482개의 문헌을 검색하였고 후기 검색으로 3편의 관련 문헌을 확인하였으며, 중복 검색을 통해

Table 2. Ovid-MEDLINE search strategy

PICO	No.	Search term	Searched no.
Patients	1	melano\$5.mp	103,575
	2	<i>BRAF</i> .mp	2,904
	3	B-RAF.mp.	2,896
	4	B-type Raf Kinase.mp.	13
	5	V600\$2.mp.	809
	6	<i>BRAF</i> V600E.mp.	111
	7	OR/2-6	3,658
	8	1 AND 7	1,035
Index test	9	exp Polymerase Chain Reaction/	334,665
	10	PCR.mp.	275,465
	11	Polymerase Chain Reaction.mp.	389,639
	12	real time PCR.mp.	28,315
	13	real time Polymerase Chain Reaction.mp.	18,100
	14	OR/9-13	494,767
	15	8 AND 14	162
Exclusion of animal studies	16	animals/	4,988,756
	17	humans/	12,506,663
	18	16 NOT (16 AND 17)	3,653,831
Total	19	15 NOT 18	159

Table 3. Ovid-EMBASE search strategy

PICO	No.	Search term	Searched no.
Patients	1	exp melanoma/	97,617
	2	melano\$5.mp	136,505
	3	OR/1-2	136,715
	4	<i>BRAF</i> .mp	5,075
	5	B-RAF.mp.	5,334
	6	B-type Raf Kinase.mp.	19
	7	V600\$2.mp.	1,435
	8	<i>BRAF</i> V600E.mp.	521
	9	OR/4-8	7,841
	10	3 AND 9	2,514
Index test	11	exp Polymerase Chain Reaction/	247,318
	12	PCR.mp.	392,994
	13	Polymerase Chain Reaction.mp.	503,341
	14	real time PCR.mp.	48,741
	15	real time Polymerase Chain Reaction.mp.	71,969
	16	OR/11-15	610,351
P&I	17	10 AND 16	322
Exclusion of animal studies	18	animals/	1,803,742
	19	humans/	13,981,186
	20	18 NOT (18 AND 19)	1,348,171
Total	21	17 NOT 20	322

Table 1. Databases used for searching published studies

Database	
KoreaMed	http://www.koreamed.org
국립중앙도서관	http://www.nl.go.kr
국회도서관	http://www.nanet.go.kr
국가자료공동목록시스템	http://www.nl.go.kr/kolisnet
한국교육학술정보원	http://www.riss4u.net
학술데이터베이스	http://kiss.kstudy.com
과학기술학회마을	http://society.kisti.re.kr
한국의학논문데이터베이스	http://kmbase.medric.or.kr
Ovid-MEDLINE	http://ovidsp.ovid.com
Ovid-EMBASE	

제거된 총 351편의 문헌에 대해 다음과 같은 기준에 의거하여 배제하였다. 따라서, 악성 흑색종 환자에서 BRAF 유전자 돌연변이 검사의 평가에 선택된 문헌은 총 9편이었다(Fig. 1).

### 3. 문헌선택기준

#### 1) 선택기준(inclusion criteria)

- 악성 흑색종 환자에서 중합효소연쇄반응 기반의 BRAF 유전

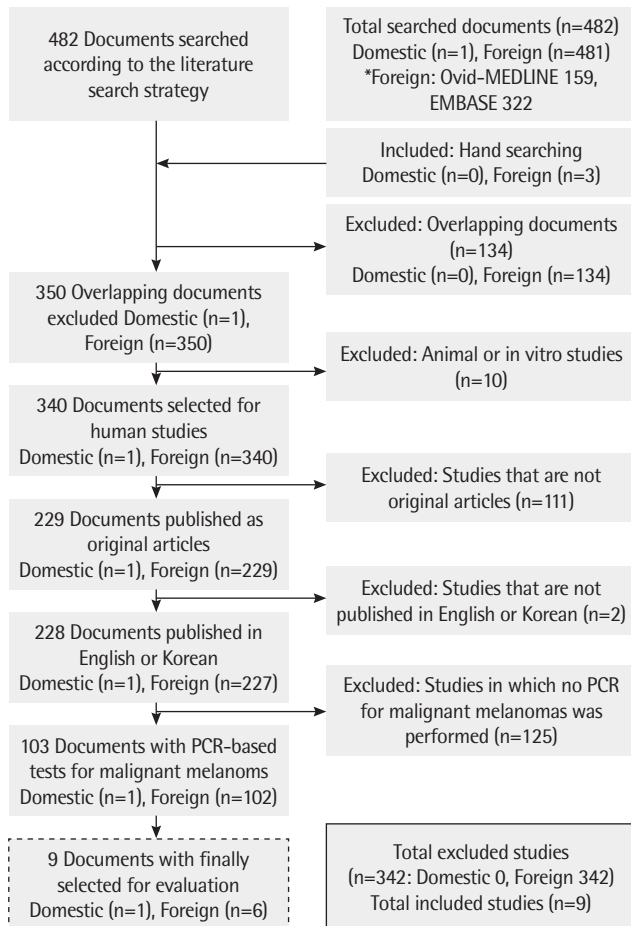


Fig. 1. Documents selected for evaluation of PCR-based BRAF mutation test according to the literature search strategy.

