

2018

대한진단유전학회 학술대회

일시 : 5월 31일(목)-6월 1일(금) | 장소 : 더케이호텔서울 컨벤션센터

PAGE
02

Focus On

- 염색체 마이크로어레이
검사의 현재와 전망

PAGE
04

정기칼럼

- 유전상담센터 운영경험
- 유전자 변이의 해석
(sequence interpretation)

PAGE
05

Technology Trend

- Ion Torrent 차세대 시퀀서의
Oncomine 제품군과 액체생검
Assay의 등장
- Oncomine cell free DNA
사용 경험

PAGE
07

신의료정보

PAGE
08

학회뉴스

염색체 마이크로어레이 검사의 현재와 전망

서울주 (울산의대 서울아산병원 진단검사의학과)

Copy number variation의 이해

인간 유전체는 약 30억 쌍(3×10^9)의 염기로 구성되어 있지만, 개인 간의 유전체 정보는 차이가 있다. 단일염기의 차이, 즉 single nucleotide polymorphism (SNP)은 대표적인 유전체의 다형성으로 잘 알려져 왔고, 2004년에는 유전체의 구조 변이로써 DNA content의 감소 또는 증가와 같이 유전체의 양적 다형성이 존재하는 것이 발견되었다.¹⁾ 이와 같이 복제수변이(copy number variation, CNV)는 유전체의 일정 구간들이 반복되고 그 반복수가 개인 간 차이를 보이는 현상으로서, CNV 크기의 기준을 최근에는 50 bp 이상으로 정하고 있다. 인간 유전체의 CNV map 보고에 의하면 인간 게놈의 4.8-9.5%가 CNV를 가지는 영역이며 100개의 유전자가 결실되더라도 임상적 표현형에 영향이 없는 CNV도 있다.²⁾ CNV는 여러 사람에게 공통적으로 존재하는 것이 많지만 인구집단-특이적인 경우도 있다. 또한 개인 특이적인 CNV도 있어 사람마다 평균 3-7개의 희귀한 CNV가 존재한다. 인구의 5-10%는 500 kb 이상의 큰 CNV를 가지고 있고 인구의 1-2%는 1 Mb 이상의 매우 큰 CNV를 가지기도 한다.³⁾

인간 유전체상에서 많은 영역을 차지하는 CNV는 질병과 관련이 없는 경우가 많지만, dosage effect를 나타내는 유전자가 포함되면 질환을 유발하게 되고 CNV에 의해 유전자가 절단 또는 유전자 간의 융합이 발생하거나 non-coding regulatory element가 포함되면 유전자의 발현이나 기능에 영향을 주게 된다. CNV와 같은 유전체의 구조적 변이에 의해 발생하는 것을 유전체 질환이라고 한다.³⁾

CNV는 임상 표현형에 미치는 영향에 따라서 'benign' 또는 'pathogenic'으로 분류한다. Benign CNV는 크기가 작고 유전자가 없는 부위에 존재하거나 유전자 복제수에 영향이 없는 유전자를 포함하는 경우, pathogenic CNV는 발달과 관련된 유전자, 복제수에 영향을 받는 유전자에 존재하는 경우로 간주한다. 그러나 개인 특이적인 CNV들이 많기 때문에 이러한 기준으로 각각의 CNV를 판단하기가 쉽지 않다.³⁾

CNV 검출 방법으로는 CNV가 원인인 유전체 질환들을 표적으로 한 FISH (fluorescence in situ hybridization), MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) 등의 target-specific 방법과 염색체 마이크로어레이 검사(chromosomal microarray analysis, CMA), whole exome sequencing (WES), whole genome sequencing (WGS)과 같은 genome-wide 방법이 있다. 임상적으로 중요한 CNV를 검출하기 위한 목적으로 염색체 마이크로어레이 검사가 임상검사실에서 널리 이용되고 있다.

염색체 마이크로어레이 검사의 활용

염색체 마이크로어레이 기법으로 주로 array comparative genomic hybridization (array CGH)와 SNP microarray의 2가지 플랫폼이 이용되고 있다. Array CGH는 test DNA와 reference DNA를 Cy3 및 Cy5로 각각 달리 형광 표지한 후, 올리고핵산염의 탐색자(probe)를 고집적한 마이크로어레이 슬라이드 상에서 동시에 부합시키고, 각 probe에 부합되어 나타난 형광 강도비는 두 게놈 간의 copy number 비를 반영하는 것이므로 전체 유전체 프로파일에서 genome-wide하게 CNV를 검출할 수 있다. SNP microarray는 test DNA만을 부합시키고 부합된 탐색자의 형광 강도를 reference dataset과 비교하여 CNV를 검출할 수 있다. 또한 genotyping 정보를 이용하여 absence- 또는 loss-of-heterozygosity (AOH/LOH) 및 uniparental disomy (UPD)를 파악할 수 있다.

염색체 마이크로어레이는 탐색자 개수, 간격, 유전체상에 집적된 양상에 따라 해상도의 차이를 보이지만, 고식적인 염색체 검사보다 해상도가 훨씬 높기 때문에 정상 핵형을 보인 환자에서 질환의 원인이 되는 CNV 검출률을 증가시켰다.

염색체 마이크로어레이 검사는 발달지연, 정신지체, 자폐스펙트럼장애, 다발성 기형을 가진 환자에서 10-20%의 진단율을 보인다. 2010년에는 전문가 그룹에 의하여 염색체 마이크로어레이 검사가 이러한 환자에서 가장 처음(first-tier) 시행할 수 있는 진단검사로 권장되었고, 플랫폼은 최소한 400 kb 이상의 CNV를 검출할 수 있어야 하며 탐색자가 염색체 전체에 걸쳐 일정하게 분포하고 유전체 질환이 발생하는 부위에 대해서는 충분한 밀도로 고안되어야 한다는 가이드라인이 제시되었다.⁴⁾

American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)는 앞서 기술한 선천성 질환의 환자들을 비롯하여 산전 목적으로 염색체 마이크로어레이 검사를 적용하는 표준안 및 가이드라인을 발표하였고,⁵⁻⁶⁾ 종양에서 염색체 이상을 검출하기 위한 염색체 마이크로어레이 검사 표준안과 가이드라인도 발표하였다.⁷⁾

