

갑상선 수질암 조직에서 RET 원암유전자의 돌연변이 양상

연세대학교 의과대학 외과학교실, 병리학교실*

정웅운 · 송현정 · 조남훈* · 박정수

= Abstract =

RET Proto-Oncogene Mutation in Medullary Thyroid Carcinoma

Woong Youn Chung, M.D., Hyeun Jung Song, M.D.,
Nam Hoon Cho, M.D.,* Cheong Soo Park, M.D.

Department of Surgery and Pathology,* College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea

Background : The molecular pathogenesis of hereditary medullary thyroid carcinoma is well known to be associated with germ-line mutation in the RET proto-oncogene and sporadic medullary thyroid carcinoma has been shown to carry somatic RET mutation especially in exon 13 and 16. The aim of this study is to evaluate the genetic background in the pathogenesis of the sporadic medullary thyroid carcinoma which shows extremely high incidence in Korea.

Materials and Methods : Direct DNA sequencing for RET exon 13 and 16, as well as immunohistochemical assay for a monoclonal RET antibody were performed from 20 cases of archival tissues of medullary thyroid carcinoma.

Results : Monoclonal RET antibody with C-terminal epitope showed comparatively stronger expression in tumor cells than in normal tissues and immunoreactive area in the tumor was $66.0 \pm 40.1\%$. Direct sequencing of RET exon 13 revealed 4 cases of mis-sense mutations in Codon 778, Codon 767, and both in Codon 768 and 778. One case showed a silent mutation (ACG-ACT) in RET exon 16 (Codon 926).

Conclusions : The strong RET immunoreactivity of medullary thyroid carcinoma may suggest that there could be a genetic alteration in oncoprotein level. RET proto-oncogene mutation may be involved in the evolutionary process of medullary thyroid carcinoma in the aspect of molecular basis.

KEY WORDS : Medullary thyroid carcinoma · RET proto-oncogene · Immunohistochemical assay · Direct DNA sequencing.

서 론

갑상선 수질암은 1959년 Hazard, Hawk, Crile에 의하여 독특한 갑상선 질환으로서 처음 기술된 바 있으며¹⁾, 다른 갑상선 암과는 달리 임상 양상이 다양하게 발현된다. 즉, 갑상선 수질암은 조직학적으로 parafollicular C-cell에서 기원하여 칼시토닌을 과다생성, 분비함으로써 진행암인 경우

에는 경부 종괴 이외에도 안면홍조 및 설사와 같은 증상을 나타낼 수 있으며, 칼시토닌 이외에도 CEA, histamine, neuron-specific enolase, somatostatin, serotonin, chromogranin, substance-p, adrenocortical-releasing hormone 등을 분비하여 이에 의한 임상 증상이 나타날 수 있다^{2,3)}. 80% 가량은 산발형 (sporadic form)으로 나타나지만, 약 20%에서는 상염색체 우성의 유전 성향을 보이는 유전형 (hereditary form)으로 발현되는데, 유전형은 MEN (multiple endocrine neoplasia) 2A, MEN 2B 및 non-MEN의 가족형 수질암으로 분류할 수 있으며, 특징적인 임상 양상이 복합적으로 발현된다^{4,5)}.

많은 연구를 통하여 유전형 갑상선 수질암의 발생기전이

교신저자 : 박정수, 120-749 서울 서대문구 신촌동 134
연세대학교 의과대학 외과학교실
전화 : (02) 361-5540 · 전송 : (02) 313-8289
E-mail : ysurg@yumc.yonsei.ac.kr

대상 및 방법

RET 원암유전자의 mis-sense mutation으로 밝혀졌는데, 현재까지 RET proto-oncogene의 mutation이 밝혀진 부위(codone)는 다양하여 exon 10(codon 609, 611, 618, 620), exon 11(codon 634, 635, 637), exon 13(codon 768, 790, 791), exon 14(codon 804), exon 15(codon 883, 891), exon 16(codon 918, 922) 등에서 발견되었다. 그러나 호발부위로 알려진 부위는 MEN 2A type과 familial non-MEN familial type에서는 RET gene product의 extracellular ligand-binding domain에 있는 cystein residue를 특이화 시키는 역할을 하는 부위 즉, axon 10의 codon 609, 611, 618, 620 및 axon 11의 codon 634에서 가장 많이 mutation이 발견되었으며, 이에 비해 MEN 2B type은 intracellular tyrosin kinase domain에 있는 axon 16의 codon 918에서 mutation이 많이 발견되었다⁶⁻¹⁰.

한편, 일부 연구에서는 산발형에서도 RET 원암유전자의 돌연변이가 exon 13(Codon 768)과 exon 16(Codon 918, Codon 975)에서 존재함을 보고하여 산발형의 수질암 발생과정에도 관여하는 것으로 밝혀졌다⁸⁾¹¹⁻¹⁶.

이 같은 연구결과를 토대로 이미 미국, 유럽, 일본 등의 선진국에서는 다양한 방법으로 갑상선 수질암 환자는 물론 발생위험도가 높은 직계가족에게 혈액검체를 이용한 유전학적 검사를 실시하고 있는데 정확한 진단을 통해 유전형 및 산발형 수질암의 조기진단 및 적절한 치료가 가능하게 되어 수술적 치료외에 다른 보조치료법의 치료효과가 없는 수질암의 치료율을 높일 수 있게 되었다¹⁷⁻¹⁹.

