



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

식도편평세포암 환자의  
순환종양DNA 검출 및 NGS  
분석을 통한 유전적 변형 확인

연세대학교 대학원

의 학 과

장 한 밀

식도편평세포암 환자의  
순환종양DNA 검출 및 NGS  
분석을 통한 유전적 변형 확인

지도교수 최 종 락

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2021 년 7 월

연세대학교 대학원

의 학 과

장 한 밀

# 장한밀 의 석사 학위논문을 인준함

심사위원                      최 종 락                      인

심사위원                      이 승 태                      인

심사위원                      박 성 용                      인

연세대학교 대학원

2021 년 7 월

## 감사의 글

석사과정 전반을 지도해 주시며 연구 진행을 총괄해 주신 최종락 교수님, 연구의 핵심이 된 분석 알고리즘 개발과 데이터 처리과정을 지도해 주신 이승태 교수님께 감사드립니다. 환자 임상정보 정리와 변수 분석에 적극적으로 도움을 주신 박성용 교수님과 검체 제공에 협조해 주신 김대준 교수님, 이은영 연구간호사를 비롯한 흉부외과 선생님들께 감사드립니다. 연구 설계와 IRB 진행을 맡아주신 신새암 교수님, 박성균 교수님께 감사드립니다. 파견근무 기간 동안 검체 인수에 차질이 없도록 책임져 주셨던 원동주 선생님, 김홍경 선생님께 감사드립니다. 연구자료 분석에 관해 상세히 알려주신 서지은 교수님과, 함께 진행중인 연구과제에 관해 교류하며 도움 주신 이광섭 선생님, 허진호 선생님, 유경희 선생님께 감사드립니다. 검체 분석 과정을 진행해 주시고 설명해주신 최지선 선생님과 디엑솜 연구원 분들께 감사드립니다. 마지막으로 대학원 생활을 물심양면으로 지원해주신 가족 모두에게 감사드립니다.

저자 씀

## <차례>

국문요약 .....	1
I. 서론 .....	2
II. 재료 및 방법 .....	4
III. 결과 .....	8
1. 임상정보 및 변이 요약 .....	8
2. Tier 1/2 변이 검출률과 임상 정보 통계 분석 .....	12
3. 추적 관찰 검체를 이용한 모니터링 결과 .....	17
4. 추적 관찰 중 대조군 결과 .....	28
IV. 고찰 .....	23
V. 결론 .....	26
참고문헌 .....	27
ABSTRACT .....	28

## 그림 차례

그림 1. 연구대상 분류 개요 .....	6
그림 2. Positional Indexing(pi-seq) 원리에 따른 관독원리 .....	7
그림 3. 초진 검체에서 검출된 tier 1/2 변이의 Oncoplot .....	10
그림 4. 초진 검체에서 검출된 tier 1/2 변이의 분포 요약 .....	11
그림 5. 종양 진행도 별 양성률(Chi-square 검정) .....	13
그림 6. 종양 진행도 별 양성률(Cochrane-Armitage 경향 분석) .....	14
그림 7. Nodal upstaging 여부에 따른 검출률 .....	15
그림 8. 분화도 및 위치에 따른 검출률 .....	16
그림 9. 재발 환자 중 새로운 tier 1/2 변이가 검출된 4명의 VAF 변화 양상 .....	19
그림 10. 재발 환자 중 초진 검체의 tier 1/2 변이가 재검출된 3 명의 VAF 변화 양상 .....	20
그림 11. 증례 29의 추적 관찰 중 변이 빈도의 변화 .....	21

## 표 차례

표 1. Patient demographics .....	9
---------------------------------	---

## 국문요약

# 식도편평세포암 환자의 순환종양DNA 검출 및 NGS 분석을 통한 유전적 변형 확인

<지도교수 최종락>

연세대학교 대학원 의학과

장 한 밀

**배경** 식도암은 내시경 외 효과적인 진단 방법이 없으며, 림프절 전이가 영상 검사 상 발견되기 어려운 암종이다. 식도암의 진단 및 추적검사를 위한 바이오마커로서 순환종양DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)의 임상적 적용 가능성이 주목받고 있다.

**방법** 식도편평세포암을 진단받아 수술적 치료를 받은 환자 49명을 대상으로 전혈 검체를 채취하여 혈장 세포유리DNA (cell-free DNA, cfDNA)에 대한 NGS 분석을 시행하였다. 식도편평세포암과 연관성이 알려진 27개 유전자로 패널을 구성하여, pi-seq 알고리즘에 따라 검출된 변이에 대해 임상적 중요도를 평가하고 임상정보와 연관성을 분석하였다. 변이의 평가는 2017 Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists (AMP/ASCO/CAP) 가이드라인에 따라 수행하였다.

**결과** 환자 49명 중 20명의 초진 검체에서 tier 1/2 변이가 검출되었다(40.8%). 분석한 27개 유전자 중 TP53에서 가장 높은 변이 검출률(20%)을 보여 기존 연구와 유사한 소견을 보였으며, 대부분의 변이는 단일뉴클레오티드변이(SNV)로 그 중 C>T 변이가 60%를 차지하였다. Cochran-Armitage 경향 분석 결과 검출률은 병기(Stage) ( $p = 0.016$ ) 및 림프절 침범도 ( $p = 0.008$ ) 에 따라 가장 큰 차이를 보였다. 재발 환자 8명 중 7명의 환자에서 추적관찰 중 tier 1/2 변이의 빈도 증가가 재발과 연관되어 관찰되었다. 병인성 생식세포 변이(CDKN2A R87W)를 가진 희귀 증례 또한 1건 발견되었다.

**결론** 순환종양DNA 분석을 통해 식도암의 진단 및 추적관찰에 기여할 수 있으며 customized panel에 의한 효율적인 검사가 가능하다.

---

핵심되는 말 : 식도편평세포암, 순환종양DNA, Next-Generation Sequencing



## 식도편평세포암 환자의 순환종양DNA 검출 및 NGS 분석을 통한 유전적 변형 확인

<지도교수 최종락>

연세대학교 대학원 의학과

장 한 밀

### I. 서론

식도암의 기본적인 치료는 수술이며, 모든 식도암 환자는 치료가 시작되기에 앞서 종양을 제거할 수 있는지에 대한 평가가 필수적이다. 임상적으로 조직 침범이 깊거나(T3-4) 림프절 전이가 있는(N+) 상황에서는 수술 전 화학방사선요법 등의 복합적인 치료방법을 선택하는 것이 권장된다[1]. 조직학적 소견에 관계없이 50-80%의 환자가 진단 당시 절제가 불가능하거나 전이가 된 상태이므로, 완치보다는 경감 치료가 대부분의 환자에서 첫번째 목표가 되며, 국내에서 또한 2011-2015년 동안 5년 생존률 35.7%로 전체 암종에서 6번째로 낮은 생존률을 보이고 있다[2].

식도암의 2015년 국내 보고서에 따르면, 식도암은 17번째로 호발하는 암으로 연간 약 2,420명의 신환이 발생하고 있으며, 남성에서는 12번째로 연간 약 2,200명의 신환이 발생하고 있다[2]. 식도암은 병리소견에 따라 편평세포암(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)과 샘암종(esophageal adenocarcinoma, EAC)으로 나눌

수 있으며 편평세포암은 상부 및 중부 식도에서, 샘암종은 하부 및 위식도경계부에서 주로 발생한다. 식도편평세포암의 경우 식도암중 가장 흔한 형태이며, 특히 중국 북쪽에서부터 중앙아시아를 걸쳐 이란의 북쪽까지의 식도암 벨트에서 높은 발생률을 나타내지만, 그 발생률은 대부분의 지역에서 감소하고 있다. 국내의 경우, 편평세포암의 경우 2013년 기준 2149건, 샘암종의 경우 2013년 기준 75건으로 편평세포암이 90.2%로 대부분을 차지하고 있다[3].

식도편평세포암에 대한 whole genome/exome sequencing 결과는 2014년부터 발표되기 시작했으며[4, 5], 변이의 양상은 대부분 두경부편평세포암과 유사하며[6], 식도샘암종이나 편평세포암과는 다른 양상을 보이는 것으로 보고되었다[4, 7]. 식도편평세포암에서 발견되는 유전적 변형은 주로 *TP53*, *KMT2D*, *NOTCH1/2/3*, *FAT1/3*, *SYNE1*, *EP300*, *RBI*, *NFE2L2*, *CDKN2A*, *AJUBA*, *CREBBP*, *KDM6A*, *FBXW7*, *MLL2/3*, *PIK3CA*, *PTEN*, *ARID2*, *PBRM1* 등의 유전자에서 단일뉴클레오티드변이(single nucleotide variant, SNV)로 발견되며, *CCND1*, *FGFS*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *PIK3CA*, *DVL3*, *LRP5/6*, *KRAS/MRAS*, *EGFR*, *AKT1*, *BCL2L1*, *NOTCH1/2/3* 등의 유전자에서 복제수변이(copy number variation, CNV)가 발견되기도 하고, 그 외 RTK-Ras-MAPK-PI3K-Akt, Hippo, Notch, Wnt, and Nfe2l2/Keap1 pathway 등 세포사멸조절, 세포주기조절, 히스톤변형에 관련된 신호전달경로의 변형 또한 보고되었다[4, 5, 8].

