

자궁경부 세포검사에서  
Makorin Ring Finger Protein1  
(MKRN1) 면역세포화학의 유용성

연세대학교 대학원

의 학 과

장 민 영

자궁경부 세포검사에서  
Makorin Ring Finger Protein1  
(MKRN1) 면역세포화학의 유용성

지도교수 김 재 훈

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2014 년 6 월

연세대학교 대학원

의 학 과

장 민 영

장민영의 석사 학위논문을 인준함

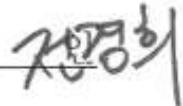
심사위원 김 재 훈



심사위원 김 성 훈



심사위원 전 경 희



연세대학교 대학원

2014 년 6 월

## 감사의 글

먼저 이렇게 논문을 마무리할 수 있도록 지도해주신 김재훈 교수님께 진심으로 감사 드립니다. 늘 어린아이와 같이 투정을 부리는 저로 하여금 제 능력 이상의 것을 할 수 있도록 이끌어 주시고 정신적인 버팀목이 되어주신 점에 대해서 어떤 방법으로도 제 마음을 다 표현할 길이 없습니다. 늘 부모님과 같이 생각해 왔고 앞으로도 그럴 것이며 부끄럽지 않은 제자가 되도록 노력하며 살겠습니다. 교수님의 제자가 된 것에 대해 늘 자랑스럽게 느끼고 있으며 저에게는 가장 큰 행운이었다고 생각합니다. 이 부족한 논문을 심사하시고 귀중한 조언을 아끼지 않으신 김성훈, 전경희 교수님께도 감사 드리며 늘 곁에서 작은 부분까지도 챙겨주신 채두병, 조한별 교수님께도 이 기회를 빌어서 감사한 마음 전합니다. 세계에서 2번째로 큰 나라인 캐나다에서 우연히 두 분을 마주치게 된 것은 제 인생의 중요한 기회였다고 생각하고 저를 알아봐 주신 두 교수님께 진심으로 감사 드립니다. 제가 하는 일에 대해서는 100%의 신뢰와 적극적인 지원을 아끼지 않은 저를 제외한 나머지 19명의 우리 가족들 너무 고맙고 가족과 다름없는 내과 분국 식구들 영미언니, 지수, 지현이 모두 제가 무사히 산부인과 전문의가 될 수 있도록 큰 도움을 주어서 진심으로 고맙습니다. 다시 한번 감사의 마음을 전하며 위의 모든 분들께 이 논문을 바칩니다.

2014년 6월  
장민영

## <차례>

국문 요약	1
I. 서론	4
II. 재료 및 방법	7
1. Study population	7
2. Liquid-based cervical cytology	8
3. Human papillomavirus testing	8
4. Histology	9
5. Cell block preparation	9
6. MKRN1 immunocytochemistry	10
7. p16 <sup>INK4a</sup> immunocytochemistry	11
8. Statistical analysis	11
III. 결과	12
1. Cytology and histologic results	12
2. Cytology, HPV, MKRN1 and p16 <sup>INK4a</sup> positivity in histologic categories	13
3. Clinical performance of cytology, HPV testing, MKRN1, and p16 <sup>INK4a</sup> immunostaining to detect CIN2+	15
IV. 고찰	19
V. 결론	23
참고문헌	24
ABSTRACT	27

## 그림 차례

- 그림 1. HSIL 환자에서 관찰된 MKRN1 면역염색 양성소견과 cytology 음성 환자에서의 MKRN1 면역염색 음성소견 ..... 10

## 표 차례

- 표 1. Liquid-based cervical cytology와 histologic result의 비교 ..... 13
- 표 2. Histologic category에 따른 cytology, HPV test, MKRN1, p16<sup>INK4a</sup>의 양성률 비교 ..... 14
- 표 3. 전체환자 군에서 CIN2+에 대한 cytology, HPV test, MKRN1과 p16<sup>INK4a</sup> 면역염색법의 진단 정확도 비교 ..... 17
- 표 4. ASCUS/LSIL 군에서 CIN2+에 대한 cytology, HPV test, MKRN1과 p16<sup>INK4a</sup> 면역염색법의 진단 정확도 비교 ..... 18

## 국문요약

# 자궁경부 세포검사에서 Makorin Ring Finger Protein1 (MKRN1) 면역세포화학의 유용성

## 목적

MKRN1이 자궁경부 병변에서 면역반응성이 증가하는지 확인하고 MKRN1 면역염색이 자궁경부암 진단의 정확도를 높이는데 유용한 검사법인지 확인하기 위하여 본 연구를 시행하였다.

## 방법

2013년 6월 강남세브란스병원 임상시험심사위원회의 승인을 받은 이후 2013년 7월부터 전향적으로 검체수집을 하였다. 자궁경부 액상 세포검사 (cytology)와 인유두종 바이러스검사 (HPV test)를 시행하고 남은 cytology 검체를 이용하여 세포블록을 제작한 뒤 MKRN1과 p16<sup>INK4a</sup> 면역염색을 시행하였다. 4가지 검사 결과는 최종 조직검사 결과와 비교하였다. 각 검사법의 CIN2 이상 (CIN2+)의 병변을 진단하는데 있어 진단 정확도를 비교하기 위해 민감도, 특이도, 양성예측도, 음성예측도, 정확도를 계산하였고 ASCUS/LSIL군만 따로 케이스 선택하여 같은 분석을 반복 시행 하였다.

## 결과

연구에 등록된 환자는 189명 이었으나 2개의 검체에서 자궁경부 세포가 관찰 되지 않아 최종 분석에서 제외하였다.

전체 환자 187명 중 비정상 cytology를 보인 환자는 140명 (74.9%), 정상 cytology를 보인 여성은 47명 (25.1%) 이었다.

Cytology와 HPV test는 각각 CIN1에서 78.9%, 86.8%, CIN2에서 90.6%, CIN3/CIS에서 93.6%, 97.9%, cancer에서 92.9%의 양성률을 보였고 MKRN1과 p16<sup>INK4a</sup>는 각각 CIN1에서 31.6%, 60.5%, CIN2에서 62.5%, 65.6%, CIN3/CIS에서 74.5%, 76.6%, invasive cancer에서 92.9%, 85.7%로 중증도에 비례해서 증가하는 양상을 보였다. MKRN1의 CIN2+를 진단하는데 있어 민감도, 특이도, 양성예측도, 음성예측도, 정확도는 각각 73.1%, 74.5%, 73.9%, 73.7%, 73.8%였다. 그러나 cytology와 HPV test는 민감도면에서는 각각 92.5%, 94.6%로 MKRN1보다 높았으나 특이도가 42.6%, 54.3%로 낮았다. p16<sup>INK4a</sup>의 민감도, 특이도, 정확도는 74.2%, 53.2%, 63.6%로 4가지 검사 방법 중 정확도가 가장 낮았다.