한편, RET 단클론항체에 대한 면역조직화학염색 분석은 신경조직기원 종양 및 선천성 거대결장에 대한 연구²⁰에서는 다수 있지만 갑상선 수질암에서의 연구는 매우 드물다.

아직까지 국내에서는 갑상선 수질암의 발생빈도가 매우 낮고 유전형이 극히 적어 RET 원암유전자에 대한 유전학적 연구는 물론 임상연구도 매우 드물고 단편적이었다. 그러나 점차 갑상선 수질암의 유전학적 배경에 대한 인식도 및 유전학적 검사의 중요성이 높아짐에 따라 이에 대한 체계적인 연구의 필요성이 높아지게 되었다.

이에 본 연구자는 갑상선 수질암의 RET 원암유전자에 대한 유전학적 검사의 기초자료로서 또한 국내 갑상선 수질암 발생의 유전학적 배경을 파악하기 위해 파라핀에 포매된 갑상선 수질암 조직을 대상으로 RET 단클론 항체를 이용한 면역조직화학염색과 산발형에서 돌연변이의 발견 빈도가 높은 것으로 알려진 exon 13과 exon 16에 대한 direct DNA sequencing analysis를 시행하여 RET 암단백 수준에서의 발현도와 RET 원암유전자의 돌연변이 여부를 알아보고자 하였다.

1. 연구대상

1986년 1월부터 2001년 7월까지 본원에서 갑상선 수술암으로 수술적 치료를 받은 총 36예 중에서 파라핀에 포매된 조직의 보관상태가 양호한 20예의 병소 및 인접 정상조직이 포함된 파라핀에 포매된 조직을 대상으로 하였다.

2. 임상병리학적 특성

대상환자의 연령, 성별, 가족력, 종괴의 크기, TNM 병기, 추적관찰 기간중 재발 및 원격전이 여부, 사망 등의 임상병리학적 특성을 조사하였다.

3. 광학현미경적 검색

10% 중성 포르말린에 고정 후 파라핀에 포매하여 보관된 블록을 연속 절편하여 hematoxylin-eosin 염색을 하여 세포밀도, 종양내 괴사여부 등을 관찰하여 면역조직화학염색 및 DNA 추출에 적합한지를 알아보았으며, 종양이 많이 포함되고 파라핀 포매조직의 보관상태가 양호한 부위를 선택하였다.

4. RET 항체에 대한 면역조직화학염색법

파라핀에 포매된 조직을 3um 두께로 절단한 후 탈파라핀과 함수과정을 거쳐 3% 과산화수소수(LSAB universal kit, DAKO, Carpinteria, CA)로 세포 내에 존재하는 페록시다제 활성도를 제거하였다. 조직항원이 잘 노출될 수 있도록 Pepsin용액(Bimoda Corporation, Foster, CA, USA)을 조직 위에 4분간 부치하였다. 조직항원과 항체간의 반응에 있어서 비특이적 결합을 억제하기 위하여 Tissue conditioner 용액(LSAB universal kit, DAKO, Carpinteria, CA)을 15분간 부치한 후, citric acid buffer(pH 6.0)에 침수시킨 체로 15분간 microwave(700W)에 처리한 후 RET 단클론 항체(Mab ; RET01, C-term epitope, Neomarker, CA)를 PBS buffer에 1 : 250으로 희석하여 각 절편에 실온에서 약 30분간 반응시킨 후 4°C에서 12시간 정도 부치하였다. Link antibody(LSAB universal kit, DAKO, Carpinteria, CA)를 조직위에 5분간 부치한 후 Streptavidine과 Tris/Hcl buffer(LSAB universal kit, DAKO, Carpinteria, CA)를 60 : 1로 희석하여 4분간 부치하였다. 페록시다제의 역가를 증가시키기 위해 페록시다제 enhancer(Biomedica Corporation, Foster, CA, USA) 처리 후 발색제로 AEC Chromogen(3-Amino-9-ethylcarbazole)을 10분간 부치한 후 Hematoxylin으로 대조염색을 시행하였다. 염색의 전 과정에서 완충액은 10×immunoassay buffer(Biomedica Corporation Foster, CA, USA)을 사용하였다.

음성 대조군으로는 RET 단클론 항체와 동량의 sub-type-matched normal mouse IgG를 반응시킨 조직으로 하였으며, 양성 대조군으로는 정상 장내 신경절 조직으로 하였는데, 세포질내에만 염색이 된 경우만을 유의한 것으로 판정하였다.

각 조직의 항체에 대한 발현도는 저배율에서 염색된 세포가 많은 부위를 확인한 후 고배율($\times 200$)에서 무작위로 5 부위를 검색하여 각 부위별 발현된 영역을 백분율로 측정(양성반응 영역 백분율) 한 후 평균치를 구하였다.