자 돌연변이 검사가 수행된 연구

- BRAF 돌연변이 검출률, 진단 정확도, 참고검사와의 일치율에 대한 의료결과가 하나 이상 보고된 연구
- 한국어나 영어로 출판된 연구

#### 2) 배제기준(exclusion criteria)

- 동물 실험(non-human) 연구
- 원저(original article)가 아닌 연구나 초록만 발표된 경우 혹은 회색문헌 등(non-systematic reviews, editorial 등)

### 4. 문헌의 질 평가

선택된 문헌의 질 평가 도구는 영국 Scottish Intercollegiate Guidelines (SIGN)의 'Methodology Checklist' (2004년 3월)를 채택하였다[6]. SIGN의 질 평가 도구는 원래 체계적 문헌 고찰, 무작위임상시험, 코호트 연구, 환자-대조군 연구, 진단법 평가 및 경제성 평가연구로 구분되어 있으나, 의료기술평가에서 대부분의 문헌이 비무작위 임상시험(quasi-experimental studies)과 비교관찰 연구(observational study)가 많아 SIGN과 협의 하에 일부 도구를 수정하였고, 연구 유형별 질 평가 도구는 Table 4와 같다. 문헌 검색부터 선택기준의 적용 및 자료 추출까지 각 단계는 2명의 평가자가 각 과정을 독립적으로 수행하였으며 이에 따라 근거의 수준과 권고의 등급을 선정하였다(Table 5).

### 5. 자료추출

평가에 포함된 문헌이 한 유형으로만 한정되지 않아 자료의 추출은 여러 차례 반복되었다. 자료의 추출은 2명의 평가자가 각각 중복하여 분석하였으며, 연구를 진행하면서 나타난 문제점을 토의하는 과정이 여러 차례 반복되었다. 동 과정에서 문헌에 기술된 내용과 결과에 영향을 주는 연구대상의 특성 및 필수적으로 기술되어야 하는 유효성에 대한 자료를 구분하였다. 1차 자료 추출은 2명의 평가자가 각각 중복하여 분석하였으며, 이후 실무회의를 통해 나타난 문제점을 토의하고 재차 자료 추출과정을 수행하였다.

Table 4. Levels of evidence (From Scottish Intercollegiate Guidelines Network. SIGN 50: a guideline developer's handbook)

1++	High-quality meta-analyses, systematic reviews of RCTs, or RCTs with a very low risk of bias
1+	Well-conducted meta-analyses, systematic reviews, or RCTs with a low risk of bias
1-	Meta-analyses, systematic reviews, or RCTs with a high risk of bias High-quality systematic reviews of case control or cohort or studies
2++	High-quality case control or cohort studies with a very low risk of confounding or bias and a high probability that the relationship is causal
2+	Well-conducted case control or cohort studies with a low risk of confounding or bias and a moderate probability that the relationship is causal
2-	Case control or cohort studies with a high risk of confounding or bias and a significant risk that the relationship is not causal
3	Non-analytic studies (e.g., case reports, case series)
4	Expert opinion

Abbreviation: RCT, randomized controlled trial.

Table 5. Grades of recommendations (From Scottish Intercollegiate Guidelines Network. SIGN 50: a guideline developer's handbook)

A	At least one meta-analysis, systematic review, or RCT rated as 1++, and directly applicable to the target population; or a body of evidence consisting principally of studies rated as 1+, directly applicable to the target population, and demonstrating overall consistency of results
B	A body of evidence including studies rated as 2++, directly applicable to the target population, and demonstrating overall consistency of results; or extrapolated evidence from studies rated as 1++ or 1+
C	A body of evidence including studies rated as 2+, directly applicable to the target population and demonstrating overall consistency of results; or extrapolated evidence from studies rated as 2++
D	Evidence level 3 or 4; or extrapolated evidence from studies rated as 2+

Abbreviation: RCT, randomized controlled trial.

Table 6. Documents selected for evaluation and detection rate of the *BRAF* mutation