두 가지 검사를 조합하여 보았을 때, cytology+HPV는 90.3%의 민감도를 보였으나 특이도가 66%로 가장 낮았던 반면 MKRN1+HPV는 민감도는 68.8%였으나 특이도가 87.2%로 가장 높았고 두 조합의 진단의 정확도는 같았다 (78.1%).

ASCUS/LSIL의 경우에는 HPV+MKRN1가 민감도 60.0%, 특이도 81.3%로 가장 정확도가 높았다 (73.1%).



## 결론

MKRN1은 cytology, HPV test보다 민감도는 낮았으나 특이도가 높았다. 그리고 두 가지 검사를 조합하였을 경우 HPV+MKRN1은 ASCUS/LSIL군에서 cytology+HPV보다 진단의 정확도가 더 높았고 전체 환자군에서는 정확도가 같았다. 따라서 MKRN1 면역염색은 특이도가 낮은 cytology 또는 HPV 검사의 단점을 보완하여 자궁경부암 진단의 정확도를 높이는데 보조적인 검사로 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

---

핵심되는 말 : MKRN1, 자궁경부 액상세포검사, 인유두종 바이러스검사, 면역세포화학

자궁경부 세포검사에서  
Makorin Ring Finger Protein1 (MKRN1)  
면역세포화학의 유용성

<지도교수 김재훈>

연세대학교 대학원 의학과

장 민 영

## I. 서론

자궁경부 세포검사는 자궁경부암의 발병률을 감소시키는데 상당히 기여하였지만 재현성에 대한 제한 때문에 세포검사 단독으로는 자궁경부 상피내암 (cervical intraepithelial neoplasia, CIN)을 진단하는데 있어서 정확도가 감소하는 단점이 있다. 따라서 자궁경부암은 사실상 인유두종바이러스 (Human papilloma virus, HPV) 감염에 의해 발생한다는 점에 근거하여 자궁경부암 선별검사의 정확도를 향상시키기 위해 새로운 molecular assay를 발전시키기 시작하였다.<sup>1</sup>

특히 최근의 연구에서 고등급의 CIN을 발견하는데 자궁경부 세포검사보다 HPV DNA를 검사하는 것이 민감도가 더 높았음을 보여주었을 뿐만 아니라 인유두종 바이러스 검사 (HPV test)를 기본으로 한 자궁경부암 선별검사를 시행하였을 경우 사라지지 않는 고등급의 CIN을

더 조기에 발견하여 침윤성 자궁경부암을 예방하는데 더 효과적이었음을 알아내었다.<sup>2,3</sup> 그러나 HPV 감염은 매우 흔하고 대부분이 1~2년 후에 자연적으로 소실되며 HPV DNA 검사는 저절로 소멸될 일시적인 감염을 함께 발견하기 때문에 고등급 CIN에 대한 특이도가 낮다는 단점이 있다.<sup>3</sup>

따라서 많은 연구자들은 세포검사와 HPV 검사의 높은 민감도는 유지하면서 낮은 특이도를 보완함으로써 CIN을 발견하는데 더욱더 효과적인 검사방법을 개발하기 위해 노력하고 있다. 특히 대부분은 암화과정에서 강하게 표현되는 HPV와 관련된 유전자들에 초점을 맞추어 표지자를 개발하고 있고 이는 세포증식과 관련된 Ki-67이나 세포주기를 조절하는 p16<sup>INK4a</sup>이 대표적이다. 이미 여러 연구들에서 p16<sup>INK4a</sup>과 Ki-67은 CIN을 발견하는데 유용한 표지자임을 발표하였으나<sup>1,3-7</sup> p16<sup>INK4a</sup> 면역염색은 내자궁경부세포, 화생세포, 위축된 정상세포에서도 면역반응성이 발현될 수 있어 판독을 할 때 추가적으로 세포형태학적인 평가가 요구되는 제한점이 있다.<sup>8</sup>

Makorin Ring Finger Protein1 (MKRN1)은 transcriptional co-regulator이자 E3 ligase로서 종양억제유전자인 p53과 p21의 negative regulator로 MKRN1이 감소되면 p53과 p21이 활성화되어 성장정지가 유도된다는 연구 결과가 있었다.<sup>9</sup> 2012년 nature communication에 실린 Lee등의 연구에 따르면 MKRN1은 세포사멸 수용체에 의해 활성화되는 외인성 세포사멸에 중추적 역할을 하는 fas-associated protein with death domain (FADD)의 유비퀴틴화를 유도함으로써 FADD 단백질 분해를 촉진하여 암세포 사멸을 방해한다고 알려졌다. 또한 MKRN1과 FADD는 necrosome 형성과 necroptosis를 조절하는데 관여하고 있어 MKRN1을 down

regulation 시켰을 경우 유방암의 종양크기 성장이 심각하게 방해되었음을 확인하였고 이 연구 과정에서 자궁경부암 조직에서 역시 MKRN1의 mRNA level이 정상 조직에 비해 의미 있게 증가 되어있음을 발견하였다.<sup>10</sup>

따라서 본 연구는 자궁경부엑상세포검사 (cytology) 후 남은 검체를 이용하여 MKRN1과 p16<sup>INK4a</sup>에 대한 면역염색을 시행, cytology, HPV test, MKRN1 그리고 p16<sup>INK4a</sup> 4가지 검사방법의 CIN2 이상의 (CIN2+) 진단에 대한 민감도, 특이도, 양성 예측도, 음성 예측도, 정확도를 비교하여 MKRN1 면역염색이 자궁경부암 및 전암병변 진단을 진단하는데 보조적인 검사방법으로 유용하게 이용될 수 있는지 확인하기 위하여 시행하였다.

