

KSGD News Forum

Korean Society for Genetic Diagnostics

Vol.05 / March, 2019

대한진단유전학회 뉴스포럼 발행인 전창호 | 간행이사 고대현 | 간행위원 박혜원 최종문 서수현 | 편집 (주) 트리니티컴즈

Focus on

혈액 기반 종양 검사 (Blood-based Cancer Diagnostic Test)

: 임상적 활용을 위한 고려 사항

이경아 (연세의대 진단검사의학과)

Technology Trend

LymphoTrack IgH Array Kit를 활용한 혈액암 환자의 MRD monitoring과 Somatic Hypermutation 효용성

급성림프모구백혈병의 미세잔존질환 추적을 위한 면역글로불린재배열 분석의 이용

김명신 (가톨릭의대 서울성모병원 진단검사의학과)

Notable Research

Recurrent de novo에 대한 확률 계산

최종문 (녹십자의료재단)

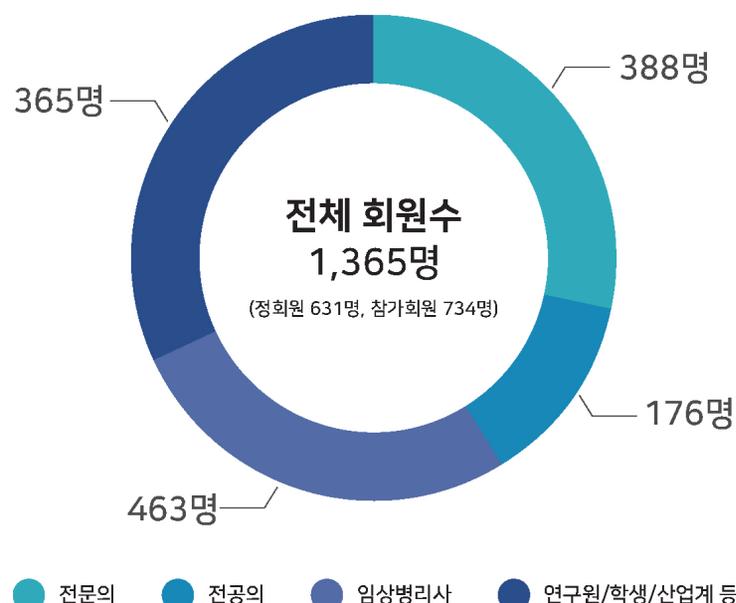
최신보험정보

2019년 분과별 사업계획

학회뉴스

대한진단유전학회

2018 Annual Report



2018년 정기학술대회 개최 (493명 참가)

2018년 5월 30일(목)~6월 1일(금)
더케이호텔서울 컨벤션센터

2018년 임상 차세대염기서열검사 워크숍 (44명 참가)

2018년 7월 19일(목)~21일(토)
서울의대 학생관 1학년 강의실

2018년 유전상담 연수강좌 (기초) (44명 참가)

2018년 8월 24일(금)
센터포인트 광화문

2018년 추계심포지엄 (268명 참가)

2018년 10월 10일(수)
서울아산병원 동관 대강당

혈액 기반 종양 검사 (Blood-based Cancer Diagnostic Test)

: 임상적 활용을 위한 고려 사항

이경아 (연세의대 진단검사의학과)

종양은 병의 진행 또는 치료 과정 중 여러 개의 서브 클론이 경쟁하다가 선택압에 의해 복제 및 전파 능력이 우세한 클론이 강화되면서 클론성 유전학적 특징을 갖게 된다. 현재 고형 종양의 분자유전학적 프로파일은 수술 또는 생검 조직 샘플을 통하여 분석하는 것이 통상적이다. 그러나 조직 기반의 분석은 종양 이질성으로 인하여 대표성 있는 결과를 얻지 못하는 경우가 있을 수 있고 임상적인 상황에 따라 반복적인 채취가 불가능하다는 제한점이 있다. 흔히 액체생검이라 불리는 혈액 기반 종양 검사는 종양 기원의 순환성 세포 유리 DNA (ctDNA), 순환성 종양 세포 (CTC), 엑소좀, 순환성 세포 유리 RNA 등 혈액 내 다양한 성분 분석을 포함하며 종양 조직 자체 또는 종양 미세환경의 특성을 반영하므로 진단, 치료제 선택, 예후 예측, 모니터링 등에 활용이 가능하다.