5. Direct DNA sequencing analysis

1) Microdissection을 이용한 DNA 유전자 추출²¹⁾

H & E stain 된 조직 slide를 검색하여 채집할 부위를 찾은 후 phenol-chloroform과 commercial Kit(QIAamp tissue kit)를 이용하여 Genomic DNA를 추출하였는데 먼저 파라핀에 포매된 조직을 $3\mu\text{m}$ 두께로 절단한 후 탈파라핀과정을 거쳐 H & E 염색 후 광학현미경적 검색을 통해 조직 채취에 적합한 부위를 조직슬라이드 뒷면에 표시한다. 표시된 부위의 조직을 18G 주사기바늘로 긁어낸 후 멸균처리된 튜브에 TE-9 buffer를 담고 긁어낸 조직을 넣은 후 15분간 실온에 보관한다. 45ml proteinase K 첨가한 후 55°C 에서 12~18시간, 100°C 에서 15분간 가열한다. PC-9 용액(480ml phenol, 320ml TE-9, 640ml chloroform)으로 추출한 후 15분간 원심분리한다. 2 l glycogen(20g/ml)과

200ml 5 M ammonium acetate를첨가한 후 900ml 100% 알코올을 첨가시킨다. 10분간 centrifuge한 후 상층액을 제거한 후 70% 알코올로 2회 세척한다. 침전물을 실온에서 건조시켜 알코올을 완전히 제거한 후 lo TE완충액으로 재부유시킨 후 4°C 에서 냉장 보관한다.

2) Direct DNA sequencing²²⁾

RET 원암유전자 부위를 PCR을 이용하여 amplification 시켰는데, RET exon 13은($95^\circ\text{C}\times 15\text{min} + [94^\circ\text{C}\times 1\text{min} + 63^\circ\text{C}\ 1\text{min} + 72^\circ\text{C}\ 1\text{min}] \times 35\text{cycles}$) 조건하에서, RET exon 16은($95^\circ\text{C}\times 15\text{min} + [94^\circ\text{C}\times 1\text{min} + 57^\circ\text{C}\times 1\text{min} + 72^\circ\text{C}\times 1\text{min}] \times 35\text{cycles}$) 조건 하에서 시행하였다. Exon 13(254bp)의 primer sequence는 X13FW GCAGGCC-TCTCTGTCTGAACTT, X13RV GGAGAACAGGGC-TGTATGGA 이었으며, exon 16(192bp)의 primer sequence는 918FW AGGGATAGGGCCTGGGCTT, 918 RV TAACCTCCACCCCAAGAG 이었다.

Sequence 분석은 Applied Biosystems Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit(Perkin Elmer Corp., Norwalk, CT)를 이용하여 시행하였다. Cycle sequencing의 산물은 6% Long Ranger gel을 이용해 전기영동 시켰으며, Applied Biosystems Prism Model 310 automated DNA sequencer(Perkin-Elmer)를 이용하여 돌연변이 여부를 분석하였다.

Table 1. Clinicopathological characteristics of the patients

No	Sex	Age	Familial History	TNM Stage	Persistent hypercalcitoninemia	Cervical LN recurrence	Distant Metastasia	Death
1	F	52	-	III	+	-	Lung	-
2	M	40	-	III	-	-	-	-
3	M	43	-	III	+	-	-	-
4	F	46	-	II	+	+	-	-
5	M	57	-	II	-	-	-	-
6	F	58	-	III	-	-	-	-
7	M	40	-	III	+	+	-	-
8	F	58	-	III	+	+	Bone, liver	+
9	F	34	-	III	-	-	-	-
10	F	58	-	II	-	-	-	-
11	M	46	-	III	+	-	-	-
12	F	54	-	II	-	-	-	-
13	F	48	-	II	-	-	-	-
14	F	48	-	III	+	-	-	-
15	M	41	+	II	-	-	-	-
16	F	71	-	III	-	-	-	-
17	F	54	-	III	+	+	-	-
18	M	32	+	II	-	-	-	-
19	F	51	-	III	+	+	-	-
20	M	50	-	III	-	-	-	-

6. RET 원암유전자의 돌연변이에 따른 종양의 악성도, RET 항체에 대한 면역조직화학적 발현도의 상관성 분석

RET 원암유전자의 돌연변이에 따른 TNM 병기, 지속적인 고칼시토닌혈증 빈도, 재발여부, RET 항체에 대한 면역조직화학적 발현도의 차이를 분석하였다.

7. 자료의 분석 및 통계처리

RET 항체에 대한 양성반응 영역 백분율은 평균±표준오차로 표시하였으며, 통계분석은 SPSS 8.0 프로그램을 이용하여, Student t-test 및 Mann-Whitney U test를 시행하였다. 모든 경우에 p값이 0.05 이하를 통계적으로 유의한 수준으로 판정하였다.

결 과

1. 임상병리적 특성 (Table 1)

대상환자들의 남녀비는 8 : 12 이었고, 평균연령은 49.0세 (32.0~71.0세) 이었으며, 가족력은 2예에서 있었는데 1

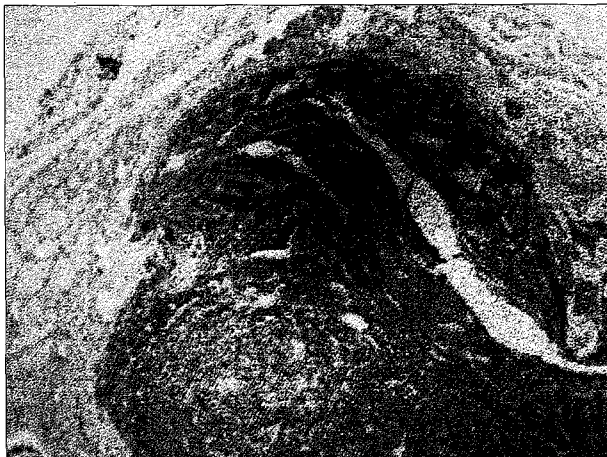


Fig. 1. Immunohistochemical staining for monoclonal RET in medullary thyroid carcinoma (×40).



