

세포학적 검사에서 갑상샘 유두암종이
의심되는 갑상샘 결절의 galectin-3 와
BRAF mutation 분석

연세대학교 대학원
의학과
김도경

세포학적 검사에서 갑상샘 유두암종이
의심되는 갑상샘 결절의 galectin-3 와
BRAF mutation 분석

연세대학교 대학원
의학과
김도경

세포학적 검사에서 갑상샘 유두암종이
의심되는 갑상샘 결절의 galectin-3 와
BRAF mutation 분석

지도교수 홍 순 원

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2009년 6월 12일

연세대학교 대학원

의학과

김 도 경

김도경의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

연세대학교 대학원

2009년 6월 12일

감사의 글

이 논문을 완성하기 위해 여러모로 도와 주신 많은 분들께 깊은 감사의 마음을 전합니다. 부족한 것이 많은 저를 자상한 격려와 믿음으로 이끌어 주신 홍순원 지도교수님, 많은 관심과 조언을 주신 카톨릭대학교 병리학 교실 정찬권 교수님과 연세대학교 영상의학교실 박진영 교수님께 감사드립니다.

실험을 진행하는데 아낌 없는 도움을 주신 정형재 선생님, 함께 수고한 강혜민 선생님, 그리고 관심과 조언을 주신 구자승 선생님, 김현기 선생님께 감사드립니다. 또한 병리 의사로 성장할 수 있도록 항상 지도해 주시는 병리학 교실의 많은 교수님들과 의국 생활을 함께하며 힘이 되어준 선후배, 동료에게도 감사의 말씀을 전합니다.

그리고 저의 사랑하는 가족에게, 헌신으로 저를 여기까지 이르게 해주신 부모님께 사랑과 고마움을 드립니다.

저자 씬.

차 례

국문 요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	5
1. 연구대상	5
2. 방법	6
가. 세침흡인 세포검사 Galectin-3 면역조직화학염색	6
나. 세침흡인 세포검사의 DNA 추출 및 BRAF T1799A 확인	7
(1) DNA 추출	7
(2) PCR-RFLP법에 의한 BRAF T1799A 확인	7
다. 결과 분석	10
III. 결과	11
1. 세침흡인 세포검사 Galectin-3 면역조직화학염색 결과	12
2. 세침흡인 세포검사의 BRAF T1799A 돌연변이 분석 결과	12
가. 세침흡인 세포검사 세포밀도에 따른 DNA 추출 및 BRAF T1799A 돌연변이 결과	12
나. BRAF T1799A 돌연변이 유무에 따른 대상 유두암종의 분석	14
(1) 조직 아형에 따른 분석	14
(2) 임상 및 조직학적 소견 분석	14
IV. 고찰	16
V. 결론	18
참고문헌	19
Abstract	23

그림 차례

- 그림 1. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 의 과정 9
- 그림 2. 배양 세포계 양성 대조군의 확인.....10
- 그림 3. PCR-RFLP를 이용한 BRAF mutation 의 확인 ... 13

표 차례

표 1. 유두암종 대상환자의 임상 정보 및 조직학적 특성...	11
표 2. 면역조직화학 검사를 통한 Galectin-3 발현정도.....	12
표 3. FNAB 의 Galectin-3 발현과 BRAF 돌연변이 유무...	13
표 4. Galectin-3 발현과 BRAF 돌연변이 유무의 조합에 따른 통계적 분석.....	14
표 5. 유두암종 아형에 따른 BRAF 돌연변이 유무의 비교.....	15
표 6. BRAF 돌연변이 유무와 유두암종 조직학적 특성의 비교.....	15

국문 요약

세포학적 검사에서 갑상샘 유두암증이 의심되는 갑상샘 결절의 galectin-3와 BRAF mutation 분석

갑상샘 결절 발견이 증가되면서 진단을 위한 갑상샘 세침 흡인 세포 검사의 수도 증가하고 있다. 가장 정확하고 비용-효율적인 방법이라고 알려진 세침 흡인 세포 검사의 결과는 약 15~30% 에서 미결정으로 분류되는데, 여기에는 유두암증이 의심되지만 세포의 수가 부족한 경우 또는 유두암증 핵의 특징 중 일부만 보이는 경우 등이 속한다. 유두암증은 약 45-86% 정도에서 BRAF 돌연변이를 동반한다고 알려져 있고, galectin-3 는 악성 종양에서 발견되며 양성 병변과의 감별에 도움을 줄 수 있는 표지자로 알려져 있다. 본 연구는 세침흡인 세포 도말검사서 ‘유두암증의 의심’ 으로 진단받은 경우 유두암증을 확진 하는데 있어 galectin-3 면역염색과 BRAF 돌연변이를 확인하는 방법이 어느 정도 도움을 줄 수 있는지를 알아보고자 하였다. 세침흡인 세포검사로 ‘유두암증의 의심’ 으로 진단받고 조직으로 유두암증을 진단 받은 44예를 대상으로 하였고 여포성 선종 (follicular adenoma) 2예, 선종성 증식 (adenomatous hyperplasia) 2예를 포함한 양성질환 4예를 대조군으로 하였다. 세침흡인 세포검사는 세포밀도에 따라 분류하였고, 유두암증의 임상 및 조직학적 소견을 분석하였으며, galectin-3 면역염색과 BRAF 돌연변이 결과와의 연관성을 분석하였다. Galectin-3 는 유두암증 44예 모두에서 염색되었으나, 양성질환 4예 중 2예에서도 염색되었다. BRAF 돌연변이는 유두암증 44예 중 9예에서 관찰되어 20.5%에서 관찰되었으나 양성질환에서는 전 예에서 관찰되지 않았다. 세침흡인 세포검사 세포밀도에 따른 분석에서는 전 예에서 DNA를 추출할 수 있었으나, 세포군집이 많을수록 BRAF 돌연변이 발견

율은 더 높았다. 조직 아형에 따른 BRAF 돌연변이는 전형적인 유두암 (conventional papillary carcinoma) 40예 중 8예(20%), 소공질-상실양 아형 (cribriform morular variant) 1예중 1예(100%)에서 관찰되었고, 여포성 아형 (follicular variant) 2예, 미만성 경화성 (diffuse sclerosing variant) 1 예에서는 관찰되지 않았다. 결론적으로 galectin-3 는 유두암종 진단에 민감도가 높으나 특이도는 낮은 문제점이 있었다. 세침흡인 세포검사서 BRAF 돌연변이 검사는 세포밀도가 낮은 경우 위음성의 가능성이 있기 때문에 유두암종 진단에서 민감도가 낮지만 특이도는 매우 높으며 특별한 아형과 임상 및 조직 소견과 연관성을 보여 수술전 진단에 있어 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다. 세침흡인 세포검사서 세포의 수가 적은 경우는 가장 흔히 미결정으로 분류되고, 이런 경우 유전자 돌연변이 검사도 어렵기 때문에 정확한 진단을 위해서는 충분한 검체의 확보가 우선시 된다.