대표적인 혈액 기반 종양 검사인 ctDNA 분석은 약물 내성의 출현을 평가할 수 있을 뿐만 아니라 돌연변이 대립유전자 빈도 정보를 통하여 치료 반응을 모니터링하고, 잔여 종양을 평가하는데 활용 가능하다. ctDNA 분석은 혈장 검체를 활용하지만 그 외에 소변, 타액, 흉막 삼출액 및 뇌척수액과 같은 체액에서도 종양 유래 유전 정보를 확인할 수 있다. 최근 동반 진단 제품으로 허가된 폐암에서의 혈장 EGFR 돌연변이 검사와 같이 이미 ctDNA 검사는 통상 진료 영역에서 사용되고 있다. 그러나 ctDNA는 조혈 세포 등 비종양성 세포 유리 핵산에 의해 희석되어 종양 유래 핵산은 매우 소량만 존재하며 반감기가 짧기 때문에 채혈량, 채혈튜브, 검체 처리 방법, 보관 상태 등 다양한 요인에 의해 검사 결과의 민감도가 달라질 수 있다. 그러므로 임상적 유용성을 뒷받침할 수 있는 최대의 분석적 성능을 유지하기 위해서는 각 임상검사실에서 분석 단계뿐 아니라 분석 전 변수 및 생물정보학적 문제 등에 대하여 고려하고 일상적으로 관리할 필요가 있다. 이에 따라 임상검사실에서 ctDNA를 분석할 때 참고로 할 수 있는 표준화된 가이드라인의 필요성이 증가하게 되었다. 유럽의 경우 European Committee for Standardization에서 ctDNA용 분석 전 단계 술기에 대한 가이드라인을 발표한 바 있다. 국내에서도 분석법, 검사 수행 주기, 타 검사실 위탁 여부 등 각 기관의 현황을 고려한 가이드라인 마련이 필요할 것으로 생각된다.

위와 같이 분석 전 단계에 대한 체계적 관리와 함께 ctDNA 검출의 민감도를 향상시키기 위하여 다양한 방법이 시도되고 있다. 혈장에는 다양한 비종양 세포 유래의 핵산이 포함되어 있기 때문에 종양에서 기원한 핵산을 농축시킬 수 있는 방법이 연구되고 있다. 예를 들어 정상 세포로부터 유래된 유리 핵산의 길이는 166 bp 정도인데 종양으로 유래된 ctDNA의 길이가 좀 더 짧은 것에 착안하여 ctDNA를 비종양 세포 유래 핵산과 구분하고자 하는 연구가 진행되고 있다. 반면 일부 암종에서는 두 개의 뉴클레옴을 감싸고 있는 핵산 절편이 좀 더 흔하게 관찰되는 경우도 있는데 이 경우는 ctDNA가 비종양 세포 유래 핵산에 비하여 길이가 두 배 정도 길다. 그 원인에 대해서 연구가 진행 중이긴 하지만 이렇게 유리 핵산의 길이가 다양한 것은 서로 다른 조직 기원일 경우 나타나는 현상으로 이해되고 있어 앞으로 핵산 절편의 길이는 유리 핵산의 기원을 구별하는데 잠재적인 지표가 될 수 있을 것으로 기대되고 있다. ctDNA의 분석의 민감도를 향상시키고자 하는 또다른 방법으로 특히 NGS 등의 기법을 사용하는 경우 분자 바코드를 사용하는 방법이 있다. 분자 바코드를 통하여 생물정보학적 분석 단계에서 동일한 핵산 절편으로부터 유래한 염기서열을 정렬함으로써 분석 자체에 의한 오류를 배제하는 방법이다.

