

KSGD News Forum

Korean Society for Genetic Diagnostics

Vol.04 / November, 2018

대한진단유전학회 뉴스포럼 | 발행인 김종원 | 편집위원장 고대현 | 편집위원 박혜원 최규태 최종문 | 편집 (주) 트리니티컴즈

Focus on

Droplet digital PCR 검사 장비 운용 경험

최종문 (녹십자의료재단 진단검사의학과)

Technology Trend

광범위 유전질환 NGS 패널의 임상 적용

Illumina TruSight One 희귀유전질환 패널검사 사용경험

박준홍/김명신 (가톨릭대학교 진단검사의학교실)

정기칼럼

유전자 검사가 끝나면

공선영 (국립암센터 진단검사의학과)

유전성 희귀질환 변이의 체계적인 평가를 위한 대립유전자빈도
(Minor allele frequency) 기준치의 임상 적용 권고안

임정훈 (연세대학교 의과대학)

학회뉴스

최신보험정보

Notable Research

유전자 편집 기술을 탑재한 신개념 항생물질 - 항균드론
(Antibacterial drone)

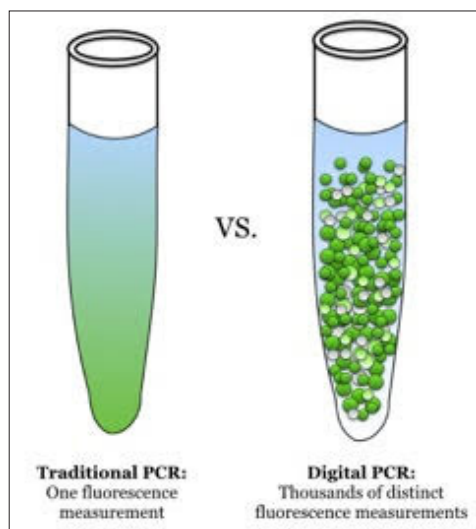
최규태 (충남대학교병원 진단검사의학과)



Droplet digital PCR 검사 장비 운용 경험

최종문 (녹십자의료재단 진단검사의학과)

일반적으로 PCR 검사는 증폭 산물의 존재 여부와 그 양을 측정할 경우 Gel, Capillary와 같은 media를 통해 전기 영동 (Electrophoresis)을 하거나, 형광 dye에 tagging하고 PCR 반응에 따른 형광의 변화를 측정합니다. 일반 PCR 검사의 경우 한 tube 내에서 template와 primer, enzyme 등을 서로 섞인 상태에서 반응이 일어납니다. Digital PCR은 이와 달리 PCR mixture를 oil droplet (Droplet digital PCR, ddPCR)이나 microfluidic chip (Chamber digital PCR, cdPCR)등을 이용해 여러 개의 분리된 공간으로 나누고 이들의 반응 정도를 각각 측정합니다. [\[그림 1\]](#)



[\[그림 1\]](#) 일반 PCR과 ddPCR (Droplet digital PCR)의 차이

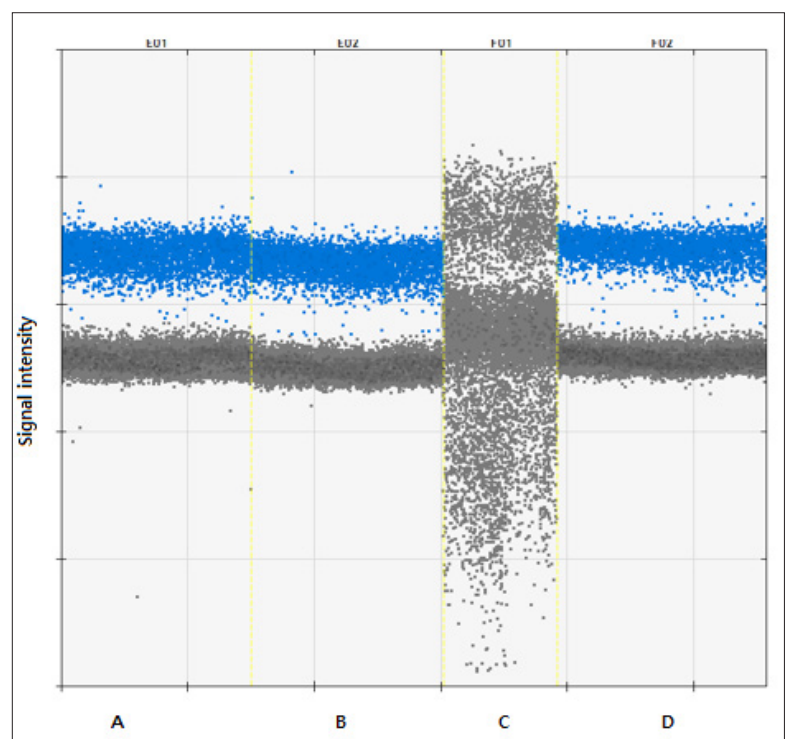
다른 물질에 비해 상대적으로 저농도로 존재하는 template는 격리된 공간 내에 0개 혹은 1개만 들어가게 되고 template가 존재하는 droplet만 반응이 일어납니다. 이를 통계학적 기법을 통해 계산하면 template의 절대량을 높은 정확도로 추정할 수 있습니다. Digital PCR은 표준 곡선 없이도 절대 정량이 가능하며 민감도가 높아 Liquid biopsy, Copy number detection, expression quantification, single cell analysis, 미생물의 검출이나 NGS Library의 정량 등 다양한 방면에서 활용 가능합니다.

저희 검사실에서는 이러한 digital PCR의 장점을 살려 NGS 검사를 통해 나온 유전자의 copy number change를 ddPCR로 확인하고자 실험을 진행했습니다. Whole exome sequencing이나 Panel sequencing으로 large deletion/duplication을 검출하는 것은 상당히 도전적인 과제입니다. ExomeDepth나 VisCap과 같은 copy number 변화를 검출하는데 유용한 Bio-informatics tool들이 공개되어 있으나, NGS library prep 과정에서 생기는 여러 가지 변수에 의해 false positive가 발생할 수 있습니다. 이에 대해 확인할 추가적인 검사로 여러

가지 검사법이 검토되었으나, 기존의 Multiplex ligation-dependent probe amplification이나 Chromosomal microarray analysis와 같은 copy number change를 확인하는 검사법들은 비싸고 검출하고자 하는 위치에 따라 확인이 불가능한 경우도 존재합니다. Real-time PCR이나 capillary electrophoresis를 이용한 Fragment analysis로도 exon copy number를 추정하는 것이 가능하나, 검사 정확성이 다소 낮고 대부분의 경우 검사 세팅에 많은 시행착오가 수반됩니다. 검출하고자 하는 CNV가 특정 유전자에만 고정되어 있다면 큰 문제가 되지 않지만 보고자 하는 유전자가 다양하다면 기존 플랫폼만으로는 단시간 내에 목표를 이루는 것이 어렵다고 판단했습니다. 이에 비해 ddPCR, 특히 intercalation dye를 이용한 ddPCR의 경우, primer dye tagging이 필요 없어, 검사 비용을 절약하고 primer 제작에 걸리는 시간도 2~3일로 단축되어 신속한 결과 판정에 많은 도움이 될 수 있을 거라고 생각했습니다.