No.	Author/Publication Year	Research location	Subjects	Index test	Detection rate %(N)	<i>BRAF</i> mutation type (N)	Level of evidence
1	Lopez-Rios et al. (2013) [7]	U.S	108 melanoma FFPE specimens*	Real-Time PCR	39.8 (43/108)	V600E	2+
2	Anderson et al. (2012) [8]	US, Australia	477 metastatic melanoma patients	Real-Time PCR	49.6 (215/433)	V600E	2+
3	Halait et al. (2012) [9]	U.S	438 malignant melanoma FFPE specimens*	Real-Time PCR	43.1 (189/438)	V600E	2+
4	Schoenewolf et al. (2012) [10]	Swiss	62 unresectable stage IV melanomas	Real-Time PCR	34.6 (18/52) <sup>†</sup>	V600E	2-
5	Lee et al. (2012) [11]	South Korea	58 primary cutaneous melanomas 27 non-cutaneous melanomas	DPO-multiplex Real-Time PCR	17.2 (10/58) 11.1 (3/27)	-	2-
6	Hacker et al. (2010) [12]	Australia	123 melanomas	AS-PCR	32.5 (40/123)	V600	2-
7	Lazar et al. (2009) [13]	Hungary	68 primary melanoma	Real-Time Quantitative PCR	39.7 (27/68)	V600E (20/68) V600K (5/68) V600R (2/68)	2+
8	Venesio et al. (2008) [5]	Italy	18 cutaneous melanoma	AS-PCR	82.2 (13/18)	V600E	2+
9	Liu et al. (2007) [14]	Australia	251 invasive primary melanomas	AS-PCR	44.6 (112/251)	V600E (T1799A)	2-

\*external commercial vendors; <sup>†</sup>DNA could be extracted from 52 (84%) of 62 FFPE tumor samples.

Abbreviations: DPO, dual priming oligonucleotide; FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded tissue; AS-PCR, allele specific-PCR.

## 6. 통계분석

본 연구에 사용된 문헌들의 통합민감도 및 통합특이도의 진단 정확도를 확인하기 위하여 MetaDiSc 1.4 version (Hospital Universitario Ramon y Cajal, Madrid, Spain)을 사용하여 메타분석을 실시하였고 통계적 유의수준이 0.05보다 큰 경우 동질성을 보이는 것으로 해석하였다. 또한, 추가적으로 출판편향을 분석하기 위해 STATA 통계프로그램 12.1 version (Stata Corp., College Station, USA)을 사용하였다.

## 결 과

악성 흑색종 환자에서 *BRAF* 유전자 돌연변이 검사의 진단적 유효성은 9편의 문헌을 근거로 돌연변이 검출률, 진단 정확도, 참고 검사와의 일치율로 평가하였으며, 평가에 포함된 문헌의 주요 자료 추출 목록은 Table 6과 같다.

### 1. *BRAF* 유전자 돌연변이의 검출률

*BRAF* 유전자 돌연변이의 검출률은 총 9편의 연구로 평가하였다 (Table 6). 한국인을 대상으로 dual priming oligonucleotide (DPO) 다중실시간 중합효소연쇄반응(multiplex Real-Time PCR)을 수행한 Lee 등[11]의 연구에서는 일차성 피부 흑색종 환자에서 *BRAF* 유전자 돌연변이 검출률은 17.2%, 비피부성 흑색종 환자에서의 검출률은 11.1%였다. 또한 미국인 및 호주인을 대상으로 실시간 중합효소연쇄반응 및 AS-PCR을 수행한 5편의 연구[5, 7-9, 11, 12]에서 검출률은 32.5-49.6%였으며, 스위스, 헝가리 및 이탈리아 환자를 대상으로 실시간 중합효소연쇄반응 및 AS-PCR을 수행한 3편의 연구[10, 13, 14]에서 검출률은 34.6-82.2%였다.

### 2. 진단 정확도

진단 정확도의 산출이 가능하였던 3편의 연구를 통해 진단민감도, 진단특이도, 양성예측도, 음성예측도, 진단교차비로 평가하였

으며, 모두 실시간 중합효소연쇄반응을 수행한 연구였다.

Lopez-Rios 등[7]의 연구에서는 악성 흑색종 환자의 종양조직 검체 116개를 대상으로 직접염기서열검사와 pyrosequencing을 참고검사로 한 실시간 중합효소연쇄반응의 진단 정확도를 보고하였다. 직접염기서열검사를 참고검사로 한 실시간 중합효소연쇄반응의 진단 정확도는 진단민감도 0.98 (95% CI, 0.90-1.00), 진단특이도 0.95 (95% CI, 0.86-0.95), 양성예측도 0.93 (95% CI, 0.86-0.95), 음성예측도 0.98 (95% CI, 0.93-1.00), 진단교차비 874.33 (95% CI, 76.40-24835.86)이었다. 또한, 직접염기서열검사와 pyrosequencing을 참고검사로 한 실시간 중합효소연쇄반응의 진단 정확도는 진단민감도 1.00 (95% CI, 0.93-1.00), 진단특이도 0.97 (95% CI, 0.92-0.97), 양성예측도 0.96 (95% CI, 0.89-0.96), 음성예측도 1.00 (95% CI, 0.95-1.00), 검사정확도 0.98 (95% CI, 0.92-0.98)이었다. Anderson 등[8]의 연구에서는 전이성흑색종으로 확진된 환자 477명을 대상으로 종양조직 검체(433개)를 채취하여 직접염기서열검사를 참고검사로 한 실시간 중합효소연쇄반응의 진단 정확도를 보고하였다. 진단민감도 0.96 (95% CI, 0.93-0.98), 진단특이도 0.80 (95% CI, 0.76-0.82), 양성예측도 0.83 (95% CI, 0.81-0.85), 음성예측도 0.95 (95% CI, 0.91-0.97), 진단교차비 107.50 (95% CI, 46.86-356.16)이었다. Halait 등[9]의 연구에서는 악성 흑색종 환자의 종양조직 검체 및 cell line 439개를 대상으로 직접염기서열검사와 pyrosequencing을 참고검