Fig. 2. Tumor-specific RET immunoreactivity (×100). A : amyloid.

예 (Patient 15)는 어머니가 갑상선암이었고, 1예 (Patient 18)은 형이 갑상선 수질암이며 임상적으로 MEN IIa가 의심되었다.

종양의 다발성이 3예 (15.0%), 양측성이 2예 (10.0%)에
서 있었으며, 원발 병소의 평균크기는 3.1cm (0.5~6.0cm)
이었다. 경부 림프절 전이는 13예 (65.0%)에서 있었으며,
TNM 병기는 2기가 7예, 3기가 13예 (65.0%) 이었다. 갑상
선 전절제술은 19예, 아전절제술은 1예에서 시행하였고 측
경부림프절 청소술은 12예 (60.0%)에서 시행되었다. 수술후
항암약물치료와 외부방사선조사 치료는 각각 1예에서 시행
되었다. 추적관찰 기간 중 지속적인 고칼시토닌혈증은 9예
(45.0%), 원격전이는 2예, 측경부 림프절 재발은 5예에서
있었으며, 사망은 1예에서 있었다.

2. RET 항체의 면역조직화학적 발현도

면역조직화학염색에 양성을 보인 세포들은 세포질내에 황
갈색의 염색양상을 보였으며 (Fig. 1), 암세포에 특이하게 염
색되는 양상을 보였다 (Fig. 2).

면역조직화학염색에 대한 양성반응 영역백분율은 0.0%
에서 100.0% 까지 다양하였으며 (Table 2), 양성반응 영역
백분율은 66.0±40.1% 이었다.

3. Direct DNA sequencing analysis

5예 (25.0%)에서 돌연변이가 발견되었는데, RET exon 13
에 대한 DNA 염기배열분석 상 Codon 778에서 2예, Codon
767 (Fig. 3), Codon 768에서 각각 1 예씩, 총 4예에서 mis-
sense mutation이 발견되었다. RET exon 16에 대한 분석
결과상에서는 1예에서 Codon 926에서의 silent mutation
(ACG-ACT)이 발견되었다. 유전형이 의심되었던 2예에서
는 RET exon 13 및 exon 16 모두에서 돌연변이가 발견되
지 않았다.

Table 2. RET immunoreactivity of Medullary thyroid carcinoma

Area of immunoreactivity (%)	Patients No.	(%)
0.0	2	10.0
1.0-10.0	2	10.0
11.0-20.0	1	5.0
21.0-30.0	1	5.0
31.0-40.0	1	5.0
41.0-50.0	-	0.0
51.0-60.0	1	5.0
61.0-70.0	-	0.0
71.0-80.0	2	10.0
81.0-90.0	1	5.0
91.0-100.0	9	45.0
Total	20	100.0

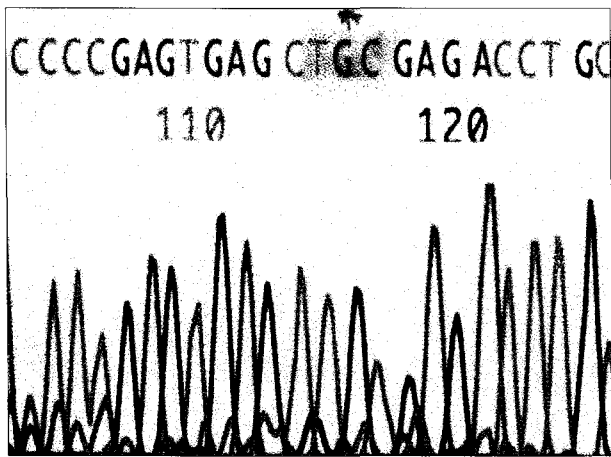


Fig. 3. A mis-sense mutation in Codon 767, a change to TGC (Cystein) from TTC (Phe).

Table 3. TNM stage, persistent hypercalcitoninemia, recurrence and RET immunoreactivity by RET proto-oncogene mutation

	RET proto-oncogene mutation		p-value
	Positive (n=5)	Negative (n=15)	
TNM stage II (n=7)	1	6	NS*
III (n=13)	4	9	NS*
Persistent (n=9)	2	7	NS*
Hypercalcitoninemia			
Recurrence (n=6)	2	4	NS*
RET immunoreactivity**	80.0±44.7	61.3±38.9	NS*

* : Not Significant, p>0.05

** : Area immunoreactivity (%), mean±SD

4. RET 원암유전자 돌연변이에 따른 종양의 악성도, RET 항체에 대한 면역조직화학적 발현도의 상관성

RET 원암유전자 돌연변이에 따른 TNM 병기, 지속적 고칼시토닌혈증 빈도, 재발여부는 통계학적으로 유의한 차이가 없었으며, RET 항체에 대한 면역조직화학적 발현도는 돌연변이가 있었던 경우가 없었던 경우보다 높았으나 마찬가지로 통계학적으로 유의한 차이는 없었다(Table 3).