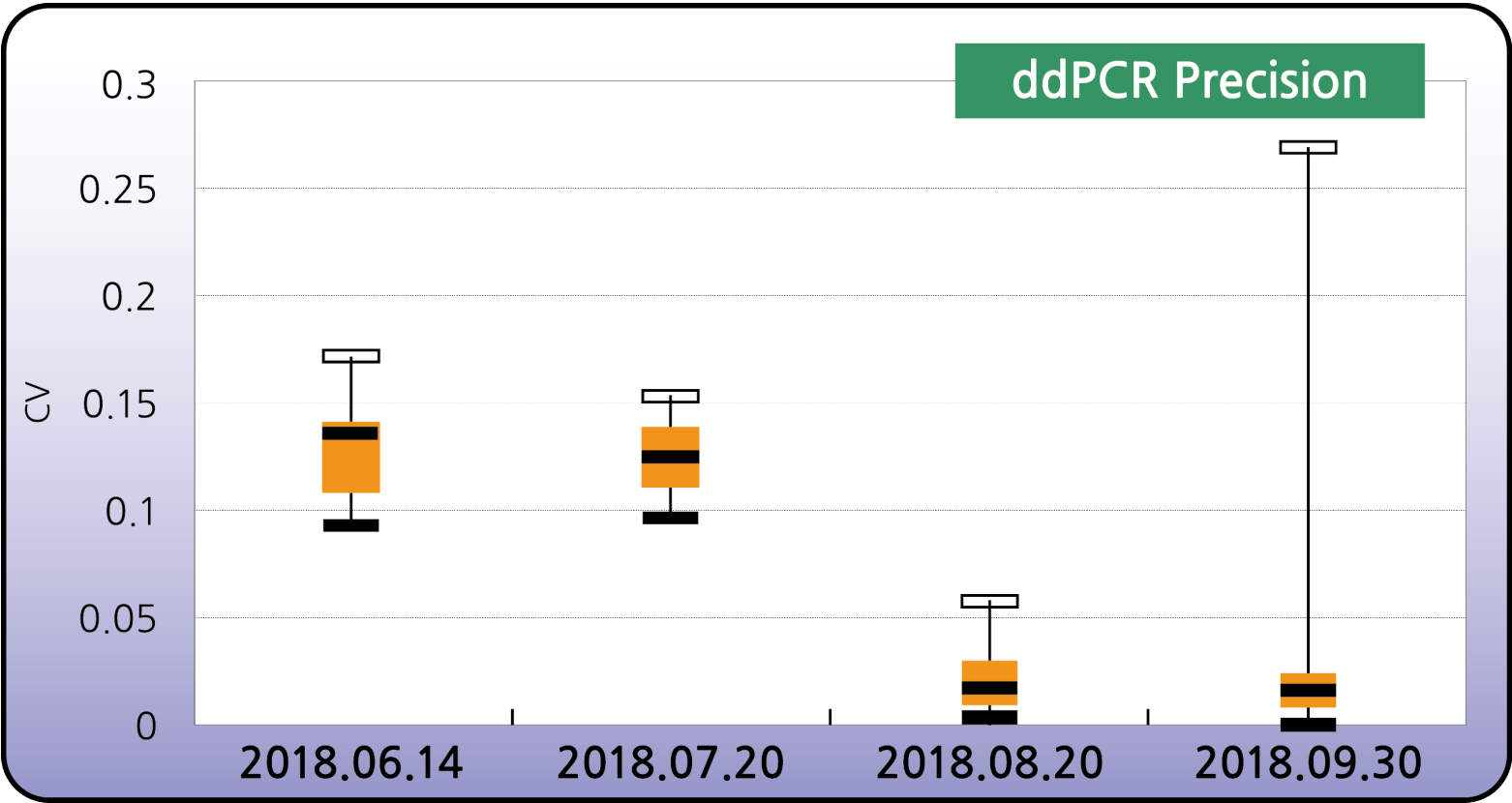
결론을 먼저 말씀드리면 검사 정확성이 높고, 빠르게 세팅할 수 있다는 점에서는 만족스러웠으나 일반 PCR 검사에 비해 변수가 많았고, robust한 결과를 얻기 위해서는 많은 시행착오가 필요할 수 있음을 느꼈습니다. ddPCR을 활용함에 있어서 주로 문제가 됐던 점은 비특이적 증폭과 droplet rain 문제였습니다.

비특이적인 증폭은 Primer가 제대로 설계되지 않거나 PCR 조건의 최적화되지 않은 경우 흔히 발생합니다. 이는 digital PCR만의 자체 문제라기보다는 PCR을 이용한 검사의 공통적인 문제라 볼 수 있으나 이를 확인할 수단이 ddPCR은 제한되어 있어 겔 전기 영동 등 추가 검사가 필요할 수 있습니다. 또 다른 주요 문제인 Droplet rain은 oil droplets이 물리적 요인으로 인해 깨지면서 발생하는 현상입니다. [\[그림 2\]](#)



[\[그림 2\]](#) A, B, D의 경우 정상적으로 데이터가 생산되었으나, C 열의 데이터는 droplet의 cluster 형성이 불량하고 흘러내리는 듯한 양상의 "Droplet rain"을 보이는 것을 알 수 있습니다. Droplet rain이 발생하면 PCR 양성 droplet(파란색)을 제대로 읽지 못해 실제보다 농도가 낮게 측정됩니다.

제조사에서는 이러한 문제가 대부분 droplet을 파이펫으로 옮기는 과정에서 발생하므로, 파이펫팅 시 그 속도와 각도에 주의하고, 가급적 전동 파이펫을 사용할 것을 권장합니다. 실제 실험자의 경험이 쌓이고 실험 프로세스를 개선하는 과정에서 검사의 정밀도가 증가하는 양상을 보였으나 [그림 3] 실험 오류를 100% 차단하는 것은 불가능했으며 모든 test를 duplication을 통해 이를 확인하는 것이 필수적이었습니다. Duplication 과정에서 발생하는 시간 및 시약의 낭비를 고려할 때 droplet rain의 정도를 측정할 수 있는 지표와 threshold의 설정이 필요하다고 생각합니다.



[그림 3] 검사 일자 별 ddPCR 정량 값의 CV값 변화에 대한 box plot. 평균 CV값은 검사가 안정화되어 가면서 점차 감소했으나 9월 30일 일부 실험에서 droplet rain이 발생하여 max CV(흰색)가 올라간 양상을 보입니다.

현재로서는 ddPCR을 기존 검사법인 Real-time PCR을 대체한다기보다는 보완하는 용도로 사용하는 것이 검사 효율성에서 나을 것으로 판단됩니다. Real-time PCR의 정량 과정은 표준 곡선 문제가 해결되면 그 이후 과정은 Digital PCR보다 검사 단계가 단순하며 PCR contamination의 가능성도 크지 않다는 장점이 있습니다. 만약 상품화된 검사 키트가 있거나, 동일한 primer를 이용하여 많은 수의 검체를 정량하는 경우 real-time PCR이 ddPCR보다 나은 선택일 것입니다. 하지만 liquid biopsy, microbiome, single cell PCR 등 새로운 검사법이 점차 임상 영역에 들어오고 있고 이러한 검사들이 필요로 하는 검사 정확성의 수준을 기존 real-time PCR만으로는 기대하기 어려우므로, digital PCR의 검사 정확성, 편의성 부분이 현재보다 개선된다면 향후에는 ddPCR만의 확고한 위치를 가질 수 있을 것이라고 생각합니다.

광범위 유전질환 NGS 패널의 임상 적용

Targeted Panel Sequencing, Illumina TruSight One Panel

Next-generation sequencing 유전자 패널 검사

차세대염기서열분석(Next-generation sequencing, NGS)은 대용량 병렬형 염기서열분석으로 하나의 유전체를 다수의 절편으로 분해하여 각 절편의 염기서열을 동시에 읽어내어 얻어진 유전체 데이터를 생물정보학적 기법으로 통합분석하는 유전자 검사기술이다. NGS 유전자 패널 검사는 2017년 보건복지부 고시에 따라 시작되어 2018년 10월 기준 52개 병원으로 확장되었다. 국가에서는 2014년부터 희귀질환 진단지원사업을 시행하여 NGS를 이용한 유전성 질환 검사를 지원해왔다.^[1]

유전성 질환은 동일 유전적 결함을 가진 사람에서도 표현도(expressivity)가 다르고 침투율(penetrance)이 불완전하여 임상증상이 다양하게 나타난다. 표현도는 동일한 유전질환에 이환된 개인 간 유형 및 중증도 등 임상상의 변이가 존재하며, 동일 가족 구성원에서도 다양한 표현도를 보일 수 있다. 침투율은 특정 질환을 유발하는 돌연변이를 가진 사람 중에서 실제 임상증상을 보이는 사람의 비율로 발병 연령이 늦거나 표현도(expressivity)가 다양한 질환의 경우일수록 낮은 침투도를 보일 수 있다. 또한 allelic heterogeneity, locus heterogeneity 외에도 원인유전자의 발현에 영향을 주는 다른 유전자(modifying genes)의 존재, 환경 요인 등의 상호작용에 의해 더욱 다양한 표현형이 나타날 수 있다.

유전형을 기반으로 내린 진단이 표현형과 일치하는 것조차 기대하기 어려운 상황에서 표현형으로 유전형을 유추해 내는 어려움은 더할 수밖에 없다. 따라서 ‘어떤 유전자를 선정하여 검사를 처방할 것인가?’라는 결정을 주치의가 하게 된다.

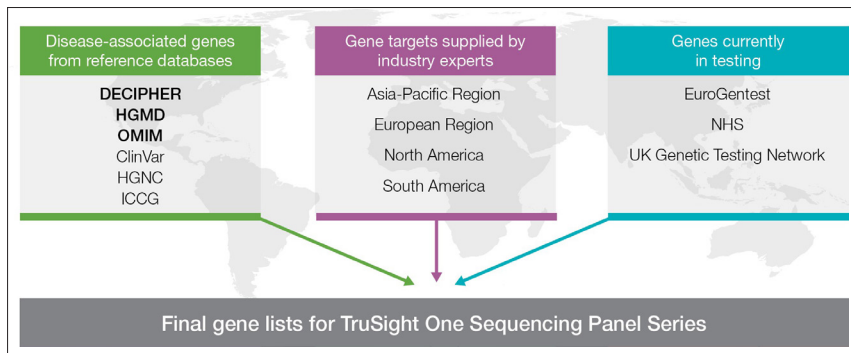
Whole Exome Sequencing VS Targeted Panel Sequencing

NGS 유전자 검사로 동시에 검사할 수 있는 유전자 개수는 계속 늘고 있지만 그와 더불어 질환과 연관된 유전자를 선정하고 패널을 구성하는 어려움도 늘고 있다.