사로 한 실시간 중합효소연쇄반응의 진단 정확도를 보고하였다. 직접염기서열검사를 참고검사로 한 진단 정확도는 진단민감도 0.95 (95% CI, 0.92-0.98), 진단특이도 0.82 (95% CI, 0.79-0.83), 양성예측도 0.81 (95% CI, 0.78-0.83), 음성예측도 0.96 (95% CI, 0.92-0.98), 진단교차비 93.54 (95% CI, 42.47-212.69)이었다. 또한, 직접염기서열검사와 pyrosequencing을 참고검사로 한 진단 정확도는 진단민감도 1.00 (95% CI, 0.98-1.00), 진단특이도 0.93 (95% CI, 0.91-0.93), 양성예측도 0.93 (95% CI, 0.91-0.93), 음성예측도 1.00 (95% CI, 0.98-1.00), 검사정확도 0.96 (95% CI, 0.94-0.96)이었다.

실시간 중합효소연쇄반응의 진단적 의미를 분석한 연구들간의 이질성을 검정한 결과 통합민감도는 0.96 (95% CI, 0.94-0.98)이었으며, 병합된 연구간 동질성을 보였다( $X^2=0.63$ ,  $df=2$ ,  $P=.729$ ) (Fig. 2). 통합특이도는 0.83 (95% CI, 0.79-0.86)이었으며, 병합된 연구간 이질성을 보였다( $X^2=10.69$ ,  $df=2$ ,  $P=.005$ ) (Fig. 3). 전반적인 Summary Receiver Operating Characteristic Area Under the Curve (SROC AUC)는 0.99 (SE=0.006)였으며(Fig. 4), 출판편향은 없는 것으로 판단되었다(Fig. 5).

### 3. 참고검사와의 일치율

동 평가는 참고검사와의 일치율을 보고한 4편의 연구를 근거로 평가하였으며, 모두 실시간 중합효소연쇄반응을 수행한 연구였다 (Table 7). Lopez-Rios 등[7]의 연구에서 직접염기서열검사와 실시간 중합효소연쇄반응의 일치율은 96.3% (95% CI, 90.9-98.6)였으며, 직접염기서열검사와 pyrosequencing과 실시간 중합효소연쇄반응의 일치율은 98.1% (95% CI, 93.5-99.5)였다. Anderson 등[8]의 연구에서는 참고검사인 직접염기서열검사와 실시간 중합효소연쇄반응과의 일치율을 보고하였으며, 일치율은 88.4% (383/433개)였

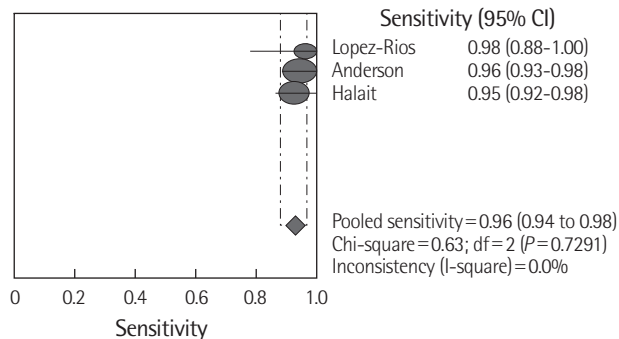


Fig. 2. Diagnostic meaning of real-time PCR (Pooled sensitivity).

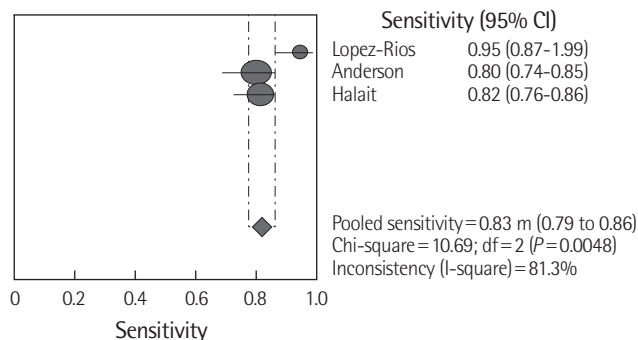


Fig. 3. Diagnostic meaning of real-time PCR (Pooled sensitivity).