염색체 마이크로어레이 검사의 장단점과 고려사항

염색체 마이크로어레이 검사의 장점은 소량의 조직이나 세포, 보관된 조직으로도 검사가 가능하고 고해상도로 CNV를 검출할 수 있으며 객관적인 결과를 얻게 되고 CNV와 관련된 유전체 정보를 획득할 수 있다는 점이다. 단점으로는 상호전좌나 역위와 같이 균형재배열인 경우는 복제수가 정상인 결과를 보이고 low-level mosaicism으로 존재하는 CNV나 aneuploidy를 파악하기 어려우며 탐색자가 울러지지 않은 부위의 CNV를 검출하지 못하는 것이다. 또한 염기서열의 변이를 확인할 수 없기 때문에 염색체 마이크로어레이 검사에서 pathogenic CNV를 발견하지 못했다면 염기서열분석을 추가로 시행해야 할 경우가 있다.⁶⁾

임상검사실에서는 염색체 마이크로어레이 검사의 수행 시 각 단계마다 지침과 정도 관리를 준수하여 정확한 결과를 얻어야 한다. 그리고 가장 중요한 단계는 검출된 수많은 CNV에 대한 임상적 해석으로서, 환자의 임상정보, 의학적 및 유전학적 지식, 적절한 검증 단계 등을 통해 임상적으로 의미 있는 결론을 내리고 해석적 검사결과를 보고하는 것이다.

CNV의 해석 시 가장 어려운 점은 임상적 중요성이 아직 알려지지 않은 CNV, 즉 variants of uncertain significance (VOUS)에 대한 해석과 유전상담이다. 사람마다 평균 3-7개의 희귀한 CNV가 존재하고, genome마다 0.05-0.16개의 CNV가 de novo로 발생한다고 알려져 있으므로,⁸⁾ 이러한 CNV는 VOUS의 가능성이 있다. 염색체 마이크로어레이 검사의 결과를 보고한 후 몇 년이 경과한 뒤에 그동안 축적된 유전체 정보를 이용하여 검사 결과를 재분석하였더니 이미 VOUS로 보고된 상당수의 CNV가 임상적으로 중요한 CNV로 재평가되었다는 연구가 있다.⁹⁾ 이처럼 염색체 마이크로어레이 검사의 CNV 해석은 복잡하며 유전체 지식과 정보가 업데이트됨에 따라 해석이 달라질 수 있다는 것을 의미한다.

염색체 마이크로어레이 검사의 전망

미국의 의료보험체계에서 발달지연 또는 정신지체 환자를 대상으로 염색체검사, 염색체 마이크로어레이 검사, targeted next generation sequencing (NGS) 검사를 시행할 경우 염색체 마이크로어레이 검사를 first-line으로 시행하는 것이 가장 비용효율성이 높다는 보고가 있다.¹⁰⁾ 유전질환이 의심되는 환자의 염색체 마이크로어레이 검사, whole exome sequencing (WES), whole genome sequencing (WGS) 결과를 비교한 meta-analysis에서 WGS, WES, 염색체 마이크로어레이 검사 순서로 0.41, 0.35, 0.10의 진단적 민감도를 보였는데 WGS과 WES 방법은 염기서열 변이를 알 수 있기 때문에 진단율이 높다.¹⁰⁾ WGS는 CNV를 비롯한 유전체의 구조적 변이도 확인할 수 있으므로 유전체 변이 정보를 가장 포괄적으로 얻을 수 있는 검사이지만 획득되는 유전체 정보가 광범위하여 임상적 해석과 유전상담이 어렵고 검사비용이 염색체 마이크로어레이 검사보다 훨씬 높다.

검사의 유용성은 대상환자군, 대상군에서 검출률, 검사 결과의 임상적 유용성, 검사비용, 결과보고시간 등이 고려되어야 한다. 이러한 측면에서 CNV 검출 목적의 검사로 염색체 마이크로어레이 검사가 현재 first-line 검사로 시행되고 있다. WGS의 검사비용이 낮아지고 확보된 유전체 변이의 분석과 해석이 빨라지고 용이해지면 WGS가 유전질환과 유전체 질환에서 최선의 진단검사가 될 것이다.

우리나라에서는 염색체 마이크로어레이 검사가 건강보험심사평가원에서 시행 여부를 검토 중이며, 임상검사실에서 targeted NGS 검사가 가능하게 된 지 이제 1년 정도 되었기 때문에 WES 또는 WGS 검사가 진단검사로 도입되기까지는 시일이 오래 걸릴 것으로 예상된다. 아직도 정확한 원인을 찾지 못한 우리나라 환자들에서 적절한 유전학적 검사법으로 pathogenic CNV를 검출하여 유전체 질환을 진단해 줄 수 있기를 기대해 본다.

참고문헌

1. Iafrate, A., Feuk L, Rivera MN, et al. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nature Genet.* 2004;36:949-951.
2. Zarrei M, MacDonald JR, Merico D, et al. A copy number variation map of the human genome. *Nat Rev Genet.* 2015;16:172-183.
3. Harel T, Lupski JR. Genomic disorders 20 years on-mechanisms for clinical manifestations. *Clin Genet.* 2018;93:439-449.
4. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet.* 2010;86:749-764.
5. Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, et al. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med.* 2011;13:680-685.
6. South ST, Lee C, Lamb AN, et al. ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: revision 2013. *Genet Med.* 2013;15:901-909.
7. Cooley LD1, Lebo M, Li MM, et al. American College of Medical Genetics and Genomics technical standards and guidelines: microarray analysis for chromosome abnormalities in neoplastic disorders. *Genet Med.* 2013;15:484-494.
8. Wilfert AB, Sulovari A, Turner TN, et al. Recurrent de novo mutations in neurodevelopmental disorders: properties and clinical implications. *Genome Med.* 2017;9:101-116.
9. Palmer E, Speirs H, Taylor PJ, et al. Changing interpretation of chromosomal microarray over time in a community cohort with intellectual disability. *Am J Med Genet A.* 2014;164A:377-385.
10. Li Y, Anderson LA, Ginns EI, et al. Cost Effectiveness of Karyotyping, Chromosomal Microarray Analysis, and Targeted Next-Generation Sequencing of Patients with Unexplained Global Developmental Delay or Intellectual Disability. *Mol Diagn Ther.* 2018;22:129-138.
11. Clark MM, Stark Z, Famaes L, et al. A meta-analysis of the diagnostic sensitivity and clinical utility of genome sequencing, exome sequencing and chromosomal microarray in children with suspected genetic diseases bioRxiv. doi: <https://doi.org/10.1101/255299>

유전상담센터 운영경험

하정숙 (계명대동산병원 진단검사의학과)

유전상담클리닉을 연지 5개월 여가 되어갑니다. 저희 유전상담클리닉은 BRCA 유전자검사뿐 아니라 모든 유전자검사를 대상으로 운영을 시작하였고, 현재까지 BRCA 검사 관련 상담과 그 외 질환 관련 상담이 반반 정도로 구성되어 운영되고 있습니다. 1주일에 한 타임으로 운영되어 5개월의 기간이 길었다고는 할 수 없으나 짧은 기간 동안 다양한 사례를 경험하고 있고, 그중 다음의 한 사례를 통해 생각을 같이 나누고자 합니다.

