

Analysis of Differential BRAF^{V600E} Mutational Status in Papillary Thyroid Carcinoma

Hye-Lim Jang¹, Tai-Jeon Kim¹, Jae-Ho Shin¹, and Chul Kim²

*Department of Biomedical Laboratory Sciences, College of Health Sciences Eulji University, Sungnam 461-713, Korea¹
Department of Pathology, Gang Nam Severance Hospital, College of Medicine, Yonsei University, Seoul 135-720, Korea²*

Papillary thyroid carcinoma (PTC) is the most common thyroid cancer, accounting for 95% or more of malignancies in Korea. Recently, many thyroid cancers have been detected owing to the widespread use of ultrasonography in health surveillance.

The objective of this study was to evaluate the association of known prognostic factors with the BRAF^{V600E} mutation and its association features in Korean patients with papillary thyroid carcinomas. The BRAF^{V600E} mutation was detected in 69.1% (256 of 370) of PTC cases. In univariate analysis, the BRAF^{V600E} mutation was significantly associated with tumor size ($p < 0.05$) and sex. However, it was not significantly associated with other established risk factors, such as age, extrathyroidal extension, and lymph node metastasis.

This finding supports the idea that the BRAF mutation plays a role in the early stage of PTC development. This relationship deserves further investigation to clarify whether BRAF^{V600E} is a useful risk factor or prognostic marker for PTC.

Key Words : Papillary thyroid carcinoma(PTC), BRAF^{V600E}, metastasis, prognostic marker

서론

갑상선암은 가장 흔한 내분비계 악성종양으로 여포성 상피에서 유래되며, 점차 발생률이 증가하고 있다. 2009년에 보고된 한국 암등록 사업 연례보고서에 의하면 위암에 이어 두 번째로 갑상선암이 전체암 중 13.1%를 차지하고 있다고 발표하고 있다(국가암등록사업 연례보고서(2007, 2009)). 특히 여성의 경우 2000년 이후 발생률이 급격히 증가하여 현재 여성에게 가장 많이 발생하는 암이 되었다. 이는 건강검진의 보편화에 따른 초음파를 이용한 갑상선 결절의 발견이

증가하면서 미세암종의 진단이 많아졌기 때문으로 사료된다. 특히 최근에는 초음파 유도하 세침흡입 검사가 널리 이용됨에 따라 아주 작은 결절인 0.5 cm 이하도 발견되어지고 있고 보다 정확한 병리학적인 검사가 뒷받침되어 점차 발병률이 늘어나고 있는 추세다.

병리학적 구별에 따라 갑상선암은 4가지 유형으로 나뉘는데, 이중 분화 갑상선암은 유두암과 여포암을 포함하여 95.6% 이상을 차지하고 있고, 미분화 갑상선암인 수질암과 역형성암은 일부에서 드물게 발견되어지고 있다(국립암센터 (2009, 2010)). 분화 갑상선암은 다른 조직에서 발생한 암에 비해 비교적 천천히 자라며 예후가 양호한 것으로 알려져 있으나, 특징적으로 유두암의 30-50%는 진단 당시에 경부 및 림프절의 전이가 있으며, 5%에서는 원격전이가 동반된다고 한다(Donohue 등, 1984; Ruegemer 등, 1988). 따라서 갑상선암의 재발 및 원격전이를 일으킬 가능성이 있는 공격성의 유두암을 저위험군의 유두암과 구별하여 적극적

Corresponding Author : 김철 (우)135-720 서울특별시 강남구 언주로 612, 연세대학교 강남세브란스병원 병리과
Tel : 017-272-2073
E-mail : crew23@hanmail.net
Received : 9 March 2012
Return for modification : 21 March 2012
Accepted : 21 June 2012

인 치료와 추적관찰을 통해 적절한 치료를 하는것이 중요하다(Fugazzola *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2003).