식도편평세포암과 관련된 유전자 중 *ERBB*, *XPO1*, *FGFR1*, *TP53* 등을 표적으로 삼은 표적치료제 개발 가능성이 대두되었으나[5], 현재까지 임상적으로 효과적인 표적치료의 뚜렷한 성과는 없어, 일차 항암화학요법 이후 질병 진행 시 표준화된 이차 치료법은 없는 상황이다[9]. 식도암의 진단 및 치료기술이 현저히 높아졌으며 외과적

치료, 방사선, 화학요법의 발전뿐만 아니라 조기 식도암 발견의 증가, 내시경 점막절제술 등의 치료 증가에 따라 치료성적이 비약적으로 좋아지고 있지만, 다른 암종에 비해 낮은 5년 생존률 및 높은 사망률을 보았을 때 여전히 식도암의 조기 진단 및 추적검사, 표적치료를 위한 마커의 개발 등이 중요하다고 할 수 있다.

순환종양DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)는 종양 세포에서 방출되어 혈액에 섞여 순환 중인 작은 핵산 조각을 뜻한다. 순환종양DNA는 해당 암종이 가지고 있는 유전적 변형의 정보를 담고 있으며, 최근 sequencing 기술의 발전에 따라 그 정보를 분석하여 암의 발생과 진행을 감지하는 바이오마커로서 이용될 가능성이 주목받고 있다. 순환종양DNA는 암종에 따라 검출률의 차이를 보이며, 병기(stage)가 진행될수록 검출률이 증가하는 양상을 보인다[10].

식도편평세포암의 경우 기존에 상용화된 광범위 NGS panel 을 통해 순환종양DNA를 분석한 연구는 존재하나[8], 해당 암종만을 표적으로 설계된 customized panel 을 통한 연구는 아직 미비한 상황이다. 본 연구에서는 국내 식도암의 대부분을 차지하는 식도편평세포암에 주목해 해당 암종에서 자주 검출되는 유전자 27종을 선별하여 customized panel 을 설계하고 그 임상적 효용성을 평가하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

2019년 10월부터 2020년 12월까지 식도편평세포암을 진단받아 수술적 치료를 받은 환자 60명에 대해 연구를 진행하였다(IRB 승인번호: 4-2019-0839). 환자의 조직검사 결과 식도편평세포암 이외의 다른 암종으로 진단된 경우, 또는 초진 검체의 DNA 분석이 불가능한 경우에는 연구대상에서 제외하여, 총 49명 환자를 연구대상으로 선별하였다(그림 1).

환자 별 초진 검체로 전혈 10-20mL를 수술 전 1회 채혈하였으며, neoadjuvant chemotherapy 가 필요한 환자의 경우 neoadjuvant chemotherapy 시행 전 1회, 시행 후 수술 전 1회 채혈하였다. 치료 후에는 병기(stage)에 따라 정해진 주기로 추적관찰을 위해 외래 방문 시 매번 1회씩 채혈하였다. 검체는 cfDNA의 안정적 보존을 위해 DxTube에 채혈 후 상온에서 최대 4일 이내에 혈장 성분을 1,900g에서 2회 원심분리 후 상층액만 분리하여 -80°C에 보관하였다. cfDNA의 추출과 Library 제작은 Dxome kit [Cat no. DXEK710-4, LP01096, Dxome, Seoul, Korea]를 이용하여 진행하였다.

기존 문헌 상 식도편평세포암에서 돌연변이가 흔히 발견되는 유전자를 선정하여 *FGFR1*, *TP53*, *NOTCH1*, *FAT1*, *PIK3CA*, *FAT3*, *EP300*, *NFE2L2*, *ZNF750*, *KMT2C*, *RB1*, *FAT2*, *PTCH1*, *KDM6A*, *FBXW7*, *CDKN2A*, *PTEN*, *CREBBP*, *NOTCH2*, *AJUBA*, *KEAP1*, *KMT2D*, *EGFR*, *SMAD4*, *SMARCA4*, *NOTCH3*, *NSD1*을 포함한 27종의 맞춤형 패널(custom panel)을 구성하였다. 앞서 제작한 Library와 Panel probe간의 Hybridization을 통해 Target capture한 후, Selection된 Library만 공동 시발체(primer)로 증폭하여 최종 Library를 만들었다. Illumina Novaseq 6000 장비(Illumina, San Diego, CA, USA)를 이용하여 Duplex sequencing 방식의 차세대염기서열분석 (Next-Generation Sequencing, NGS)을 시행하였다.

NGS 분석 결과 검출된 변이는 검사실 내 in-house 알고리즘에 의해 calling되었으며, 낮은 대립유전자빈도(variant allele frequency, VAF)를 보이는 변이들을 positional indexing(pi-seq) 원리에 의해 그룹화하여 참-양성(true-positive) 여부를 판별하였다. Duplex sequencing 시 증폭되는 시퀀싱 리드(sequencing read)들을 표준염기서열(reference sequence)에 대한 위치 별로 그룹화하면, 증폭 전에 실제로 존재한

참-양성 변이의 경우 여러 그룹에서 공통적으로 나타나는 반면, 증폭 과정 도중에 생겨난 거짓-양성 결과는 일부 시퀀싱 리드에서만 산발적으로 나타나는 차이를 보인다(그림 2, 가). 이러한 원리에 따라 공통된 위치에서 양방향으로 모두 검출되는 변이를 참-양성 결과로 판독하되, IGV(Integrative Genomics Viewer, Broad Institute and the Regents of the University of California) 소프트웨어를 이용해 각 변이를 시각적으로 판독하여(그림 2, 나), 시퀀싱 리드의 말단부에 존재하거나 주변에 반복서열이 있어 위양성 가능성이 있는 경우를 배제하였다.

양성 변이들 각각에 대하여 OncoKB, cBioPortal 등 웹 기반 데이터베이스를 참조해, 진단/치료/예후와 관련된 해당 변이의 임상적 근거의 타당성을 검토하고, Association for Molecular Pathology (AMP) Clinical Practice Guideline에 따라 tier를 부여하였다[11]. 그 중 tier 1(임상적 의의가 명확한) 변이와 tier 2(잠재적 임상적 근거가 있는) 변이들을 선별해 변이의 양상을 정리하고, 환자의 임상정보와 연관지어 통계적 분석을 시행하였다. 통계 분석은 Analyse-it® 프로그램(Microsoft) 과 R을 이용하였으며, 항목형 변수에 따른 검출률 차이를 Chi-square 검정을 통해 확인하고, 순서형 변수에 따른 경향성을 파악하기 위해 Cochran-Armitage trend test를 수행하였다.