핵심되는 말: 유두암종 의심, 세침 흡인 생검, BRAF 돌연변이, Galectin-3

세포학적 검사에서 갑상샘 유두암종이 의심되는 갑상샘 결절의
galectin-3 와 BRAF mutation 분석

<지도 교수 홍 순 원>

연세대학교 대학원 의학과

김 도 경

I. 서론

갑상샘암은 내분비 종양 중 가장 많은 비율을 차지하는 악성 종양으로 그 발병율은 우리나라뿐 아니라 전 세계적으로 빠르게 증가하고 있다. 이는 초음파를 통한 갑상샘 결절의 발견이 증가되면서 미세암종의 진단이 증가하였기 때문이다. 그 중 유두암종은 전체 갑상샘 종양의 80% 정도를 차지하고, 1 cm 미만 미세암종의 거의 대부분을 차지하고 있다.^{1,2} 초음파에서 갑상샘 결절이 관찰되는 경우, 가장 정확하고 비용-효율적인 진단 방법은 세침 흡인 세포 검사이다. 그 결과에 따라 치료 방향 및 수술적 절제 여부를 결정하게 된다. 문헌에 따르면, 세포학적 검사에 의한 진단의 민감도와 특이도는 각각 70-98% 와 55-100% 정도로 보고되어 있으며, 약 15~30 % 의 경우에서 세침 흡인 세포 검사로 악성 또는 양성의 판단이 어렵다고 알려져 있다^{3,4}. 이것은 검체 채취, 표본, 병리학자의 숙련도에 의한 영향을 배제하고, 노련한 병리학자에 의해서 현미경적 세포학적 특성만으로 진단이 어려운 경우를 말한다. 이처럼 미결정으로 분류되는 세포 소견은 ‘유두암종의 의심’, ‘여포 병변’, ‘여포 종양’ 을 포함한다. 특히 ‘유두암종의 의심’ 병변의 경우에 환자는 대부분 진단

및 치료를 위해 수술을 받게 된다.

따라서 수술 전 세포학적 검사에서 진단의 정확성을 높이기 위한 노력이 필요하며, 이를 위한 많은 분자 표지자가 연구되었다. 이 중, 가장 민감도가 높은 것으로 알려진 galectin-3는 lectin group 의 β -galactosyl-binding protein 으로, 세포 사이 또는 세포와 기질 사이에 영향을 주며, 세포 주기 조절, 세포 사멸의 억제 등에 관여한다.^{5,6} 이것은 악성 종양의 갑상샘 세포 표면에서 발현되지만, 양성 또는 정상 갑상샘 세포에서는 발현되지 않기 때문에 좋은 종양 표지자로 사용될 수 있으며, 많은 다른 연구의 결과가 이를 뒷받침 해주고 있다.⁷⁻⁹

많은 연구를 통하여 갑상샘 암의 발생에 관여하는 몇 가지 종류의 유전자 변이가 밝혀졌는데 이는 갑상샘암의 종류와 그 조직학적 특성에 따라 차이가 있다. 세포의 증식, 분화, 세포 사멸 등의 기능을 조절하는 세포간 신호 전달 체계인 MAPK/ERK 전달 체계의 이상은 여러 종류의 악성 종양에서 관찰된다. 유두암종에서도 약 70 % 경우에서 MAPK 전달 체계의 이상이 동반되며 여기에는 RET/PTC 재배열, BRAF 와 RAS 유전자의 점돌연변이등이 포함된다. 문헌 보고에 따르면, 유두암종에서 이들은 각각 20%, 45%, 10% 정도 비율로 나타난다.^{10,11} 가장 많은 비율을 차지하는 BRAF 돌연변이는 대부분 T1799A 점돌연변이이며, BRAF 단백질 중 V600E 아미노산의 변화를 초래한다. 이것은 BRAF kinase 를 구조적으로 활성화시키고, ERK 인산화를 지속 시켜 MAPK 전달 체계의 기능에 이상을 가져온다. BRAF 돌연변이는 체세포 유전자 변경(somatic genetic alteration)이며, 갑상샘에서는 특징적으로 유두암종과 유두암종에서 파생된 미분화암에서 제한적으로 발현된다.^{10,12,13} 다른 돌연변이를 보이는 유두암종에 비하여 BRAF 돌연변이를 보이는 유두암종은 병기, 갑상샘 주변 조직으로의 침범, 림프절 전이의 빈도가 높은 것과 관련되어 나쁜 예후를 보이는 것으로 알려져 있다.^{13,14} 이것은 BRAF 돌연변이가 종양 억제 유전자(TIMP3, DAPK 등)를 억제시키고, 신생 혈관 생성을 촉진(VEGF, MMPs, NF- κ B 등)하는 등 이차적인 유전자 변화를 가져오기 때문이다. 또한 요오드 대사 유전자 (iodide-metabolizing

gene; TSHR, NIS, TPO 등)을 억제하여 방사성요오드 소작 치료 (radioiodine ablation therapy)에 저항성 보이고 재발하는 것과는 관련되어 있다.^{13,15} 따라서, BRAF 돌연변이는 유두암종의 중요한 예후 인자일 뿐만 아니라, 앞으로 환자의 적절한 치료 방향을 결정하는 데에도 그 중요성이 강조되고 있다. 또한 이것은 유두암종에 특이도가 높기 때문에,^{10,12,13} ‘유두암종의 의심’으로 진단된 갑상샘 결절에서 이를 확인하는 것은 진단적인 가치가 있을 것으로 생각한다. 한편, 한국에서의 BRAF 돌연변이에 대한 연구를 살펴보면 그 발생률은 약 60~80% 이상으로 다른 나라에 비해 현저히 높게 보고되어 있어 우리 검체에서의 BRAF 돌연변이를 Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 방법으로 확인하고, 문헌과 비교하여 그 차이점을 분석하고자 하였다.^{14,16-19}