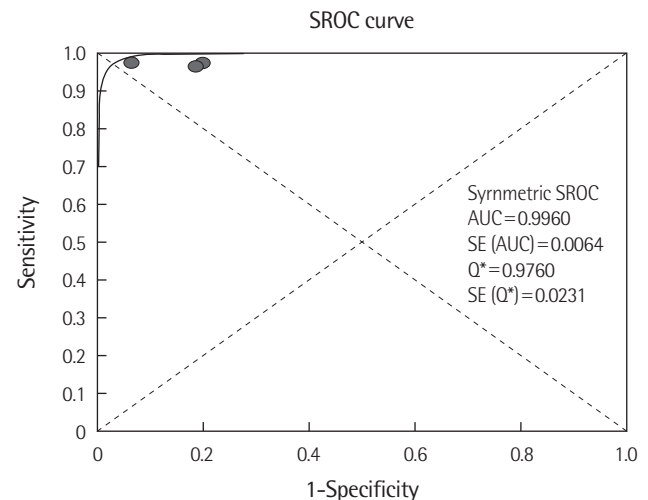


Fig. 4. Summary receiver operating characteristics area under the curve of real-time PCR.



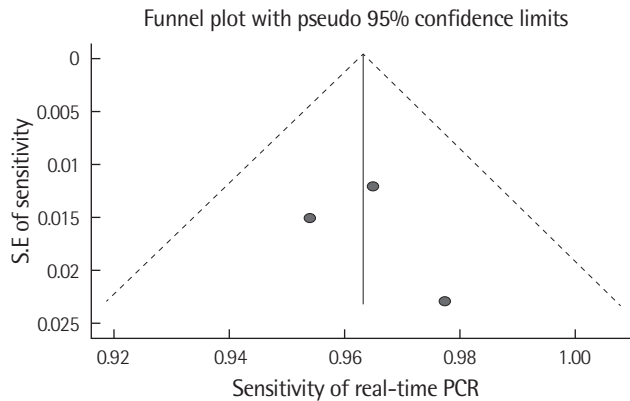


Fig. 5. Funnel plot of real-time PCR.

다. Halait 등[9]의 연구에서는 직접염기서열검사와 실시간 중합효소연쇄반응의 일치율은 87.9% (385/438개)였으며, 직접염기서열검사 및 pyrosequencing와 실시간 중합효소연쇄반응의 일치율은 96.3% (422/438개)였다. Schoenewolf 등[10]의 연구에서 직접염기서열검사와 실시간 중합효소연쇄반응 검사가 가능하였던 36개 검체를 대상으로 대한 두 검사의 일치율은 91.7% (33/36개)였다.

#### 4. 근거의 등급

중합효소연쇄반응 기반의 *BRAF* 유전자 돌연변이 사는 진단법 평가연구 총 9편을 근거로 평가하였고, 질 평가 결과 2'가 5편, 2'가 4편이었다. 따라서 진단 정확도를 확인할 수 있었던 4편의 문헌에 근거하여 실시간 중합효소연쇄반응은 참고검사와 비교 시 진단 정확도 및 일치율이 높아 권고등급 C의 유효성이 있는 기술로 평가하였다.

### 고 찰

악성 흑색종은 드물게 발생하는 편이나 초기에 적절하게 치료하지 못하면 조기에 전이되어 사망에 이르게 되는 질병이다. 서양인의 경우 피부에 멜라닌 색소가 적은 사람에게 많이 발생하는 피부종양으로 알려져 있으며, 동양인의 경우 피부에 색소가 있는 사람에서는 비교적 적게 발생하나 발생한 경우 예후는 불량한 것으로 알려져 있다[15]. 2011년 발표된 중앙암등록본부 자료에 의하면 2009년에 우리나라에서는 연 192,561건의 암이 발생되었는데, 그 중 악성 흑색종의 빈도는 남녀를 합하여 연 444건으로 전체 암 발생의 0.23%를 차지한 것으로 보고된 바 있다[16]. 이러한 예후가 불량한 악성 흑색종 치료에 있어서 국내 의료 환경에서는 적절한 치료약제의 선정에 어려움을 겪고 있는 실정이다.

최근 악성 종양 치료를 위한 분자유전학적 검사의 중요성이 대두되고 있으며, 그 예로서 HER<sup>2</sup> 표적 치료제인 trastuzumab이나

Table 7. Diagnostic concordance rate

Author	No. of specimens (N)	Research location	Concordance rate (%), (N)
Lopez-Rios et al. [7]	108	Direct sequencing	96.3 (104/108)
		Direct sequencing + pyrosequencing	98.1 (105/108)
Anderson et al. [8]	433	Direct sequencing	88.4 (383/433)
Halait et al. [9]	438	Direct sequencing	87.9 (385/438)
		Direct sequencing + pyrosequencing	96.3 (422/438)
Schoenewolf et al. [10]	6	Direct sequencing	91.7 (33/36)

lapatinib이 개발되어 유방암 자 치료방침 결정에 필수적인 요소가 되었다[17]. 악성 흑색종 환자에서 *BRAF* 유전자 돌연변이의 가장 중요한 관점은 *BRAF* V600 돌연변이 양성 종양 환자에 대한 표적 치료로서, 현재 미국 NCCN, NCI 및 영국 NHS의 임상진료지침에서 vemurafenib 치료결정을 위해 *BRAF* 유전자 돌연변이 검사를 권고하고 있다[18]. 2011년 8월 미국 FDA가 승인한 *BRAF* 억제제 vemurafenib은 *BRAF* V600 돌연변이 양성인 675명의 전이성 흑색종 환자를 대상으로 vemurafenib과 dacarbazine 치료제 효과를 비교한 3상 무작위임상시험연구 결과, vemurafenib 치료군에서 무병생존율(Progression Free Survival)이 유의하게 향상되었음을 보고하였고, 약물투여 후 6개월 시점에서 vemurafenib 치료군의 생존율이 84%로 dacarbazine 치료군 64%보다 더 높게 보고되어 그 임상적 유효성이 입증되었다[19, 20]. 따라서 체계적 문헌 고찰을 토대로 악성 흑색종 환자에서 중합효소연쇄반응 기반의 방법을 통한 *BRAF* 유전자 돌연변이 검사의 진단적 유효성을 평가하고자 하였다.