그림 1. 연구대상 분류 개요

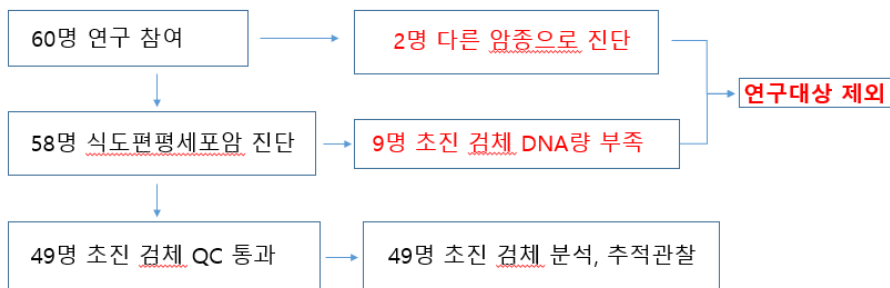
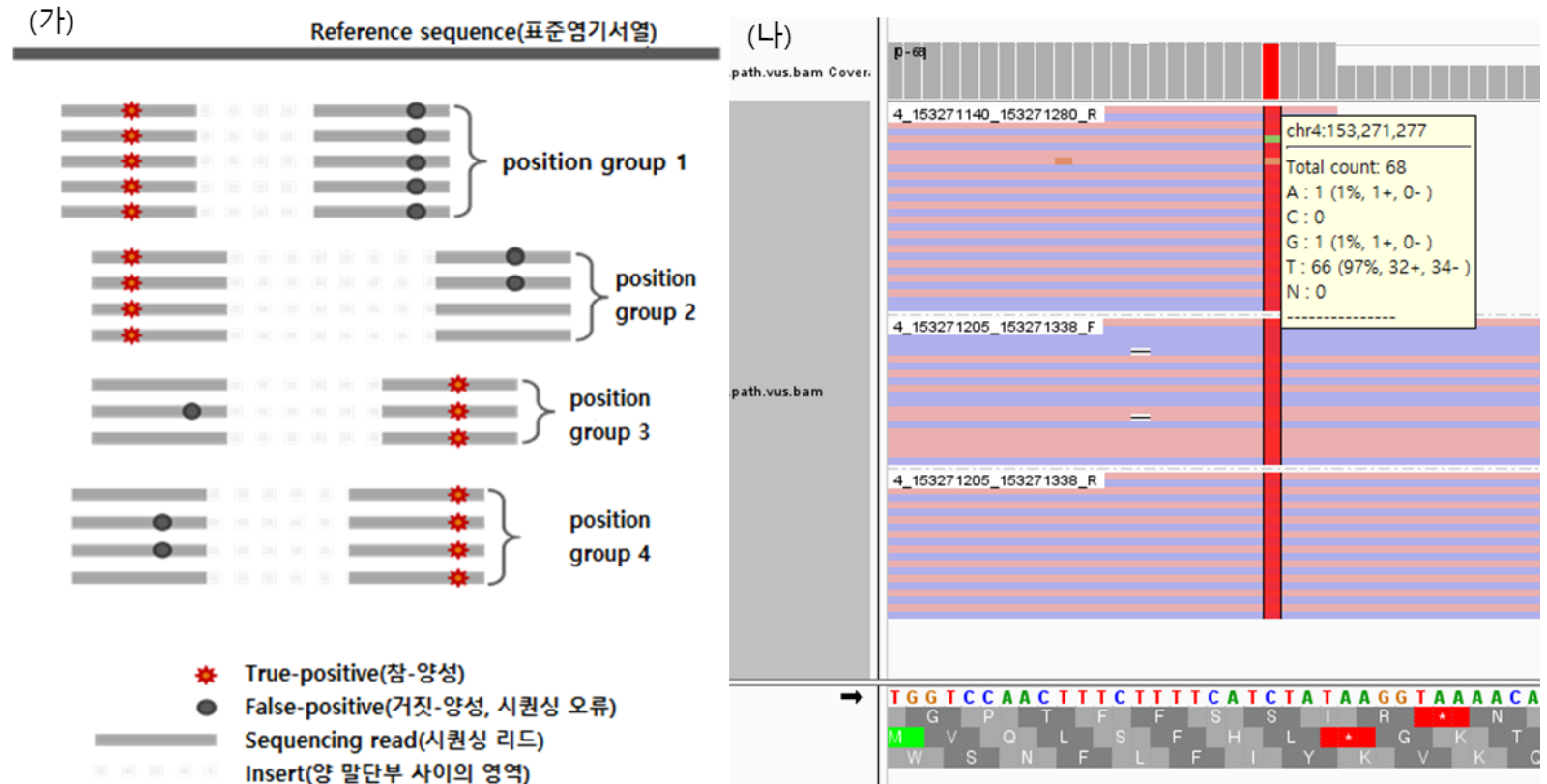


그림 2. Positional Indexing(pi-seq) 원리에 따른 관독원리 개요(가) 및 참-양성 결과의 예시(나)



### III. 결과

#### 1. 임상정보 및 변이 요약

환자 집단 구성의 임상정보를 표 1에 요약하였다. 환자의 성별은 남성이 44명(89%), 여성이 6명(11%) 였으며 연령은 60대가 대부분이었다(평균 연령: 63.8세). 전체 49명 환자 중 neoadjuvant chemotherapy가 필요한 환자는 5명이었으며, 나머지 44명은 초기 치료로 수술적 절제를 받았다. 내시경 및 영상검사 소견을 통해 부여된 임상적 병기(clinical staging)가 수술 후 병리 결과에 따라 림프절 전이가 추가로 확인되어 병리학적 병기(pathological staging)가 더 높아진 환자는 16명이었으며, 연구기간 동안 재발/진행이 발견된 환자는 8명이었다.

환자 49명의 초진 검체에서 발견된 총 37개의 tier 1/2 변이들을 oncoplot 형식으로 그림 3에 나열하였다. 변이가 발견된 유전자는 TP53이 가장 많았으며(12개) 주로 stage III-IV 환자에게서 발견되었다. 변이들의 특성은 그림 4의 도표로 정리하였다. 검출률이 높은 유전자는 TP53(20%), KMT2D(10%), SMAD4(8%), FAT1(6%) 등이었으며 검체 당 변이의 개수는 4개 이하로 관찰되었다. 변이의 종류는 missense 변이가 가장 많았으며, 그 중 염기의 변화는 C>T 변이가 43%로 가장 자주 관찰되었다.

**표 1.** Patient demographics

		No. of Patients			No. of Patients
<b>Age</b>	40s	3	<b>pStage</b>	1	19
	50s	8		2	16
	60s	26		3	5
	70s	10		4	4
	80s	2	<b>pT</b>	1a	6
<b>Sex</b>	Female	5		1b	24
	Male	44	2	3	
<b>Tumor length(cm)</b>	0~3	17	<b>pN</b>	3	11
	3~6	25		0	25
	9~	3		1	9
				2	6
<b>Tumor location</b>	Lower	19	3	4	
	Middle	26	<b>LVI</b>	11	
	Upper	4		<b>PNI</b>	3
<b>Histological grade</b>	WD	14	<b>Neoadj.</b>	5	
	MD	21	<b>Nodal upstaging</b>	16	
	PD	11	<b>Recurrence</b>	8	

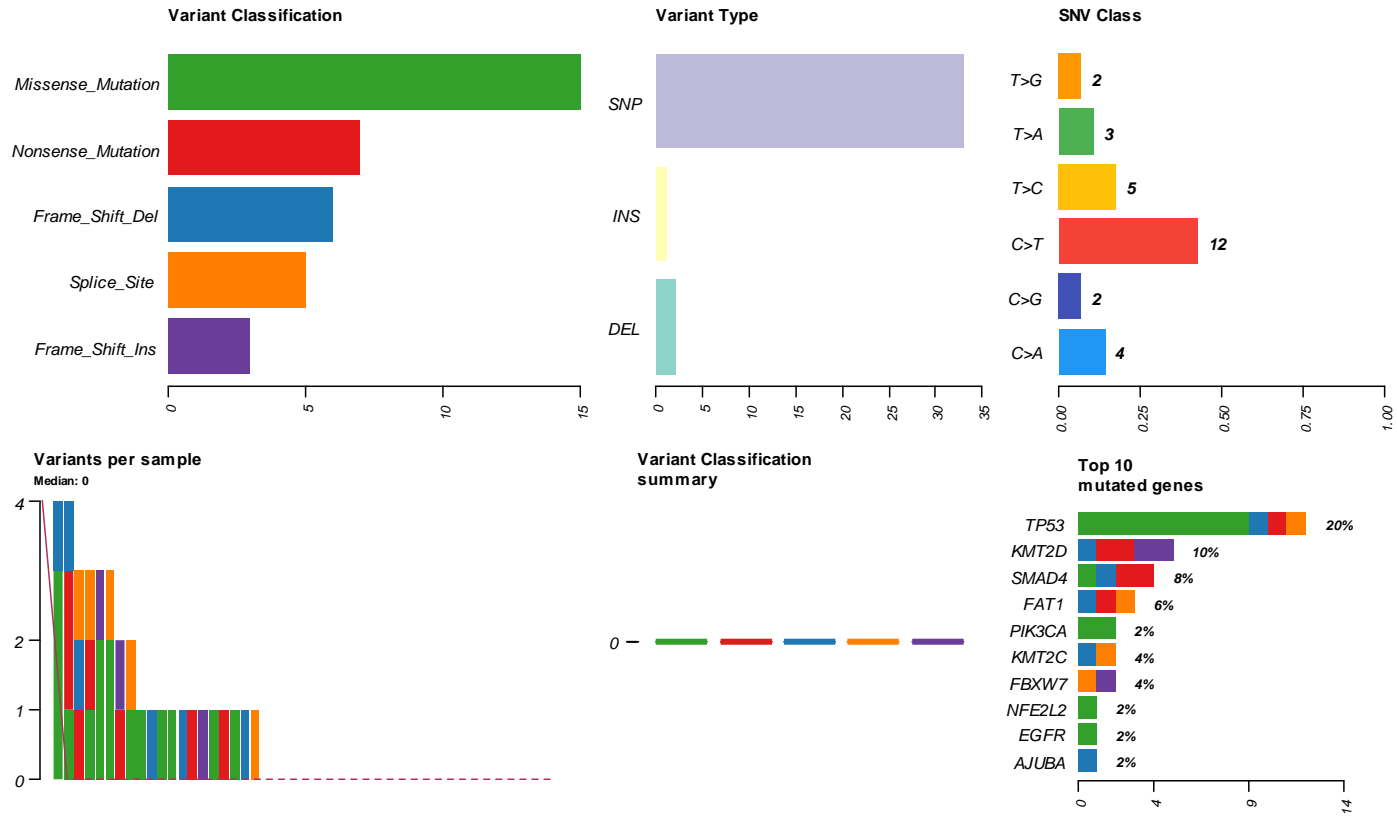
*WD* well-differentiated, *MD* moderately differentiated, *PD* poorly differentiated, *LVI* Lymphovascular invasion, *PNI* Perineural invasion