32세의 젊은 여성이 며칠간 잠을 이룰 수 없었다며 다소 창백한 얼굴로 내원하였습니다. 그 이유가 건강검진을 받던 중 선택검사로 우연히 실시하게 된 암예측유전자검사서 BRCA 유전돌연변이가 검출되었기 때문이라고 하였습니다. BRCA 1,2 두 유전자 모두 돌연변이가 발견되었다고 들었고, 그 후 본인은 유방암 발병에 대한 불안으로 며칠을 고민하다가 상담클리닉을 방문하게 되었다고 하였습니다. 이 분은 유방암이나 난소암을 비롯해 가족력에서 특이할 만한 점은 없었습니다. 가지고 오신 BRCA 검사 결과지를 보니, 검사법이 targeted multiplex PCR법으로 BRCA 1,2 유전자에서 선별된 30여개의 변이에 대해서만 선택적으로 검출하는 방법이었으며, 그중 BRCA 1과 2에서 각각 다수의 변이가 검출되었다고 기술되어 있었습니다. 추후 확인한 결과 검출된 변이 중 2개는 이미 병적(pathogenic)으로 알려져 있는 변이였습니다. 의뢰자는 양성이라는 검사 결과만을 받았을 뿐 결과에 대한 어떤 설명이나 해석도 받지 못한 상태였고, 결과지에도 검출된 변이의 임상적 의미에 대한 해석이 기술되어 있지 않았습니다. 우선, 의뢰자가 받으신 검사법 자체의 한계에 대해 설명을 해드리고, 병적(pathogenic) 변이가 이렇게 다수로 검출되었다는 점을 생각할 때 검사의 신빙성을 확신할 수 없으며, target 변이 선별의 근거나 기준 서열에 대한 정보가 제시되어 있지 않고 raw data가 없어 추가적 해석을 임의로 진행할 수 없는 사정에 대해 설명을 하였습니다. 또한, BRCA 검사를 이해하지 못한 상태에서 검사를 받으셨으므로 BRCA 검사를 하는 목적과 실제 양성인 경우 이루어지는 일반적·예방적 조치들에 대해서 검사 전 상담과 동일하게 자세한 설명을 진행하였습니다. 현재의 검사결과를 검증하고 BRCA 변이 유무를 좀 더 확실하게 알기 위해서는 다른 검사법을 이용한 재검사를 하는 수밖에 없음에 대해서도 설명하였습니다. 상담 후 환자는, BRCA 검사의 의미를 설명 받은 상태에서 다시 검사의 선택이 주어진다면 검사를 굳이 하지 않았을 것이라며 재검사는 원하지 않으셨고, 현 상태에서는 우선 검진을 자주 받는 방향으로 결정하셨습니다.

요즘 크고 작은 많은 검진기관에서 환자선택검사의 하나로 암예측유전자검사를 제시하고 있습니다. 그러나 검사 전 제대로 된 검사 안내나 검사 후 결과 해석/설명과정 없이 실시되는 유전자검사의 경우 그 결과를 받게 되는 환자는 본 경우와 같이 자의적 해석을 통해 정신적 고통을 받을 수 있습니다. 본 의뢰자는 본인의 의지로 상담의 기회를 가질 수 있었지만, 대다수 의뢰자들은 그런 기회를 갖지 못하고 앞으로도 불충분한 결과를 그대로 믿는 채로 살아갈 수도 있게 됩니다. 비단 양성결과뿐 아니라 음성결과가 나온 경우에도 환자의 자의적 해석에 의해 완전한 음성결과로 받아들여지게 되어 잠재적 병적 변이를 검출할 기회를 놓치는 결과를 초래하게 되며, 이는 환자 본인뿐 아니라 가족에게도 해당이 되게 됩니다. 따라서, 이러한 예측유전자검사의 경우 검진에서 비록 가벼운 마음으로 선택하게 된 검사일지라도 그 결과가 미치는 영향은 매우 크다는 점에서 적어도 검사를 제안하는 입장에서는 신중을 기해 제안하고 그 결과를 전달해야 하는 것이 옳지 않은가 생각을 해봅니다. 유전자검사는 보통 한 번의 검사로 그 결과가 고정되며, 스크리닝이라는 개념을 적용하기 어려운 검사 영역입니다. 그러함에도 소위 스크리닝 검사라는 이름으로 결과에 책임을 지지 않은 채 시행되는 예측유전자검사는 결과를 받게 되는 환자에게 잘못된 낙인 효과를 초래할 수 있음을 검사를 제안하거나 시행하는 입장에서 반드시 깊이 인식을 해야 할 것입니다. 특히 본 검사와 같이 일부 변이만을 검출하는 검사법을 쓸 경우 최소한 검사 전 상담을 통해 검사법의 한계에 대한 설명과 함께 검사 후 추가 검사 필요성에 대한 설명이 이루어졌어야 합니다. 물론 그전에 이러한 검사법을 쓰는 것 자체가 옳은 것인지에 대해서는 추후 깊은 논의가 필요하다고 생각합니다. 본 의뢰자는 안타깝게도 여러 가지 사정상 재검사를 바로 시행하지는 않으시고, 결과를 염두에 두고 검진을 실시하는 것으로 방향을 잡으셨으나, 추후 본인의 의지에 의해 재검사 기회를 가지실 수 있을 것입니다. 이 사례는 유전자검사 시행에 있어 제대로 된 검사 시행과 상담의 중요성을 다시 한번 생각하게 하고, 현재 유전자검사가 실시되고 있는 현실의 한 단면을 보여준 사례라 할 수 있겠습니다. 유전상담을 진행하고 계신 분들뿐 아니라 검사를 제안하시는 의료진분들도 이 사례를 통해 같이 생각해 보는 계기가 되었으면 합니다.