## II. 재료 및 방법

### Study population

2013년 6월 강남세브란스병원 임상시험심사위원회의 승인을 받은 후 2013년 7월부터 2014년 2월까지 전향적으로 검체 수집을 하였다. 연구 대상은 비정상 cervical cytology 소견을 보여 의뢰된 환자 또는 자궁근종이나 선근증과 같이 자궁 경부 이외의 양성질환으로 인해 전자궁절제술을 받기 위해 내원한 환자, 그리고 정기검진을 위해 강남세브란스병원에 내원하여 자궁경부 세포 검사를 시행한 18세 이상의 여성을 대상으로 하였다. 모든 여성을 대상으로 자궁경부역상세포검사 및 인유두종 바이러스 검사 (HPV test)를 시행 하였고 cytology를 시행하고 남은 검체를 이용하여 세포블록을 제작한 뒤 MKRN1과 p16<sup>INK4a</sup>에 대한 면역염색을 시행하였다. 18세 미만이거나 전자궁절제술을 시행한 여성, 임신한 여성, 다른 암으로 진단 받은 적이 있는 여성, 최근 5년간 CIN 또는 침윤성 자궁경부암 (invasive cancer)에 대한 치료를 받은 기왕력이 있는 여성, 기타 면역력이 저하된 만성질환 여성, 연구에 대한 동의를 하지 않은 여성은 본 연구 대상에서 제외 하였다.

총 189명의 환자가 본 연구에 참여하였으며 편치생검이나 전자궁절제술을 통해 얻은 조직검사 결과를 바탕으로 후향적으로 각 검사 방법에 대한 clinical performance를 분석하였다.

## Liquid-based cervical cytology

본 연구에 포함된 모든 여성을 대상으로 cytobrush를 이용하여 자궁경부 액상세포검사 (Thin prep®2000 system; Cytic Corporation, Boxborough, MA, USA)를 시행하였으며 동일한 기관에 소속된 두 명의 병리학 전문의가 2001 Bethesda System에 기초하여 진단 하였다.

1차 의료 기관에서 시행한 cytology 결과와 본 기관에서 시행한 검사 결과가 다른 경우 더 고등급의 결과를 분석에 이용하였다.

## HPV testing

13가지 종류의 고위험군 HPV를 검출하도록 디자인 되어있는 Hybrid Capture 2 assay (HC2) (Digene Corporation, Gaithersburg, MD, USA)를 시행하였으며 결과는 실험 검체의 light emission과 세 개의 control 검체 평균값인 1pg/mL HPV DNA 비로 나타내었다 (예, 1 relative light unit [RLU]은 검체의 HPV DNA가 1 pg/mL임을 의미함). HC2 방법은 단독감염과 다중감염을 구분하지 못하며 HPV type 16, 18만을 분류해 내지 못하므로 추가적으로 Cobas 4800 HPV test (Roche, Pleasanton, CA, USA)를 시행 하였다. HPV type에 대한 결과는 negative, type 16 또는 18, 그리고 other type으로 구분하였으며 HPV 양성 여부는 HC2 결과 양성이거나 16, 18 또는 other type의 HPV가 detection 되었을 경우 양성으로 판단하였다.

## Histology

Cytology상 이상소견을 보였거나 정상 cytology 결과를 보이거나 HPV 고위험군 감염 결과를 보였을 경우 colposcopy 전문가에 의해 편치생검을 시행하였다. CIN1 이하일 경우는 더 이상의 치료 없이 추적관찰을 하였고 모든 CIN 3 이상 (CIN3+)의 환자와 대부분의 CIN2 환자의 경우는 환상투열요법 (loop electrosurgical excision procedure, LEEP) 또는 전자궁절제술의 치료를, 침윤성 자궁경부암이 진단된 경우는 근치적 자궁 절제술을 시행하였다. 만약 편치 생검과 LEEP 또는 자궁절제술의 진단 결과가 다른 경우 가장 고등급의 결과를 분석에 이용하였다.

## Cell block preparation

MKRN1과 p16<sup>INK4a</sup>의 면역 염색을 위하여 cytology를 시행하고 남은 Thin-prep sample을 이용하여 이전의 여러 논문에서 소개된 방법에 따라 세포블록을 제작하였다.<sup>11,12</sup> 간단히 소개하면, 남은 PreservCyt solution을 1500 revolutions per minute (rpm)으로 5분간 원심분리 한 뒤 상층액은 버리고 pellet은 5-8방울의 혈장과 함께 재부유 시켰다. 그리고 2% 염화칼슘 (CaCl<sub>2</sub>)을 첨가해 잘 혼합하여 응고가 될 때까지 약 20분간 둔 후 Clot은 렌즈티슈로 감싼 뒤 조직카세트에 넣고 10% 중성완충포르말린 (neutral buffered formalin)에서 10분간 고정시켰다. 만들어진 Cell block은 우선 400 $\mu$ m로 section한 뒤 hematoxylin and eosin (H&E) 염색을 하여 세포의 형태와 충실도를 확인하였다.

## MKRN1 immunocytochemistry

준비된 세포블록을 다시 400 $\mu$ m로 section하여 MKRN1 발현을 확인하기 위해 Rabbit anti-MKRN1 antibody, affinity purified makorin-1 antibody (Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX, USA)를 이용하여 immunocytochemistry를 시행하였으며 발색은 streptavidin biotin-horseradish peroxidase법을 이용한 UltraVision LP Detection System (Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA) kit를 사용하여 biotin이 부착된 2차 항체를 반응시킨 다음 streptavidin biotin-horseradish peroxidase와 반응 시켰다. 부착된 horseradish peroxidase는 DAB (3,3-Diaminobenzidine) tetrahydrochloride를 이용하여 발색시키며 hematoxylin으로 대조염색 하였다.

MKRN1 발현 여부에 대한 평가는 병리학 전문의가 시행하였으며 핵이 염색 되었을 경우 양성으로 판독하였다 (Fig. 1).

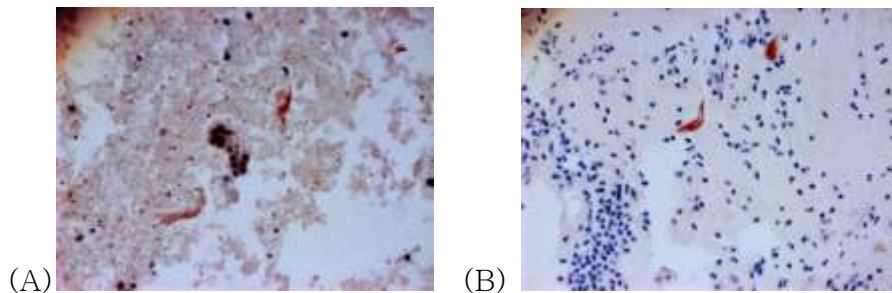


Fig 1. (A) HSIL 환자에서의 MKRN1 면역염색 양성 소견과, (B) 자궁경부 액상세포검사 음성 환자에서의 MKRN1 음성소견.