그림 3. 초진  
검체에서 검출된  
tier 1/2 변이의  
Oncoplot

그림 4. 초진 검체에서 검출된 tier 1/2 변이의 분포 요약

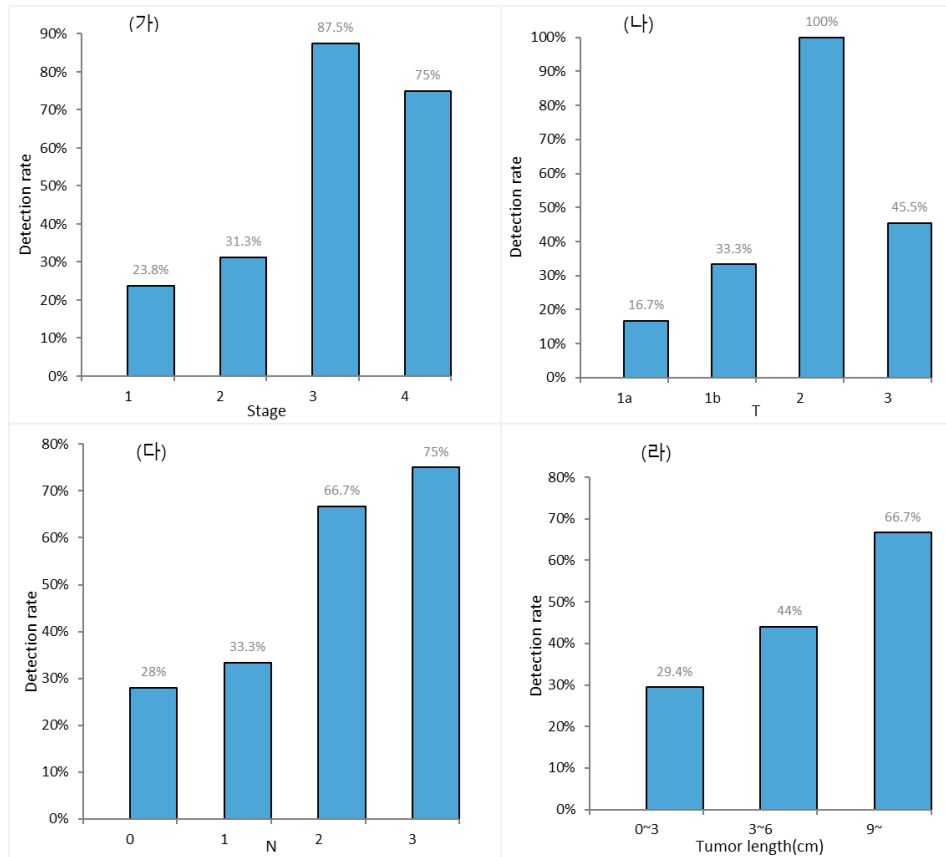


## 2. Tier 1/2 변이 검출률과 임상 정보 통계 분석

다음으로 tier 1/2 변이의 초진 검체 검출률을 환자별 임상정보와 연관지어 통계적 분석을 시행하였다. 검출률은 병리학적 병기(pStage)에 따라 가장 유의미한 차이를 보였으며( $p = 0.0065$ ), TNM stage 의 경우 항목별로 종양의 침범도가 심할수록 검출률이 증가하는 양상을 보였으나, 단순 chi-square 검정 상으로는 통계적 유의성을 찾지는 못하였다. 하지만 각 항목을 그룹화하여 경증/중증 침범군을 단순 비교한 결과, N stage의 [0+1] / [2+3] 그룹 간 검출률의 차이가 chi-square 검정 상  $p = 0.0205$ 로 유의미한 차이를 보였다. 수술적으로 적출된 종양의 최대 직경을 3cm 단위로 그룹화하여 분석한 결과, 크기가 클 수록 검출률이 증가하는 양상을 보였으나 그룹 간 차이가 통계적으로 유의하지 않았다(그림 5).

순서형 변수에 대한 경향성을 검증하기 위해 Cochran-Armitage 경향 분석을 실시한 결과, 검출률은 전반적으로 종양 침범도와 비례하는 경향성을 보였으나, 그 중 통계적으로 유의미한 결과는 병기(Stage) 와 N stage 에서 각각  $p = 0.016$ ,  $p = 0.008$  의 유의성을 보였다(그림 6).

그림 5. 종양 진행도 별 양성률 차이(Chi-square 검정)



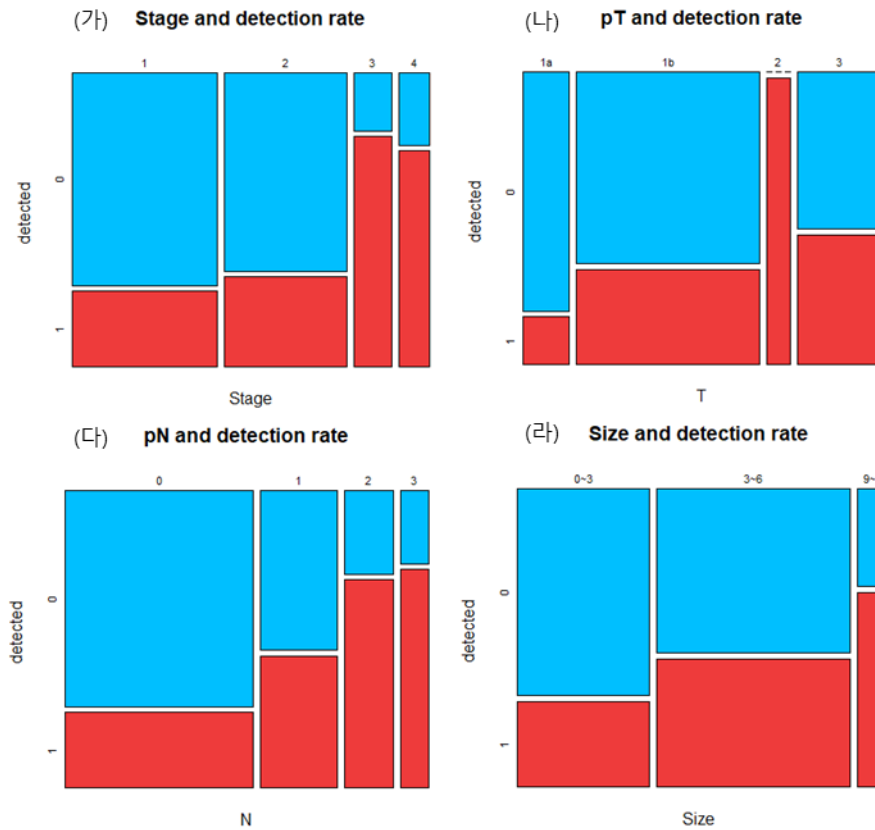
(가) 병기(Stage)별 검출률( $p = 0.0065$ ),

(나) T stage 별 검출률 ( $p = 0.0902$ ),

(다) N stage 별 검출률 ( $p = 0.1375$ ),

(라) 종양 직경 별 검출률 ( $p = 0.3966$ )

그림 6. 종양 진행도 별 양성률 차이(Cochrane-Armitage 경향 분석)



(가) 병기(Stage)별 검출률( $p = 0.016$ ),

(나) T stage 별 검출률 ( $p = 0.153$ ),

(다) N stage 별 검출률 ( $p = 0.008$ ),

(라)종양 직경 별 검출률 ( $p = 0.180$ )

다른 명목형 변수에 대한 Chi-square 분석을 시행한 결과, 수술 전 영상 소견 상 발견되지 않은 림프절 전이에 의해 임상적 병기(clinical staging)에 비해 병리학적 병기(pathological staging)가 상향되는(upstaging) 경우, 검출률 증가의 차이가 통계적으로 유의하지 않았다(그림 7). 종양의 조직학적 분화도(histological grading) 및 식도 해부학적 위치 별 차이에 대한 분석에서도 통계적인 유의성은 보이지 않았다(그림 8).