유전자 변이의 해석(sequence interpretation)

너와 나, 해석의 차이를 극복하다

장미애 (순천향대학교부천병원 진단검사의학과)

건강만은 늘 자신하던 A씨. 그러나 평상시처럼 산책하던 중 갑작스럽게 쓰러졌고 병원으로 옮겨졌지만 사망했습니다. 그의 시신을 부검한 결과 비대심근병증(hypertrophic cardiomyopathy)이 밝혀졌습니다. 비대심근병증은 심장근육이 과도하게 두꺼워지는 질환으로 유전적 소인에 의해 발생하며, 심장돌연사(sudden cardiac death)의 원인이 됩니다. 유전자검사 결과 질환의 원인일 가능성이 높은 유전자 변이(likely pathogenic variant)가 확인이 되었고, 그의 가족들은 동일한 유전자 변이 유무를 확인하는 검사를 받게 되었습니다. 검사 결과 “양성”으로 확인된 가족의 경우 정기적인 심초음파 검진을 통해 향후 비대심근병증의 발병여부를 추적관찰하기로 하였습니다. 그로부터 5년 후, 주치의는 A씨 가족에서 발견된 유전자 변이가 다른 검사실에서는 오히려 질환의 원인일 가능성이 낮은 변이(likely benign variant)로 해석되고 있음을 알게 되었습니다. 그리하여 비대심근병증과 연관된 유전자를 추가로 포함하여 검사를 재시행하였고, 보다 확실한 질환 원인 유전자 변이(pathogenic variant)가 새롭게 발견되었습니다. A씨의 가족들은 다시 한번 유전자검사를 받기로 하였습니다. 그 결과, 5년전 검사에서 “음성”으로 확인되어 별다른 정기 검진을 받지 않았던 사람에게서 동일한 질환 원인 유전자 변이가 확인이 되었습니다. 실제로 그의 심초음파검사결과 비대심근병증이 발견되었고 심장돌연사 위험을 낮추기 위해 예방적 수술치료를 받게 되었습니다.

* N Engl J Med. 2015;372:2235-2242 내용을 의역

유전자검사를 통해 확인된 유전자 변이(genetic variant)의 의미를 해석하고 이를 실제 의료현장에서 적용하는 일은 매우 중요합니다. 유전자정보의 분석은 환자 본인의 진단과 치료뿐 아니라 환자의 가족과 친척에 대한 보인자, 증상전, 산전검사의 탐색 등 여러 영역에서 중요한 영향을 미치기 때문입니다. 그런데, 유전자 변이의 의미를 해석하는 일은 그리 쉽지가 않습니다. 위 예시에서 볼 수 있듯 동일한 유전자 변이에 대한 해석이 판독자마다 다를 수도 있고, 또는 해석을 위해 근거로 삼았던 각종 데이터베이스가 시간이 지나면서 개정되거나 혹은 후속 연구결과에 따라 내용이 변화함에 따라 처음에 생각했던 변이의 해석과 달라질 가능성이 충분히 존재하기 때문입니다.

미국의학유전학회(American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG)에서는 유전자 변이 해석을 보다 체계적이고 표준화하기 위한 노력의 일환으로 2001년, 2007년 지침에 이어 2015년 분자병리학회(Association for Molecular Pathology, AMP)와 공동으로 최신 가이드라인을 발표했습니다(Genet Med. 2015;17(5):405-24). 그 내용에 따르면 유전자 변이는 5가지 카테고리 “pathogenic”, “likely pathogenic”, “uncertain significance”, “likely benign”, “benign”중 한 가지로 분류하여 보고해야 합니다. 카테고리 분류를 위해서는 다양한 영역, 이를테면 대립유전자빈도(allele frequency), 기능연구(functional data), 컴퓨터를 이용한 유전자 정보 혹은 유전자산물의 기능분석자료(computational data) 등에서 개별 유전자 변이에 대한 충분한 근거(evidence)를 수집하여 종합적으로 판단해야 합니다. 그러나, 이러한 노력에도 불구하고 여전히 판독자 간 해석의 간극을 좁히기는 녹록지 않아 보입니다. 2016년 발표된 한 연구(Am J Hum Genet 2016;98(6):1067-1076)에 따르면 97개의 유전자 변이에 대한 9개 검사실 간 변이 해석 일치율은 2015년 ACMG-AMP 가이드라인을 적용하더라도 고작 34%에 불과한 것으로 나타났습니다. 이는 가이드라인에서 기술되고 있는 내용 중에는 일부 애매모호하여 판독자의 주관적인 해석이 들어가거나, 충분히 설명되지 않은 부분들로 인해 근거기준을 잘못 적용할 가능성 등을 원인으로 생각해볼 수 있겠습니다.

최근 차세대염기서열분석(Next-generation sequencing, NGS)기술의 도입으로 검사실에서 만날 수 있는 유전자 변이의 수와 더불어, 의미를 정확하게 판단하기 어려운(uncertain significance) 변이의 발견 또한 크게 증가하였습니다. 그 어느 때보다 유전자 변이의 해석에 대한 관심과 체계화를 위한 노력이 필요한 시기라고 생각합니다.

Ion Torrent 차세대 시퀀서의 Oncomine 제품군과 액체 생검 Assay의 등장

Ion S5 System 고객 모두에게 제공되는 Oncomine 액체 생검 NGS 시퀀싱

NGS (Next Generation Sequencing) 기반 정밀의료는 아직 발전 단계이지만, 유전자 검사를 중심으로 이제는 우리 모두의 현실로 다가왔다. 미국 NCI-MATCH^[1], NCI-COG Pediatric MATCH^[2], 일본 SCRUM-Japan^[3], 캐나다 Personalize My Treatment (PMT) 프로그램^[4] 등에서 Ion Torrent NGS 유전자 검사가 활발하게 이루어지고 있으며, 특히 'Basket' 또는 'Umbrella' 형태의 임상연구로, 하나의 표적치료제가 동일한 유전 변이를 가진 다른 암 종류에 효과를 나타내는 경우들도 확인되면서, 암 정밀의료의 혜택을 볼 수 있는 환자 풀(Patient Pool)이 확대되고 있다.