본 평가에 선택된 한국인을 대상으로 한 1편의 연구[11]의 경우 DPO 다중실시간 중합효소연쇄반응을 이용한 *BRAF* 유전자 돌연변이 검출률은 비피부성 흑색종(acral lentiginous melanoma, nodular melanoma, superficial spreading melanoma) 환자에서 11.1%, 피부 흑색종 환자에서 17.2%로 서양인을 대상으로 한 8편[5, 7-10, 12, 13, 15]에서 실시간 중합효소연쇄반응 및 AS-PCR을 이용한 연구결과 32.5-82.2%보다 낮게 보고되었다. 이러한 차이는 동양인의 경우 서양인과 달리 악성 흑색종의 아형이 점막이나 말단에 나타나는 형태가 많기 때문인 것으로 판단된다. 말단 흑색종(acral melanoma)은 대부분의 동양인의 피부악성 흑색종에서 나타나는 아형으로 우리나라에서는 흑색종 전체의 약 60%를 차지한다. 주로 사지 말단인 손바닥, 발바닥에 생기며 점막이나 손발톱 밑의 병변도 이 유형에 속한다[21, 22]. 이러한 연구결과는 한국인 및 중국인을 대상으로 염기서열검사를 수행한 다른 연구(11.9%, 14.7%) [23, 24] 결과와 유사하였다.

또한 본 평가에서 원발성 흑색종 및 전이성 흑색종 환자에서 검출된 *BRAF* 유전자형은 모두 V600으로 보고되었다. 다른 연구에

의하면 *BRAF* 유전자는 흑색종에서 50%의 유병률을 보이는 단일 유전자로서 *BRAF* 돌연변이의 92%가 V600E 돌연변이로 보고되고 있으며, V600E 돌연변이의 비율은 흑색종의 종양발생 기전에서 *BRAF* 유전자의 핵심적 역할을 나타낸다. V600E 돌연변이는 원발성 흑색종의 80%에서 나타나며 전이성 흑색종에서 68%, 양성 모반(benign nevi)에서 82% 정도로 나타나는 것으로 보고된 바 있다[23].

대다수의 모반에 돌연변이가 잠재해 있다는 사실은 *BRAF* 유전자 돌연변이가 흑색종 종양의 초기 직계성 특이 발병(lineage-specific event)과 추가적 종양발생이 악성화에 관여한다는 것을 시사하며, *BRAF* 유전자 돌연변이는 모반의 세포학적 노화를 유발시키고 *PTEN* 유전자 돌연변이는 멜라닌 세포의 *BRAF* 매개성 종양화에 연관되어 있는 것으로 보고되고 있다[25].

본 평가에서 진단 정확도 및 참고검사와의 일치율을 보고한 4편의 연구 모두 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하였다. 참고검사를 직접 염기서열검사로 하였을 때, 실시간 중합효소연쇄반응의 진단 정확도는 메타분석 결과에서 통합민감도는 0.96로 병합된 연구들 간 동질성( $P=.729$ )을 나타내었으나, 통합특이도는 0.83로 이질성을 보였다( $P=.005$ ). 이는 분석에 포함된 Lopez-Rios 등[7]의 연구 대상 검체수(108개)가 다른 2편의 연구에 비해 적어 특이도가 비교적 높게 나타난 것이 원인으로 사료된다. 전반적인 SROC AUC는 0.99였으며, 병합된 연구들 간 출판편향은 보이지 않았다. 또한, 참고검사인 직접 염기서열검사와의 일치율은 87.9-96.3%, 직접염기서열검사 및 pyrosequencing과 실시간 중합효소연쇄반응의 일치율은 96.3-98.1%였다. 따라서, 실시간 중합효소연쇄반응은 진단 정확도 및 참고검사와의 일치율이 높고 간편하고 신속한 방법으로, 악성 흑색종 환자의 *BRAF* 유전자 돌연변이를 확인하고 그 결과에 따라 *BRAF* 활성효소 억제제의 치료방침을 결정하는 데 있어 유효성의 근거가 있는 의료기술로 평가하였다(권고등급 C).