혈액 기반 종양 검사의 임상 적용을 위해 가장 중요한 요소 중 하나인 분석적 민감도를 향상시키기 위하여 위와 같이 많은 기술적 진보가 이루어지고 있지만 이를 임상 검사의 품질로 향상시키기 위해서는 그 외에도 여러 가지 고려해야 할 사항이 있다. 일반적으로 임상 검사실에서 새로운 검사를 도입할 때는 참고치 및 간섭 요인을 고려해야 한다. 최근 혈장의 조직 기원에 대한 맵핑 연구들을 보면 정상인과 암환자에서 혈장 핵산에 기여하는 조직 기원 및 분획이 다른 것을 알 수 있다. 그러나 아직까지 정상인으로부터 암환자를 구분해 내거나 질병 모니터링을 위하여 참고로 사용할 정상인 혈장의 핵산 프로파일 및 생리학적인 변화에 대한 이해는 부족한 실정이다. 또 한 가지는 양성 체세포성 돌연변이에 의한 위양성의 문제이다. 최근 대량의 인구집단 유전자 결과를 분석한 결과 연령이 증가함에 따라 조혈 세포의 클론성 체세포 돌연변이(Age-Related Clonal Hematopoiesis, ARCH)가 드물지 않게 발견되었는데 이 ARCH 현상이 혈장 ctDNA 검사에서 위양성을 초래할 수 있다. 예를 들어 KRAS 유전자 돌연변이가 낮은 빈도로 발견된 경우 이 현상이 ARCH인지 실제 악성 종양을 시사하는 것인지 단독 검사 결과만으로는 구분하기 어렵다.

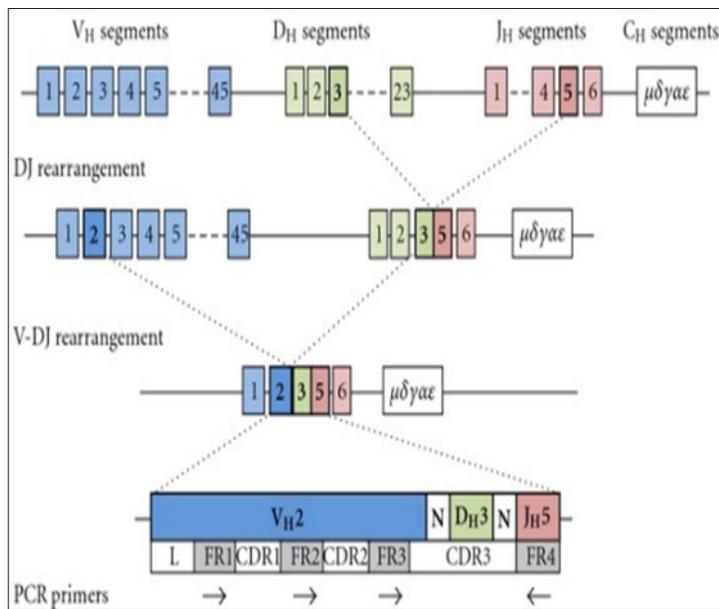
혈액에는 다양한 조직 기원의 DNA, mRNA, miRNA, 엑소좀, 단백질, 대사물질 등이 존재하므로 종양 환자에서 이들이 어떻게 변화하는지를 단일 마커로 해석하는 데는 한계가 있다. 최근 연구들에서는 이러한 한계점을 극복하고자 다중 마커를 동시에 분석함으로써 검사 성능을 높이고자 시도하고 있다. 예를 들어 혈장 KRAS 돌연변이 검사와 함께 CA19-9, TIMP1, LRG1 등과 같은 단백질 마커를 동시 분석하여 절제 가능한 췌장암의 진단율을 향상시켰다는 보고 등이 있다. 혈액 기반 종양 검사의 궁극적인 목표는 암 조기 진단 및 잔여 종양을 민감하게 추적 관찰하여 환자의 질병 경과를 변화시키는 것이다. 그러므로 향후 혈액 기반 종양 검사가 좀 더 임상적으로 유용하게 활용되기 위해서는 혈액 내 존재하는 종양 및 미세환경과 관련한 서로 다른 정보를 다중적으로 분석함으로써 포괄적이고 통합적으로 프로파일링 하는 연구가 필요하다.