유두암종에서 galectin-3 와 BRAF 돌연변이는 많은 부분에서 중첩되지만 그 둘 사이에 유의할 만한 상관관계는 없으며 BRAF 돌연변이가 직접적으로 galectin-3 단백질 발현에 관여하지 않는 것으로 보고 되어 있다.²⁰ 본 연구에서는 Galectin-3 와 BRAF 돌연변이의 민감도와 특이도를 확인하고, 이 두가지 검사가 어떻게 진단에 활용될 수 있는지 알아보하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 연구대상

2002년부터 2004년까지 갑상샘 세침흡인 세포검사를 시행하고 세브란스병원 병리과에 의뢰되어 ‘유두암종 의심’으로 진단받고 갑상샘 절제술을 시행한 사례 중 절제술 후 유두암종으로 확인된 44예를 대상으로 하였고, 세침흡인 세포검사로 ‘유두암종 의심’으로 진단받았으나 최종적으로 양성 질환으로 진단된 여포성 선종 (follicular adenoma) 2예, 선종성 증식 (adenomatous hyperplasia) 2예, 총 4예를

대조군으로 하였다. 세침흡인 세포검사는 22-gauge needle 로 갑상샘 결절을 1-2 회 흡인한 세포를 Papanicolaou 염색 하고 두 명 이상의 병리 의사가 현미경으로 관찰하였다. ‘유두암종 의심’으로 진단받은 예들은 유두종암 핵의 특징 (핵의 크기 증가, 간유리양 염색질, 핵고랑 및 핵내 세포질 봉입체) 중 일부가 관찰되지만 진단 하기에 부족한 경우 (6/48) 와 유두종암 핵의 특징 다수가 관찰되지만 그 세포의 수가 적어 진단적이지 않은 경우 (42/48)가 포함되었다.^{21,22} 세포 도말 슬라이드는 세포 밀도, 특히 5~10개의 세포로 구성된 군집의 수에 따라서 그 수가 10개 이하인 경우, 군집의 수가 10~30 개 그리고 30개 이상인 경우, 세 가지로 분류하였다. 절제된 갑상샘 조직은 10%중성 formalin 에 고정한 다음, paraffin 에 포매, 4 μ m 두께로 세절하고, hematoxylin-eosin 염색을 시행하여 현미경으로 관찰하였다. 표준 진단 기준을 적용하여 두 명 이상의 병리의사가 유두암종의 아형을 분류하였고 임상정보와 기타 조직학적 특성을 살펴보았다.

2. 방법

가. 면역조직화학염색: Galectin-3

세침 흡인하여 도말한 세포에서 시행하고 cell block 이 있는 경우는 이를 사용한다. 파라핀으로 제작된 세포 블록을 5 μ m 두께로 박절하여 Silane coated slide 위에 조직절편을 부착시킨 후 60°C 오븐에서 1시간 건조시켰다. 자일렌(Xylene)에서 탈 파라핀 과정과 고농도 알코올에서 저농도 알코올, 증류수까지의 흡수과정을 거치고, 항원 부활처리를 위해 0.4% Pepsin을 실온에서 10분간 처리하였다. 슬라이드는 내인성 과산화효소 활성도를 저지하기 위해 3% H₂O₂로 15분간 처리하고, Tris-Buffered Saline(TBS)에 5분간 세척 후 1차 항체인 Galectin-3 antibody (Novocastra, England)를 실온에서 2시간 처리하였다. 일차항체 처리가 끝난

슬라이드는 TBS로 세척한 후 이차 항체 (EnVision Detectin System; peroxidase-conjugated polymer, DAKO, Denmark) 로 실온에서 30분간 반응시키고, TBS로 세척한 후 발색하였다. 세포 블록이 없는 경우 도말 슬라이드는 자일렌에 담귀 커버슬라이드를 분리 시킨 후 탈 파라핀 과정을 제외한 동일 과정을 거쳤다. 대조 염색은 Harris Hematoxylin으로 시행하고, 탈색과 현 색 과정을 거친 후 탈수, 투명, 봉입과정을 거쳐 현미경으로 검경하였다. 결과의 평가는 이형성을 보이는 소포세포의 세포질에 염색된 경우에 양성으로 평가하고, 대식세포를 내부 양성 대조군으로 하였다.

나. DNA 검출 및 BRAF T1799A 확인

(1) DNA extraction of cytologic specimen

세침으로 흡인하여 도말한 슬라이드에서 이형성 세포가 있는 부위의 슬라이드 바닥면에 다이아몬드 펜슬(diamond pencil)로 표시한다. 자일렌을 이용하여 커버글라스를 제거하고 단계별 알코올에 수화후 증류수에 2분간 담근다. 단계별 알코올에 수화후 다시 dH₂O에 1분간 담근다. 공기에 완전히 마르게 한 다음 다이아몬드 날로 표시한 이형성 세포 부위를 면도칼(razor blade)로 긁어내고 소형관에 담는다. QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Chatsworth, CA) 을 이용하여 안내서에 따라 DNA 를 추출하고 PCR 을 시행하였다. 그 중 일부는 Spectrophotometer(NanoDrop)에서 DNA량을 측정하여 그 양이 PCR을 하는데 적당한지를 알아보았다.