고 찰

갑상선 수질암은 칼시토닌 생성 parafollicular C-cell에서 기원하며 전체 갑상선암의 5~10%를 차지한다²⁾³⁾. 80% 가량은 산발형(sporadic form)으로 나타나지만, 약 20%에서는 상염색체 우성의 유전 성향을 보이는 유전형(hereditary form)으로 발현되는데, 유전형은 MEN(multiple endocrine neoplasia) 2A, MEN 2B 및 non-MEN의 가족형 수질암으로 분류할 수 있으며, 특징적인 임상 양상이 복합적으로 발현된다⁴⁾⁵⁾. 남녀 성별로는 대체로 차이가 없으나 여성에서 약간 호발하며, 연령별로는 산발형은 50~60대에서 주로 발견되나, MEN 2B는 신생아 내지 어린이에서, MEN 2A는

20대 초반에서 대개 발견된다²⁻¹⁰⁾. 증상은 경부종괴 외에도 진행암인 경우에는 칼시토닌을 과다생성, 분비함으로써 안면홍조 및 설사와 같은 증상을 나타낼 수 있다. 산발형은 양측성, 다발성이 20~30% 정도이며, 유전형은 90% 이상에서 양측성 혹은 다발성을 보인다²⁻⁵⁾. 대개 50% 이상에서 경부림프절 전이소견을 보이고 골, 폐, 간 등으로의 원격전이율은 10% 정도이다. 일반적인 진단은 MEN인 경우는 특징적인 임상표현형만으로도 알 수 있지만 세침흡입세포검사를 하면 수술전에 진단이 내려질 수 있다. 특히 조직학적 소견과 흡입표본을 immunoperoxidase method로 칼시토닌을 증명하면 진단은 확실해 진다. 그 외에도 기초 혈청 칼시토닌의 증가 및 pentagastrin 자극검사를 통한 칼시토닌 증가를 확인할 수 있다²⁻⁵⁾. 치료는 항암약물치료 및 외부방사선조사치료의 치료효과가 거의 없으므로 수술적 완전 절제가 가장 중요한데 일반적으로 높은 양측성 및 다발성을 고려하여 갑상선 전절제술을 모든 경우에 시행하며 중앙경부림프절 청소술을 기본적으로 실시한다²⁻⁵⁾²³⁾. 측경부 림프절에 대한 광범위 경부림프절 청소술은 아직까지는 임상적으로 전이 증거가 있는 경우에만 시행하는 치료적 접근법을 이용하나 여러 연구에서 수술후 재발 및 지속적인 고칼시토닌혈증의 가장 중요한 원인이 림프절 전이에 의한 것으로 보고해 일측 혹은 양측으로 예방적 광범위 경부 림프절 청소술을 시행해야 한다고 주장하고 있다³⁾²³⁾. 예후는 non-MEN 가족형, 산발형, MEN 2A, MEN 2B 순으로 좋은데 10년 생존율은 대개 40~95%로 보고되었다²⁻⁵⁾.

본 연구의 대상환자들은 유전형이 의심되었던 경우가 단지 2예로 대부분이 산발형에 해당이 되었는데, 남녀비는 8 : 12로 여성에서 호발하였으며, 평균연령은 49.0세(32.0~71.0세) 이었다. 종양의 다발성은 15.0%, 양측성은 10.0%로 기존의 보고와 큰 차이는 없었고, 경부 림프절 전이율은 65.0%로 높았으며, TNM 병기상 대부분(n=13) 3기에 해당되었다. 수술은 19예에서 갑상선 전절제술이 시행되었고, 광범위 경부 림프절 청소술은 12예(60.0%)에서 시행되었다. 추적관찰 기간 중 지속적인 고칼시토닌혈증은 9예(45.0%), 원격전이는 2예, 국소 재발은 5예에서 있었는데 모두 측경부 림프절에서의 재발이었고, 사망은 1예(5.0%)에서 있었다.

갑상선 수질암의 발생기전은 RET 원암유전자의 돌연변이가 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌는데, 유전형에서는 100%에서 RET 원암유전자의 germ line mutation에 의해 발생하며 C-cell hyperplasia 단계를 거쳐 대개 30대 이전에 발병하게 되고, 산발형에서도 RET 원암유전자의 후천적인 somatic mutation이 25~85%에서 발견되어 암발생의 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다⁶⁻¹⁶⁾. 현재까지 RET proto-oncogene의 mutation이 밝혀진 부위는 다양하여 exon 10, exon 11, exon 13, exon 14, exon 15, exon 16

의 여러 codon에서 발견되었는데, MEN 2A type과 familial non-MEN type은 주로 axon 10의 codon 609, 611, 618, 620 및 axon 11의 codon 634에서 mutation이 발견되었으며, MEN 2B type은 axon 16의 codon 918에서 mutation이 많이 발견되었다. 산발형에서는 주로 exon 13 (Codon 768)과 exon 16(Codon 918, Codon 975)에서 RET 원암유전자의 돌연변이가 발견되었다⁶⁻¹⁶⁾. 1998년 Shan 등은 중국과 일본의 산발성 갑상선 수질암 조직을 이용하여 RET exon 16의 codon 918에서의 돌연변이를 알아보았는데 각각 돌연변이가 발견율이 35%와 30%로 대동소이한 결과를 보였다¹¹⁾.