## p16<sup>INK4a</sup> immunocytochemistry

Section된 cell block에서 p16<sup>INK4a</sup> 발현을 확인하기 위하여 p16-INK4a-specific monoclonal antibody (clone E6H4) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA)와 CINtec p16-INK4a Cytology kit (Dako Cytomation, now Dako A S, Glostrup, Denmark)를 이용하였다. 이어 secondary goat-anti-mouse antibody (Dako)로 30분간 incubation 한 뒤 다시 10분간 DAB (3,3'-diaminobenzidine) tetrahydrochloride (Dako)로 incubation 하고 최종적으로 Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 하였다.

## Statistical analysis

SAS software package (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) version 9.2를 이용하여 cytology, HPV test, MKRN1과 p16<sup>INK4a</sup> 면역염색법 각각의 CIN2+ 진단에 대한 민감도, 특이도, 양성 예측도, 음성예측도를 계산하였고 민감도와 특이도를 이용하여 Receiver Operating Characteristic (ROC) curve를 통해 각 검사법의 정확도를 알아 보았다. 그리고 4가지 검사 방법 중 두 가지를 조합하여 역시 같은 분석을 시행하였으며 cytology 결과상 ASCUS 또는 LSIL 결과를 보인 환자들을 따로 추출하여 같은 분석을 반복하였다. 각 결과는 95% 신뢰구간과 함께 나타내었다.

### III. 결과

#### Cytology and histologic results

Table 1은 cytology 결과와 histology 결과를 비교한 것이다. 총 189명의 환자가 등록 되었으나 2개의 검체에서 자궁경부 세포가 관찰 되지 않아 분석에서 제외되어 최종적으로 187명의 결과를 분석에 이용하였다. 정상 cytology를 보인 여성은 47명 (25.1%), 비정상 cytology 환자는 140명 (74.9%)이었다. Cytology상 음성이었던 47명의 환자 중 조직검사상 8명 (17%)은 CIN1, 3명 (6.4%)은 CIN2, 3명 (6.4%)은 CIN3/Cervical carcinoma in situ (CIS), 1명 (2.1%)은 cancer였다. 비정상 cytology군 140명 중에서 atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS) 또는 atypical glandular cells of undetermined significance (AGUS)를 보인 환자는 22명으로 그 중 5명 (22.7%)은 조직검사상 negative 소견을 보였고 5명 (22.7%)은 CIN1, 4명 (18.2%)은 CIN2, 6명 (27.3%)은 CIN3/CIS, 2명 (9.1%)은 cancer로 나타났다. Low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) 55명의 환자는 17명 (30.9%)이 조직검사상 정상 소견을 보였고 20명 (36.4%)이 CIN1, 12명 (21.8%)이 CIN2, 6명 (10.9%)이 CIN3/CIS 진단을 받았다. Atypical squamous cells, cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion (ASC-H)/High-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) 환자는 57명으로 5명 (8.8%)이 CIN1, 13명 (22.8%)이 CIN2, 31명 (54.4%)이 CIN3/CIS, 6명 (10.5%)이 invasive cancer의 결과를 보였다. Cytology상 6명은 cancer로 보고 되었고 조직검사상에서는 1명 (16.7%)은 CIN3/CIS로, 5명 (83.3%)은 모두 cancer로 나왔다.

Table 1. Liquid-based cervical cytology와 histologic result 비교

Cytology	No.	Histology				
		Negative (%)	CIN1 (%)	CIN2 (%)	CIN3/CIS (%)	Cancer (%)
Negative	47	32 (68.1)	8 (17.0)	3 (6.4)	3 (6.4)	1 (2.1)
ASCUS or AGUS	22	5 (22.7)	5 (22.7)	4 (18.2)	6 (27.3)	2 (9.1)
LSIL	55	17 (30.9)	20 (36.4)	12 (21.8)	6 (10.9)	0
ASC-H/HSIL	57	2 (3.5)	5 (8.8)	13 (22.8)	31 (54.4)	6 (10.5)
Cancer	6	0	0	0	1 (16.7)	5 (83.3)
Total	187	56	38	32	47	14

#### Cytology, HPV, MKRN1 and P16<sup>INK4a</sup> in histologic categories

본 연구에서 자궁경부암 선별검사로서의 역할을 알아보고자 한 4가지의 검사방법이 조직검사 결과 범주로 구분하여 보았을 때 각각 어떤 결과를 보였는지 알아보았으며 Table 2에 나타내었다. Cytology상 reactive cellular change 또는 chronic non-specific inflammation 소견을 보인 경우는 음성으로 간주하였고 ASCUS이상의 소견을 보인 경우만 양성 결과로 생각하였다. 조직검사상에서는 병변이 관찰 되지 않은 환자는 56명 (29.9%)이었고 이 중 24명 (42.9%)의 환자에서 cytology 양성을 보였으며 21명 (37.5%)의 환자에서는 p16<sup>INK4a</sup> 면역염색 결과 양성이었다. HPV test와 MKRN1 면역염색 양성을 보인 여성은 각각 10명 (17.9%), 12명 (21.4%)이었다. CIN1 환자는 38명 (20.3%)으로 cytology, HPV test, p16<sup>INK4a</sup> 각각 30명 (78.9%), 33명 (86.8%), 23명 (60.5%)의 양성률을 보였고 MKRN1은 12명 (31.6%)에서 양성 소견을 보였다.

32명 (17.1%)은 CIN2 진단을 받았는데 cytology와 HPV test의 양성률은 29명 (90.6%)으로 같았고 MKRN1과 p16<sup>INK4a</sup>은 20명 (62.5%), 21명 (65.6%)으로 비슷한 결과를 보였다. CIN3/CIS 환자군 47명 (25.1%)에서는 cytology와 HPV test는 각각 44명 (93.6%), 46명 (97.9%), MKRN1과 p16<sup>INK4a</sup>은 각각 35명 (74.5%), 36명 (76.6%)의 양성 소견을 보였다. Invasive cancer 환자 14명 (7.5%)에서는 cytology, HPV test, MKRN1이 13명 (92.9%)으로 같은 결과를 보였고 p16<sup>INK4a</sup>은 12명 (85.7%)의 양성률을 보였다.

Table 2. Histologic category에 따른 cytology, HPV test, MKRN1, p16<sup>INK4a</sup>의 양성률 비교.