(2) Polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length

polymorphism (RFLP) analysis of BRAF^{V600E} mutation PCR은 추출한 DNA 와 5 U Taq polymerase, 각 0.25 mM dNTP, 20 pmole of primers, 10X Ex Taq buffer 로 조성하여

총량을 50 μ l로 하였다. 이때 추출한 genomic DNA 양은 100 ng/ μ l에 맞추었고, 양이 적은 경우에는 농도 조절 없이 총량에 맞추었다. Exon 15 의 BRAF 유전자를 확인하기 위해서 primer 를 고안하였는데, 이것은 증폭 산물에 Bsp EI restriction site 를 만들기 위한 것으로 두개의 불일치 염기를 포함한다; Forward primer 5 ' ATA GGT GAT TTT GGT CTA GCT CCG G 3', Reverse primer 5 ' GAT TTT TGT GAA TAC TGG GAA CT 3' (그림 1). PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C 10분 후, 94 $^{\circ}$ C 30초, 45 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 30초의 순환을 40 회 반복하고 72 $^{\circ}$ C 10 분 으로 하였다. 증폭 산물은 MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN) 을 이용하여 정제하고 10unit 의 Bsp EI (Takara, Tokyo, Japan) 를 2시간 정도 반응 시켜 mutant DNA 를 절단한다. 결과물은 4 % agarose gel 과 TAE buffer 를 이용하여 전기 영동을 시행하고 ethidium bromide 로 1시간 정도 염색한다. 염색된 gel 은 ultraviolet light transilluminator 를 이용하여 사진으로 남긴다. 양성 대조군은 이형접합 BRAF^{V600E} 돌연변이 (heterozygous BRAF^{V600E} mutation)를 갖는 사람 갑상샘 유두암종 배양 세포계 (human papillary thyroid carcinoma cell line)인 HT29 과 ARO 를 사용하였고 음성 대조군은 야생형의 사람 갑상샘 유두암종 배양 세포계인 DLD-1 을 사용하였다 (그림 2).

그림 1. Polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism

(PCR-RFLP) 를 통한 BRAF^{V600E} 돌연변이의 확인과정.

Wild type	FNAB	Mutant type
5' — ATA—GCTACAGTG—3'	Genome DNA	5' — ATA—GCTACAGAG—3'
5' — ATA— GCT <u>CCG</u> G-3'	PCR 5' primer	5' —ATA— GCT <u>CCG</u> G—3'
5' —ATA—GCTCCGGTG—3' 3' —TAT—CGAGGCCAC—5'	PCR	5' —ATA—GCTCCGGAG—3' 3' —TAT—CGAGGCCTC—5'
5' — ATA—GCTCCGGTG—3' 3' —TAT—CGAGGCCAC—5'	Cut with Bsp E1	5' —ATA—GCT▼CCGGAG—3' 3' —TAT—CGAGGCC▲TC—5'
Product size : 210 bp		Digested products size : 189 bp

FNAB 슬라이드에서 얻은 세포에서 추출한 DNA 를 mismatched forward primer 를 이용하여 PCR로 증폭시키고, 그 증폭 산물을 Bsp E1 제한 효소들과 충분히 반응시킨 다음, 4% agarose gel 에서 전기영동을 시행한다. ▼는 제한효소에 의해 절단되는 BRAF^{V600E} 돌연변이 부위이고, 밑줄 그은 염기는 PCR primer 의 인위로 조작된 부분이다.

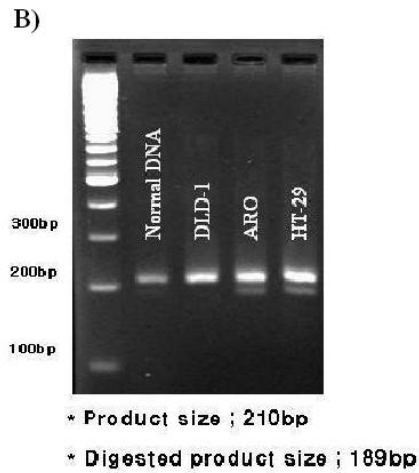
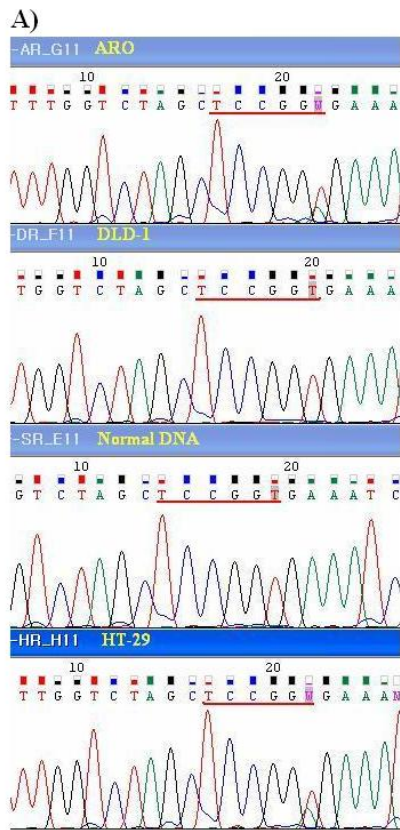


그림 2. 배양 세포계 양성 대조군의 확인. ARO, HT-29: human papillary carcinoma cell line, heterozygous BRAFV600E mutation, DLD-1: human papillary carcinoma cell line, wild type. A) 대조군의 PCR product 의 sequencing 결과. B) PCR-RFLP (Bsp E1) 후 4% agarose gel 에서 전기영동 시행한 결과.

다. 결과 분석

BRAF mutation 과 galectin-3 의 악성 종양에 대한 민감도, 특이도, 정확도, 양성 예측율, 음성예측율과 조직학적 빈도 등에 대한 기술 통계와 카이제곱 통계량을 이용한 교차분석을 시행하였고, 분석에는 SPSS 13.0 program (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 을 이용하였다.

III. 결과

조직으로 확인된 44예의 유두암종은 전형적인 유두암 (conventional papillary carcinoma) 40예, 여포성 아형 (follicular variant) 2예, 소공질-상실양 아형 (cribriform morular variant) 1예, 미만성 경화성 (diffuse sclerosing variant) 1예로 최종 진단되었다. 대상 환자의 평균 나이는 44.7세로 22세부터 71세까지의 넓은 분포를 보였고, 남녀 비율은 5:39였다. 종양의 평균 크기는 14.7 mm였고, 다발성으로 존재하는 경우가 13예 (29.5%), 주변 조직으로의 침윤이 있는 경우가 25예 (56.8%), 림프절 전이가 있는 경우가 23예 (52.3%) 였다(표 1).