갑상선 유두암에서 많이 관찰되는 유전자 이상은 Raf kinase의 여러 동종형 중 B type RAF(BRAF)로 A type이나 C type보다 강력한 활성화체이다. 산발적인 유두암에서 나타나는 BRAF 돌연변이 대부분은 BRAF^{V600E} 15번째 엑손에 주로 나타나며 점 돌연변이를 보인다(Xing *et al.*, 2005). 이 돌연변이는 T1799A BRAF 혹은 BRAF^{V600E}라고 불리며, 엑손 1799번째 염기가 thymine에서 adenine으로 바뀌고, 600번째 아미노산이 valine에서 glutamic acid로 바뀌는 점돌연변이이다(Davies *et al.*, 2002).

BRAF 돌연변이 빈도는 세계적으로 29-69%로 알려져 있으나(Cahill *et al.*, 2007), 한국인 갑상선 유두암에서는 60-80%까지 검출되어 다른 지역보다 발생율이 현저히 높은 것으로 보고되고 있어 한국인에게서 발생하는 갑상선 유두암의 고위험군을 진단하는데 매우 유용한 지표라 생각된다(Kim *et al.*, 2004).

본 연구는 한국인에 특이적으로 많은 갑상선 유두암종에서 종양유전자인 BRAF^{V600E} 돌연변이의 빈도를 알아보고, 예후인자와 연관성이 있는지를 알아보려고 시행하였다.

재료 및 방법

1. 연구대상

본 연구는 2010년 1월부터 3월까지 서울 Y대학교병원에서 갑상선 유두암을 진단받고 종양 적출수술을 시행한 370예를 대상으로 하였다.

종양의 크기는 초음파 검사와는 상관없이 병리조직결과를 기준으로 측정하였다. 임상조직학적 인자는 후향적으로 의무기록을 검토하였다. 그리고 환자의 성별, 연령, 장기 및 진단을 위한 개인정보는 익명으로 처리하였으며, 유전자 정보에 대한 연구는 환자의 서면동의서를 받았다.

2. 방법

1) 병리 조직학적 분석

환자들의 진단 기록을 재검토하여 성별, 나이 등을 확인

하고 Hematoxlin-Eosin 염색을 시행한 후 종양 부분만을 따로 절취하여 DNA를 추출하였다.

2) 핵산 추출

genomic DNA는 QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Crawley, West Sussex, UK)를 사용하여 분리하였다.

3) 증폭

BRAF exon 15를 증폭 시키기 위한 정방향 primer는 5-CATAATGCTTGCTTGATAGG-3 그리고 역방향 primer는 5-GCCAAAAATTTAATCAGTGA-3를 사용하였고 exon 15의 T1799A 돌연변이 예측 부위를 중합효소 연쇄반응으로 증폭시켰다. 중합효소 연쇄반응 혼합액은 정방향, 역방향 primer 20 pmol, 0.2 mmol dNTP, 1.5 mmol/L MgCl₂, 1 x PCR buffer, 1.5 units Taq DNA polymerase를 넣어 mix한 후 template DNA 5 μL을 넣어 증폭하였다(Qiagen, Hilden, Germany).

4) 직접 염기서열 분석법

중합효소 연쇄반응 결과는 2% agarose gel을 이용하여 217bp의 크기로 증폭된 PCR product결과를 확인 하였다. 반응이 끝난 PCR product는 반응물 내에 남아있는 dNTP와 primer dimer를 제거하기 위해 purification 단계를 진행하였고 정제된 DNA는 60℃에서 30분간 완전히 건조 시키고 sequencing primer와 dye terminator인 10 μL의 HI-DI formamide를 넣고 혼합한 후에 95℃에서 denaturation시킨 후 ice에 넣어 고정시켰다. 안정된 plate는 ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems, FosterCity, CA, USA) automated capillary DNA sequencer로 분석하였다(Fig 1).

3. 통계학적 분석

통계학적 분석은 SPSS 18.0 (spss Inc. Chicago, Illinois, USA) 을 이용하여 처리하였으며 각 군간의 변수는 Chi-Square test 및 t-test를 사용하였다. p값은 0.05 미만을 유의 수준으로 하였다.