Histology	No.	Cytology+ (%)	HPV				MKRN1+ (%)	P16+ (%)
			HPV+ (%)	HPV - 16 or 18	HPV - others	Unknown		
Negative	56	24 (42.9)	10 (17.9)	2	5	3	12 (21.4)	21 (37.5)
CIN1	38	30 (78.9)	33 (86.8)	5	17	11	12 (31.6)	23 (60.5)
CIN2	32	29 (90.6)	29 (90.6)	12	13	4	20 (62.5)	21 (65.6)
CIN3/CIS	47	44 (93.6)	46 (97.9)	17	20	9	35 (74.5)	36 (76.6)
Cancer	14	13 (92.9)	13 (92.9)	9	2	2	13 (92.9)	12 (85.7)

## Clinical performance of cytology, HPV testing, MKRN1 and p16<sup>INK4a</sup> immunostaining to detect CIN2+

본 연구의 궁극적인 목적인 자궁경부 전암병변을 진단하는데 있어 앞서 소개한 선별검사 4가지 방법에 대한 임상적인 진단의 정확성을 알아보기 위해 민감도, 특이도, 양성 예측도, 음성 예측도 및 정확도를 계산하였으며 검사방법을 두 가지씩 조합해서도 알아보았다 (Table 3). 조직검사 결과 CIN2를 기준으로 질병 양성으로 간주하였고 cytology 결과가 ASCUS 또는 LSIL이었던 환자만을 따로 추출하여 같은 분석을 반복 시행하였다 (Table 4). 먼저 단독검사의 경우 HPV test가 94.6%로 가장 민감도가 높았으나 54.3%의 낮은 특이도를 보였다. 현재 primary screening 방법으로 이용되고 있는 liquid-based cytology의 경우 민감도는 92.5%로 HPV test와 비슷하였으나 특이도가 42.6%로 4가지 검사법 중 가장 낮았다. MKRN1 면역염색은 73.1%의 민감도와 74.5%의 특이도를 보여 민감도는 cytology와 HPV test에 비해 낮았으나 가장 높은 특이도를 보이는 검사법으로 나타났다. p16<sup>INK4a</sup>은 MKRN1과 비슷한 74.2%의 민감도를 보였으나 특이도가 53.2%로 낮았다. 두 가지 검사법을 조합하였을 경우 cytology와 HPV test의 조합 (cytology+ HPV)의 경우 90.3%의 가장 높은 민감도를 보였으나 특이도는 66.0%로 모든 조합의 경우 중 가장 낮은 결과를 보였다. Cytology+ HPV를 제외한 나머지 검사 방법에서는 HPV와 MKRN1을 시행하였을 경우 (HPV+ MKRN1) 특이도가 87.2%로 가장 높았다. Cytology와 MKRN1 (cytology+ MKRN1), HPV와 p16<sup>INK4a</sup> 조합의 경우 (HPV+ p16<sup>INK4a</sup>) 민감도, 특이도가 각각 71.0%, 77.7%로 같은 결과

를 보였다. Cytology와 p16<sup>INK4a</sup> (cytology+p16<sup>INK4a</sup>)의 경우는 특이도가 69.1%로 cytology+HPV 다음으로 가장 낮았고 MKRN1과 p16<sup>INK4a</sup>을 시행하였을 경우 (MKRN1+p16<sup>INK4a</sup>)는 특이도가 80.9%로 HPV+MKRN1 다음으로 높았으나 민감도가 62.4%로 모든 검사방법 중 가장 낮았다. 정확도는 단독검사로서는 74.3%의 HPV test와 73.8%의 MKRN1이 가장 높게 나왔고 두 가지 검사를 시행 하였을 경우는 cytology+HPV와 HPV+MKRN1이 78.1%로 같은 결과를 보였다.

ASCUS 또는 LSIL 환자군에서도 역시 단독 검사법으로는 cytology와 HPV test가 100%로 높은 민감도를 보여주었으나 특이도가 낮았고 MKRN1과 p16<sup>INK4a</sup>은 각각 60.0%, 63.3%의 비슷한 민감도를 보였으나 MKRN1의 경우 특이도가 62.5%로 가장 높았다. 검사를 조합하였을 경우에는 cytology+HPV의 경우 100% 민감도인 반면 특이도가 41.7%로 가장 낮은 결과를 보였고 이에 반하여 HPV+MKRN1의 경우는 81.3%로 특이도가 높았다. 단독검사법의 정확도는 HPV test가 64.1%, MKRN1이 61.5%로 전체 환자군과 같이 가장 높게 나왔고 cytology는 39.7%로 가장 정확도가 낮았다. 두 가지 검사를 시행 하였을 경우는 HPV+MKRN1이 73.1%로 가장 높은 정확도를 보였고 cytology+HPV의 정확도는 64.1%였다.

Table 3. 전체환자 군에서 CIN2+ 에 대한 cytology, HPV test, MKRN1  
 과 p16<sup>INK4a</sup> 면역염색법의 진단 정확도 비교.

Entire study population					
	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	Accuracy
Cytology	92.5 (87.1-97.8)	42.6 (32.6-52.5)	61.4 (53.4-69.5)	85.1 (74.9-95.3)	67.4 (60.2-74.0)
HPV	94.6 (90.0-99.2)	54.3 (44.2-64.3)	67.2 (59.1-75.2)	91.1 (83.6-98.5)	74.3 (67.5-80.4)
MKRN1	73.1 (64.1-82.1)	74.5 (65.7-83.3)	73.9 (64.9-82.9)	73.7 (64.8-82.5)	73.8 (66.9-79.9)
P16	74.2 (65.3-83.1)	53.2 (43.1-63.3)	61.1 (52.1-70.1)	67.6 (56.9-78.2)	63.6 (56.3-70.5)
Cytology + HPV	90.3 (84.3-96.3)	66.0 (56.4-75.5)	72.4 (64.3-80.5)	87.3 (79.6-95.1)	78.1 (71.5-83.8)
Cytology + MKRN1	71.0 (61.7-80.2)	77.7 (69.2-86.1)	75.9 (66.9-84.9)	73.0 (64.3-81.7)	74.3 (67.5-80.4)
Cytology + p16 <sup>INK4a</sup>	73.1 (64.1-82.1)	69.1 (59.8-78.5)	70.1 (61.0-79.2)	72.2 (63.0-81.5)	71.1 (64.1-77.5)
HPV + MKRN1	68.8 (59.4-78.2)	87.2 (80.5-94.0)	84.2 (76.0-92.4)	73.9 (65.7-82.0)	78.1 (71.5-83.8)
HPV + p16 <sup>INK4a</sup>	71.0 (61.7-80.2)	77.7 (69.2-86.1)	75.9 (66.9-84.9)	73.0 (64.3-81.7)	74.3 (67.5-80.4)
MKRN1 + p16 <sup>INK4a</sup>	62.4 (52.5-72.2)	80.9 (72.9-88.8)	76.3 (66.8-85.9)	68.5 (59.8-77.1)	71.7 (64.6-78.0)

Table 4. ASCUS/LSIL 군에서 CIN2+ 에 대한 cytology, HPV test, MKRN1과 p16<sup>INK4a</sup> 면역염색법의 진단 정확도 비교.