표 1. 유두암종 대상환자의 임상 정보 및 조직학적 특성.

Range of age	22~71yr (M ¹ :44.7yr)
Sex (Male: Female)	5:39
Variant of PTC	cPTC 40 (90%)
	fvPTC 2 (4.4%)
	dsPTC 1 (2.3%)
	cmPTC 1 (2.3%)
Average size of tumor	14.7 mm
Multiplicity	13/44 (29.5%)
Perithyroidal soft tissue extension	25/44 (56.8%)
Lymph node metastasis	23/44 (52.3%)

1: mean age, PTC: papillary thyroid carcinoma, cPTC: conventional papillary thyroid carcinoma, fvPTC: follicular variant papillary thyroid carcinoma, dsPTC: diffuse sclerosing variant papillary thyroid carcinoma, cmPTC: cribriform morular variant papillary thyroid carcinoma

Galectin-3 면역조직화학검사 결과는 유두암종 44예 모두 (100%) 에서 양성 반응을 보였고, 양성질환 4예중 여포 종양 1예와 선종성 증식 1예, 총 2예 (50%)에서 양성이었다 (표 2).

표 2. 면역조직화학 검사를 통한 Galectin-3 발현정도.

Histologic diagnosis	Galectin-3	
	Positive (%)	Negative (%)
cPTC: 40	40 (100)	0
fvPTC: 2	2 (100)	0
dsPTC: 1	1 (100)	0
cmPTC: 1	1 (100)	0
Benign: 4	2 (50)	2(50)

Galectin-3 염색 결과 악성종양으로 진단 받은 44예 전체와 양성종양 4예중 2예에서 양성반응을 보였다.

PCR-RFLP를 통한 BRAF 돌연변이 확인의 결과는 총 44예의 유두암종 중 9예에서 BRAF 돌연변이가 있는 것으로 판명되었고 양성 병변 4예에서는 모두 음성 이었다 (그림 3, 표 3). 이 결과를 바탕으로 Galectin-3 발현 결과와 BRAF 돌연변이 유무를 각각, 또는 조합하여 그 예민도, 특이도, 정확도, 양성 예측율, 음성 예측율을 살펴 보았다. Galectin-3 를 단독으로 시행했을 때 예민도, 특이도, 정확도, 양성 예측율, 음성 예측율은 각각 100, 50, 95.8, 95.6, 100(%) 였고, BRAF 돌연변이를 단독으로 시행하였을 때 그것은 20.4, 100, 27.1, 100, 10.2(%), Galectin-3 와 BRAF 돌연변이를 동시에 시행하였을 때는 100, 100, 100, 100, 100(%) 으로 확인되었다 (표 4)

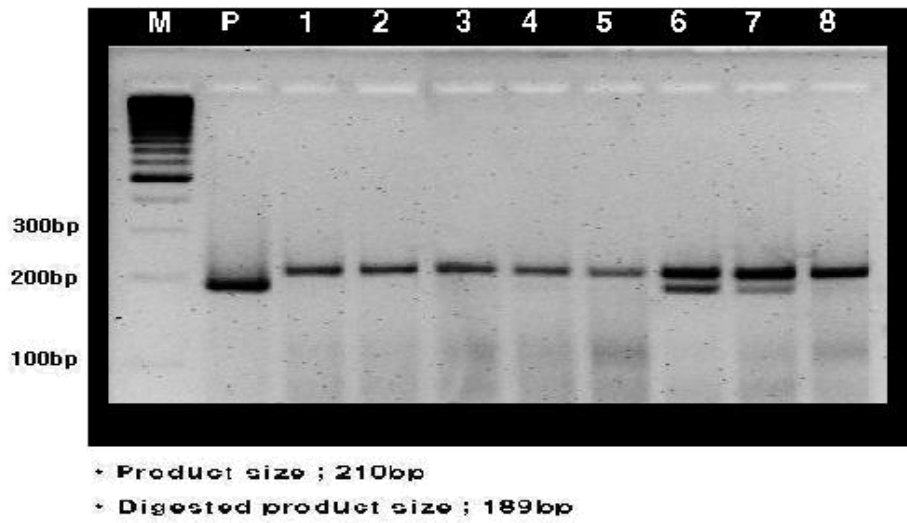


그림 3. BRAF mutation 의 확인. PCR-RFLP (Bsp E1) 후 4% agarose gel 에 서 전기영동 시행한 결과 총 44예의 유두암종중 6번과 7번을 포함한 9예에서 BRAF 돌연변이가 확인되었고 4예의 양성병변에서는 BRAF 돌연변이가 검출 되지 않았다.

표3. FNAB 의 Galectin-3 발현과 BRAF 돌연변이 유무

Category (n)	Galectin-3 (+)		Galectin-3 (-)	
	BRAF (+)	BRAF (-)	BRAF (+)	BRAF (-)
cPTC (40)	8	32	0	0
fvPTC (2)	0	2	0	0
dsPTC (1)	0	1	0	0
cmPTC (1)	1	0	0	0
Benign (4)	0	0	2	2

표 4. Galectin-3 발현과 BRAF 돌연변이 유무의 조합에 따른 통계적 분석

	Sensitivity	Specificity	Accuracy	PPV	NPV
BRAF ^{V600E}	20.4	100	27.1	100	10.2
Gal-3	100	50	95.8	95.6	100
BRAF ^{V600E} and Gal-3	100	100	100	100	100
Gal-3 or BRAF ^{V600E}	100	50	95.8	95.6	100

세포 도말 슬라이드의 세포 밀도에 따른 분류를 살펴보면, 5~10개의 세포로 구성된 군집의 수가 10개 이하인 경우는 유두암종으로 확인된 총 44예중 20예가 속하였고, 군집의 수가 10~30 개인 경우는 18예, 군집의 수가 30개 이상인 경우는 6예였다. 각 각에서 BRAF 돌연변이의 양성률은 각각 15% (3예), 22.2%(4예), 33.3%(2예) 로 세포 밀도가 증가할수록 BRAF 돌연변이의 빈도가 증가하는 경향을 보였다.