그림 7. Nodal upstaging 여부에 따른 검출률( $p = 0.2419$ )

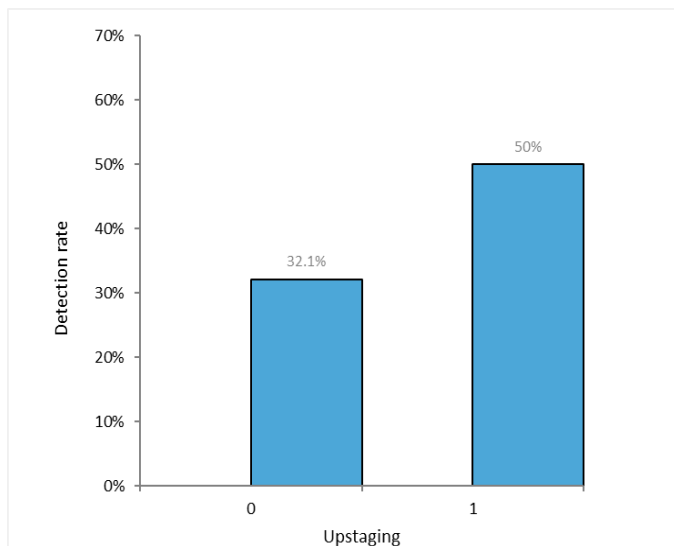
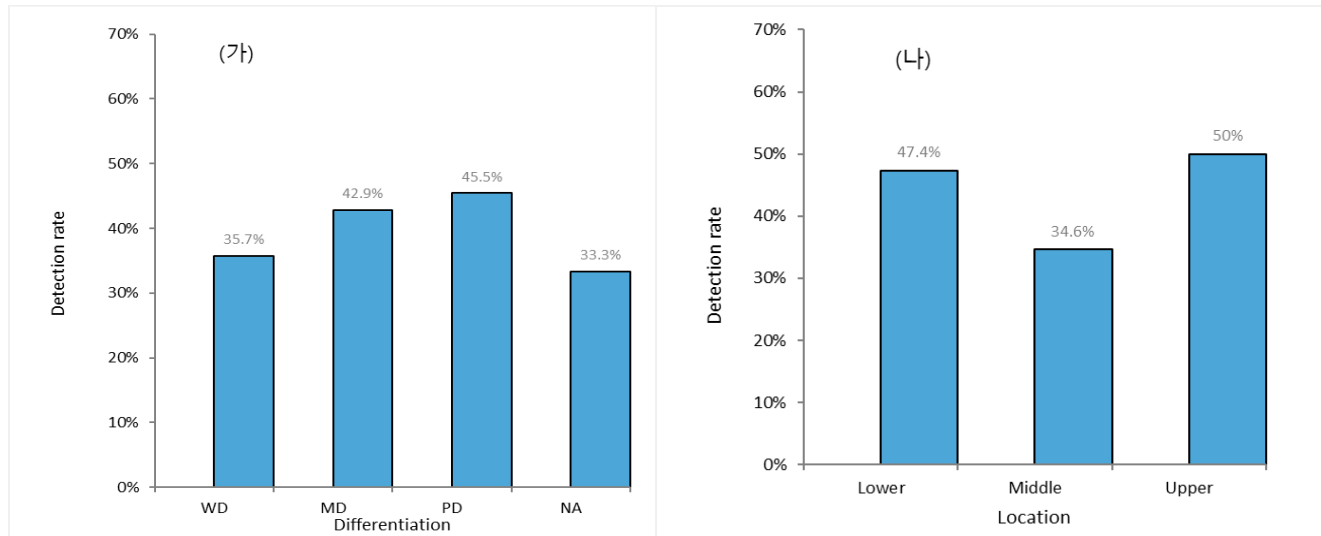


그림 8. (가)조직학적 분화도 별 검출률( $p = 0.9495$ )

(나)식도의 해부학적 위치 별 검출률( $p = 0.6404$ )



### 3. 추적 관찰 검체를 이용한 모니터링 결과

추적 관찰 중 식도암의 재발/진행이 관찰된 8명의 환자 중 7명에게서 질환이 진행됨에 따라 tier 1/2 변이의 VAF가 증가하는 양상이 관찰되었다. 그 중 4명은 초진 검체에서 tier1/2 변이가 검출되지 않았으나 재발과 연관되어 새롭게 검출된 환자이며(그림 8), 나머지 3명은 초진 검체에서 관찰된 변이를 포함한 tier1/2 변이가 재발과 연관되어 증가하는 양상을 보였다(그림 9).

증례 1번은 adjuvant FP 치료 후 9개월 차에 흉막 전이가 발견된 환자로, 아직 임상적/영상의학적 재발 소견이 보이지 않던 5개월 차의 혈액검체에서 순환종양DNA 검사 상 tier1/2 변이가 미리 검출되었다는 점이 고무적이다(VAF 0.6~1%). 증례 12번의 경우에도 재발 소견이 보이지 않던 7개월 차의 혈액검체에서 순환종양DNA 검사 상 tier1/2 변이가 미리 검출된 다음(VAF 0.4~1.5%), 수술 후 12개월 차에 재발 소견이 발견되었다. 증례 10번의 경우 추적관찰 3개월 차에 choroidal metastasis가 발견된 뒤, 질환이 더 진행된 12개월 차에 새로운 tier 1/2 변이가 검출되었다(VAF 0.2~0.5%). 증례 25번의 경우 8개월 차에 재발이 발견될 당시 검체에서 tier 1/2 변이가 높은 비율로 검출되었다(VAF 7.4~12.1%)(그림 9).

증례 7번은 초진 검체에서 발견된 *TP53* L137fs, *FBXW7* c.502-1G>A, *KMT2D* S660X 변이를 포함한 다수의 tier 1/2 변이가 11개월 차 재발 검체에서 더 높은 비율로 발견되었으며(VAF 0.4~5.9%), 증례 30번의 경우 재발 소견이 보이기 전인 4개월 차 검체에서 *TP53* R110P, *TP53* H179R 변이의 비율이 이전보다 상승하는 소견을 보였다(VAF 0.5~2.5%). 증례 30번의 9개월 차 재발 검체의 경우 현재 검사 대기 중인 상태로, 이후 검사 진행 결과 순환종양DNA의 비율이 더 상승할 것으로 예측된다. 증례 26번의 경우 7개월 차에 재발이 발견되면서



tier 1/2 변이가 매우 높은 분율로 검출되었으며(VAF 20.0~56.4%), 검출된 변이 중 *PIK3CA* E726K 변이와 *KMT2D* S368fs 변이는 초진 검체에서도 관찰되었던 변이었다(그림 10).

#### 4. 추적 관찰 중 대조군 결과

추적 관찰 시 변이 검출 양상을 비교하기 위해 재발이 없는 환자의 경우를 살펴본 결과, 간혹 tier 1/2 변이가 추적 관찰 중 발견되는 경우는 있었으나, 모두 1% 미만의 낮은 분율로 관찰되었으며, 이전 또는 이후 검체와 연속성이 없는 산발적인 검출 결과를 보였다. 또한 tier 3 변이 중 초진 검체와 연속성을 보여 중앙에서 유래된 것으로 추정되는 변이의 경우, 치료 경과에 따라 감소하는 양상을 보였다. 대표적인 사례로 증례 29번의 경우, 수술 후 1개월째부터 adjuvant XP 치료 및 방사선요법을 병행한 결과, 초진검체 및 수술 후 1개월 때까지 검출되던 *FAT1*의 변이들이 그 이후에는 검출되지 않았다(그림 11, 가). 한편, 증례 29번은 tier 1/2 변이(*CDKN2A* R87W)가 추적 검사 중 지속적으로 VAF 50% 에 가깝게 검출되어(그림 11, 나), 병인성 생식세포변이를 선천적으로 보유했음이 확인된 사례이기도 하였다.