	ASCUS/LSIL				
	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	Accuracy
Cytology	100	N.A	39.0 (28.1-49.9)	100	39.7 (28.8-51.5)
HPV	100	41.7 (27.7-55.6)	51.7 (38.9-64.6)	100	64.1 (52.4-74.7)
MKRN1	60.0 (42.7-77.5)	62.5 (48.8-76.2)	50.0 (33.7-66.3)	71.4 (57.8-85.1)	61.5 (49.8-72.3)
P16	63.3 (46.1-80.6)	47.9 (33.8-62.0)	43.2 (28.5-57.8)	67.6 (51.9-83.4)	53.9 (42.2-65.2)
Cytology + HPV	100	41.7 (27.7-55.6)	51.7 (38.9-64.6)	100	64.1 (52.4-74.7)
Cytology + MKRN1	60.0 (42.5-77.5)	62.5 (48.8-76.2)	50.0 (33.7-66.3)	71.4 (57.8-85.1)	61.5 (49.8-72.3)
Cytology + p16 <sup>INK4a</sup>	66.7 (49.8-83.5)	45.8 (31.7-59.9)	43.5 (29.2-57.8)	68.8 (52.7-84.8)	53.9 (42.2-65.2)
HPV + MKRN1	60.0 (42.5-77.5)	81.3 (70.2-92.3)	66.7 (48.9-84.4)	76.5 (64.8-88.1)	73.1 (61.8-82.5)
HPV + p16 <sup>INK4a</sup>	63.3 (46.1-80.6)	72.9 (60.3-85.5)	59.4 (42.4-76.4)	76.1 (63.8-88.4)	69.2 (57.8-79.2)
MKRN1 + p16 <sup>INK4a</sup>	43.3 (25.6-61.1)	70.8 (58.0-83.7)	48.1 (29.3-67.0)	66.7 (53.7-79.6)	60.3 (48.5-71.2)



## 고찰

Cytology와 HPV 검사의 낮은 특이도를 보완하기 위해 새로운 표지자로써 그 동안 p16<sup>INK4a</sup>에 대한 연구가 활발히 진행 되었다. p16<sup>INK4a</sup>은 진단의 특이도를 높이는데 유용하며<sup>6,15,16</sup> 조직검사 결과와 correlation이 잘 되고<sup>17</sup> 기존에 시행되던 cervical cytology와 HPV test를 조합 하였을 때보다 HPV test에 대한 보조검사로 p16<sup>INK4a</sup> 면역염색을 시행하여 과다발현 여부를 보는 것이 더 진단의 정확도가 높았음을 대규모 무작위 연구에서 발표하였다.<sup>3,8</sup> 이와 같이 cytology나 HPV test에 대한 보조검사로써 유용한 표지자를 찾는 연구가 진행되던 중 Lee등의 연구에서 MKRN1의 과발현과 자궁경부암의 상관관계가 in vivo에서 확인되어<sup>10</sup> 본 기관에서 선행연구를 시행한 결과 자궁경부 조직에서의 MKRN1 발현 정도와 종양의 stage나 grade가 비례한다는 것을 알 수 있었고 또한 MKRN1의 발현은 pAKT 발현과는 양의 상관관계를, PTEN의 발현과는 음의 상관관계를 보인다는 것을 확인 하였다 (data not shown).

따라서 본 연구를 시행한 결과 민감도와 특이도를 모두 고려하였을 때 HPV와 MKRN1은 약 74%의 비슷한 정확도를 보여주었으나 cytology는 67.4%로 두 검사법 보다 정확도가 낮았다. 두 가지 검사를 하였을 경우 cytology+HPV, HPV+MKRN1이 78.1%로 같은 정확도를 보였으나 차이점은 cytology+HPV의 경우는 두 검사 방법 모두 특이도가 낮은 공통적인 단점을 가진 검사법으로써 오히려 cytology 또는 HPV 단독으로 시행하였을 경우 92.5%, 94.6%의 더 높은 민감도를 얻을 수 있었고 HPV+MKRN1의 경우는 HPV test의 높은 민감도에 낮은 특이도를 MKRN1이 보완하여 54.3%에서 87.2%

로 특이도를 높여주어 정확도가 가장 높았다는 점은 두 가지 검사를 시행하는데 충분한 이득이 있으며 추가 검사를 시행하는 데 대한 합리적인 근거를 제시하여 주었다.

Cervical cancer screening을 시행하였을 때 가장 치료에 어려움을 겪는 경우가 ASCUS와 LSIL group이다. 이전 연구에서 이와 같은 범주에 드는 환자들은 병변이 소실될 가능성이 높은 집단이므로<sup>17</sup> 경과 관찰만을 할 경우 불필요한 procedure를 피할 수 있다고 발표 하였다. 본 연구 결과에서도 볼 수 있듯이 cytology상 ASCUS 또는 LSIL였던 환자 77명이 실제 조직검사상 CIN1+는 55명 (71.4%), CIN2+는 30명 (39.0%)를 진단받았다는 점은 간과할 수 없는 부분이다. 따라서 자궁경부 병변을 가지고 있을 가능성이 높으며 향후 invasive cancer로 진행할 확률이 높아 적극적인 procedure를 시행 할 경과 관찰을 할 군을 구별해 내는 것이 중요한 과제이며 cytology상 ASCUS 또는 LSIL을 보인 환자만을 선택하여 선별검사들의 clinical performance를 다시 알아 보았다. 결과는 전체 환자를 대상으로 하였을 때와 같은 경향을 보였고 특히 cytology+ HPV와 비교하여 HPV+ MKRN1의 특이도는 약 2배 높았으며 (41.7% Vs. 81.3%) 정확도는 HPV+ MKRN1이 76.5%로 가장 높았다.