본 연구에서는 5예(25.0%)에서 돌연변이가 발견되었는데 RET exon 13의 Codon 778, Codon 767, Codon 768에서 RET exon 16의 Codon 926에서 돌연변이가 발견되어 기존에 많이 발견되었던 exon 13의 codon 768에서도 발견되었지만 Codon 778, Codon 767에서도 발견되었으며, 특히 exon 16의 호발부위인 codon 918이 아닌 codon 926에서 발견되어 기존의 보고와 약간의 차이를 알 수 있었다. 또한, 유전형이 의심되었던 2예에서는 산발형에서 돌연변이가 발견율이 높은 RET exon 13 및 exon 16 모두에서 돌연변이가 발견되지 않았는데 이는 유전형에서의 돌연변이가 높은 exon 10, exon 11에서 검사시 발견 가능성이 있을 것으로 생각된다.

한편 일부 연구에서는 산발형에서 RET 원암유전자의 돌연변이, 특히 exon 16의 codon 918에서의 돌연변이가 존재가 불량한 예후를 예측할 수 있는 척도가 될 수 있다고 주장하였는데, Zedenius 등¹⁵⁾은 산발성 수질암에서 codon 918에서의 돌연변이의 존재는 원격전이와 재발과 관련되어 예후가 불량하다고 보고한 바 있으며, Romei 등¹³⁾도 이와 비슷한 보고를 하였다. 이에 반해 Marsh 등¹⁴⁾은 exon 16의 codon 918에서의 돌연변이 존재는 진단시 연령, 원격전이, 사망률, 칼시토닌 수치변화와 특별한 연관성이 없다고 주장하였고, Komminoth 등¹⁶⁾도 임상경과 및 생존율과 연관성이 없었다고 주장하여 상반된 주장을 하였다.

본 연구에서도 exon 13과 exon 16에서 돌연변이가 발견되었던 예와 돌연변이가 없었던 예에서 종양의 악성도에 따른 TNM 병기, 지속적 고칼시토닌혈증 빈도, 재발여부를 비교하였으나 통계학적으로 유의한 차이가 없었다.

이미 미국, 유럽, 일본 등의 선진국에서는 이 같은 갑상선 수질암에서의 RET 원암유전자의 유전학적 배경을 임상적으로 수질암의 진단 및 치료에 광범위하게 활용하고 있는데, 갑상선 수질암에 대한 유전학적 검사의 의의는 다음과 같다.

첫째, 갑상선 수질암의 발견빈도를 높힐 수 있다는 점이다, 즉, 유전학적 검사가 이미 보편화된 유럽 및 미국에서는

갑상선 수질암의 빈도를 전체 갑상선암의 5.0~10.0%로 보고하고 있는 반면, 국내의 보고는 아직 중례 보고의 수준을 벗어나지 못하고 있는 실정이다. 본원에서 1986년부터 2001년 7월까지 경험한 갑상선 수질암은 총 36예로 전체 갑상선암의 1.7%이며, 2000년 성균관대의대 삼성서울병원의 보고도 약 1.7%(n=18)로서 서구의 발생빈도와 많은 차이를 보이고 있다. 일본의 보고에서도 전체 갑상선암의 1.5%로서 나타났지만 유전학적 검사가 보편화된 이후에는 진단율이 많이 높아졌다고 주장하고 있다. 따라서, 이같이 서구와의 발생빈도의 차이의 원인은 인종적인 차이 이외에도, 유전학적 검사를 통한 수질암의 발견 빈도의 차이가 관여하였을 가능성이 높다.

둘째는, 산발형과 유전형의 정확한 감별을 통해 치료의 효용성이 높아질 수 있다. 산발형은 암종의 다발성, 양측성이 20~30%인 반면, 유전형 90~100%가 다발성, 양측성으로 알려져 있어, 유전형인 경우는 반드시 갑상선 전절제술을 시행하는 것으로 되었으며, 유전형 중 MEN 형은 갈색세포종, 부신기능항진증, 등의 동반질환이 존재하므로 이에 대한 치료도 같이 시행하여야 한다. 실제로 산발형으로 생각되었던 수질암 환자들이 상당수가 유전학적 검사를 통해 RET 원암유전자의 돌연변이가 밝혀짐에 따라 여러 가지 추가 진단과정을 거쳐 MEN 2A로 확진되어 효과적인 치료를 받았다는 보고가 있다²⁴⁾. 또한, 유전학적 검사를 통해 RET 원암유전자의 돌연변이가 없어 산발형으로 진단되고 종괴가 일측엽에만 존재하면 갑상선 전절제술이 아닌 일측엽 절제술로 충분하다는 주장도 있다.