BRAF 돌연변이의 유무를 유두암종의 아형에 따라 비교해 보면 전형적인 유두암은 8 예 (20%), 소공질-상실양 아형은 1예 (100%)에서 BRAF 돌연변이를 갖고 있었고, 미만성 경화성 아형 1예와 여포성 아형 2예는 BRAF 돌연변이가 관찰되지 않았다 (표 5). 다른 조직학적 특성을 BRAF 돌연변이 유무로 분류해 비교해 보면, BRAF 돌연변이가 있는 경우의 평균 종양 크기는 19.8mm, 없는 경우의 평균은 13.9 mm 였다. 다 결절을 보이는 것은 양성인 경우가 3예 (33.3%), 음성인 경우가 12예 (38.7%), 주변 조직으로의 침윤을 보이는 것은 BRAF 돌연변이가 있는 경우가 4예 (44.4%), 없는 경우가 20예 (64.5%) 였다. 림프절 전이는 BRAF 돌연변이가 존재하는 경우 4예 (44.4%) 에서, BRAF 돌연변이 없는 경우 18예 (58%)에서 관찰되었다 (표 6). BRAF 돌연변이 유무에 따라 조직학적 특징의 차이가 있는지를 교차 분석한 결과 각 항목 모두에서 유의한 상관 관계는 없는 것으로 확인되었다.

표 5. 유두암종 아형에 따른 BRAF 돌연변이 유무의 비교.

Histologic type	BRAF mutation	
	Positive	Negative
cPTC	8 (20%)	32 (80%)
fvPTC	0 (0%)	2 (100%)
dsPTC	0 (0%)	1 (100%)
cmPTC	1 (100%)	0 (0%)
Total No.	9 (20.4%)	35 (79.6%)

표 6. BRAF 돌연변이 유무와 유두암종 조직학적 특성의 비교

	BRAF mutation	
	Positive	Negative
Average size (mm)	19.8	13.9
Multiplicity	3 (33.3%)	12 (38.7%)
Perithyroidal soft tissue extension	4 (44.4%)	20 (64.5%)
Lymph node metastasis	4 (44.4%)	18 (58%)
Total	9	35

IV. 고찰

세침 흡인 세포 검사에서 유두암종이 의심되는 경우 Galectin-3 면역조직화학 검사는 민감도는 높으나 특이도는 낮은 반면, BRAF 돌연변이 검사는 민감도는 낮으나 특이도는 높은 것을 알 수 있었다. 또한 두 검사를 조합한 결과는 민감도와 특이도가 현저히 증가함을 확인하였다.

세침 흡인 세포 검사에서 유두암종이 의심되고, 조직으로 유두암종이 확인된 44예에서 미세침 흡인 도말 세포의 Galectin-3 면역조직화학 검사는 100% 양성 결과를 보였고, BRAF 돌연변이는 20.9%에서 확인되었다. 세침 흡인 세포 검사에서는 유두암종이 의심되었으나 조직에서 양성 병변임이 확인된 4예에서는 galectin-3가 50%에서 양성하였고 BRAF 돌연변이는 전예에서 관찰되지 않았다.

Galectin-3는 세포 사멸의 억제와 관련된 단백질로 이미 많은 연구를 통해 악성 종양에서 특이적으로 발현하고 양성 병변에서는 발현하지 않는 것으로 알려져 있으나, 그 특이도는 70~90% 다양하게 보고되어 있다.^{23,24} 본 연구에서도 총 수는 적지만 50%의 위양성 결과를 보여, Galectin-3 결과만으로 양성과 악성을 나누는 것은 무리가 있었다.

BRAF 돌연변이는 외국문헌에서는 약 40%에서 BRAF 돌연변이가 검출되는데 비해,^{10,11} 국내 자료를 분석한 문헌에서는 BRAF 돌연변이가 60%에서 높게는 80%까지 검출되어 다른 지역보다 발생률이 현저히 높은 것으로 보고되어 있지만^{14,16-19} 이런 차이에 대한 분석은 보고된 바가 없었다. 본 연구의 BRAF 돌연변이 양성율은 20.9%로 국내 자료들과 비교하면 낮은 것이었으나, 몇몇 외국의 문헌들은 이와 비슷한 정도의 BRAF 돌연변이 양성율을 보고하였다.¹⁴ 본 연구의 외국문헌과의 차이점은 이미 만들어진 슬라이드에서 세포를 채취했다는 것과 이렇게 채취한 검체량, 즉 세포수가 적었다는 것인데, 이는 임의의 검체가 아닌 유두암종이 의심되는 세침 흡인 세포를 대상으로 했기 때문이다. 국내 연구와 결과의 차이를 보이는 것은 검체의 양이

적었다는 점과 다른 검사 방법을 사용한 점이 함께 영향을 미친 것으로 생각한다.

검체의 채취 방법에 있어서, 슬라이드에서 세포를 채취하는 것은 DNA를 얻는 데에는 문제가 없었으나 세포 군집이 적을수록 BRAF 돌연변이의 검출 빈도가 낮아지는 것을 알 수 있었다. 유두암종이 의심되나 확실히 진단하기에는 양적 또는 질적으로 부족하여 미결정으로 분류된 세침 흡인 세포 도말은 46예중 40예가 이형성을 보이는 세포 수의 부족 때문이고, 6예가 부족한 핵의 특징 때문이었다. 이형성을 보이는 도말 세포의 수는 최소 20개 정도였고, 이를 포함한 모든 예에서 DNA 검출 및 PCR-RFLP 가 가능하였다. 도말 세포의 수가 증가할수록 BRAF 돌연변이의 검출 빈도가 증가하는 것을 확인할 수 있었고, BRAF 돌연변이의 양성률은 5~10개의 세포로 구성된 군집의 수가 10개 미만일 때 15%(3예), 군집의 수가 10개에서 30개 사이일 때 22.2%(4예), 그 이상인 경우가 33.3%(2예)로 나타났다. 슬라이드의 세포를 채취하여 검체로 사용한 보고는 Sapio²⁰ 와 황의 연구¹⁹ 등이 있었지만, 본 연구와는 대상과 방법에 차이가 있었다. 전자의 경우는 대상으로 선정된 슬라이드가 본 연구에서와 같이 진단용으로 제작된 것이 아니라 연구 목적으로 다시 제작된 것이었고 direct sequencing 방법으로 BRAF 돌연변이를 확인하였다. 후자는 세침 흡인검사의 진단과 관계없이 수술한 모든 예를 대상으로 하였고 Pyrosequencing 방법을 이용하였다.