한국도 2017년 3월부터 NGS 유전자 검사가 제도권으로 들어왔고, 써모 피셔 사이언티픽은 암 유전자 검사에 초점을 맞춘 Oncomine 브랜드로 제품과 전체 작업 흐름까지 clinical 수준으로 검증된 NGS 시퀀싱을 지원하고 있다(Figure 1). NCI-MATCH, SCRUM-Japan 등에서 엄밀하게 검증된 Oncomine Comprehensive Assay는 최적화된 분석 솔루션과 함께^{[5][6]}, 가장 많은 한국 병원들에 도입된 고품질 NGS 패널로 자리잡았고, Oncomine BRCA Research Assay, Oncomine Myeloid Research Assay와 면역요법 관련 패널들도 다양하게 활용되고 있다.

또한 FFPE (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded) 또는 FNA (Fine Needle Aspiration) 샘플의 한계를 극복하여, 간단한 혈액검사 등의 액체 생검(Liquid Biopsy)을 NGS 유전자 분석으로 연결하여, 다양한 암종에서 암의 진화를 분석, 검증하고, 환자의 부담이 최소화된 조기 진단이나 암의 전이에 대한 예후 모니터링 등을 발전시킬 필요성이 부각되었다^[7].

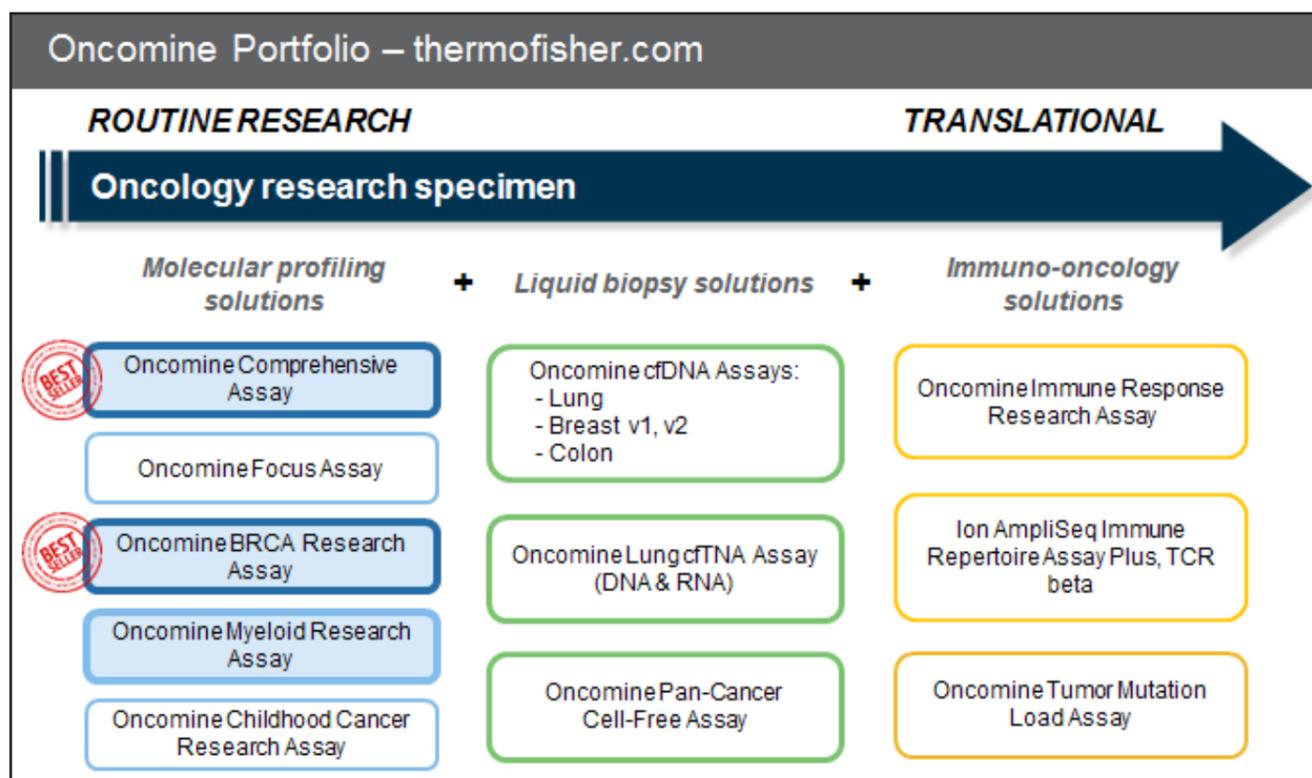


Figure 1. 써모 피셔 사이언티픽에서 clinical 수준의 제품들로 제공되는 Oncomine Portfolio

써모 피셔 사이언티픽은 모든 Ion S5 System 고객들에게 제공 가능한 액체 생검 NGS 제품들을 개발하였고, 2018년 5월 현재 6개의 Assay가 제공되고 있다. 암종별로, Oncomine Colon cfDNA Assay, Oncomine Lung cfDNA Assay가 나온 후에, ALK, RET, ROS1을 포함한 49개 fusion과 CNV 분석까지 확장된 Oncomine Lung Cell-Free Total Nucleic Acid Assay가 출시되었고, ERBB2 (HER2) 유전자 등의 CNV 분석도 가능한 새로운 버전의 Oncomine Breast cfDNA Assay v2도 최근 등장하였다. 그리고 가장 최근의 Oncomine Pan-Cancer Cell-Free Assay는

주요 암 관련 유전자 52개 타깃으로 96개 fusions, 12개 CNVs 분석도 가능하다. 모든 액체 생검 제품들은, 기존의 AmpliSeq 기술에서 더 발전되어 molecular barcode 기술이 적용된 tag-sequencing으로 20 ng DNA 기준 0.1% LOD (Limit Of Detection) 분석이 가능하다. Oncomine Pan-Cancer Cell-Free Assay의 경우, Ion S5 XL의 540 chip에서 4개, 550 chip에서 8개 샘플을 동시에 분석할 수 있으며, 모든 액체 생검 Assay에서는 샘플 준비부터 최종 분석까지의 전체 작업 흐름이 Oncomine 솔루션으로 제공된다(Figure 2).