[참고문헌]

- [1] CEN/TS 2015:16835-3
- [2] Proc. Natl Acad Sci USA 2014;111:7361, Sci Rep 2017;7:8421
- [3] Proc. Natl Acad Sci USA 2017;114:10202

LymphoTrack IgH Array Kit를 활용한 혈액암 환자의 MRD monitoring 과 Somatic Hypermutation 효용성

Clonality Test 원리



[그림1]. IgH gene rearrangement 모식도 ¹⁾

다른 체세포와 달리, 림프구는 발달 중 Antigen receptor 유전자의 체성 유전자 재배열(Somatic gene rearrangement)을 겪게 된다. B-림프구는 14번 염색체(14q32.4) 위에 면역글로불린 중쇄(Immunoglobulin Heavy Chain, IgH) 유전자에서 체성 유전자 재배열이 일어나며, 46-52 종류의 Variable (VH) gene segments와 27 종류의 Diversity (DH) gene segments, 6 종류의 Joining (JH) gene segments 중에서 선택된 Segment들간의 조합은 VH-DH-JH와 같이 연결된 고유한 염기서열을 생성한다. IgH 전체 유전자 길이는 1250 Kbp를 넘어서지만 재배열이 진행되면서 선택되지 않은 Segment와 Intron이 제거되며, 조합이 완성된 DNA 가닥은 1 Kbp 보다 작게 된다. 체성 유전자 재배열 단계를 경험한 림프구는 다른 체세포의 'Germline antigen receptor 유전자'와 확연히 구분되는 '재배열된 Antigen receptor 유전자'를 갖게 되는 것이다.

IgH 유전자 내부의 각 VH gene segment 부위는 잘 보존된 3개의 Framework Region(FR)과 변이가 잦은 2개의 Complementarity-Determining Region(CDR)로 구성되어 있다. CDR3은 VH-DH-JH 조합 부위에 존재하며, 재배열 과정 중 Non-template sequence가 VH-DH 사이와 DH-JH 사이에 삽입되면서 변이 비율이 높아지게 된다. Non-template sequence는 무작위적인 우연의 산물로서, 해당 부위의 길이와 염기서열은 서로 다른 유래의 림프구끼리 동일할 수 없으며 다형성의 근본이 된다.

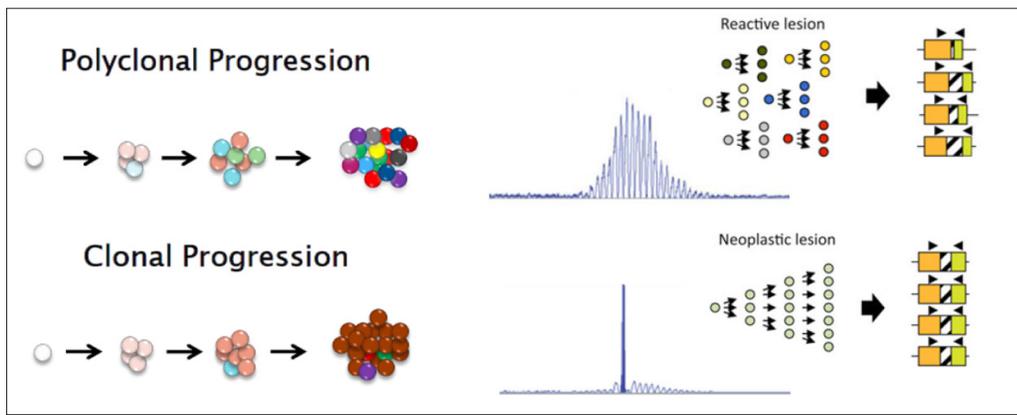
혈액암은 개별적인 림프구가 암세포 또는 그와 유사한 세포로 형질 전환 과정을 시작으로 혈액 내 무한 증식하는 질환이므로, 모든 혈액 종양 세포들은 하나 이상의 특이적인 Clonal antigen receptor gene rearrangement를 공유하게 된다. 그러므로, IgH clonal rearrangement를 탐지하는 검사 방법은 혈액암 진단에 유용하다.