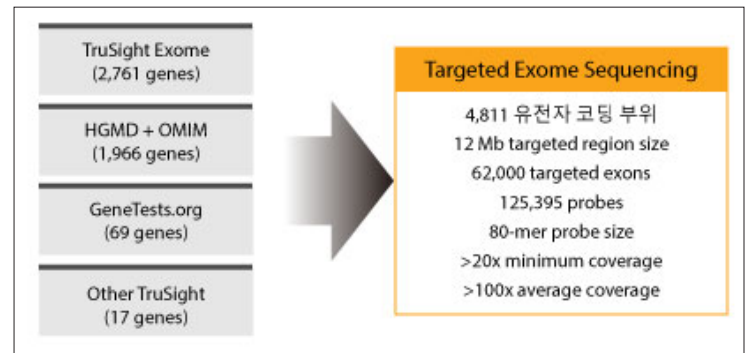
Whole exome sequencing(WES)은 단백질을 코딩하는 인간 유전체의 2%를 차지하며 유전질환을 유발하는 원인 유전자 돌연변이의 85%가 위치한 엑솜(exome)을 분석하는 NGS 검사이다. 주로 유전질환에 기여하는 새로운 원인 유전자를 발굴하기 위해 사용하며 비교적 높은 검사비용과 고난도의 생물정보학적 분석기법이 요구된다. 그러나 다양한 원인 유전자의 돌연변이에 의한 복합 유전질환의 경우 환자의 임상증상을 근거로 Resequencing 검사를 시행하는 것이 비용과 효율 면에서 유용하게 사용될 수 있다. Resequencing은 이미 기준염기서열이 완성된 전장 유전체를 기준으로 환자의 염기서열을 비교 분석하는 검사기술로 유전형-표현형이 규명된 유전질환의 경우 특정 원인 유전자를 선택적으로 선별하여 비교 분석하는 Targeted panel sequencing이 활용된다. 대표적인 WES과 Targeted panel sequencing의 임상적 유용성을 평가하는 연구는 에스토니아의 타르투 대학병원에서 수행되었는데 WES의 진단율은 28%(18/65), 광범위 유전질환 NGS 패널의 진단율은 26%(132/501)이었다. 이는 질환별로 선별되지 않은 환자의 검사 결과로 광범위 유전질환 NGS 패널과 WES 간의 진단율이 차이가 크지 않다는 것을 보여주었다.^[2]

4318개의 Targeted Panel Sequencing – Illumina TruSight One 패널

에스토니아 논문 연구에서 사용된 대용량 유전자 패널은 Illumina사의 TruSight One 패널로 멘델 유전질환과 관련된 유전자에 대한 상용화된 임상용 엑솜시퀀싱(Clinical exome sequencing)이다. 보통 Targeted Panel Sequencing 검사에 사용되는 유전자 수가 300개 내외인 반면 TruSight One 패널은 유전질환의 원인 유전자 4,813개가 포함된 62,000개의 엑솜을 빠르고 효율적으로 분석할 수 있다. TruSight One 패널은 Human Gene Mutation Database(HGMD)와 the Online Mendelian Inheritance in Man(OMIM) 자료에서 유전질환 관련 유전자를 추출하고 GeneTests.org를 참고하여 부족한 유전질환 관련 유전자를 추가하였다. 이를 통해 제작된 TruSight One 패널의 크기는 12 Mb이다. 이와 같은 광범위 NGS 패널을 운영하면 결과적으로는 환자의 진단에 소요되는 비용과 노력을 감소시킬 수 있다. 따라서 TruSight One Panel은 Whole Genome Sequencing이나 WES에 비하여 임상 검사실에서 빠르고 효율적으로 NGS 분석을 수행할 수 있는 검사로 사용될 수 있다.



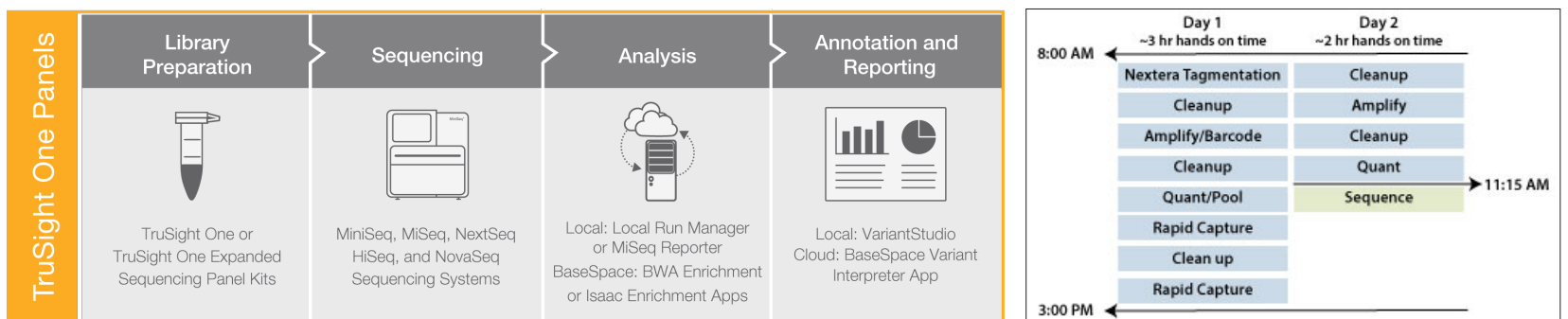
[Figure 1] TruSight One Series Global Gene Content Contributors. The TruSight One Panels focus on exonic regions of the genome with known disease-associated mutations.



[Figure 2] Illumina targeted gene sequencing panel TruSight One 패널 소개³

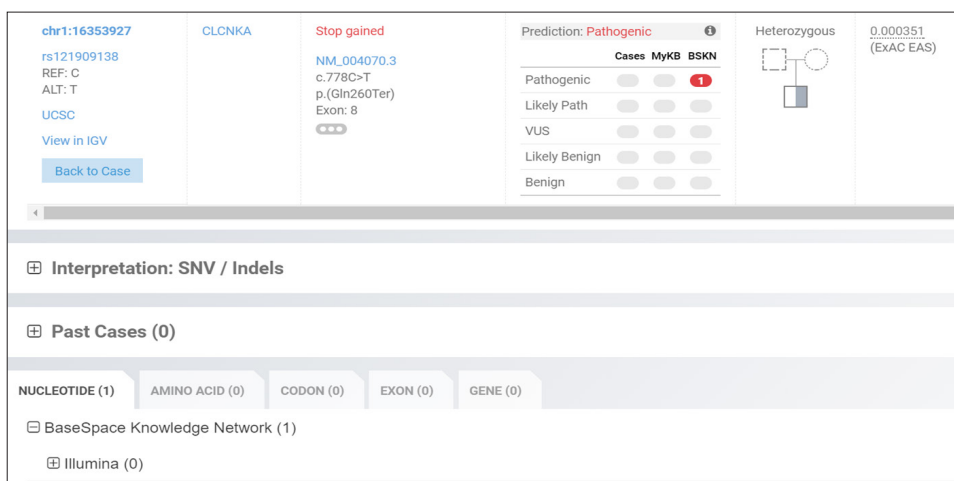
TruSight One Panel 검사 방법

NGS 유전자 패널 검사는 인체 유래물에서 추출한 50 ng의 핵산을 이용하여 라이브러리를 제작하는 전처리 과정과 NGS 장비에서 염기서열분석을 진행하는 과정으로 나뉜다. TruSight One 패널은 Hybridization Enrichment 방식을 택하고 있다. 세부적으로는 핵산을 분절화시키는 단계(Tagmentation)와 PCR 증폭 단계, 혼성화 단계, PCR 산물 클린업 단계로 나뉘지며 이틀간 실험이 진행된다.



[Figure 3] TruSight One Workflow—The Illumina TruSight One Workflow provides a solution for every step from library preparation to data analysis and data reporting.

장비는 Illumina Miseq Dx 와 NextSeq 550Dx를 사용할 수 있는데 MiSeq Dx 장비는 한번에 3 검체를 실험할 수 있고, NextSeq 550Dx 장비는 12검체를 동시에 진행할 수 있다. NextSeq 550Dx 장비도 최근 체외진단 의료기기로 허가를 받았으며 검사 처리 용량이 커서 Whole Exome Sequencing이나 Whole Genome Sequencing 이 가능하다. 결과는 Illumina에서 제공하는 BaseSpace Sequence



[Figure 4] Illumina Variant Interpreter[2차 분석 소프트웨어(BI)] 구동 화면

Hub 분석 파이프라인을 통해 유전자 내 염기서열의 변이를 찾을 수 있으며 정도관리 보고서와 변이 정보가 생성된다. 질병 연관성과 표현형, 인종별 SNP 비율과 같은 정보는 Illumina VariantStudio 및 Base space variant interpreter (BSVI) 소프트웨어를 이용하여 분석하고 판독 보고서 작성이 가능하다. BSVI는 ACMG 가이드라인에 따라 변이 분류 정보를 제공하며 환자의 유전자형-표현형의 연관성을 논문 database와 연계할 수 있으며 누적된 판독 자료를 내부 정도관리에 이용할 수 있다.^[3] [Figure 4]

[참고문헌]

- [1] 2017년도 진단지원사업 실적보고서 (박성섭. 서울대학교 병원, 2017)
- [2] Large gene panel sequencing in clinical diagnostics-results from 501 consecutive cases, Clin Genet 2018;98:78-83
- [3] TruSight™ One Series of Sequencing Panels Data Sheet, Pub. No. 670-2013-015-C QB #4728
- [4] Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med 2015;17:405-424.