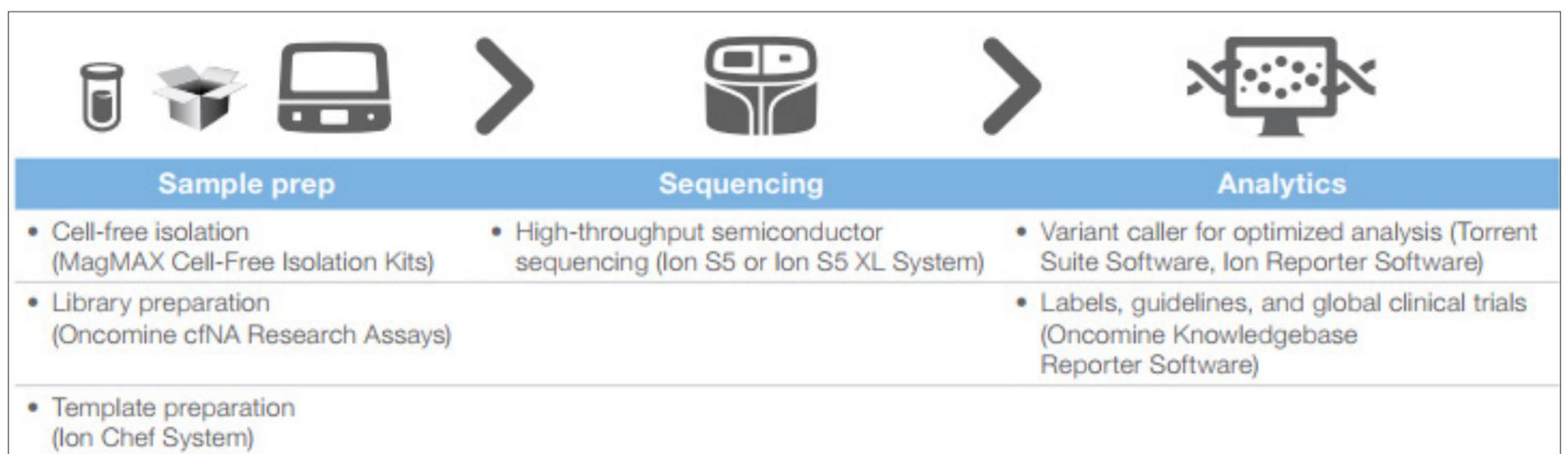


Figure 2. Oncomine으로 제공하는, 샘플 준비에서 Ion S5 System NGS 시퀀싱, 기본 서버와 Ion Reporter 서버를 이용한 분석까지 완료되는 전체 작업 흐름

2017년 4월, 유럽, 캐나다, 일본의 11개 연구소에서 Oncomine Lung cfDNA Assay를 교차 검증한 내용이 AMP (Association for Molecular Pathology) Global Congress에서 보고되었다. F0.1% 비율의 변이에 대해 평균 94.8% sensitivity와 99.8%의 specificity가 얻어졌고, 특히 Tagrisso의 타깃 마커인 EGFR T790M 변이는 모든 연구소에서 찾아내는 데 성공했다^[8]. 이러한 Oncomine 액체생검의 기술력으로, 써모 피셔 사이언티픽은 영국 Genomics England 10만 명 게놈 프로젝트에 참가한다는 것이 2017년 10월에 결정되었다^[9]. 2018년 말에는 새로운 AmpliSeq HD 기술이 등장하여 시퀀싱의 data quality가 극적으로 향상될 예정이고 또한 모든 Ion S5 System 고객들은 AmpliSeq HD 기반으로 자신이 원하는 custom Cell-Free 패널도 자유롭게 만들어, 액체 생검 시퀀싱을 할 수 있게 된다.

2018년 말에는 새로운 AmpliSeq HD 기술이 등장하여 시퀀싱의 data quality가 극적으로 향상될 예정이고, 또한 모든 Ion S5 System 고객들은 AmpliSeq HD 기반으로 자신이 원하는 custom Cell-Free 패널도 자유롭게 만들어, 액체 생검 시퀀싱을 할 수 있게 된다.

참고문헌

- [1] <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/clinical-trials/nci-supported/nci-match>
- [2] <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/clinical-trials/nci-supported/pediatric-match>
- [3] <http://www.scrum-japan.ncc.go.jp/index.html>
- [4] <http://www.labmanager.com/news/2018/04/exactis-innovation-selects-ion-genestudio-s5-systems-and-oncomine-assays-to-drive-canadian-clinical-trial-studies>
- [5] Chih-Jian Lih et al. The Journal of Molecular Diagnostics 2017 Mar; 19(2): 313-327.
- [6] Luthra R et al. The Journal of Molecular Diagnostics 2017 Mar; 19(2): 255-264.
- [7] Wan JCM et al. Nat Rev Cancer 2017 Apr; 17(4): 223-238.
- [8] <https://www.genomeweb.com/cancer/thermo-fisher-lung-liquid-biopsy-assay-reproducible-across-labs-study-presented-amp-global>
- [9] <https://www.genomicsengland.co.uk/genomics-england-partners-with-inivata-and-thermo-fisher-scientific/>

Oncomine cell free DNA 사용 경험

조은해 (GC Genome)

도입배경

액체 생검 (liquid biopsy)은 혈액에서 조직검사의 불편함 없이, 손쉽게 암세포의 유전적 돌연변이를 검출할 수 있는 획기적인 기술이다. 일부 조직만의 유전자 변화를 반영하는 조직검사와는 달리 액체 생검은 환자의 전신에 존재하는 암세포의 전반적인 유전적 변화를 검출할 수 있고, 종양의 동태를 손쉽게 추적 관찰할 수 있다. 액체 생검의 여러 기법 중에서도 특히 혈액 속에 떠돌아다니는 ctDNA (circulating tumor DNA)를 NGS (next generation sequencer) 사용으로 검출하는 방법이 활발하게 연구되었다. 특히 미국 기업인 Guardant, Foundation Medicine, Sequenom 등에서는 이미 수 십 개의 유전자의 돌연변이를 확인하는 액체 생검 검사를 시행하고 있으며 많은 암환자들이 이를 이용하여 치료받고 있다. 국내에서도 액체 생검에 대한 임상 의사 및 연구자들의 관심이 증폭되고 있으나 아직 국내에서 액체 생검이 초기 연구 단계이기 때문에 국내 임상 현장에서는 미국으로 환자의 혈액을 보내어 검사 결과를 받고 있는 실정이다. Oncomine cfDNA assay는 Ion PGM 또는 Ion S5 장비를 이용하여 태그시퀀싱 (Tag Sequencing) 기법을 사용하여 검출 한계 0.1%를 80-90% 민감도와 98% 특이도로 달성할 수 있다. cell free DNA와 RNA 모두를 사용하여 SNV뿐만 아니라 CNV, fusion까지 검출할 수 있다. pan-cancer assay의 경우 52개의 유전자를 동시에 검사할 수 있으며 임상적으로 유용한 hotspot를 표적으로 하고, 폐암, 유방암, 대장암에 특화된 assay도 존재한다.