IgH Clonal Rearrangement 검사 - LymphoTrack

LymphoTrack 제품은 Antigen receptor 유전자의 잘 보존된 Framework Region(FR)에 상보적으로 결합하는 한 쌍의 프라이머에 의한 PCR 증폭 과정으로 라이브러리를 제작한다. Forward primer는 VH gene segment 내 3개의 Framework(FR1, FR2 or FR3) 중 하나와 결합하고, Reverse primer는 JH gene segment 내 FR4에 결합한다. 프라이머는 타겟 영역(VH and JH)에 결합하는 염기서열 외에도 5'-overhang으로 연결된 추가적인 염기서열을 갖고 있다. 일루미나 NGS 장비(i.e. MiSeqDx) 구동에 필수적인 Adapter와 Index가 해당된다. Adapter 부위의 염기서열은 일루미나 NGS 장비 안에서 클러스터 생성과 염기서열분석 단계마다 프라이머가 결합하는 영역을 제공하며, Index 부위의 염기서열은 검체 식별 기호로 사용된다. 그러므로 LymphoTrack 제품은 포함된 프라이머를 사용한 단 한 번의 PCR 단계로 일루미나 NGS 장비에 탑재 가능한 형태의 증폭산물(라이브러리)을 제작하게 구성되어있다.