그림 9. 재발 환자 중 새로운 tier 1/2 변이가 검출된 4명의 VAF 변화 양상

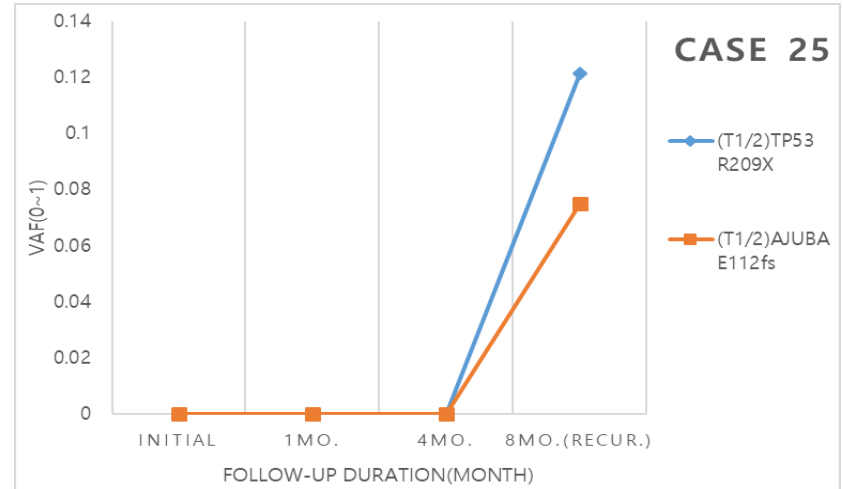
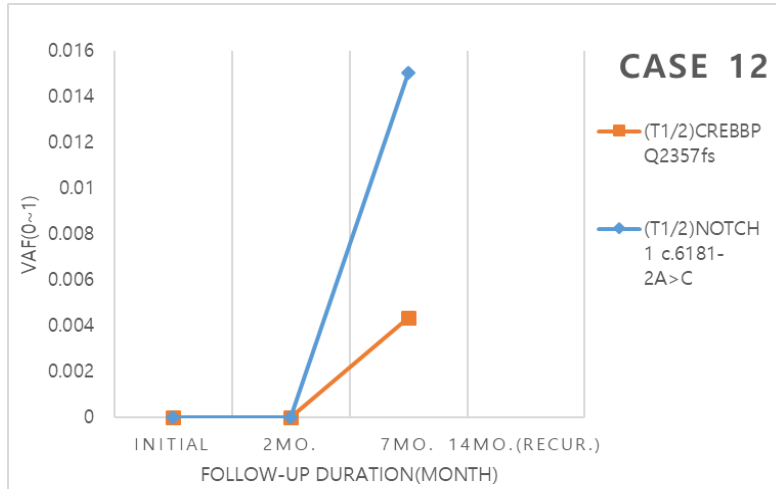
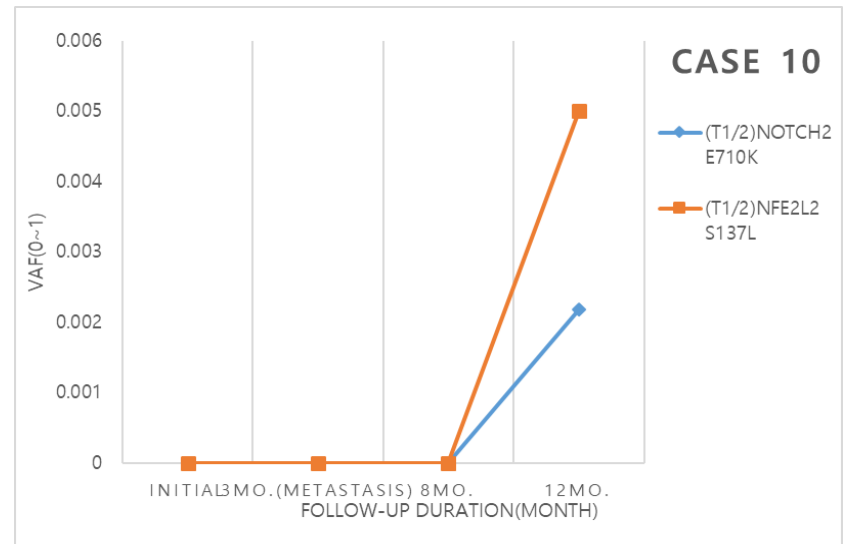
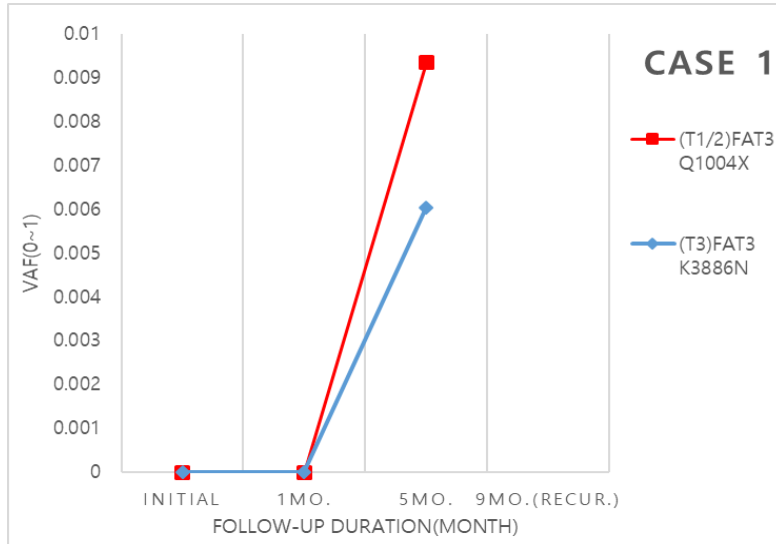