IIlumina TruSight One 희귀유전질환 패널검사 사용경험

박준홍/김명신 (가톨릭대학교 진단검사의학교실)

도입배경

정밀의료(precision medicine)는 유전자, 환경, 생활습관 등 환자 개인의 가변성을 고려해 효과성을 극대화할 수 있는 질병 치료 및 예방 방법을 의미한다. 우리나라에서도 보건복지부에서 차세대염기서열분석(Next-Generation Sequencing, NGS)기반 유전자 패널검사를 고시하여 2017년 3월부터 유전성 유전자검사의 경우 질환별로 1회 인정하여 급여검사(본인부담 50%)로 시행할 수 있게 되었다. 본 기고에서는 가톨릭유전진단검사센터와 가톨릭선천성질환센터를 운영 중인 상급의료기관에서 Illumina TruSight One 희귀유전질환 패널검사 사용경험에 대해 공유하고자 한다.

고려사항

우리나라에서는 희귀질환을 유병률이 2만 명 미만으로, 인구 10만명 당 42.5명 이내의 유병질환으로 적절한 치료방법과 치료의약품이 개발되지 않은 질환으로 정의하고 있으며 세계보건기구에 의하면 약 7,000여 종이 넘는 것으로 알려져 있다. 희귀질환별 유전자 패널 구성은 현재까지 관련 연구를 근거로 표현형-유전형 상관성이 규명된 유전자만을 선별적으로 선정하는 것이 매우 중요하다. 또한 각 검사실에서 자체 제작한 유전자 패널 검사를 시행할 경우, 패널의 검사 수행능력과 유효성 검증 등의 검사의 유효성을 실제 검사 시행 전에 반드시 평가해야만 한다. 그러나 자체 제작 유전자 패널 검사를 완벽히 검증할 수 있는 표준화된 검증물질이나 정도관리물질이 없으며 특정 희귀질환에 대한 검증용 환자 검체도 확보가 어려울 실정이다. 특히 원인 유전자가 다양한 복합유전질환의 경우 개별 패널검사를 각 검사실에서 모두 구비하는 것은 현실적으로 불가능하므로 1회 시행으로 다수의 유전질환을 진단할 수 있는 범용 유전자 패널검사를 시행하는 것이 현실적으로 도움이 될 수 있다. 이러한 측면에서 Illumina TruSight One 희귀유전질환 패널검사는 유전성 희귀질환 관련 4,813개 유전자의 돌연변이 여부를 1회 검사로 확인할 수 있는 매우 높은 결과 생산성을 보이는 상용화된 차세대 염기서열 분석검사이다. 유전질환 패널검사로 선정된 세부 유전자 항목은 제조사 홈페이지에서 제공하고 있다.

(<http://emea.support.illumina.com/downloads.html>)

패널검사 도입 시 유효성 검증

Illumina TruSight One 희귀유전질환 패널검사는 기본적으로 Germline mutation을 검출하는 측면에서 allele burden(정량, %) 이 아닌 zygosity에 따라 heterozygous/homozygous 를 구분하는 것이 중요하므로 10x, 20x, 30x 에서 depth of coverage를 95%, 90%, 85% 이상으로 기대하고 yield on target과 mean depth(x)를 산출하여 mapping data의 질을 평가하였다. 또한 의심되는 유전자 돌연변이의 read depth (<30x) 가 낮거나 환자의 임상증상에 관여하는 것으로 판단되는 경우 Sanger sequencing을 기준검사법으로 채택하여 돌연변이 유무를 재확인하였다. NGS 도입 전 가톨릭유전진단검사센터에서 Sanger sequencing으로 진단한 16종의 다양한 단일유전질환과 복합유전질환(유전성 난청, 유전성 대동맥질환, 선천성 면역 결핍증, 적혈구 효소결핍증, 판코니빈혈 등) 환자의 DNA를 이용하여 정확도 검증을 무작위 맹검법으로 분석한 결과 기존 Sanger sequencing 결과와 모두 일치하였다.

검사운영

서울성모병원에서는 NextSeq 장비를 이용하여 Illumina TruSight One 희귀유전질환 패널검사를 위해 환자말초혈액에서 추출한 50 ng DNA를 대상으로 12개의 검체를 동시에 1회 검사로 시행하고 있다. 주요 패널검사는 임상 의사들의 관심이 높은 유전성 난청, 유전성 대동맥질환, 선천성 면역결핍증과 관련된 유전자 항목을 아분류하여 시행하고 있으며 또한 타 상급의료기관에 비해 혈액질환/혈액암 환자의 분포가 높아 선천성 백혈구 감소증, 선천성 혈소판 감소증, 유전성 용혈성 빈혈, 판코니빈혈, 골수부전증후군 등의 선천성 혈액질환에 대한 유전자 패널을 세분화하여 검사의 분석 정확도를 높이고 있다. 기본적으로 read depth 의 95%가 10X 이상임을

Illumina TruSight One 희귀유전질환 패널검사 사용경험

확인하고 Exome sequencing 후 생산된 FASTQ 파일은 Illumina VariantStudio, BaseSpace Variant Interpreter 등의 클라우드 기반 분석 소프트웨어를 이용하여 NGS 데이터 분석 및 결과 보고가 가능하다. 해당 프로그램에서는 Germline mutation과 Somatic mutation 등 쉽게 분석할 수 있는 다양한 분석 옵션을 원하는 생물정보분석에 따라 선택하고 수정할 수 있는 장점이 있다. 또한 단일 생물정보분석 파이프라인만을 사용하여 발생하는 분석 오류를 방지하기 위해 리눅스 기반의 생물정보분석 파이프라인을 구축하여 2차 분석을 시행하고 있다. 2차 분석 시, 서로 다른 2인 이상의 진단검사의학 전문의가 dbNSFP 프로그램을 이용하여 검출된 변이의 HGVS 명명, 변이의 위치, 변이의 종류, 변이의 zygoty, 변이의 depth, 변이의 공공 시퀀스 데이터베이스별 빈도, 관련 임상증상(OMIM, Clinvar 등), 병적 예측, 보존성 평가 등이 정리된 TSV 파일을 맵검분석하여 분석결과를 토의와 문헌고찰 후 결과통보하고 있다. 결론적으로 Illumina TruSight One 희귀유전질환 패널검사는 Whole Genome Sequencing (WGS) 또는 Whole Exome Sequencing (WES)과 비교하여 상대적으로 저렴한 검사비용과 신속한 검사소요시간으로 효율적으로 희귀유전질환 관련 유전자에 대한 exome sequencing을 수행할 수 있는 매우 우수한 NGS 검사로 평가할 수 있다.

chr1:16353927 CLCNKA Stop gained
 rs121909138
 REF: C
 ALT: T
 UCSC
 View in IGV
 Back to Case

Prediction: Pathogenic
 Cases MyKB BSKN
 Pathogenic ☐ ☐ ☒ 1
 Likely Path ☐ ☐ ☐
 VUS ☐ ☐ ☐
 Likely Benign ☐ ☐ ☐
 Benign ☐ ☐ ☐

Heterozygous
 0.000351 (ExAC EAS)

Filters P
 GQX ...
 Quality ...
 Var... ...
 Alt
 Tot... ...

Interpretation: SNV / Indels

Past Cases (0)

NUCLEOTIDE (1) AMINO ACID (0) CODON (0) EXON (0) GENE (0)

BaseSpace Knowledge Network (1)

Illumina (0)

ClinVar RCV Variants (1)

CLINVAR ID	GENOME BUILD	OMIM	PHENOTYPE	PATHOGENICITY	SUBMITTED BY	LAST UPDATED	STATUS
RCV000008028.2	HG19	613090,602024.0002	Bartter syndrome, type 4b	Pathogenic			Enabled

[Fig 1] BaseSpace Variant Interpreter 프로그램을 이용한 Trio 분석 결과로 율슨병 환자의 ATP7B 돌연변이 규명(다우바이오테크 제공)

유전자 검사가 끝나면

공선영 (국립암센터 진단검사의학과)

이야기에 앞서 국립암센터 유전상담 클리닉을 소개합니다. 저희 유전상담 클리닉은 2003년부터 운영되어 현재 월평균 80여 명의 암환자 혹은 검사가 필요한 가족의 가족력을 확인하고, 필요한 경우 환자와 상의하여 검사 처방을 한 후 결과가 보고될 때 의미를 설명하는 절차로 상담을 진행하고 있습니다. 특히, 유전상담 다학제 진료를 운영하여 각 진료과별 상담을 원스톱으로 진행하여 한 명의 주치의만으로 설명이 제한적일 수밖에 없는 한계를 극복하는 통합 진료 시행을 지향합니다.