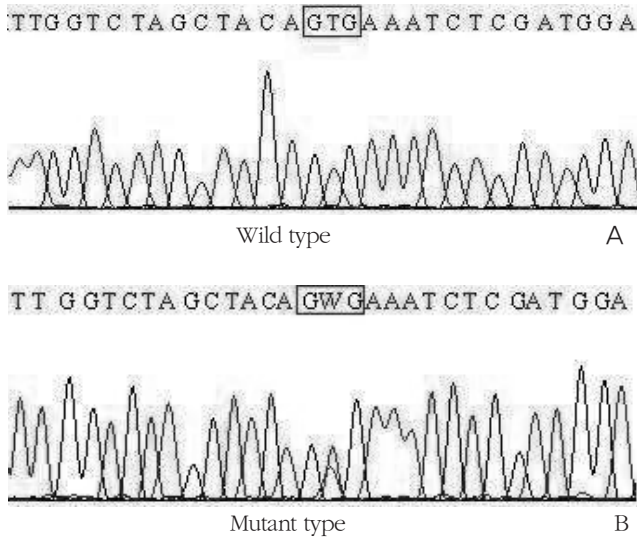


Fig. 1. Wild and mutant type sequences of codon 600 of the BRAF gene.

결 과

1. 병리 조직학적 조사

본 연구의 총 환자는 370명이었으며 여자는 289명(78.1%) 남자는 81명(21.9%)이었다. 평균 나이는 44.5세였으며 16세부터 77세까지 분포하였다. 또한 암종의 크기는 평균 0.84 cm이었으며 0.1cm부터 6.2 cm까지 분포되었다. 갑상선 외 침윤은 양성인 207명(56%), 음성인 163명(44%) 이었고, 임파절 전이 소견은 양성인 145명(39%), 음성인 225명(61%)이었다. BRAF^{V600E} 돌연변이 양성 결과는 370명 환자 중에서 256명이 검출되어 69.1%를 나타내었다(Table 1).

2. Tumor size에 따른 BRAF^{V600E} 돌연변이 검출율

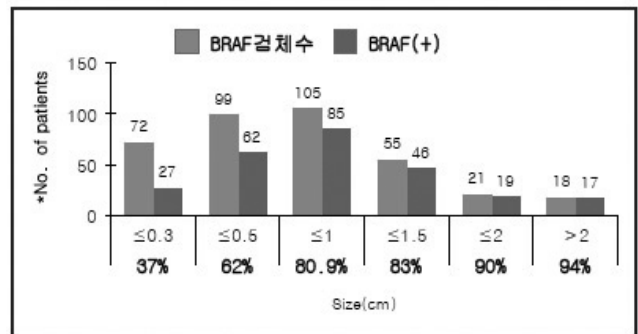
종양의 크기가 0.5 cm이하인 환자는 171명, 0.6 cm부터 1.5 cm이하인 환자는 160명, 그리고 1.6 cm이상인 환자는 39명이었다. WHO에서 정의하고 있는 1 cm이하의 미세 갑상선 유두암종은 276명으로 전체의 74.5%를 차지하였다. 종양의 크기에 따른 BRAF^{V600E} 검출비율은 0.3 cm에서 36%, 0.5 cm이하에서 52%, 0.5 cm에서 61%, 0.5 cm이상에서 66%, 1 cm이상 에서는 80 - 90%까지 현저하게 증가된 양성율을 나타내($p < 0.05$) 종양의 크기에 따른 BRAF 돌연변이 양

성율이 통계학적으로 유의성이 있게 높은 것으로 나타났다(Fig. 2).