BRAF 돌연변이를 검출하는 방법들 중 본 연구에서 시행한 PCR-RFLP은 간편하고 경제적이며 검출력이 높은 검사 방법이다. 현재 BRAF 돌연변이를 확인하는 방법은 매우 다양하게 소개되어 있는데, 가장 널리 쓰이는 방법은 Direct sequencing 이고, 그 외에도 Pyrosequencing, Melting curve analysis, PCR-RFLP 등이 있다. 미세침 흡인 생검 도말에는 종양 세포 뿐 아니라 정상 소포 세포, 적혈구, 혈관 내피 세포 그리고 간질세포들이 혼재해 있고, 종양 세포도 대부분 이형 접합체(heterozygote)이며, 종양 세포의 일부만이 돌연변이를 갖고 있기 때문에 실제로 돌연변이를 갖는 DNA의 양은 극히 일부에 지나지 않는다. 따라서 돌연변이를 확인하기 위해서는 검출력이 높은 방법 (high resolution technique) 을 사용해야 한다. 돌연변이를 갖는 대립 인자

를 검출 할 수 있는 종양의 최소 용적 비율을 나타내는 검출 한계는 Direct sequencing 이 20%, Pyrosequencing 이 6%, Melting curve analysis 가 10%, PCR-RFLP 는 3% 정도로 각각 보고 된 바 있다.²³⁻²⁵ 이중 PCR-RFLP 는 고가의 장비 없이 간편하게 사용할 수 있으며 검출력이 높아 임상에서 진단 목적으로 사용하기에 가장 적합한 방법 중 하나이다. PCR-RFLP 의 제한 효소 (restriction enzyme) 는 돌연변이형의 대립인자를 절단하거나 야생형의 대립인자를 절단하게 되는데, 후자의 경우에는 효소 반응이 불충분할 때 위양성의 결과를 얻게되는 단점이 있다. 본 연구는 돌연변이형의 대립인자를 절단하는 Bsp E1 enzyme 을 이용하였고 이는 이전에 사용되지 않았던 enzyme 으로서, 이전의 방법들 보다 돌연변이의 검출률이 더 높은 것을 확인하였다.

유두암종의 아형에 따라서는, 소공질-상실양 아형에서 BRAF 돌연변이가 검출되었고, 미만성 경화성 아형과 여포성 아형에서는 BRAF 돌연변이가 검출되지 않았다. 이 같은 결과는 미만성 경화성 아형과 여포성 아형에서 BRAF 돌연변이가 검출되지 않거나 드물게 검출된다는 보고^{25,26}와 일치하는 것이었다. 소공질-상실양 아형의 BRAF 돌연변이에 대한 연구는 지금까지 보고된 것이 없어 비교할 수 없었고, 본 연구에는 포함된 예가 적어서 결론을 내리기는 어렵지만 드물게 발생하는 아형이므로 이 한 예도 의미 있는 것으로 생각하였다.

V. 결론

갑상샘 세침 흡인 세포 검사에서 ‘유두암종 의심’으로 진단받은 경우 BRAF 돌연변이 검사와 galectin-3 면역염색을 동시에 시행하는 것은 진단의 민감도, 특이도 및 정확도를 높일 수 있는 방법이다. BRAF 돌연변이 검사는 슬라이드에 도말 된 세포라도

그 수를 충분히 얻을 수 있다면 진단을 하는데 도움이 될 수 있다. BRAF 돌연변이 검사 방법은 여러 가지가 있으나 PCR-RFLP 법이 가장 경제 효율적인 것으로 생각되며, 세침 흡인 세포 검사라도 그 아형에 따라 다른 결과를 보일 수 있기 때문에 치료 계획을 세우는데 도움이 될 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973–2002. *JAMA* 2006;295(18):2164–7.
2. Leenhardt L, Grosclaude P, Cherie-Challine L. Increased incidence of thyroid carcinoma in France: a true epidemic or thyroid nodule management effects? Report from the French Thyroid Cancer Committee. *Thyroid* 2004;14(12):1056–60.
3. Gharib H, Goellner JR. Fine-needle aspiration biopsy of the thyroid: an appraisal. *Ann Intern Med* 1993;118(4):282–9.
4. Rowe LR, Bentz BG, Bentz JS. Utility of BRAF V600E mutation detection in cytologically indeterminate thyroid nodules. *Cytojournal* 2006;3:10.
5. Takenaka Y, Inohara H, Yoshii T, Oshima K, Nakahara S, Akahani S, Honjo Y, Yamamoto Y, Raz A, Kubo T. Malignant transformation of thyroid follicular cells by galectin-3. *Cancer Lett* 2003;195(1):111–9.
6. Yoshii T, Inohara H, Takenaka Y, Honjo Y, Akahani S, Nomura T, Raz A, Kubo T. Galectin-3 maintains the transformed phenotype of thyroid papillary carcinoma cells. *Int J Oncol* 2001;18(4):787–92.
7. Liu YY, Morreau H, Kievit J, Romijn JA, Carrasco N, Smit JW. Combined immunostaining with galectin-3, fibronectin-1, CITED-1, Hector Battifora mesothelial-1, cytokeratin-19, peroxisome proliferator-activated receptor- γ , and sodium/iodide symporter antibodies for the differential diagnosis of non-medullary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol* 2008;158(3):375–84.
8. Rydlova M, Ludvikova M, Stankova I. Potential diagnostic markers in nodular lesions of the thyroid gland: an immunohistochemical study. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2008;152(1):53–9.
9. Semenov D, Pozharisskii KM, Boriskova ME, Pankova PA, Mukhina MS, Feshchenko NS. [Galectin-3 in diagnosis of thyroid cancer]. *Vopr Onkol* 2008;54(3):321–3.
10. Nikiforova MN, Nikiforov YE. Molecular genetics of thyroid cancer: implications for diagnosis, treatment and prognosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2008;8(1):83–95.
11. Namba H, Nakashima M, Hayashi T, Hayashida N, Maeda S, Rogounovitch TI, Ohtsuru A, Saenko VA, Kanematsu T, Yamashita S. Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *J Clin*