셋째로는, 수질암의 조기발견 및 조기치료를 가능하게 하여 암치료를 높힐 수 있다. 유전학적 검사의 대상은 수질암으로 진단된 환자는 물론 유전적 성향을 고려하여 RET 원암유전자의 돌연변이의 위험도가 높은 가족 구성원들(at-risk family members)에 대해서도 시행하는데, 조기암의 발견은 물론 종괴가 채 발생되지 않고 수질암의 전구 질환인 증식성 병변(C-cell hyperplasia) 상태에서 진단되어 조기 치료를 받을 수 있다. 즉, RET 원암유전자의 돌연변이가 있는 환자 모두에서 증식성 병변이 존재하는데, 이는 대개 30세 이전에 암으로 변하게 된다. 따라서 5세 이후에 발견시에는 발견 즉시 갑상선 전절제술을 예방적으로 시행받고, 5세 이전에 발견시에는 5세가 되면 반드시 예방적 수술을 받는 것으로 되어있다. 이처럼 종괴가 없이 증식성 병변 상태에서 수술적 치료를 받으면 예후는 월등히 좋은 것으로 되어 있다¹⁶⁻¹⁹⁾²³⁾.

이처럼 RET 원암유전자에 대한 유전학적 검사가 갑상선 수질암의 진단 및 치료를 위하여 매우 중요하므로 국내의 갑상선 수질암에 대한 진단 및 치료상의 체계적이고 획기적인 발전을 위해서는 RET 원암유전자에 대한 유전학적 연

구가 매우 필요할 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 비록 실험적으로 제한적이지만 갑상선 수질암의 파라핀에 포매된 암조직을 대상으로 국내에서 산발형의 발생빈도가 절대적으로 높은 점을 고려해 이미 산발형에서 돌연변이가 많이 보고된 exon 13과 exon 16에 대한 direct DNA sequencing analysis를 시행하여 RET 원암유전자의 돌연변이 여부를 알아봄으로써, RET 원암유전자에 대한 유전학적 검사를 위한 기초자료를 제공하고 또한 국내 갑상선 수질암 발생의 유전학적 배경을 알아보고자 하였으며, 연구 결과 25%에서 돌연변이를 확인한 바 있다.

한편, RET 단클론항체에 대한 면역조직화학염색 연구는 갑상선 수질암에서 매우 적으나, 최근, Orlandi 등²⁵⁾은 RET 단클론항체에 대한 면역조직화학염색법을 이용하여 수질-여포상 혼합암의 진단에 유용하였다고 보고하였는데, 본 연구에서도 RET 단클론 항체를 이용한 면역조직화학염색을 실시하여 높은 발현도를 확인하였다.

이 같이 본 연구에서 갑상선 수질암 조직의 RET 암단백 수준에서 높은 발현도와 높은 빈도의 RET 원암유전자 돌연변이를 확인함으로써 국내 갑상선 수질암의 발생과정에도 RET 원암유전자의 유전학적 배경이 존재함을 추측할 수 있으며, 더 나아가 유전학적 검사를 통해 갑상선 수질암의 발견빈도를 높이고, 수질암의 조기발견 및 조기치료를 가능하게 하여 암치료를 높일 수 있는 근거를 제시할 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

갑상선 수질암의 RET 원암유전자에 대한 유전학적 검사의 기초자료로서 또한 국내 갑상선 수질암 발생의 유전학적 배경을 알아보고자 20예의 파라핀에 포매된 갑상선 수질암 조직을 대상으로 RET 단클론 항체를 이용한 면역조직화학염색과 산발형에서 돌연변이의 발견 빈도가 높은 것으로 알려진 exon 13과 exon 16에 대한 direct DNA sequencing analysis를 시행하여 RET 암단백 수준에서의 발현도와 RET 원암유전자의 돌연변이 여부를 알아본 결과 다음의 결론을 얻었다.

1) 면역조직화학염색에 대한 양성반응 영역백분율은 66.0±40.1%로 높은 발현도를 보였다.

2) 5예(25.0%)에서 돌연변이가 발견되었는데, RET exon 13에 대한 DNA 염기배열분석 상 Codon 778에서 2예, Codon 767, Codon 768에서 각각 1 예씩, 총 4예에서 mis-sense mutation이 발견되었다. RET exon 16에 대한 분석 결과상에서는 1예에서 Codon 926에서의 silent mutation (ACG→ACT) 이 발견되었다.

3) RET 원암유전자 돌연변이에 따른 TNM 병기, 지속

적 고칼시토닌혈증 빈도, 재발여부, RET 항체에 대한 면역조직화학적 발현도는 모두 통계학적으로 유의한 차이가 없었다(p>0.05).

결론적으로 비록 본 연구가 파라핀에 포매된 조직을 이용하였고, 전체적인 DNA 염기배열분석이 아닌 단지 exon 13과 exon 16에 대한 연구이기에 그 한계성은 있었지만 갑상선 수질암 조직의 RET 암단백 수준에서 높은 발현도와 5예에서의 RET 원암유전자 돌연변이의 존재를 확인함으로써 국내 갑상선 수질암의 발생과정에도 RET 원암유전자의 유전학적 연관성을 추측할 수 있었으며, 유전학적 검사를 통한 조기 진단 및 효율성 있는 치료를 시행할 수 있는 근거를 제시할 수 있을 것으로 생각된다.

중심 단어 : 갑상선 수질암 · 면역조직화학염색 · 직접 DNA 염기서열검사.