Table 1. Demographics of patients with thyroid papillary carcinomas

| Characteristics | No. of patients n=370 |
|--------------------------|--------------------------|
| Mean age (yr) | 44.5 (16 - 77) |
| Sex ratio (F : M) | 289 (78.1%) : 81 (21.9%) |
| Mean tumor size (mm) | 8.4 (1.0 - 62) |
| Extrathyroidal extension | |
| Present | 207 (56%) |
| Absent | 163 (44%) |
| LN metastasis* | |
| Present | 145 (39%) |
| Absent | 225 (61%) |
| BRAF mutation | 256(69.1%) |

* Lymph node metastasis

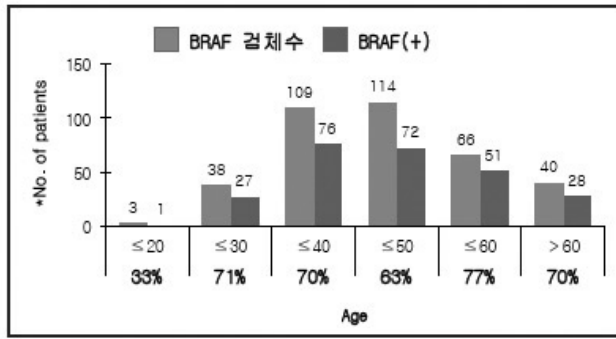


chi-square=5.825 df=5 p =0.0324 *No : Number

Fig. 2. Positive rate of BRAF^{V600E} according to size distributions of 370 thyroid papillary carcinoma.

3. 연령에 따른 BRAF^{V600E} 돌연변이 검출율

연령에 따른 BRAF^{V600E} 돌연변이 양성비율은 10대에서 33%(1명), 20세이상에서 71%(27명), 30세이상에서 70%(76명), 40세이상에서 63%(72명), 그리고 50세이상에서 75%(79명)로 나타냈으나($p > 0.05$) 10대를 제외하면 BRAF^{V600E} 돌연변이와 연령사이에는 통계학적으로 유의성이 있는 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 3).



chi-square=4.863 df=5 p=0.0627 *No : Number

Fig. 3. Positive rate of BRAR^{V600E} according to age distributions of 370 thyroid papillary carcinoma.

4. 예후인자들에 따른 BRAF^{V600E} 돌연변이 검출율

환자들의 예후인자들에 따른 BRAF^{V600E} 돌연변이 검출 빈도를 분석한 결과 연령간에, 갑상선외 침윤과 임파절 전이 유무간에 약간의 차이는 있지만 유의할 만한 차이는 없었다. 그러나 성별분석에서는 남자가 여자보다 통계학적으로 매우 높은 양성빈도($p < 0.05$)를 나타내었다(Table 3).

고찰

갑상선 유두암은 현재의 수술과 치료법으로도 장기간 생존율이 양호하나 많은 환자에서 재발을 경험하며 일부에서는 미분화암으로 변하여, 치료가 불가능하여 사망하기도 한다(Ito 등, 2003; Sakorafas 등, 2005; Kucuk 등, 2007). 그러므로 갑상선유두암 진단당시에 고위험과 저위험군 인자를 파악하여 적절한 치료를 하는 것이 중요하다(Fugazzola 등, 2004; Xu 등, 2003). BRAF^{V600E} 돌연변이는 갑상선 유두암에서 특히 많이 발생하며, BRAF^{V600E} 변이가 있는 경우 임상적으로 더 공격적인 것으로 알려져 갑상선유두암의 예후에 관한 연구가 활발히 진행 중이다(Knauf 등, 2005). BRAF^{V600E} 돌연변이는 산발형 갑상선 유두암에서 가장 흔히 발견되는 종양 유전적 이상소건이며 갑상선 유두암에서 29-69% 정도의 빈도로 나타난다고 보고되고 있다(Xing 등, 2005; Cahill 등, 2007).

본 연구 결과 갑상선 유두암 370예 중 256예(69.1%)에서 BRAF^{V600E} 돌연변이 양성을 보였다. 이는 Kim 등 (2010) 과 Kwak 등 (2009)이 보고한 60.7%와 63.0%와 대등한 결과라 하겠다.