HPV 감염에 대한 역학 조사를 보면 성생활이 활발한 35세 미만에서 감염률이 더 높게 나타나지만 이들 대부분은 자연 소실되는 경과를 보인다는 것을 알 수 있다.<sup>18,19</sup> 이들 젊은 연령군에서는 향후 출산을 계획하는 여성이 많으므로 자궁경부 시술로 인한 조산이나 자궁경부 근무력증과 (IIOC) 같은 산과적 morbidity 증가의 가능성이 그들에게는 매우 중요한 문제가 될 수 있고 cytology상 ASCUS나 LSIL 또는 HPV에 감염이 되었다는 검사 결과가 미혼의 여성에게 psychological stress 요인이 될 수 있어 reassurance 후 경과관찰을

할 지 적극적인 검사와 치료를 통해 invasive cancer로의 진행을 막아야 할 지 주치의의 결정이 중요하다. 이와 같은 이유로 본 연구결과에서 보인 ASCUS/LSIL군에서의 HPV+ MKRN1의 탁월한 특이도는 굉장히 의미 있으며 주목 할만 하다.

또한 2006년에는 Gardasil® (Sanofi Pasteur MSD)이, 2009년에는 Cervarix® (GlaxoSmithKline)가 FDA 승인된 이후 미국에서 자궁경부암 예방을 위한 접종을 시작한 이후 약 8년이 지난 지금 백신 접종률이 높아져 HPV type 16, 18 감염에 대한 예방효과의 결과로 invasive cancer 또는 머지않아 invasive cancer로 이행될 고등급의 CIN 환자들의 비율이 줄어들 것으로 예상되어 cytology의 경우 더욱 양성예측도가 떨어질 것으로 생각된다. 따라서 primary cervical cancer screening의 policy가 점차 cytology에서 HPV DNA test로 shift 되고 있으나 이는 앞에서 기술한 바와 같이 낮은 특이도로 인한 제한점이 있어 본 연구 결과에서 밝힌 보조적인 검사로서 MKRN1의 역할이 필요할 것으로 생각된다.

Cytology는 주관적인 검사방법이므로 시술자의 기술이나 경력에 따라 unsatisfactory의 결과를 얻는 비율이 높아지기도 하고 병리과 의사가 판독할 시 많은 정상세포들 사이에 존재하는 비정형세포를 유심히 찾아 보아야 진단을 할 수 있으므로 주의를 기울이지 않는다면 관찰한 슬라이드의 위치에서 비정상세포를 놓칠 가능성이 있다. 또한 ASCUS부터 HSIL까지의 cytologic category의 진단에 대한 intra-observer 또는 inter-observer간의 discrepancy가 있을 수 있어 Fahey등이 pap test의 accuracy를 알아보기 위해 62개 논문에 대한 systemic review를 시행해본 결과 민감도가 11-99%, 특이도가 14-97%로 확인되어 variation이 큼을 알 수 있었다.<sup>20</sup> 이에 비해 HPV test는 자동화된 방법으로 시행하는 객관적인 검사방법이므로

높은 민감도 이외에도 결과에 대한 논쟁의 여지가 적기 때문에 medico-legal claim을 줄일 수 있다는 장점도 있다.

본 연구는 invasive cervical cancer/CIN 진단의 표지자로서 MKRN1의 기능과 이점에 대해서 처음으로 발표한 연구이다. 또한 연구가 계획된 이후 전향적으로 검체수집을 하여 치료 guideline에 따라 management를 한 뒤 조직검사 결과를 바탕으로 후향적으로 데이터를 분석하였으므로 selection bias에 대해 자유로울 수 있었다.

본 연구에서 cytology와 HPV의 낮은 특이도를 보완해 줄 수 있는 효율적인 검사 방법으로 선택된 MKRN1 면역염색법은 liquid-based cytology 또는 cobas HPV test 후 남은 검체를 이용하여 시행하는 것이므로 환자에게 부인과 검사에 대한 추가적인 번거로움과 불편감, 두려움을 주지 않는다는 장점이 있으며 특히 불필요한 colposcopically directed biopsy 및 refer rate를 줄일 수 있어 의료비용의 절감을 기대할 수 있고 screening interval을 안전하게 연장시켜 줄 수 있을 것으로 생각된다.

향후 연구에서는 age category에 따른 study population의 세분화를 통해 각 검사 별 clinical performance를 분석하여 HPV+ MKRN1이 특히 어느 연령대의 여성에게 더 유익한지 알아보고 선별검사시 MKRN1 양성이었던 군과 음성이었던 군을 구분하여 추적검사를 실시하였을 경우 고등급 CIN으로의 이행률에 대한 차이를 보이는지 추가 분석이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

## V. 결론

결론적으로 현재까지 알려진 자궁경부암 선별검사들과 MKRN1 면역염색의 진단 정확도를 비교해 본 결과 cytology+ HPV와 HPV+ MKRN1의 정확도는 같았으나 HPV+ MKRN1의 경우 HPV 검사의 높은 민감도와 MKRN1의 높은 특이도를 이용하여 서로의 단점을 보완할 수 있는 이상적인 조합임을 알 수 있었고 ASCUS/LSIL군에서도 HPV+ MKRN1이 CIN2+ 진단에 대한 정확도가 가장 높았다.

따라서 cytology 또는 HPV test 시행 후 남은 검체를 이용하여 시행하는 MKRN1 면역염색은 cervical cancer screening에서 유용한 보조적인 검사법으로 이용 될 수 있을 것으로 기대된다.

## 참고문헌

1. Wentzensen N, Schwartz L, Zuna RE, Smith K, Mathews C, Gold MA, et al. Performance of p16/Ki-67 immunostaining to detect cervical cancer precursors in a colposcopy referral population. *Clin Cancer Res* 2012;18:4154-62.
2. Cuzick J, Clavel C, Petry KU, Meijer CJ, Hoyer H, Ratnam S, et al. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer* 2006;119:1095-101.
3. Carozzi F, Gillio-Tos A, Confortini M, Del Mistro A, Sani C, De Marco L, et al. Risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia during follow-up in HPV-positive women according to baseline p16-INK4A results: a prospective analysis of a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2013;14:168-76.
4. Shidham VB, Mehrotra R, Varsegi G, D'Amore KL, Hunt B, Narayan R. p16 immunocytochemistry on cell blocks as an adjunct to cervical cytology: Potential reflex testing on specially prepared cell blocks from residual liquid-based cytology specimens. *Cytojournal* 2011;8:1.
5. Waldstrom M, Christensen RK, Ornskov D. Evaluation of p16(INK4a)/Ki-67 dual stain in comparison with an mRNA human papillomavirus test on liquid-based cytology samples with low-grade squamous intraepithelial lesion. *Cancer Cytopathol* 2013;121:136-45.
6. Yoshida T, Fukuda T, Sano T, Kanuma T, Owada N, Nakajima T. Usefulness of liquid-based cytology specimens for the immunocytochemical study of p16 expression and human papillomavirus testing: a comparative study using simultaneously sampled histology materials. *Cancer* 2004;102:100-8.
7. Genoves J, Alameda F, Mancebo G, Sole JM, Bellosillo B, Lloveras B, et al. Human papillomavirus detection and p16(INK4a) expression in cervical lesions: a comparative study. *Hum Pathol* 2014;45:826-33.
8. Carozzi F, Confortini M, Dalla Palma P, Del Mistro A, Gillio-Tos A, De Marco L, et al. Use of p16-INK4A overexpression to increase the specificity of human papillomavirus testing: a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2008;9:937-45.
9. Lee EW, Lee MS, Camus S, Ghim J, Yang MR, Oh W, et al.