그림 10. 재발 환자 중 초진 검체의 tier 1/2 변이가 재검출된 3명의 VAF 변화 양상

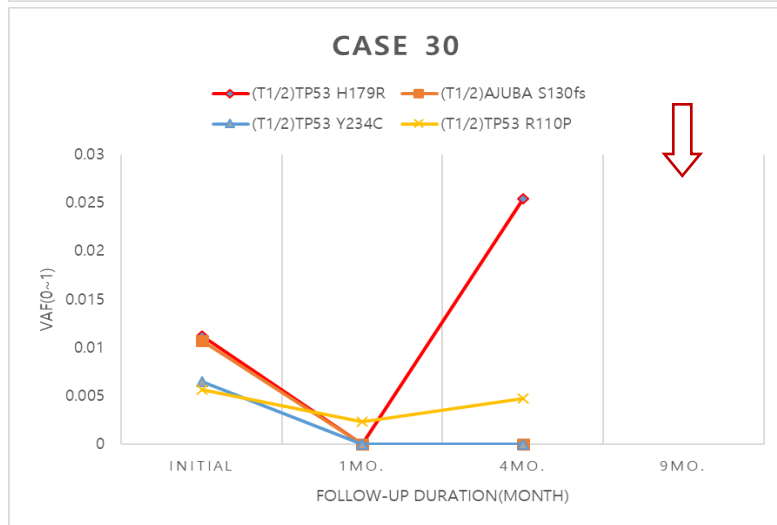
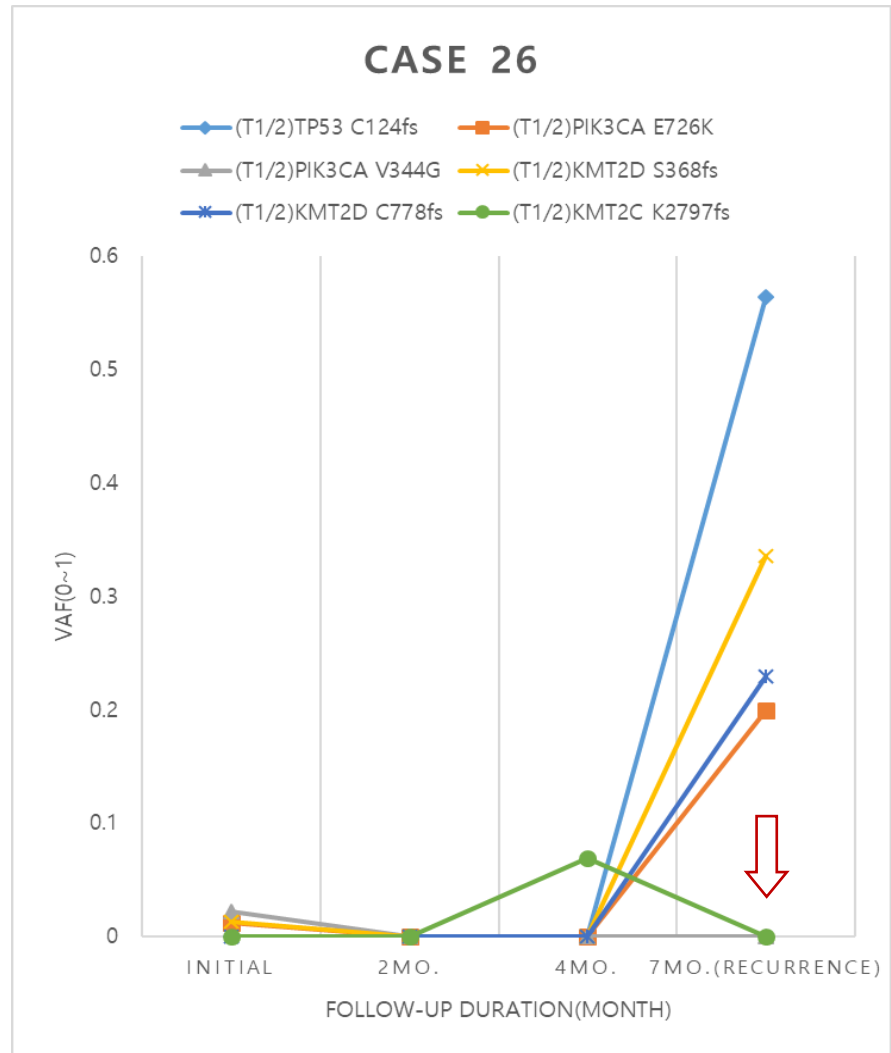
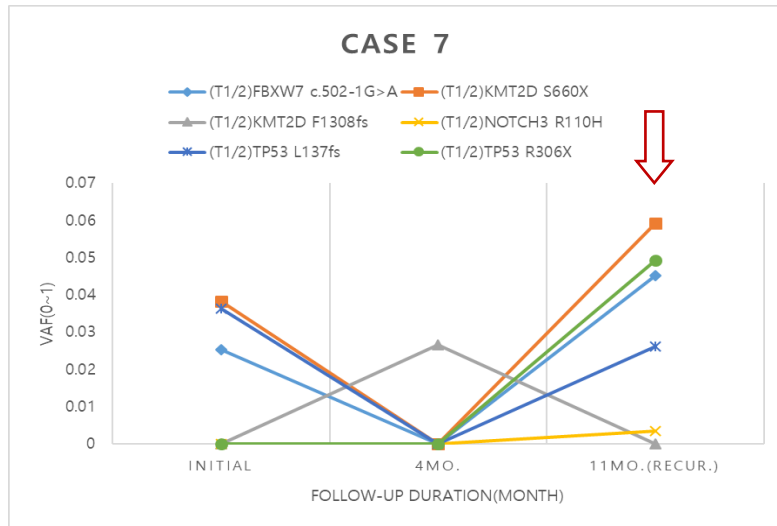
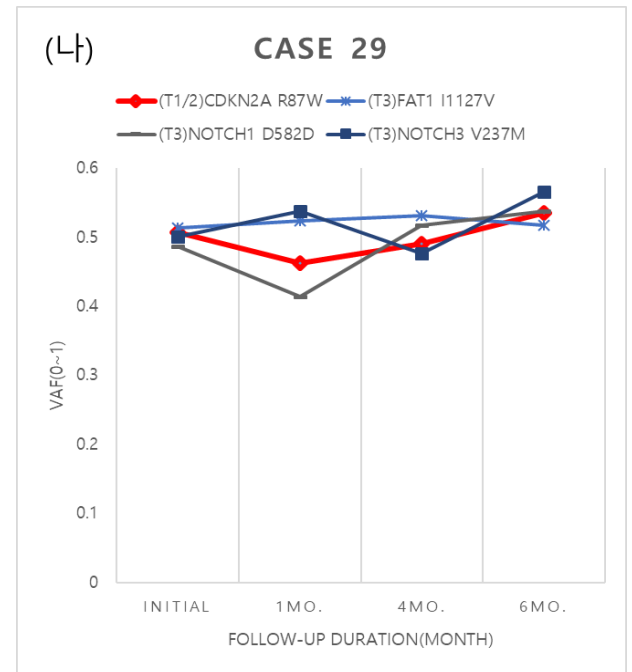
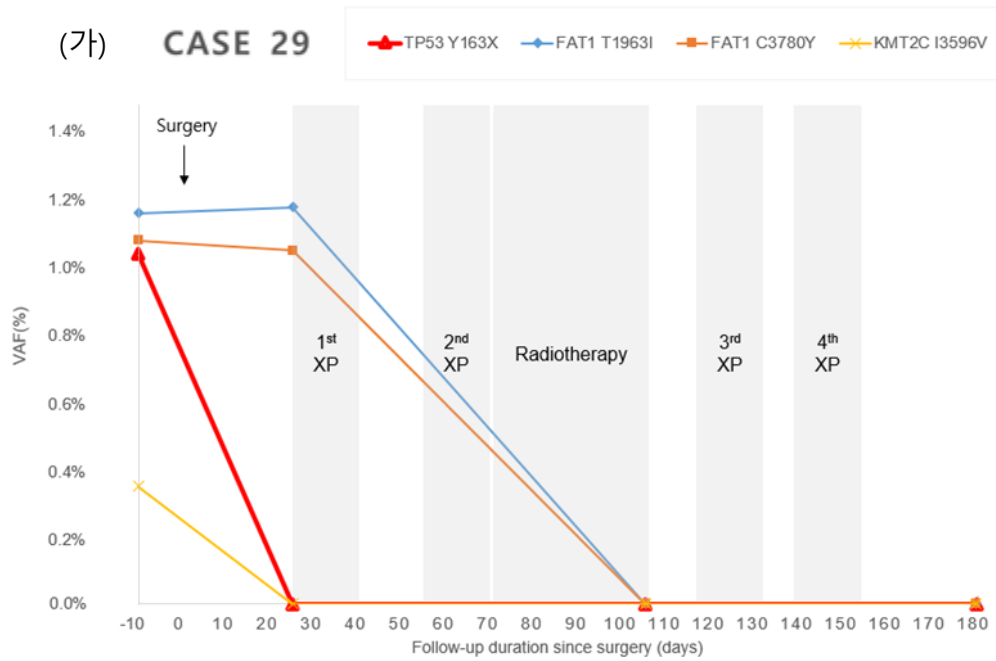


그림 11. 증례 29의 추적 관찰 중 변이 빈도의 변화

- (가) 치료 경과에 따른 VAF 변화 양상,
- (나) 생식세포변이의 VAF 변화 양상



#### IV. 고찰

본 연구에서는 검사의 효용성과 특이도를 고려하여 식도편평세포암과 연관된 27개 유전자만을 선별하여 customized panel을 구성하여 순환종양DNA 검출을 시도하였다. 순환종양DNA는 일반적으로 생식세포변이(germline variant)에 비해 매우 낮은 비율로 검출되기 때문에, 위양성(false positive) calling과 구분하기 위한 별도의 방법이 필요하다. 저빈도 변이 검출법으로 기존에 알려진 Duplex sequencing 방법은 2014년에 소개되어 널리 쓰이고 있으며, 최초의 DNA가닥에 양방향 무작위 태그(duplex tag)를 결합시킨 후 PCR 증폭함으로써 공통된 duplex tag를 지닌 consensus sequence를 그룹화해 비교하여 위양성을 배제하고 양방향 서열에서 모두 공통적으로 보이는 변이만을 참양성으로 판단하는 원리이다[12]. 본 연구에서는 Duplex sequencing의 원리에 기반하였으나, duplex tag를 결합시키는 과정을 생략하는 대신, mapping position의 공통 위치를 기준으로 consensus sequence를 그룹화하는 positional indexing 기법을 응용한 pi-seq 알고리즘을 사용하여 저빈도 변이의 위양성을 배제할 수 있었다.

본 연구에서 NGS 분석을 시행한 결과, 종양에서 유래되었을 것으로 추측되는 tier 1/2 변이들의 검출 양상은 기존의 exome sequencing에서 보였던 유전자 빈도 및 염기서열 변화와 유사한 양상을 보였다. 식도편평세포암의 경우 다른 유전자에 비해 TP53에서 종양유발변이(cancer-driving mutation)가 매우 높은 빈도로 검출되는 것으로 알려져 있으며[5], 염기의 변화 중 C>T transition 이 자발적 cytosine deamination에 의해 식도편평세포암에서 악성화를 유발하여 다른 염기 변화에 비해 높은 빈도로 관찰됨이 보고되었다[4].

기존에 보고된 대장암의 유전체 분석 연구에 따르면, 대장암의

경우 악성화에 관여하는 유전자가 다양하여 종양 유전체의 종양 간 이질성(inter-tumor heterogeneity)이 심하게 보이는 것으로 알려져 있다[13]. 종양 간 이질성이 높은 질환의 경우, 임상적으로 유의한 변이를 놓치지 않으면서도 특이적인 customized panel을 설계하는 것이 어려워진다. 이에 반해, 식도편평세포암의 경우에는 대부분의 변이가 TP53에서 반복적으로 나타나며 대부분의 다른 암종에 비해 두 배 가까이 집중도를 보이는 것으로 알려져[8, 14], 상대적으로 customized panel을 설계하고 이를 이용해 순환종양DNA를 검출하기에 유리한 암종이라 할 수 있다.

본 연구에서 질환의 재발이 관찰된 환자 중, 영상 소견 및 임상적 관찰에 의해 재발이 진단되기 수 개월 전부터 순환종양DNA의 상승이 관찰된 사례가 3례 있었다(Case 1, Case 12, Case 30). 해당 환자의 재발 시점 검체는 현재 아직 분석이 완료되지 않았으나, 분석 결과 다른 사례와 유사하게 순환종양DNA의 분율이 더 높게 관찰될 것으로 예상된다. 이와 같이 재발 진단 이전에 순환종양DNA의 변동이 먼저 관찰되는 사례가 누적되면 비침습적이고 간단한 검사를 통해 모니터링 및 잔존암의 민감한 검출이 가능함을 뒷받침하는 근거가 될 것이라 기대된다.