유전자 검사에 대한 부정적 인식이 줄고 패널 검사 등 다양한 유전자를 포함하는 검사가 증가하면서 최근에 느껴지는 가장 큰 어려움은 VUS (Variant of Unknown Significance) 미분류 변이입니다. 검사 결과 미분류 변이가 관찰될 때 어떻게 설명할 수 있을까요? 우선 용어부터 어렵습니다. 미분류 변이는 그 자체로 설명하기보다는 세 가지 카테고리를 모두 설명함으로써 의미가 드러나는 분류입니다. 환자분께 설명드리는 말을 글로 옮기자면 ‘질병의 원인이라고 봐야 하는 돌연변이가 있습니다. 그리고, 우리의 생김새가 개인마다 다른 것도 유전자의 변이로 인한 것인데 이러한 질병 관련성이 없는 변이를 중성 변이라고 합니다. 다만 아직까지 의미가 명확하지 않는 돌연변이와 중성변이 중간에 위치한 변이가 있는데 이를 미분류, 아직 의미를 모른다는 의미의 미분류 변이라고 합니다. 이 미분류 변이의 의미는 시간이 지나면서 저희가 해석하는 데이터가 쌓이고 연구를 통해서 밝혀지는데 대부분의 경우 중성 변이로 판명되지만 일부는 돌연변이로 판명되는 경우도 있어 의미가 정확해질 때까지 재해석이 필요합니다’입니다. 이후 환자분께서 원하시는 경우 1년 후 외래에서 재해석의 절차를 거치고 혹시 원하지 않는 경우는 다시 한번 의미가 변경될 수도 있음을 설명드리는 것으로 마무리가 됩니다.

1년 후, 대부분의 미분류 변이는 미분류 상태인 경우가 많습니다. 하지만, 간혹 돌연변이로 의미가 변경되는 경우도 있어 역시 처음 결과를 설명할 때 이에 대한 충분한 설명이 필요하다고 생각합니다. 이때, 진료 기록은 어떻게 작성해야 할까? 기왕에 보고된 검사 결과의 해석을 변경해야 할지 아니면 의무기록 상에 의미 해석의 변경에 대한 기록을 남기는 것으로 갈음할지 아직 해결되지 않은 고민입니다. 보고 결과를 수정하지 않은 상황에서는 다른 의료진이 혼란을 가질 수 있는 가능성이 높기 때문입니다.

유전자 검사가 끝나면, 환자도 의사도 선택해야 하는 많은 일들이 기다리고 있습니다. 미분류 변이라는 결과에 무심한 환자분들도, 마치 돌연변이 결과 보고를 받은 듯 두려워하는 환자분들도 진료가 거듭될수록 이해도가 높아진다는 것은 공통된 사실입니다.

앞으로 더 많은 분들이 유전자 검사를 진행하게 될 것이고 정보의 바다에서 정확하지 않은 정보로 인해 혼란이 가중될 수 있을 것 같습니다. 이때 유전상담 클리닉의 역할은 무엇일까요? 정확한 정보 제공의 창구, 소통의 기회 속에 환자, 혹은 가족이 자기 결정권을 존중받는 클리닉, 새로운 의사-환자 관계를 고민하는 지점으로 자리매김할 수 있을 것 같습니다.

아직 갈 길이 멀다고 생각합니다. 올해까지 다섯 병원에서 견학을 오셨고 그중 기쁘게도 유전상담 클리닉을 개소하셔서 활발히 운영하고 계신 병원도 있지만 저변을 넓히고 공통의 어려움을 상의하여 표준을 만들어가는 움직임이 절실합니다. 아직까지 첫 발을 떼지 않으신 유전상담 클리닉을 개설해야 되나 고민 중인 선생님들께 저희 국립암센터는 열려 있습니다. 많이 오셔서 필요한 부분을 가져가셨으면 합니다. 감사합니다.

유전성 희귀질환 변이의 체계적인 평가를 위한 대립유전자빈도 (Minor allele frequency) 기준치의 임상 적용 권고안

얼마나 드물어야 질환 원인 유전자 변이가 될 수 있을까?

임정훈 (연세대학교 의과대학)

최근 차세대 염기서열 분석(Next-Generation Sequencing; NGS) 기술이 발전함에 따라 기존의 진단기술로는 확인하기 어려웠던 유전성 희귀 질환들이 진단유전학적/분자생물학적으로 명확하게 진단되고 있으며 해당 결과는 치료 방향 설정 및 유전 상담에 적극적으로 활용되고 있습니다. 유전검사를 통해 확인된 유전자 변이(genetic variant)의 의미를 해석하는 과정에는 개별 유전자 변이에 대한 다양한 근거(evidence)를 수집하여 종합적으로 판단이 필수적이므로 진단유전학 전문가의 역할 및 판독이 매우 중요합니다. 개별 유전자 변이 판독에 있어서 임상 현장에서 가장 많이 사용되고 있는 2015년 미국의학유전학회(American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG) 가이드라인^[1] 중 주요 근거로 제시하고 있는 대립유전자빈도(minor allele frequency, MAF)는 해당 변이가 인구집단(population)에서 발견되는 드문 정도(rarity)를 수치화한 것으로 이해할 수 있습니다.

실제로 임상 유전체 검사실에서 수행하는 유전성 희귀 질환 환자의 NGS 분석 과정 중 수많은 변이들 가운데 질환 원인 유전자 변이(pathogenic variant)를 찾기 위한 첫 번째 단계로써 보편적으로 많이 사용하는 기준이 바로 대립유전자빈도(MAF)입니다. 당연히게도 특정 변이가 희귀 질환의 원인 유전자 변이가 되기 위해서는 인구집단에서 해당 변이의 발견 빈도가 매우 낮아야 합니다. 이러한 논리를 적용하는 과정에서 주의하여야 할 2가지 사안으로 인구집단의 정의와 낮은 MAF의 기준치를 고려해야 합니다.

먼저, 인구집단이라 함은 “희귀 질환이 없어 정상으로 간주될 수 있는 대조군 집단”이라고 할 수 있습니다. 기존 2015 ACMG 가이드라인에서는 Exome Aggregation Consortium (ExAC), Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project 등의 인구집단 데이터베이스 활용을 권고하였습니다. 이때 각각 데이터베이스의 특성을 잘 파악해야 하는데, 실제로 기존에 가장 많이 사용하는 ExAC 데이터베이스에 포함된 60,706명의 염기서열 변이들은 17개 프로젝트의 총합으로 중증 소아 질환(severe pediatric disease) 환자들은 제외한 데이터베이스라는 설명이 있습니다. 하지만 해당 인구집단들이 모두 건강한 개인들만 포함되어 특정 유전성 희귀 질환에 대한 대조군이라고 추정할 수 있는지에 대해 생각해 볼 필요가 있습니다. 또한 대규모 유전체 데이터가 축적되면서 임상검사실에서 활용할 수 있는 새로운 인구집단 데이터베이스가 발표되고 있으며, 기존의 인구집단 데이터베이스가 갱신되고 있는(예로 gnomAD) 현 시점에서 어떤 데이터베이스를 참고할지 고민되게 됩니다.

두 번째로 해당 변이가 인구집단에서 얼마나 희귀하게 존재해야 하는지에 대한 판단이 필요합니다. 예를 들어, 충분히 많은 수의 인구집단에서 해당 변이가 존재하지 않는다면 즉 MAF가 0이라면 해당 변이가 유전성 희귀 질환의 원인 유전자 변이가 될 수 있는 기본 조건을 갖추었다고 할 수 있습니다. 물론 인구집단에서 발견되지 않은 변이가 모두 원인 유전자 변이라고는 할 수 없습니다. 하지만 환자에서 확인된 변이가 늦게 표현형을 나타내거나 불완전한 침투도(incomplete penetrance)를 보이는 경우에는 원인 유전자 변이도 정상 인구집단에서 MAF가 낮은 값을 보일 수 있습니다. 결국 MAF가 0이 아니라고 병원성 분석 대상에서 해당 변이를 제외하는 것은 잘못된 분석 전략이며, 반대로 MAF 기준치를 너무 높게 설정한다면 병원성(pathogenicity) 분석 대상 변이가 무분별하게 많아져서 비효율적인 분석이 됩니다. 따라서 적절한 인구집단 데이터베이스를 활용하여 적절한 MAF 기준치를 설정하는 것은 효과적인 임상 NGS 분석의 첫걸음이라고 할 수 있습니다.