- Differential regulation of p53 and p21 by MKRN1 E3 ligase controls cell cycle arrest and apoptosis. *Embo j* 2009;28:2100–13.
10. Lee EW, Kim JH, Ahn YH, Seo J, Ko A, Jeong M, et al. Ubiquitination and degradation of the FADD adaptor protein regulate death receptor-mediated apoptosis and necroptosis. *Nat Commun* 2012;3:978.
  11. Varsegi GM, Shidham V. Cell block preparation from cytology specimen with predominance of individually scattered cells. *J Vis Exp* 2009.
  12. Yu L, Wang L, Zhong J, Chen S. Diagnostic value of p16INK4A, Ki-67, and human papillomavirus L1 capsid protein immunochemical staining on cell blocks from residual liquid-based gynecologic cytology specimens. *Cancer Cytopathol* 2010;118:47–55.
  13. Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, Confortini M, Dalla Palma P, Del Mistro A, et al. Results at recruitment from a randomized controlled trial comparing human papillomavirus testing alone with conventional cytology as the primary cervical cancer screening test. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:492–501.
  14. Kitchener HC, Almonte M, Gilham C, Dowie R, Stoykova B, Sargent A, et al. ARTISTIC: a randomised trial of human papillomavirus (HPV) testing in primary cervical screening. *Health Technol Assess* 2009;13:1–150, iii–iv.
  15. Gustinucci D, Passamonti B, Cesarini E, Butera D, Palmieri EA, Bulletti S, et al. Role of p16(INK4a) cytology testing as an adjunct to enhance the diagnostic specificity and accuracy in human papillomavirus-positive women within an organized cervical cancer screening program. *Acta Cytol* 2012;56:506–14.
  16. Walts AE, Bose S. P16/Ki-67 Immunostaining is Useful in Stratification of Atypical Metaplastic Epithelium of the Cervix. *Clin Med Pathol* 2008;1:35–42.
  17. Lukic A, Sbenaglia G, Carico E, M DIP, Giarnieri E, Frega A, et al. Prediction of clinical outcome using p16INK4a immunocytochemical expression in low-grade squamous intraepithelial lesions and high-risk HPV-positive atypical squamous cells of undetermined significance in patients with and without colposcopic evident cervical disease. *Exp Ther Med* 2011;2:853–8.
  18. Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJ, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer* 2011;128:927–35.

19. Ronco G, Segnan N, Giorgi-Rossi P, Zappa M, Casadei GP, Carozzi F, et al. Human papillomavirus testing and liquid-based cytology: results at recruitment from the new technologies for cervical cancer randomized controlled trial. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:765-74.
20. Fahey MT, Irwig L, Macaskill P. Meta-analysis of Pap test accuracy. *Am J Epidemiol* 1995;141:680-9.



## ABSTRACT

Usefulness of Makorin Ring Finger Protein1  
(MKRN1) immunocytochemistry  
in liquid-based cervical cytology

Min Young Chang

*Department of Medicine  
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Jae-hoon Kim)

### Objectives

The aim of the study was to investigate the clinical performance of detecting high grade cervical lesions (CIN2+) with MKRN1 immunostaining and its use as an adjunctive test to liquid based cervical cytology.

### Materials and methods

This study was approved by the institutional review board of Gangnam Severance Hospital in June 2013. We conducted

PROspective specimen collection and retrospective Blinded Evaluation (PROBE) study. Liquid-based cervical cytology, HPV hybrid capture and real time Polymerase chain reaction (PCR) were performed and cell block was prepared from residual cervical cytology specimen for immunocytochemistry of MKRN1 and P16<sup>INK4a</sup>. Clinical performances [sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), accuracy] of detecting CIN2+ were calculated for all women and subgroup analysis was performed for patients with ASCUS or LSIL.

## Results

Specimens were collected from 189 women, however, 2 cases were not available due to scant cellularity. Women who showed abnormal cytology were 140 and normal cytology were 47 out of 187 patients.

Cytology and HPV showed a positive rate of 78.9%, 86.8% in CIN1, 90.6% in CIN2, 93.6%, 97.9% in CIN3/CIS, 92.9% in cancer respectively. MKRN1 and p16<sup>INK4a</sup> positivity also increased with histologic severity, from 31.6%, 60.5% in CIN1, 62.5%, 65.6% in CIN2, 74.5%, 76.6% in CIN3/CSI to 92.9%, 85.7% in invasive cancer.

The sensitivity, specificity, PPV, NPV and accuracy of MKRN1 to detect CIN2+ was 73.1%, 74.5%, 73.9%, 73.7% and 73.8%, respectively. Liquid-based cytology and HPV test showed higher sensitivity (92.5%, 94.6%, respectively) than MKRN1, however, the specificity was low by 42.6% and 54.3%, respectively. p16<sup>INK4a</sup>

showed the lowest accuracy by 63.6%. (sensitivity: 74.2%, specificity: 53.2%, respectively)

Combining two screening tests, cytology+ HPV showed sensitivity of 90.3% but the lowest specificity by 66%, meanwhile the sensitivity of MKRN1+ HPV was 68.8% but it showed the highest specificity by 87.2% and the accuracy of these two combinations was the same (78.1%).

For ASCUS/LSIL, HPV+ MKRN1 showed the highest accuracy (73.1%) by showing 60.0% of sensitivity and 81.3% of specificity.

## **Conclusion**

MKRN1 immunostaining showed lower sensitivity but higher specificity than cytology and HPV test. In addition, combining two screening tests, HPV+ MKRN1 showed the highest accuracy in ASCUS/LSIL group. Therefore it is considered that MKRN1 can be useful in increasing the accuracy of diagnosis of cervical cancer.

-----  
Key Words : MKRN1, liquid-based cervical cytology, human papillomavirus test, immunocytochemistry