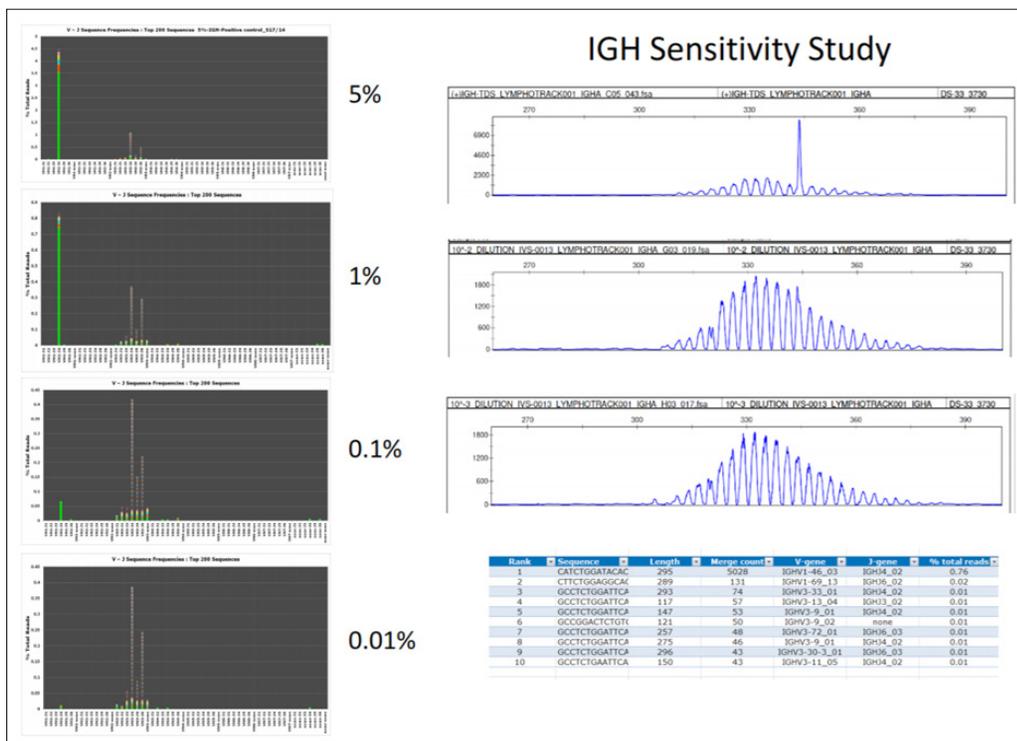
기존 IdentiClone 검사법과의 차이점

LymphoTrack 제품의 출시 이전부터 동일 제조사의 IdentiClone 제품은 Clonality test 목적으로 의료 시약으로 사용하고 있었으며, 진단검사의학과 검사실에서는 PCR 산물의 절편 길이를 ABI Genetic Analyzer(-3130, -3500, -3730) 장비로 1~3 bp 해상도로 분석하는 Genescan 검사법을 활용하고 있다. 정상인의 IgH Clonal gene rearrangement가 완료된 또는 진행 중인 림프구 집단에서는



[그림 2] 림프구증식질환에 동반된 CDR3 영역의 Polymorphism과 Genescan 검사 결과 [2]

조합된 DNA 가닥의 CDR3 영역에서 길이의 다형성이 관측되며, 이는 Gaussian Curve(또는 정규분포 곡선) 양상으로 판독된다. 이에 반해, 혈액암 또는 림프구증식질환을 보유한 환자의 림프구 집단에서는 동일 세포 유래의 클론들이 공유하는 Clonal gene rearrangement 결과에 따라 1~2개의 재조합된 DNA 길이가 우세하게 관측된다.



[그림 3] LymphoTrack(좌)와 IdentiClone(우) 민감도 비교 [3]

문제는 Genescan 검사법은 전체 림프구 집단에 존재하는 조합 DNA를 주형으로 PCR 증폭하기 때문에 발생한다. 종양 세포들은 클론 세포들로서 동일한 IgH gene rearrangement 결과를 공유하더라도 다른 정상적인 림프구들이 우세한 경우에는 Genescan 검사 결과에서 Monoclonal 양상이 Polyclonal background에 가려져서 관측되지 않을 수 있다.

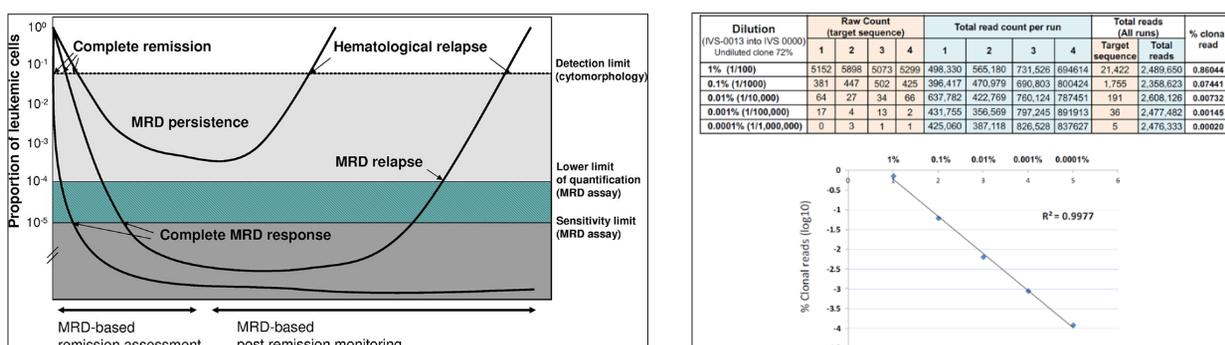
IdentiClone 양성 판독은 Genescan 검사결과에서 Polyclonal background 높이 대비 우세한 Peak 높이가 3배 이상을 기준으로 한다. 이로 인해 IdentiClone 제품을 활용한 Clonality test의 민감도는 5%를 한계로 보아야 한다. [그림 3. 우] 5% 민감도는 일반적인 초진 검체에서는 문제가 되지 않지만 낮은 민감도를 극복하기 위한 대안으로 LymphoTrack 제품을 고려할 수 있다.