Table 3. Relationship between clinicopathologic parameters and positive rate of BRAF^{V600E} mutation

| Chrateristics | BRAF mutation | | Total | p-value |
|--------------------------|---------------|----------|-------|---------|
| | Positive (%) | Negative | | |
| Age(yr) | | | | |
| <45 | 135(69.9) | 58 | 193 | 0.071 |
| =45 | 121(68.3) | 56 | 177 | |
| Gender | | | | |
| Female | 196(67.8) | 93 | 289 | 0.006* |
| Male | 60(74) | 21 | 81 | |
| Extrathyroidal extension | | | | |
| Present | 157(75.8) | 50 | 207 | 0.242 |
| Absent | 99(60.7) | 64 | 163 | |
| LN metastasis | | | | |
| Present | 113(77.3) | 33 | 146 | 0.341 |
| Absent | 143(63.8) | 81 | 224 | |

* Correlation is significant at the 0.05 lever ($p < 0.05$)

또한 종양의 크기에 따른 BRAF^{V600E} 돌연변이 양성율을 보면 0.3 cm에서 36%, 0.5 cm이하에서 52%, 0.5 cm에서 61%, 0.5 cm이상에서 66%, 1 cm이상에서는 80 - 90%까지 현저하게 증가된 양성율을 나타내 종양의 크기에 따른 BRAF^{V600E} 돌연변이 양성율은 통계학적으로 유의성이 있게 높은 것으로 나타났다($p < 0.05$). 이와같은 결과는 종양의 크기에 따른 BRAF^{V600E} 돌연변이 양성율을 조사한 Kwak 등 (2009)도 0.5 cm이하인 경우는 50.3%, 0.5 cm이상인 경우는 74.1%로 통계학적으로 종양의 크기에 따라 차이를 보인다는 보고와 일치하는 결과라 하겠다. 그러나 Puxeddu 등 (2004)은 갑상선 유두암에서 나이, 성별, 암종의 크기, 갑상선의 침윤, 림프절 전이 그리고 병기와 BRAF^{V600E} 돌연변이 사이에는 상호관련성이 없는 것으로 보고하였다. 본 저자들도 갑상선 유두암과 관련이 있는 예후인자로 나이, 성별, 갑상선의 침윤 및 임파절 전이 유무에 따른 BRAF^{V600E} 돌연변이 검출빈도를 조사한 결과 성별에서만 양성비율이 여성보다 남성이 매우 유의성 있게 높은 것으로 나타났다($p < 0.05$), 나머지 인자인 나이, 갑상선의 침윤과 림프절 전이 유무와는 BRAF^{V600E} 돌연변이 검출빈도가 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않아 밀접한 관련성이 적은 것으로 생각된다. 한편 최근 Park 등 (2010)은 BRAF 돌연변이의 양성율과 예후인자 간에 상관관계가 없음은 BRAF 돌연변이가 초기 발생기전에서 즉, 종양발생 기전에서 발생함을 시사한 바 있다. 그리고 저자들에 따라 결과가 분분한 것은 환자마다 갑상선 유두암종의 발생 원인, 생활환경과 습성, 유전적 소인이 다르고, 또한 연구자마다 분석방법이 다르다 점 등에 기인된 것으로 여겨진다.

위에 결과들을 종합하면 370명의 갑상선 유두암 환자에서 BRAF^{V600E} 돌연변이는 69.1%에서 양성을 나타냈다. 예후인자인 나이, 성별, 종양의 크기 그리고 갑상선의 침윤과 림프절 전이 유무에 따른 BRAF^{V600E} 돌연변이와의 연관성을 조사한 결과 성별과 암종의 크기에 따라서만 양성율이 증가하여 유의성이 인정되었고, 나머지 예후인자에 대해서는 뚜렷한 유의성이 관찰되지 않았다. 따라서 각각의 예후인자와는 상관없이 갑상선 유두암 종양 발생기전에서 BRAF^{V600E} 돌연변이 여부가 결정되는 것으로 사료된다.