식도편평세포암의 림프절 전이(nodal metastasis)가 있는 경우, 전이된 림프절과 전이 병변(metastasis focus)의 크기는 각각 평균 6.60mm, 4.47mm 로 매우 작기 때문에, 기존의 영상의학적 검사 기법을 통해 정확히 진단하는 것이 매우 어렵다[15]. 영상 소견 상 찾기 힘든 림프절 전이가 수술 시 발견되는 경우 임상적 병기(clinical stage)보다 병리학적 병기(pathological stage)가 상향되는 upstaging이 일어나는데, 이러한 환자들의 경우 검출률의 상승이 예상되나 본 연구에서는 통계적 유의성을 보이진 않았다. 림프절 침범이 심할수록 검출률의

상승 역시 예상과 유사한 양상을 보이는데, 연구 대상의 수가 늘어날수록 통계적으로 유의한 차이를 보일 것으로 예상된다.

순환종양DNA의 대립유전자빈도(VAF)는 일반적으로 생식세포 변이(germline variant)에서 보이는 0.5/1.0 에 비해 매우 낮은 값을 보인다[16]. 하지만 본 연구에서 병의 진행에 따라 드물게 생식세포 변이와 유사한 수준의 VAF까지 상승되는 사례가 관찰되었고(그림 8, Case 26), 또한 잠재성 불명 클론성 조혈(clonal hematopoiesis of indeterminate potential, CHIP) 등 mosaicism에 의해 종양에서 유래되지 않았음에도 0.5배수보다 낮은 VAF를 보이는 변이가 존재할 수 있기 때문에, 본 검사에서 검출된 변이들이 종양에서 유래된 세포유리DNA인지 확인하는 절차가 필요하다[17]. 일반적으로 말초혈액 단구세포 비교(peripheral blood mononuclear cell matching, PBMC matching)를 통해 세포유리DNA 여부를 검정하지만, 본 연구에서는 추적 관찰 시 질환의 진행과 무관하게 유사한 비율로 반복적으로 보이는 변이들을 제외하는 방식을 선택하였다.

본 연구의 한계점으로 CEA, CA19-9, CA72-4, SCC-Ag, Cyfra21-1 등 기존에 알려진 종양 바이오마커와의 비교 분석을 실시하지 못한 점 들 수 있다. 상기 바이오마커들의 경우 식도편평세포암에서 민감도와 특이도가 우수하지 않아 임상적 효용성을 주목받지 못해 실제 임상에서 자주 처방되지 않았고, 본 연구에서도 바이오마커 농도의 추이를 데이터화할 만큼 충분한 횟수로 검사한 증례가 없어 비교 분석이 불가능하였다.

## V. 결론

기존의 광범위 종양 패널(broad cancer panel)에 비해 비용 효과가 뛰어나며 특이도가 높은 customized panel을 이용하여 순환종양DNA를 분석한 결과, 기존에 알려진 genetic landscape와 유사한 양상을 보였으므로 본 검사법은 식도편평세포암의 진단과 추적관찰에 기여할 수 있는 바이오마커로서 유용하게 쓰일 수 있는 가능성이 보인다. 본 검사법에 의해 초기 진단 시 암종의 유전적 프로파일을 파악하고, 나아가 추적관찰 시 민감하게 잔존암의 변화를 검출해 내는 데 보조적인 역할을 할 수 있을 것으로 기대된다. 추후 더 많은 증례 및 정상인과의 비교분석을 통해 초기진단의 임상적 효용성을 검증하는 후속 연구가 필요할 것으로 사료된다.



## 참고문헌

1. Ajani, J.A., et al., *Esophageal and Esophagogastric Junction Cancers, Version 2.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology*. Journal of the National Comprehensive Cancer Network, 2019. **17**(7): p. 855-883.
2. Jung, K.-W., et al., *Cancer Statistics in Korea: Incidence, Mortality, Survival, and Prevalence in 2015*. Cancer Research and Treatment, 2018. **50**(2): p. 303-316.
3. Shin, A., et al., *Trends in incidence and survival of esophageal cancer in Korea: Analysis of the Korea Central Cancer Registry Database*. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2018. **33**(12): p. 1961-1968.
4. Gao, Y.-B., et al., *Genetic landscape of esophageal squamous cell carcinoma*. Nature Genetics, 2014. **46**(10): p. 1097-1102.
5. Lin, D.-C., et al., *Genomic and molecular characterization of esophageal squamous cell carcinoma*. Nature Genetics, 2014. **46**(5): p. 467-473.
6. Agrawal, N., et al., *Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1*. Science, 2011. **333**(6046): p. 1154-7.
7. Hammerman, P.S., et al., *Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers*. Nature, 2012. **489**(7417): p. 519-525.
8. Luo, H., et al., *Noninvasive diagnosis and monitoring of mutations by deep sequencing of circulating tumor DNA in esophageal squamous cell carcinoma*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016. **471**(4): p. 596-602.
9. Rustgi, A.K. and H.B. El-Serag, *Esophageal Carcinoma*. New England Journal of Medicine, 2014. **371**(26): p. 2499-2509.
10. Bettgowda, C., et al., *Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies*. Science Translational Medicine, 2014. **6**(224): p. 224ra24-224ra24.
11. Li, M.M., et al., *Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer*. The Journal of Molecular Diagnostics, 2017. **19**(1): p. 4-23.
12. Kennedy, S.R., et al., *Detecting ultralow-frequency mutations by Duplex Sequencing*. Nature Protocols, 2014. **9**(11): p. 2586-2606.
13. Uchi, R., et al., *Integrated Multiregional Analysis Proposing a New Model of Colorectal Cancer Evolution*. PLOS Genetics, 2016. **12**(2): p. e1005778.
14. Ueda, M., et al., *Somatic mutations in plasma cell-free DNA are diagnostic markers for esophageal squamous cell carcinoma*

- recurrence*. *Oncotarget*, 2016. **7**(38): p. 62280–62291.
15. Park, S.Y., et al., *Relationship Between the Size of Metastatic Lymph Nodes and Positron Emission Tomographic/Computer Tomographic Findings in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma*. *World J Surg*, 2015. **39**(12): p. 2948–54.
  16. Slavin, T.P., et al., *Identification of Incidental Germline Mutations in Patients With Advanced Solid Tumors Who Underwent Cell-Free Circulating Tumor DNA Sequencing*. *J Clin Oncol*, 2018. **36**(35): p. Jco1800328.
  17. Heuser, M., F. Thol, and A. Ganser, *Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential*. *Deutsches Arzteblatt Online*, 2016.

## ABSTRACT

### Detection of circulating tumor DNA from esophageal squamous cell carcinoma and NGS analysis of genetic variants

Hanmil Jang

*Department of Medicine  
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Jong-rak Choi)

**Background** Esophageal cancer is cancer without an effective diagnostic method other than endoscopy, and nodal metastases often go undetected in radiological testing. Circulating tumor DNA (ctDNA) is a prospective biomarker for diagnosing and monitoring esophageal cancer, currently being tested for its clinical application.

**Method** We obtained blood samples from 49 patients who underwent surgical treatment for esophageal squamous cell cancer (ESCC) We performed ctDNA analysis with a next-generation sequencing panel targeting 27 genes related to ESCC, on blood samples collected preoperatively and postoperatively. We evaluated each somatic variant on its clinical significance and its correlation with clinical variables of patients. Variant classification was performed according to the 2017 Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists (AMP/ASCO/CAP) guidelines.

**Result** Tier 1/2 variants were detected from 20 initial samples out of 49 patients (40.8%). Among 27 genes, *TP53* showed the highest detection rate (20%), a finding consistent with previous reports. Most variants were single nucleotide variants (SNVs), with small insertion or deletion consisting only a tiny proportion of variants. Of all SNVs, the most common base change was C>T (60%). Cochran-Armitage trend test revealed significant difference in detection rate between stages of disease ( $p = 0.016$ ) and nodal invasion levels ( $p = 0.008$ ). Follow-up tests demonstrated increasing variant allele frequency patterns of tier 1/2 variants among 7 out of 8 patients with disease recurrence. A rare case has also been discovered carrying a germline pathogenic variant (*CDKN2A* R87W).

**Conclusion** The NGS analysis of ctDNA can contribute to the diagnosis and monitoring of ESCC, ensuring the efficiency of testing by utilizing a customized gene panel.

---

Key Words : esophageal squamous cell cancer, next-generation sequencing, circulating tumor DNA