- Endocrinol Metab 2003;88(9):4393-7.
12. Adeniran AJ, Zhu Z, Gandhi M, Steward DL, Fidler JP, Giordano TJ, Biddinger PW, Nikiforov YE. 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.
 13. Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev* 2007;28(7):742-62.
 14. Lee JH, Lee ES, Kim YS. Clinicopathologic significance of BRAF V600E mutation in papillary carcinomas of the thyroid: a meta-analysis. *Cancer* 2007;110(1):38-46.
 15. Liu D, Hu S, Hou P, Jiang D, Condouris S, Xing M. Suppression of BRAF/MEK/MAP kinase pathway restores expression of iodide-metabolizing genes in thyroid cells expressing the V600E BRAF mutant. *Clin Cancer Res* 2007;13(4):1341-9.
 16. Lee JH, Lee ES, Kim YS, Won NH, Chae YS. BRAF mutation and AKAP9 expression in sporadic papillary thyroid carcinomas. *Pathology* 2006;38(3):201-4.
 17. Jo YS, Li S, Song JH, Kwon KH, Lee JC, Rha SY, Lee HJ, Sul JY, Kweon GR, Ro HK and others. Influence of the BRAF V600E mutation on expression of vascular endothelial growth factor in papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(9):3667-70.
 18. 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(5):818-21.
 19. Kim SK, Kim DL, Han HS, Kim WS, Kim SJ, Moon WJ, Oh SY, Hwang TS. Pyrosequencing analysis for detection of a BRAFV600E mutation in an FNAB specimen of thyroid nodules. *Diagn Mol Pathol* 2008;17(2):118-25.
 20. Sapio MR, Guerra A, Posca D, Limone PP, Deandrea M, Motta M, Troncone G, Caleo A, Vallefucio P, Rossi G and others. Combined analysis of galectin-3 and BRAFV600E improves the accuracy of fine-needle aspiration biopsy with cytological findings suspicious for papillary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer* 2007;14(4):1089-97.
 21. Kelman AS, Rathan A, Leibowitz J, Burstein DE, Haber RS. Thyroid cytology and the risk of malignancy in thyroid nodules: importance of nuclear atypia in indeterminate specimens. *Thyroid* 2001;11(3):271-7.
 22. Oertel YC, Oertel JE. Thyroid cytology and histology. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2000;14(4):541-57.

23. Saggiorato E, De Pompa R, Volante M, Cappia S, Arecco F, Dei Tos AP, Orlandi F, Papotti M. Characterization of thyroid 'follicular neoplasms' in fine-needle aspiration cytological specimens using a panel of immunohistochemical markers: a proposal for clinical application. *Endocr Relat Cancer* 2005;12(2):305-17.
24. Prasad ML, Pellegata NS, Huang Y, Nagaraja HN, de la Chapelle A, Kloos RT. Galectin-3, fibronectin-1, CITED-1, HBME1 and cytokeratin-19 immunohistochemistry is useful for the differential diagnosis of thyroid tumors. *Mod Pathol* 2005;18(1):48-57.
25. Sheu SY, Schwertheim S, Worm K, Grabellus F, Schmid KW. Diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma: lack of BRAF mutation but occurrence of RET/PTC rearrangements. *Mod Pathol* 2007;20(7):779-87.
26. Santarpia L, Sherman SI, Marabotti A, Clayman GL, El-Naggar AK. Detection and molecular characterization of a novel BRAF activated domain mutation in follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *Hum Pathol* 2009.

Abstract

Analysis of Galectin-3 and BRAF mutation in cases of cytologically suspicious of papillary thyroid carcinoma

Dokyung Kim

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Soon Won Hong)

Recently, the fine needle aspiration becomes more popular than the past in medical field, because incidental found of thyroid nodule has been increased. Fine needle aspiration, known as the most accurate and cost-effective manner, still have 15 to 30% of chances to be indeterminate cases which are pauci-cellular and showing minor nuclear atypia, but most of are suspicious of papillary thyroid carcinoma.

BRAF mutation was found about 45% of cases of papillary thyroid carcinoma and galectin-3 was expressed by some kind of malignant tumor, helping us to differentiate malignancy from benign lesion. In this paper, we try to analyze usefulness of identification of expression of galectin-3 and mutation of BRAF for diagnosis, in case of suspicious of papillary thyroid carcinoma on cytologic examination.

Subjected cases included 44 cases previously diagnosed with suspicious of papillary thyroid carcinoma on cytologic examination which are confirmed with papillary thyroid carcinoma after tissue examination and 4 benign controls which are composed of 2 cases of follicular neoplasm

and 2 cases of adenomatous hyperplasia, from January 2006 to December 2008. We classify subjected cases into three categories based on their cellularity and also assess clinical and histological findings of cases of papillary thyroid carcinoma and analyze associations of galectin-3 expression and BRAF mutation. PCR-RFLP is used to identify BRAF mutation.

Forty four cases of papillary thyroid carcinoma above mentioned are composed of 40 of conventional type (cPTC), 2 of follicular variant, 1 of diffuse sclerosing type and 1 of cribriform morular type (cmPTC). The expression of Galectin-3 is confirmed by immunohistochemical staining in all 44 cases of papillary thyroid carcinoma, 1 case of follicular neoplasm and 1 case of adenomatous hyperplasia. BRAF mutation was found in 9 cases of papillary thyroid carcinoma (cPTC:8, cmPTC:1). Depending on the cellularity of the FNAB, DNA could be detected from all cases. According to the cellularity, the positive rate of the BRAF mutation is increased.

In conclusion, to assess galectin-3 expression for diagnostic purpose demonstrates high sensitivity but low specificity. Evaluation of the BRAF mutation is expected to be a preoperative diagnostic method because of high specificity and the relationship between the mutation and subtypes of the papillary carcinoma. As shown in this study, cellularity is associated with sensitivity, it is anticipated that sufficient specimen guarantees appropriate sensitivity.

Key words: suspicious cytology, fine needle aspiration, BRAF mutation, galectin-3.