고려사항

혈장에 떠돌아다니는 cfDNA (cell free DNA)는 genomic DNA에 비하여 극미량이며, 특히 ctDNA의 양은 환자 개개인과 병기에 따라 다르지만, 총 cfDNA의 1% 미만으로 존재하는 경우가 많기 때문에, 이를 검출하기 위해서는 고도의 민감도와 특이도를 요구한다. 이러한 요구를 충족하기 위해서는, 채혈에서부터 ctDNA 추출까지 검체의 전처리 과정이 일반적인 NGS 실험보다 결과의 정확성에 큰 영향을 미친다. 또한 PCR과 sequencing 과정 중에 수많은 염기서열의 에러 (error)가 발생하는데, 이러한 에러 신호가 위양성 결과를 초래할 수 있으므로 실험과정에서 분자 바코딩 (molecular barcoding)을 사용하고, 생물정보학적 분석 (bio-informatic analysis) 과정에서 최대한 노이즈를 제거하는 기법이 요구된다.

현재 여러 회사에서 분자 바코딩을 이용한 기술이 개발되었는데, 현실적으로 임상에서 요구되는 민감도나 특이도에 있어서 안정적이고 재현성이 높은 결과를 도출하는 데는 아직 한계가 있다. 또한 임상샘플에서 최대한 추출할 수 있는 cfDNA 양이 개인마다 다르고, 추출된 cfDNA 양에 따라 획득할 수 있는 민감도 또한 달라질 수밖에 없어, 소량의 cfDNA만을 추출한 경우에는 실험이 불가능하거나, 적정 민감도를 달성할 수 없다.

Oncomine cfDNA assay는 동사의 cfDNA 추출 키트로부터 oncomine knowledgebase reporter까지 연계하여 분석이 가능하다는 점과, cfDNA 양이 1ng까지 낮은 경우에도 실험이 가능하고, 실제 실험 결과에 따라, 변이 별로 민감도가 다르게 표시되는 기능이 있다는 점이 유리하게 판단되었다.

표준물질을 이용한 검사 성능 평가

우선 Horizon의 cfDNA 표준물질 set (8개의 hotspot 돌연변이를 각각 5%, 1%, 0.1%, 0%로 함유함)의 20ng의 DNA를 사용하여 oncomine lung cfDNA assay의 성능을 평가하였다. 4개의 표준물질에서 median molecular coverage가 약 5,000대로 0.1%의 민감도를 달성하기에 충분하였다. 8개의 잘 알려진 돌연변이를 5%, 1%로 함유한 표준물질에서는 모든 8개의 돌연변이가 정확하게 검출되었으며, 0.1%를 함유한 표준물질에서는 6개의 돌연변이가 검출되었으며, 총 4개의 표준물질에서 단 1개의 위양성 돌연변이만이 검출되었다. 이는 임상적으로 유의한 hotspot 변이의 저빈도 돌연변이 검출에 있어서 아주 탁월한 민감도와 특이도였다. 그리고 표적으로 하는 유전자 정보가 fusion, CNV를 포함하고 있어, 임상현장에서 사용하기에 매우 유용하리라 판단되었다. Oncomine cfDNA assay를 직접 환자의 혈액에 응용하여 분석한 결과, 1-10ng의 소량의 cfDNA가 추출된 경우라도 증폭 효율이 높아 적정 민감도를 유지할 수 있었고, hotspot 변이에 있어서 높은 민감도와 특이도를 잘 유지하였다. 단 TP53은 유전자 전체를 분석하면서 hotspot 변이가 아닌 경우에 위양성이 발생할 수 있으므로 검출한계를 0.5%로 조정해야 한다.

운영 계획

현재 여러 연구자들의 의뢰로 oncomine cfDNA assay를 시행하고 있다. 다른 검사방법에 비해 민감도와 특이도가 높아 의뢰자들의 만족도가 높고, 실제 임상영역에서 필요로 하는 핵심 정보를 많이 제공할 수 있다는 점에서 향후 연구의뢰건수의 확대 및 실제 임상영역에의 도입이 기대된다.