현재 국가별, 기관별로 진단법 평가에 특화되어 있는 다양한 근거수준 및 권고 등급체계를 사용하고 있으며, 본 평가에 사용한 SIGN 이외에도 영국의 Centre for Evidence-Based Medicine (CEBM), 코크란 방법론 그룹의 Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies (QUADAS), World Health Organization (WHO) 과 영국의 NICE 등을 포함한 20개의 기구들에서 채택하고 있는 Grading of Recommendations, Assessment, Development and Evaluation (GRADE) 등이 있다. QUADAS의 경우 질 평가 시 진단 검사의 문맥이나 주제에 맞게 중요한 항목을 추가하도록 권고하고 있으나, SIGN의 등급체계는 다소 세부적인 질문에 대한 내용을 충분히 포괄하고 있지 못하여 이를 보완하기 위해 최근 근거의 질에 더 중점을 두도록 개정된 새로운 등급체계가 소개된 바 있다[26]. 본 연구에서는 개정된 새로운 버전을 적용하지 못한 한계점을 가

지고 있으나 향후 등급 체계가 발전함에 따라 문헌적 근거에 대한 평가 방식이 점진적으로 정립될 것으로 판단된다.

다만, 동 검사의 적응증에 있어서 아직은 1기 또는 2기의 초기 악성 흑색종 환자를 대상으로 한 유효성을 입증할 만한 연구결과가 부족하였다. 따라서 미국 NCCN, NCI 및 영국 NHS의 임상진로지침 [2, 3, 18]의 근거를 토대로 말기암 또는 전이성 및 적출불가능한 악성 흑색종 환자에서 *BRAF* 억제제의 치료방침을 결정할 수 있는 검사로서 시행하는 것이 바람직하다고 판단되며, 현재 국내 악성 흑색종 환자의 유병률이 매우 낮고 적절한 치료제가 거의 없다는 점을 감안할 때, 국내 임상환경에서 유효성이 높을 것으로 사료된다.

본 연구의 제한점은 중합효소연쇄반응 기반의 검사로 포괄적으로 문헌검색을 실시하였음에도 진단 정확도 및 참고검사와의 일치율을 보고한 연구는 실시간 중합효소연쇄반응을 수행한 4편만 확인되었고, 진단 정확도를 제시한 3편의 문헌에 대해서만 메타분석이 가능하였다는 점이다. 그러나 본 연구에서의 메타분석 수행목적은 동 검사의 진단 정확도에 대한 결합추정치(pooled estimate)를 제시하여 객관적 결론을 도출하고자 함이었으며, 본 연구는 악성 흑색종 환자에서의 중합효소연쇄반응 기반의 *BRAF* 유전자 돌연변이 검사에 대한 진단적 유효성을 체계적 문헌 고찰로 입증한 첫 연구로서 향후 악성 흑색종의 원인 유전자로 보고되고 있는 NRAS, *PTEN* 등의 유전자에 대한 임상적 유효성 관련 연구가 더 필요할 것이다.

## 요 약

**배경:** 이 연구는 체계적 문헌 고찰을 토대로 악성 흑색종 환자에서 중합효소연쇄반응 기반의 방법을 통한 B-type Raf Kinase (*BRAF*) 유전자 돌연변이 검사의 진단적 유효성을 평가하고자 하였다.

**방법:** 체계적 문헌 고찰은 KoreaMed를 포함한 8개 국내 데이터베이스와 Ovid-MEDLINE, Ovid-EMBASE의 국외 데이터베이스를 이용하였으며, 실시간 중합효소연쇄반응, dual priming oligonucleotide (DPO) 다중실시간 중합효소연쇄반응, allele specific-polymerase chain reaction (AS-PCR)을 수행한 총 9편의 문헌이 평가에 선택되었다. 2명의 평가자가 각 과정을 독립적으로 질 평가 및 자료 추출을 수행하였다.

**결과:** *BRAF* 유전자 돌연변이의 검출률은 한국인이 11.1-17.2%로 서양인 36.7-82.2%보다 낮게 보고되었다. 본 평가에서 진단 정확도를 산출할 수 있었던 4편의 연구에서 참고검사를 직접 염기서열검사로 하였을 때, 메타분석 결과 실시간 중합효소연쇄반응의 진단 정확도는 통합민감도 0.96, 통합특이도 0.83, 전반적인 SROC AUC는 0.99였으며, 출판편향은 보이지 않았다. 또한, 참고검사와의 일치율은 87.9-98.1%였다.

**결론:** 실시간 중합효소연쇄반응은 말기암 또는 전이성 및 적출불 가능한 악성 흑색종 환자에서 *BRAF* 유전자 돌연변이를 확인하여 *BRAF* 활성효소 억제제의 치료방침을 결정하는 데 있어 유효성이 있는 검사로 판단된다.

## 감사의 글

본 논문은 2012년 보건복지부의 연구기금에서 연구비를 지원받았습니다.