MAF 기준치 설정과 관련하여 최근 Whiffin 등의 연구진들이 2017년 MAF 도출 공식을 제안하였고 이는 타 연구진들에게도 주목을 받았습니다.^[2] 고해상도 분석 체계(high-resolution framework)라고 명명한 MAF 기준치 계산식은 질환별로 설정할 수 있도록 되어 있으며, 특정 유전성 질환의 유병률(prevalence) 외에도 최대 기여 변이의 빈도(maximum allelic contribution) 및 해당 질환의 유전적 침투도(penetrance)를 고려합니다. 또한 유전자의 유전양상(우성/열성)에 따라 제공근의 유무 및 최대 기여 유전자의 빈도(maximum genetic contribution)의 대입 여부로 계산식의 차이를 두고 있습니다. 질환의 종류에 상관없이 분석적 편의성을 위해 획일적인 기준치(예를 들어 MAF 0.01)를 적용하는 방법에 비해 상기 방법은 비교적 합리적이고 객관적이므로 임상검사실에서 활용하기 유용할 수 있으나, 각 수치들의 적절한 추정치 설정이 난해한 동시에 적절한 MAF 기준치 설정에 큰 영향을 미칠 수 있습니다.

따라서 저희 연구진은 국내에서 NGS 검사가 활발하게 적용되고 있는 질환 3가지(유전성 비증후군성 난청, 조기 발생 간질 및 레베르 선천성 흑암시 질환)를 선정하고 각 질환의 유병률, 최대 기여 변이의 빈도, 유전적 침투도, 유전자별 유전양상 등을 양질의 문헌, 데이터베이스 및 임상현장 경험을 바탕으로 MAF를 설정하는 권고안을 작성하였습니다. 3가지 유전성 질환들의 MAF 기준치 값들은 각각 다른 분포를 보였으며, 이는 질환특이적(disease-specific) MAF 기준치 적용의 필요성을 반증한다고 할 수 있습니다. 권고안을 통해 NGS 검사가 급증하는 현시점에서 다양한 질환에 적용할 수 있도록 MAF 설정 방법의 논리적이고 합리적인 예시를 제공하고자 하였으며, 이는 해당 질환에 대한 진단유전학적/분자생물학적 연구가 축적됨에 따라 지속적으로 개선 및 발전해 나가야 할 것으로 생각됩니다.

[참고문헌]

[1] Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med 2015;17:405-24.

[2] Whiffin N, Minikel E, Walsh R, O'Donnell-Luria AH, Karczewski K, Ing AY, et al. Using high-resolution variant frequencies to empower clinical genome interpretation. Genet Med 2017;19:1151-8.

항 목	제 목	세부인정사항		고 시								
나580 유전성 유전자 검사	유전성 유전자 검사 항목별 유전자 종류	나. 중합효소연쇄반응- 확장 (1)중합효소연쇄반응- 교잡반응 주. 유전성 난청 다중검사 유전자명 (01) GJB2, SLC26A4, 12SrRNA, TMPRSS3, CDH23	유전성 난청 다중검사의 급여기준 1. 나580나(1)주. 중합효소연쇄반응-교잡반응-유전성 난청 다중검사의 급여기준은 다음과 같이함. - 다 음 - 가. 선천성 난청이 확진된 경우 나. 중이가 정상이지만 난청이 확진된 유소아 다. 난청을 동반하는 증후군 환자 라. CT, MRI에서 내이 기형이 확진된 경우 마. 원인불명의 진행성 난청 환자 바. 가족 중 유전성 난청이 확인된 환자가 있으며, 동일 질환이 의심되어 실시한 경우 2. 상기 1. 이외 유전성 난청이 의심되어 실시하는 경우에는 「선별급여 지정 및 실시 등에 관한 기준」에 따라 본인부담률을 80%로 적용함. 3. 상기 1. 또는 2.에 해당되지 않는 경우에는 「국민건강보험 요양급여의 기준에 관한 규칙」[별표2] 비급여대상 제3호가목 본인의 희망에 의한 건강검진에 따라 비급여대상임.	보건복지부 고시 제2018-135호 (2018년06월29일 시행) 보건복지부 고시 제2018-160호 (2018년09월01일 시행) (81)								
		다. 염기서열분석 (3) 유전성- 염기서열분석-20회 초과 40회 이하 유전자명 (79) HEXA Gene (80) SLC2A2 Gene (81) GALNS Gene										
누591 핵산증폭 누685 핵산증폭	VRE Genotype [중합효소연쇄반응법] 검사, 반코마이신 내성 장구균 유전자형 검사의 급여기준		누591다 약제내성그룹1 (02) VRE Genotype [중합효소연쇄반응법]검사와 누685가 다중그룹1 (01) 반코마이신 내성 장구균 유전자형 검사는 과거 VRE 보균자, 타병원에서 전원된 환자 중 VRE 감염이 의심되는 환자, 중환자실 또는 혈액종양 병동에 입원한 환자에게 VRE 보균진단 및 격리여부를 판단하기 위해 선별적으로 실시 시 인정하되, 배양검사와 동시에 실시한 경우에 각각 인정함.	보건복지부 고시 제2018-162호 (2018년09월01일 시행)								
누680 핵산증폭 누685 핵산증폭	다중그룹 검사의 급여기준		다중그룹 검사는 2종 이상의 분석물질에 대하여 다중 검사키트(multiplex, panel)를 이용하여 검사를 실시한 경우에 산정하며, 다중그룹 검사의 필수 분석물질 목록과 급여기준은 다음과 같이 함 - 다 음 - <table><tr><th>구 분</th><th>필수 분석물질</th></tr><tr><td>급성설사 원인 바이러스</td><td>아데노바이러스(Adenovirus) 로타바이러스(Rotavirus) 노로바이러스(Norovirus)</td></tr><tr><td>급성설사 원인 세균</td><td>캠필로박터균(Campylobacter spp.) 살모넬라균(Salmonella spp.) 시겔라균(Shigella spp.) 장출혈성 대장균 Enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC, Shiga 독소 생성 E. coli)</td></tr><tr><td>뇌수막염/뇌염/수막뇌염 원인 세균</td><td>대장균(Escherichia coli) 헤모필루스 인플루엔자균 (Haemophilus influenzae) 리스테리아 모노사이토게네스 (Listeria monocytogenes) 수막염균 (Neisseria meningitidis) B군 사슬알균 (Streptococcus agalactiae) 폐렴사슬알균 (Streptococcus pneumoniae)</td></tr></table>	구 분	필수 분석물질	급성설사 원인 바이러스	아데노바이러스(Adenovirus) 로타바이러스(Rotavirus) 노로바이러스(Norovirus)	급성설사 원인 세균	캠필로박터균(Campylobacter spp.) 살모넬라균(Salmonella spp.) 시겔라균(Shigella spp.) 장출혈성 대장균 Enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC, Shiga 독소 생성 E. coli)	뇌수막염/뇌염/수막뇌염 원인 세균	대장균(Escherichia coli) 헤모필루스 인플루엔자균 (Haemophilus influenzae) 리스테리아 모노사이토게네스 (Listeria monocytogenes) 수막염균 (Neisseria meningitidis) B군 사슬알균 (Streptococcus agalactiae) 폐렴사슬알균 (Streptococcus pneumoniae)	
구 분	필수 분석물질											
급성설사 원인 바이러스	아데노바이러스(Adenovirus) 로타바이러스(Rotavirus) 노로바이러스(Norovirus)											
급성설사 원인 세균	캠필로박터균(Campylobacter spp.) 살모넬라균(Salmonella spp.) 시겔라균(Shigella spp.) 장출혈성 대장균 Enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC, Shiga 독소 생성 E. coli)											
뇌수막염/뇌염/수막뇌염 원인 세균	대장균(Escherichia coli) 헤모필루스 인플루엔자균 (Haemophilus influenzae) 리스테리아 모노사이토게네스 (Listeria monocytogenes) 수막염균 (Neisseria meningitidis) B군 사슬알균 (Streptococcus agalactiae) 폐렴사슬알균 (Streptococcus pneumoniae)											