결론적으로 갑상선 BRAF^{V600E} 돌연변이 여부는 수술 후 치

료계획을 정하고 예후를 가늠하는 중요한 지표로 최근 연구가 많이 급증했으나 더 많은 연구와 조사가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Cahill S, Smyth P, Denning K. Effect of BRAF^{V600E} mutation on transcription and post-transcriptional regulation in a papillary thyroid carcinoma model. *Mol Cancer* 6:21-25, 2007.
2. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stehens P, Edkins S, Clegg S. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature(Lond)* 417:949-954, 2002.
3. Donohue JH, Goldfien SD, Miller TR, Clark OH. Do the prognosis of papillary and follicular thyroid cancer. *Am J. Surg.* 148:168-173, 1984.
4. Fugazzola L, Mannavola D, Cirello V, Vannucchi G, Muzza M, Vicentini L. BRAF mutations in an Italian cohort of thyroid cancers. *Clinical Endocrinology* 61:239-243, 2004.
5. Ito Y, Uruno T, Nakano K. An observation trial without surgical treatment in patients with papillary micro carcinoma of the thyroid. *Thyroid Journal* 13:381-387, 2003.
6. Kim KH, Kang DW, Kim SH, Seong IO. Mutations of the BRAF gene in papillary thyroid carcinoma in a Korean population. *Yonsei Medical Journal* 45:818-821, 200.
7. Kim T, JH Roh, HJ Park, JE Kwon, SY Kang YL Choi, YL Oh. The Frequency of BRAF Mutation in Very Small Papillary Thyroid Carcinomas The Korean Journal of Pathology. 44:308-314, 2010.
8. Knauf JA, Ma X, Smith EP, Zhang L, Mitsutake N, Liao XH. Targeted expression of BRAF^{V600E} in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo differentiation. *Cancer Res* 65:4238-4245, 2005.
9. Kucuk NO, Tari P, Tokmak E, Aras G. Treatment for microcarcinoma of the thyroid: clinical experience. *Clin Nucl Med.* 32:279-281, 2007.
10. Kwak JY, Kim EK, Chung WY, Moon HJ, Kim MJ, Choi JR. Association of BRAF^{V600E} mutation with poor clinical prognostic factors and US features in Korean patients with papillary thyroid carcinoma. *Radiology* 253:854-860, 2009.
11. Park YJ, Kim YA, Lee YJ. Papillary microcarcinoma in comparison with larger papillary thyroid carcinoma in BRAF^{V600E} mutation, clinico pathological features, and immunohistochemical findings. *Head Neck* 32:38-45, 2010.
12. Puxeddu E, Moretti S, Elisei R, Romei C, Pascucci R, Martinelli M, Marino C, Avenia N, Rossi ED, Fadda G. BRAF(V599E) mutation is the leading genetic event in adult sporadic pap-

- illary thyroid carcinomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89:2414–2420, 2004.
13. Ruegemer JJ, Hay ID, Bergstralh EJ, Ryan JJ, Offord KP, Gorman CA. Distant metastases in differentiated thyroid carcinoma: a multivariate analysis of prognostic variables. *J Clin Endocrinol Metab* 67:501–508, 1988.
 14. Sakorafas GH, Giotakis J, Stafyla V. Papillary thyroid microcarcinoma a surgical perspective. *Cancer Treat Rev* 31:423–438, 2005.
 15. Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 12:245–262, 2005.
 16. Xu X, Quiros RM, Gattuso P, Ain KB, Prinz RA. High prevalence of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinomas and thyroid tumor cell lines. *Cancer Research* 63:4561–456, 2003.
 17. Ministry for Health, welfare and Family Affairs. Annual report of cancer incidence(2007), cancer prevalence(2007) and survival(1993–2007) in Korea. seoul:Ministry for Health, welfare and Family Affairs, 2009
 18. Thyroid cancer: incidence and histological pattern in Korea. Goyang: National cancer Information Center; 2009[cited 2010 May 10]. Available from:1191182_1753. html.