## REFERENCES

1. Rha SY, Lee JC, Kwon KH, Lee HJ, Kim KS, Jo YS, et al. The relationship between the *BRAF* mutation in thyroid papillary carcinomas and the prognostic factors. *J Korean Soc Endocrinol* 2005;20:224-9.
2. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Guidelines. <http://www.nccn.com> (Updated on Dec 2013).
3. National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE) technology appraisal guidance 269, Vemurafenib for treating locally advanced or metastatic *BRAF* V600 mutation-positive malignant melanoma, December 2012.
4. Korean Society for Laboratory Medicine. Park CJ, ed. Laboratory Medicine. 4th ed. Seoul: E\*PUBLIC, 2009:828-9.
5. Venesio T, Chiorino G, Balsamo A, Zaccagna A, Petti C, Scatolini M, et al. In melanocytic lesions the fraction of *BRAF* V600E alleles is associated with sun exposure but unrelated to ERK phosphorylation. *Mod Pathol* 2008;21:716-26.
6. SIGN 50: a guideline developer's handbook. Scottish Intercollegiate Guidelines Network. <http://www.sign.ac.uk/pdf/sign50.pdf> (Updated on Jan 2013).
7. Lopez-Rios F, Angulo B, Gomez B, Mair D, Martinez R, Conde E, et al. Comparison of testing methods for the detection of *BRAF* V600E mutations in malignant melanoma: preapproval validation study of the companion diagnostic test for vemurafenib. *PLoS ONE* 2013;8:e53733.
8. Anderson S, Bloom KJ, Vallera DU, Rueschoff J, Meldrum C, Schilling R, et al. Multisite analytic performance studies of a Real-Time polymerase chain reaction assay for the detection of *BRAF* V600E mutations in formalin-fixed paraffin embedded tissue specimens of malignant melanoma. *Arch Pathol Lab Med* 2012;136:1385-91.
9. Halaït H, De Martin K, Shah S, Soviero S, Langland R, Cheng S, et al. Analytical performance of a real-time PCR-based assay for V600 mutations in the *BRAF* gene, used as the companion diagnostic test for the novel *BRAF* inhibitor Vemurafenib in metastatic melanoma. *Diagn Mol Pathol* 2012;21:1-8.
10. Schoenewolf NL, Dummer R, Mihic-Probst D, Moch H, Simcock M, Ochsenbein A, et al. Detecting *BRAF* mutations in formalin-fixed melanoma: experiences with twostate-of-the-art techniques. *Case Rep Oncol* 2012;5:280-9.
11. Lee HW, Song KH, Hong JW, Jeon SY, Ko DY, Kim KH, et al. Frequency of *BRAF* mutation and clinical relevance for primary melanomas. *Korean J Pathol* 2012;46:246-52.
12. Hacker E, Hayward NK, Dumenil T, James MR, Whiteman DC. The association between MC1R genotype and *BRAF* mutation status in cutaneous melanomas: findings from an Australian population. *J Invest Dermatol* 2010;130:241-8.
13. Lazar V, Ecsedi S, Attila G Szöllösi, Tóth R, Vízkeleti L, Rákossy Z, et al. Characterization of candidate gene copy number alterations in the 11q13 region along with *BRAF* and NRAS mutations in human melanoma. *Mod Pathol* 2009;22:1367-78.
14. Liu W, Kelly JW, Trivett M, Murray WK, Dowling JP, Wolfe R, et al. Distinct clinical and pathological features are associated with the *BRAF*<sup>T1799A(V600E)</sup> mutation in primary melanoma. *J Invest Dermatol* 2007;127:900-5.
15. Kim JO, Yang HY, Son S, Park KH. Clinical experiences in malignant melanoma. *J Korean Surg Soc* 1997;53:905-10.
16. National Cancer Information Center. <http://cancer.go.kr> (Updated on Dec 2013).
17. Sung WJ, Park SJ, Gu MJ, Bae YK. Automated silver-enhanced in situ hybridization for evaluation of HER2 gene status in breast carcinoma: comparison with fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *Korean J Pathol* 2010;44:28-34.
18. National Cancer Institute (NCI). <http://www.cancer.gov> (Updated on Dec 2013).
19. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. BRIM-3 Study Group. Improved survival with Vemurafenib in melanoma with *BRAF* V600E mutation. *New Engl J Med* 2011;364:2507-16.
20. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, et al. Inhibition of mutated, activated *BRAF* in metastatic melanoma. *New Engl J Med* 2010;363:809-19.
21. Cunnon B and May JW Jr. Skin contractures of the hand. In: Flynn JE, editor. *Hand surgery*. 2nd ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1982: 776-7.
22. McGovern VJ. The nature of melanoma. A critical review. *J Cutan*



- Pathol 1982;9:61-81.
23. Jin SA, Chun SM, Choi YD, Kweon SS, jung ST, Shim HJ, Et al . *BRAF* mutations and KIT aberrations and their clinicopathological correlation in 202 Korean melanomas. J Invest Dermatol 2013;133:579-82.
24. Ziai J, Hui P. *BRAF* mutation testing in clinical practice. Expert Rev Mol Diagn 2012;12:127-38.
25. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, et al. High frequency of *BRAF* mutations in nevi. Nat Genet 2003;33:19-20.
26. Scottish Intercollegiate Guidelines Network (SIGN). URL: <http://www.sign.ac.uk> (Updated on Dec 2013).