항 목	제 목	세부인정사항		고 시																
			<table><thead><tr><th>구 분</th><th>필수 분석물질</th></tr></thead><tbody><tr><td>뇌수막염/뇌염/수막뇌염 원인 바이러스</td><td>엔테로바이러스(Enterovirus) 단순포진바이러스 1형 (Herpes simplex virus type 1) 단순포진바이러스 2형 (Herpes simplex virus type 2) 수두-대상포진바이러스 (Varicella zoster virus(VZV))</td></tr><tr><td>뇌수막염/뇌염/수막뇌염 원인 진균</td><td>크립토кок쿠스 네오포르만스/가티(Cryptococcus neoformans/gattii)</td></tr><tr><td>폐렴 원인균</td><td>폐렴 미코플라즈마 (Mycoplasma pneumoniae) 레지오넬라뉴모필라 (Legionella pneumophila)</td></tr><tr><td>호흡기 바이러스</td><td>인플루엔자바이러스 A (Influenzavirus A) 인플루엔자바이러스 B (Influenzavirus B) 호흡기합포체바이러스 (Respiratory syncytial virus) 파라인플루엔자바이러스 (Parainfluenza virus) 아데노바이러스 (Adenovirus)</td></tr><tr><td>성매개 감염균 (하부요생식기 감염, 질염등)</td><td>질편모충 (Trichomonas vaginalis) 마이코플라스마 제니탈리움 (Mycoplasma genitalium) 클라미디아 트라코마티스 (Chlamydia trachomatis) 임균 (Neisseria gonorrhoeae)</td></tr><tr><td>반코마이신 내성 장구균 유전자형</td><td>vanA, vanB</td></tr><tr><td>카바페넴 분해효소 유전자</td><td>KPC, NDM, VIM, IMP, OXA-48</td></tr></tbody></table> 가. 다종그룹검사의 필수 분석물질 나. 인정횟수 다종그룹 검사는 질환의 진단을 위하여 실시한 경우 1회 실시함을 원칙으로 함. 다만, 급격한 증상 변화가 있어 임상적으로 필요한 경우 사례별로 추가 인정함. 다. 기타 1) 상기 나.에도 불구하고 「요양급여의 적용기준 및 방법에 관한 세부사항」에서 세부인정사항을 별도로 정한 항목은 해당 고시에서 정한 기준을 따름. 2) 다종그룹 검사의 종수 계산에서 분석물질의 아형(subtype)은 여러 개의 아형을 검사해도 해당 아형들이 속한 분석물질만 계산함. 또한 복수의 종(species)이 있는 바이러스의 경우 해당 바이러스가 속한 분석물질 1종에 대해서만 계산함(파라인플루엔자바이러스, 코로나바이러스, 로타바이러스, 아데노바이러스 등). 이 밖에 인플루엔자바이러스는 세부사항 고시된 A형과 B형 이외의 형(type)에 대해서는 종수 계산하지 않음.	구 분	필수 분석물질	뇌수막염/뇌염/수막뇌염 원인 바이러스	엔테로바이러스(Enterovirus) 단순포진바이러스 1형 (Herpes simplex virus type 1) 단순포진바이러스 2형 (Herpes simplex virus type 2) 수두-대상포진바이러스 (Varicella zoster virus(VZV))	뇌수막염/뇌염/수막뇌염 원인 진균	크립토кок쿠스 네오포르만스/가티(Cryptococcus neoformans/gattii)	폐렴 원인균	폐렴 미코플라즈마 (Mycoplasma pneumoniae) 레지오넬라뉴모필라 (Legionella pneumophila)	호흡기 바이러스	인플루엔자바이러스 A (Influenzavirus A) 인플루엔자바이러스 B (Influenzavirus B) 호흡기합포체바이러스 (Respiratory syncytial virus) 파라인플루엔자바이러스 (Parainfluenza virus) 아데노바이러스 (Adenovirus)	성매개 감염균 (하부요생식기 감염, 질염등)	질편모충 (Trichomonas vaginalis) 마이코플라스마 제니탈리움 (Mycoplasma genitalium) 클라미디아 트라코마티스 (Chlamydia trachomatis) 임균 (Neisseria gonorrhoeae)	반코마이신 내성 장구균 유전자형	vanA, vanB	카바페넴 분해효소 유전자	KPC, NDM, VIM, IMP, OXA-48	
구 분	필수 분석물질																			
뇌수막염/뇌염/수막뇌염 원인 바이러스	엔테로바이러스(Enterovirus) 단순포진바이러스 1형 (Herpes simplex virus type 1) 단순포진바이러스 2형 (Herpes simplex virus type 2) 수두-대상포진바이러스 (Varicella zoster virus(VZV))																			
뇌수막염/뇌염/수막뇌염 원인 진균	크립토кок쿠스 네오포르만스/가티(Cryptococcus neoformans/gattii)																			
폐렴 원인균	폐렴 미코플라즈마 (Mycoplasma pneumoniae) 레지오넬라뉴모필라 (Legionella pneumophila)																			
호흡기 바이러스	인플루엔자바이러스 A (Influenzavirus A) 인플루엔자바이러스 B (Influenzavirus B) 호흡기합포체바이러스 (Respiratory syncytial virus) 파라인플루엔자바이러스 (Parainfluenza virus) 아데노바이러스 (Adenovirus)																			
성매개 감염균 (하부요생식기 감염, 질염등)	질편모충 (Trichomonas vaginalis) 마이코플라스마 제니탈리움 (Mycoplasma genitalium) 클라미디아 트라코마티스 (Chlamydia trachomatis) 임균 (Neisseria gonorrhoeae)																			
반코마이신 내성 장구균 유전자형	vanA, vanB																			
카바페넴 분해효소 유전자	KPC, NDM, VIM, IMP, OXA-48																			

유전자 편집 기술을 탑재한 신개념 항생물질 - 항균드론 (Antibacterial drone)

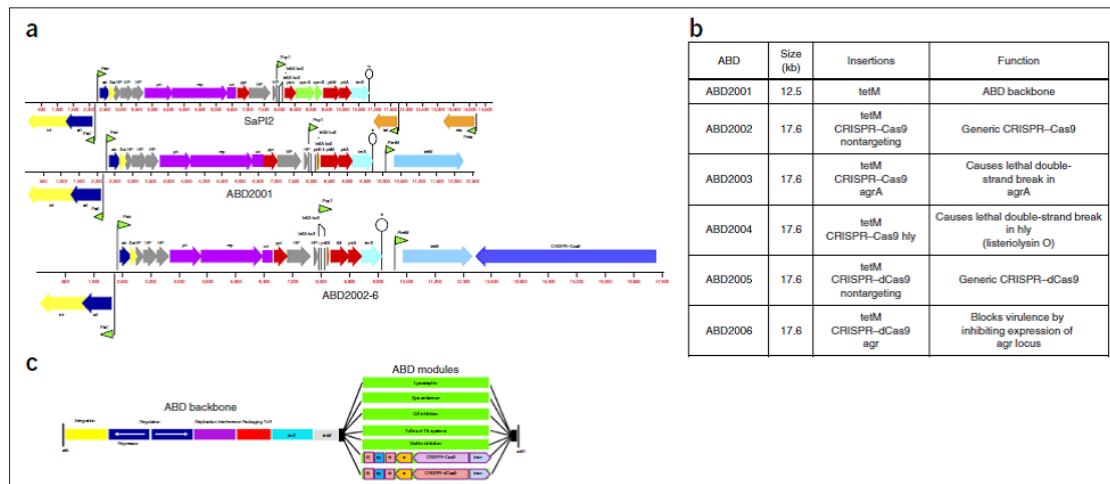
Conversion of staphylococcal pathogenicity islands to CRISPR-carrying antibacterial agents that cure infections in mice

최규태 (충남대학교병원 진단검사의학과)

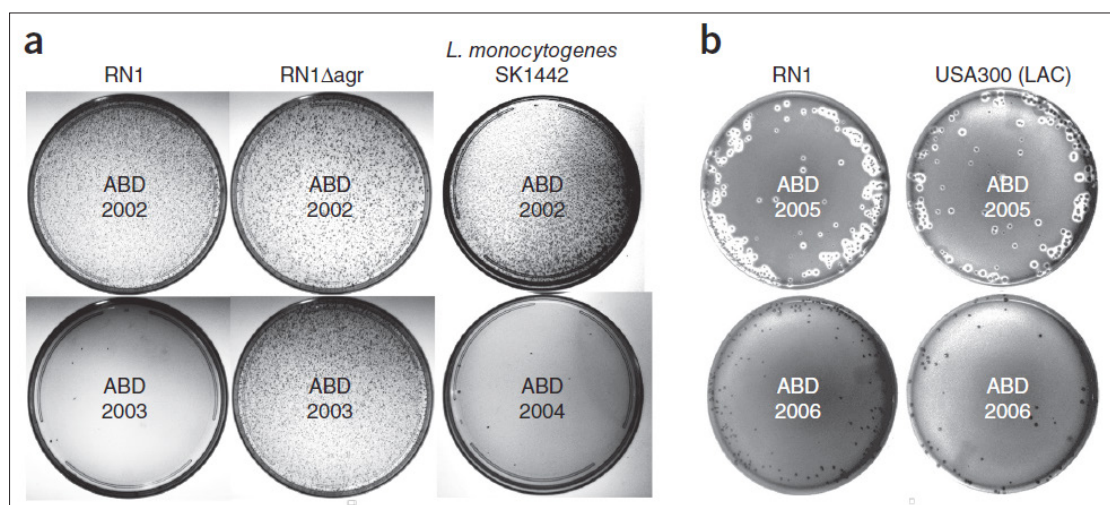
지난 10월 10일에 개최되었던 2018 대한진단유전학회 추계 심포지엄 ‘유전검사-ESLI(Ethical, Legal and Social Implications): 검사실 인증과 규제’에는 많은 회원들이 참석하여 최신 유전검사 및 유전검사 분야의 발전을 위한 정책, 법, 제도 등에 대해 다양한 정보와 의견을 나누는 시간을 가졌습니다. 특히 첫 세션에서는 한양대학교 화학과 배상수 교수님께서 ‘유전자가위 기술을 활용한 유전자 편집 기술의 최근 동향’이라는 주제로 유전자 가위의 간략한 역사와 디자인 원리, 실험 방법 및 분석 등에 대해 강의해 주셔서, 회원들이 유전자 편집 기술에 대해 쉽게 이해하고 한층 더 관심을 갖는 계기가 되었습니다.^[1,2] 강의 내용에 따르면, 유전자 가위는 Zinc Finger Nucleases (ZFNs)에서 처음 시작하여 TAL Effector Nucleases (TALENs)를 거쳐 최근에는 CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)-Cas 시스템까지 개발되었다고 합니다. 특히 CRISPR-Cas 시스템을 이용한 유전자 가위는 이전 기술에 비해 쉽게 사용할 수 있으며, 매우 정교한 유전자 편집이 가능하다고 합니다. 그런데 얼마 전 이 유전자 가위를 감염 치료에 활용하여 성공했다는 흥미로운 논문이 있어 그 내용에 대해 간략하게 소개하고자 합니다.