References

- 1) Hazard JB, Hawk WA, Crile G Jr : *Medullary (solid) carcinoma of the thyroid ; a clinicopathologic entity. J Clin Endocrinol Metab.* 1959 ; 19 : 152-161
- 2) Pommier RF, Brennan MF : *Medullary thyroid carcinoma. Endocrinologist.* 1992 ; 2 : 393-405
- 3) Marsh DJ, Learoyd DL, Robinson BG : *Medullary thyroid carcinoma : recent advances and management update. Thyroid.* 1995 ; 5 : 407-424
- 4) Sipple JH : *The association of pheochromocytoma with carcinoma of the thyroid gland. Am J Med.* 1961 ; 31 : 163-166
- 5) Chong GC, Beahrs OH, Sizemore GW, Woolner LH : *Medullary carcinoma of the thyroid gland. Cancer.* 1975 ; 35 : 695-704
- 6) Donis-Keller H, Dou S, Chi D : *Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. Hum Mol Genet.* 1993 ; 2 : 851-856
- 7) Mulligan L, Kwok J, Healy C : *Germ-line mutations of the RET protooncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A (MEN 2A). Nature.* 1993 ; 363 : 458-464
- 8) Hofstra RM, Landsvater RM, Ceccherini I, et al : *A mutation in the RET proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2A and sporadic medullary thyroid carcinoma. Nature.* 1994 ; 367 : 375-376
- 9) Eng C, Smith DP, Mulligan LM, et al : *A novel point mutation in the tyrosin kinase domain of the RET proto-oncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma and in a family with FMTC. Oncogene.* 1995 ; 10 : 509-513
- 10) Shirahama S, Ogura K, Takami H, et al : *Mutational analysis of the RET proto-oncogene in 71 Japanese patients with medullary thyroid carcinoma. J Hum Genet.* 1984 ; 43 : 101-106
- 11) Shan L, Nakamura M, Nakamura Y, et al : *Somatic mutation in the RET protooncogene in Japanese and Chinese sporadic medullary thyroid carcinoma. Jpn J. Cancer Res.* 1998 ; 89 : 883-886

- 12) Maeda S, namba H, takamura N, et al : *A single missense mutation in codon 918 of the ret proto-oncogene in sporadic medullary thyroid carcinomas. Endocr J. 1995 ; 42 : 245-250*
- 13) Romei C, Elisei R, Pinchera A, et al : *J Clin Endocrinol Metab. 1996 ; 81 : 1619-1622*
- 14) Marsch DJ, Learoyd DL, Andrew SD, Krishnan L, Pojer R, Richardson AL : *Somatic mutation in the ret proto-oncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma. Clin Endocrinol. 1996 ; 44 : 249-257*
- 15) Zedenius J, Larsson C, Bergholm U, et al : *Mutation of codon 918 in the ret proto-oncogene correlate to poor prognosis in sporadic medullary thyroid carcinomas. J Clin Endocrinol Metab. 1995 ; 80 : 3088-3090*
- 16) Komminoth P, Muletta-Feurer S, Saremaslani P, et al : *Molecular diagnosis of multiple endocrine neoplasia (MEN) in paraffin-embedded specimen. Endocr Pathol. 1995 ; 6 : 267-278*
- 17) Wells SJ, Chi D, Toshima K : *Predictive DNA testing and prophylactic thyroidectomy in patients at risk for multiple endocrine neoplasia type 2A. Ann Surg. 1994 ; 220 : 237-242*
- 18) Thomas PM, Gagel RF : *Advances in genetic screening for multiple endocrine neoplasia type 2 and the implications for management of children at risk. Endocrinologist. 1994 ; 4 : 140-146*
- 19) Calmettes C, Ponder BAJ, Fischer JA, Raue F, and the members of the European Community Concerted Action : *Medullary Thyroid Carcinoma. Early diagnosis of the multiple endocrine neoplasia type 2 syndrome : consensus statement. Eur J Clin Invest. 1992 ; 22 : 775-760*
- 20) Martucciello G, Fevre A, Takahashi M, Jasonni V : *Immunohistochemical localization of RET protein in Herschprung's disease. J Ped Surg. 1995 ; 30 : 433-436*
- 21) Moskaluk CA, Kern SE : *Microdissection and polymerase chain reaction amplification of genomic DNA from histological tissue sections. Am J Pathol. 1997 ; 150 : 1547-52*
- 22) Jhiang SM, Fithian L, Weghorst CM, Chark OH, Faliko JM, O'Dorisio TM, Mazzaferri EL : *RET mutation screening in MEN2 patients and discovery of a novel mutation in a sporadic medullary thyroid carcinoma. Thyroid. 1996 ; 6 : 115-121*
- 23) Russell CF, van Heerden JA, Sizemore GW, et al : *The surgical management of medullary thyroid carcinoma. Ann Surg. 1983 ; 197 : 42-48*
- 24) Sizemore GW, Heath HL, Larson JM : *Multiple endocrine neoplasia type 2. Clin Endocrinol Metab 1980 ; 9 : 299-304*
- 25) Orlandi F, Chiefari E, Caraci P, et al : *RET proto-oncogene mutation in mixed medulary-follicular thyroid carcinoma. J Endocrinol Invest. 2001 ; 24 : 51-55*