신의료정보

항목	제목	세부인정사항	고시
누623 핵산증폭	Candida albicans[중합효소연쇄반응법] 검사의 급여기준	1. 누623가 핵산증폭-정성그룹1-(03) Candida albicans[중합효소연쇄반응법]검사는 칸디다 질염 의심환자 중 다음과 같은 경우에 요양급여를 인정함 - 다음 - 가. 질분비물 도말 결과 음성 나. 질분비물 진균배양 결과 음성 2. 칸디다 질염이 의심되는 환자에서 상기 1.에 해당되지 않는 경우에는 국민건강보험법 시행규칙 별표 6에 따라 본인부담률을 100분의 80으로 적용함	보건복지부 고시 제2018-88호 (2018년04월30일 시행)
누658 핵산증폭 누659 핵산교잡	메르스 코로나바이러스 [실시간역전사중합효소연쇄반응법] 검사의 급여기준 인유두종 바이러스 검사(Human Papilloma Virus, HPV검사)의 급여기준	누658라 핵산증폭-정성그룹4-메르스 코로나바이러스[실시간역전사중합효소연쇄반응법] 검사는 질병관리본부의 메르스 대응지침에 따름을 원칙으로 함(질병관리본부에 신고 포함). 유행단계에서 다음과 같은 경우에 요양급여하며, 그 외에는 비급여함 - 다음 - 가. 의심환자에 해당하는 경우 나. 의심환자에 해당되지 않더라도 위험요소에 노출되어 의사가 필요하다고 인정하는 경우 1. 인유두종 바이러스(Human Papilloma Virus, HPV)검사의 적응증은 다음과 같이 하며, 동 기준 이외에 시행한 경우에는 비급여토록함. - 다음 - 가. 자궁질세포병리검사상 미확정 비정형 편평세포(ASC-US) 이상의 변화된 소견이 있는 경우 나. 조직검사상 구인두암 또는 구인두전구암이 확인된 경우 다. 상기 가. 또는 나. 이후 추적검사가 필요한 경우 2. 산정방법위 1항에 의한 적응증에 해당하는 경우 검사방법에 따른 다음 검사항목 중 1가지 검사만 인정함. 다만, 중합효소연쇄반응법(PCR)에 의한 HPV 검사인 누658가, 누658나, 누658바 검사는 여러 HPV type을 실시하더라도 소정점수의 200%까지만 산정함. - 다음 - 가. 누658가 핵산증폭-정성그룹1-인유두종바이러스 나. 누658나 핵산증폭-정성그룹2-인유두종바이러스 다. 누658바 핵산증폭-유전자형그룹1- 인유두종바이러스 라. 누659나 핵산교잡-유전자형그룹1-인유두종바이러스 ※ ASCUS : Atypical Squamous Cell of Undetermined Significance	보건복지부 고시 제2018-70호 (2018년04월01일 시행)
누841 조직형검사-단일형	HLA-B5801 유전자형검사의 급여기준	1. 누841다 조직형검사-단일형-핵산증폭-HLA-B5801 검사, 누841라 조직형검사-단일형-염기서열분석-HLA-B5801 검사의 급여기준은 다음과 같이 함 - 다음 - 가. 적응증 만성신질환 환자로 통풍으로 진단 후, 고요산혈증의 치료가 필요한 경우(uric acid 검사상 9mg/dL이상) 나. 인정횟수 알로퓨리놀 최초 투여 전 1회 2. 알로퓨리놀 약제 투여가 필요한 환자에서 상기 1.가.에 해당되지 아니한 경우에는 국민건강보험법 시행규칙 별표 6에 따라 본인부담률을 100분의 80으로 적용함	보건복지부 고시 제2018-70호 (2018년04월01일 시행)

‘2018 대한진단유전학회 학술대회’ 개최

대한진단유전학회는 5월 31일부터 6월 1일까지 이틀 간 더케이호텔 서울에서 2018 대한진단유전학회 학술대회를 개최한다. 이번 심포지엄에는 주제강연을 비롯 심포지엄, 교육특강, 구연발표를 포함한 총 26개의 세션이 진행된다.

● 5월 31일

	그랜드볼룸 B	크리스탈볼룸	금강홀 A
08:00-08:30	등록		
08:30-09:00			[Education I] 한국유전자검사평가원-대한진단유전학회 공동교육
09:00-10:30	[Symposium I] Breast cancer genetics	[Symposium II] Metabolomics meets genomics	
10:30-11:00	Coffee Break / 기기관람		
11:00-12:00	[Plenary Lecture I] Discovery Epigenetics Drive Precision Medicine Approaches for Lymphoma		
12:00-13:10	[Luncheon Symposium I] 한국로슈진단	[Luncheon Symposium II] 엔젠바이오	[Luncheon Symposium III]
13:10-14:40	[Symposium III] Cardiovascular genomics	[Industrial Workshop]	[Education II] Interpretation of NGS data
14:40-15:10	Coffee Break / 기기관람		
15:10-16:40	[Symposium IV] Clinical molecular diagnostics : From bench to bedside	[Symposium V] Genetic counseling	[Education III] Troubleshooting in the molecular diagnostic tests
17:00-18:00	평의원회		

● 6월 1일

	그랜드볼룸 B	크리스탈볼룸	금강홀 A
08:30-09:00	등록		
09:00-10:30	[Symposium VI] Chromosomal microarray	[Education IV] Clinical application of NGS-based target sequencing	[Oral Presentation I]
10:30-11:00	Coffee Break / 기기관람		
11:00-12:00	[Plenary Lecture II] 유전검사의 규범적 쟁점에 관하여		
12:00-13:10	[Luncheon Symposium IV] 써모피서 사이언티픽	[Luncheon Symposium V] 다우바이오메디카	[Luncheon Symposium VI] IDT Korea
13:10-14:40	[Symposium VII] 미생물분자진단키트의 평가	[Symposium VIII] Emerging technologies	[Oral Presentation II]
14:40-15:00	Coffee Break / 기기관람		
15:00-16:30	[Symposium IX] 분자진단검사 임상진단지침 권고안	[Symposium X] Microbiome and metagenomics	[Education V] Bioinformatics for laboratory medicine
16:30-17:00	총회 및 시상식		

‘2018 임상 차세대염기서열검사 워크숍’ 안내

대한진단유전학회는 오는 7월 19일부터 21일까지 3일 간 서울의대 교육관에서 2018 임상 차세대염기서열검사 워크숍을 개최할 예정이다. 자세한 프로그램은 아래 참조.

7/19 (Thu)	7/20 (Fri)	7/21 (Sat)
NGS data structure and format	Strategy for variant filtering	Design of a targeted gene panel
Database and annotation	Copy number analysis tools	Clinical application of gene pane for diagnosis
GATK Best Practice for germline SNP/indel	Evidence assessment using ACMG guideline	Clinical application of gene panel for treatment decision
Commercial NGS analysis suite: NextGENe	Evidence assessment using ACMG guideline: practice	Validation and quality assurance of NGS-based test
Commercial NGS analysis suite: Alamut	Interpretation of somatic variants	Laboratory accreditation
Data visualization using IGV	Reporting and incidental findings	Genetic counseling in the NGS era

‘2018 유전상담 연수강좌’ 안내

대한진단유전학회는 오는 8월 중 ‘2018 유전상담 연수강좌’를 개최한다. 학회는 차세대 유전체 분석의 임상 검사 도입에 발맞추어 해당 연수강좌를 개설했다. 특히 지난해 열린 유전상담 연수강좌 기초편에서는 기본적인 유전 상담의 내용부터 질환별 예시뿐 아니라 신설 유전상담 클리닉 사례를 공유하는 등 프로그램 구성 측면에서 참석자들에게 큰 호평을 받은 바가 있다. 올해 연수강좌의 프로그램은 추후 홈페이지 및 회원 메일을 통해 안내될 예정이다.