지난 9월 nature biotechnology에 미국과 인도 연구자들이, 항균드론(antibacterial drones, ABDs)을 만들어 감염된 쥐를 치료했다는 내용의 논문을 발표했습니다.^[3] 연구자들은 ABDs를 만들기 위해 staphylococcal pathogenicity islands(SaPIs)를 사용했는데, SaPIs는 staphylococcal chromosomal DNA에 삽입되어있는 약 15kb의 유전 인자로서 tst 와 다른 toxic superantigen들을 운반하는 역할을 한다고 알려져 있습니다.^[4] SaPIs를 이용하여 ABDs를 제작하는 방법을 간단히 살펴보면, 전형적인 SaPI2에 항생제 저항 유전자를 붙이고 몇 가지

독성 인자들을 제거하는 등 간단한 편집 과정을 거친 후, standard allelic replacement technology 를 사용하여 CRISPR-Cas9 또는 CRISPR-dCas9을 삽입합니다. 이때 agr이라는 staphylococcal virulence 조절인자를 타겟으로 하는 spacer를 함께 삽입하는데, 이는 staphylococci의 보존된 영역을 선택함으로써 사실상 모든 Staphylococcus를 타겟으로 삼기 위함입니다. [Fig. 1.] Spacer는 타겟으로 하는 균에 따라 다르게 선택합니다.



[Fig. 1] Genetic maps of SaPI2 and its ABD derivatives. orange, toxin genes; light blue, tetracycline resistance (tetM); royal blue, CRISPR module

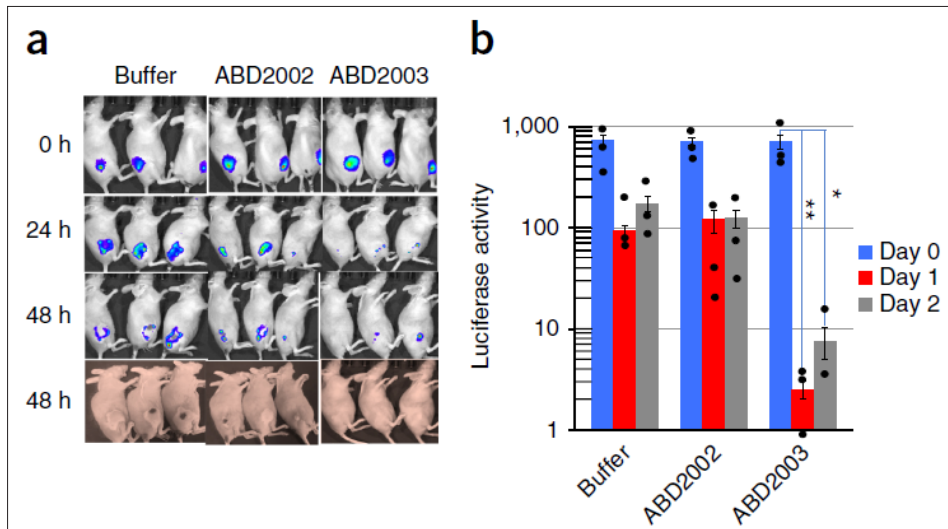


[Fig. 2] ABD activities in vitro. (a) Killing of *S. aureus* by ABD2003 and of *L. monocytogenes* by ABD2004. (b) Inhibition of hemolytic activity by ABD2006.

이렇게 제작한 ABDs의 성능을 검증하기 위해, 연구자들은 in vitro에서 *S. aureus*, *L. monocytogenes* 등 다양한 균을 이용하여 실험을 진행하였고, antibacterial activities 및 bacterial function block abilities를 확인하였습니다. [Fig. 2.]

유전자 편집 기술을 탑재한 신개념 항생물질 – 항균드론 (Antibacterial drone)

쥐를 이용한 in vivo 실험에서는, subcutaneous space에 균을 주입 한 후, ABDs가 균을 제거하거나 농양(abscess) 형성을 억제함을 관찰하였습니다. [Fig. 3]



[Fig. 3] Blockade of SC murine infections by ABDs. (a) The IVIS images for luciferase activity (top three rows) and photographs of the abscesses in the same mice (bottom row). (b) A quantitative analysis of the luciferase signals.

이처럼 CRISPR 운반 ABDs가 plate 실험뿐 아니라 쥐를 이용한 실험에서도 탁월한 성능을 보이는 것을 관찰하였으나, 원하지 않는 host gene이 동시에 packaging 되거나, 다른 SaPIs를 유도하고, virulence/resistance 유전자를 운반하는 plasmid와 재조합을 일으키는 등, 해결해야 할 잠재적 문제가 아직 많이 남아있기에, 연구자들은 앞으로 많은 추가 연구가 필요하다고 말하고 있습니다.

감염을 치료하는 non-antibiotic, non-phage method라는 점에서 ABDs는 매우 흥미롭고 관심을 가지고 연구해 볼만한 주제라 생각됩니다. 관심 있는 회원들께서는 본 논문 및 연관된 논문들을 찾아 자세히 읽어보실 것을 추천합니다.

[참고문헌]

- [1] Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. Cell. 157(6):1262-1278 (2014)
- [2] Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. Bioinformatics. 30(10):1473-1475 (2014)
- [3] Conversion of staphylococcal pathogenicity islands to CRISPR-carrying antibacterial agents that cure infections in mice. Nat Biotechnol. 36(10):971-976 (2018)
- [4] The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in Staphylococcus aureus. Mol. Microbiol. 29:527-543 (1998)

추계 심포지엄 ‘유전검사와 ELSI’ 성료

지난 10월 10일 서울아산병원에서 대한진단유전학회 추계 심포지엄 ‘유전검사-ELSI: 검사실 인증과 규제’가 성공적으로 개최됐다. 지난해에 이어 두 번째 열린 대한진단유전학회 추계 심포지엄은 유전검사의 발전을 위해 학문적인 토론을 넘어서 사회적, 경제적, 제도적 문제를 여러 분야의 전문가들과 함께 논의하는 행사다. 이번 추계 심포지엄은 총 13개의 강연과 패널 토론으로 진행됐으며, 현장에는 약 270여 명이 참석했다. 추계 심포지엄 발표 연제는 아래 참조.



Session I: 최신 유전검사와 ELSI		
유전자가위 기술을 활용한 유전자 편집기술의 최근 동향		배상수 (한양대학교 화학과)
유전자가위를 활용한 유전자 편집 기술과 법적, 윤리적 문제		신동일 (한경대학교 법학과)
Session II: 분자진단검사의 최신지견		
분자진단검사 임상진단지침 권고안: 차세대염기서열분석기법을 이용한 혈액암유전자패널에서의 체성유전자변이 평가검증지침		김혜진 (명지병원 진단검사의학과)
[특강] 동반진단 마커		
BRCA VUS reclassification in Clinician perspectives		임명철 (국립암센터 산부인과)
Biomarker trends in Immuno-Oncology		박유림 (한국엠에스디 의학부)
Session III: 검사실 인증과 유전자 검사		
NGS 임상검사실 검사시스템 인증, 관리 규정		고대현 (울산대 진단검사의학과)
NGS 검사 분야별 품질관리체계, 숙련도, 검사성능 가이드라인		장자현 (녹십자의료재단)
유전검사의 국내 검사실 인증 프로그램 인증 체계 및 평가 기준 - 진단검사의학재단		이우인 (경희대 진단검사의학과)
유전검사의 국내 검사실 인증 프로그램 인증 체계 및 평가 기준 - 유전자검사평가원		이경아 (연세대 진단검사의학과)
유전검사의 CLIA 임상검사실 인증 및 관리 체계 및 평가 기준		엄태현 (인제대 진단검사의학과)
Session IV: 유전자 검사 현행 규제의 문제점과 개선방향		
유전자 검사 동의 및 익명화		박경선 (에스디지노믹스)
검사 대상물의 제공, 폐기		서자영 (가천대 진단검사의학과)
유전자 검사 기관 신고 및 변경		허미나 (건국대 진단검사의학과)
Panel Discussion: 국내 유전자 검사 인증 제도 발전 방향과 유전자 검사 내실화를 위한 방안		