LymphoTrack 제품은 IdentiClone과 동일한 프라이머 세트로 PCR 증폭 후 라이브러리 제작 과정을 통해 차세대염기서열분석(NGS) 장비에 구동시키는 방식으로, 개별 DNA 가닥 별로 염기서열 분석을 진행하여 동일한 길이와 염기서열끼리 그룹을 형성하는 방법으로 진행된다. 그로 인해 Polyclonal background에 가려지는 문제가 발생되지 않아서 혈액 종양 세포의 비율이 낮은 검체에서도 사용할 수 있으며, 민감도는 NGS 분석을 위해 배정한 'Depth of coverage'가 몇 가닥(단위: Reads)인지에 따라 결정된다. [그림 3. 좌]

Lymphotrack 검사의 활용

1. Minimal Residual Disease

MRD 측정을 위한 민감도는 0.01~0.001%이며, NGS을 활용한 Ultra deep sequencing으로 도달할 수 있는 수준이다. LymphoTrack 제조사 자료에 의하면 양성대조물질을 음성대조물질로 단계적으로 희석하는 방법으로 Limit of Detection(LOD)가 0.0001%(10⁻⁶)까지 측정되었다. (상관계수, R²=0.9977)



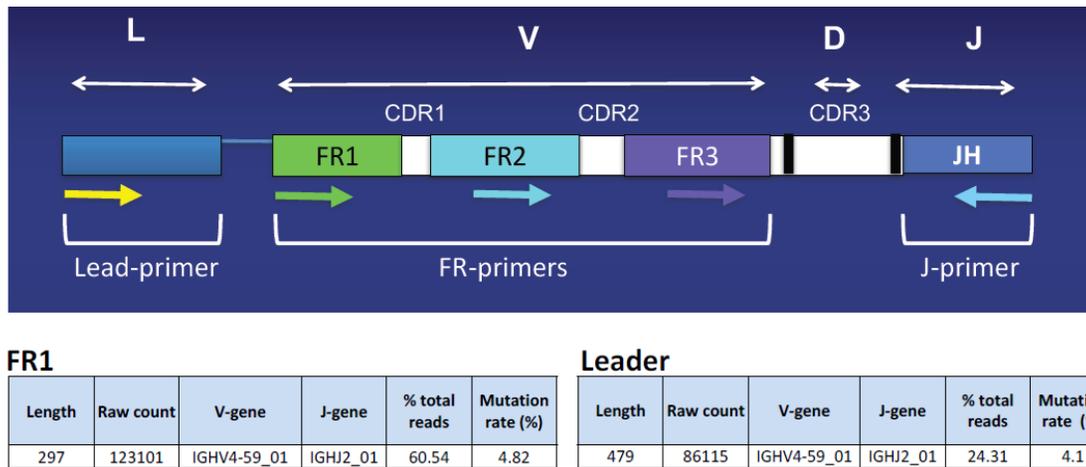
[그림 4] Minimal Residual Disease의 민감도(좌)와 LymphoTrack 직선성(LOD) 평가 결과(우) [3]

2. Somatic Hypermutation

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL)과 Small Lymphocytic Lymphoma (SLL) 환자의 예후와 IgH 유전자 VH 부위에 발생하는 Hypermutation 정도의 연관성이 연구되었다. Somatic Hypermutation(SHM)의 유의미한 수준은 Germline VH 유전자의 염기서열 대비 2% 이상의 변이가 존재하는 경우를 의미한다. 특히 B cell-CLL에서 임상적 타당성이 분명히 나타나며, SHM를 갖는 환자는 좋은 예후를 보인 반면에 부재 시에는 나쁜 예후로 진행됨이 보고되었다.^[4]

SHM의 수준을 정확히 측정하기 위해서는 재배열된 IgH 유전자를 가능한 넓게 염기서열 분석을 진행하여야 한다. LymphoTrack은 분석 소프트웨어 결과 중 ‘V-Coverage(%)’ [\[그림5\]](#) 항목을 지표로 관측값과 실제값의 상관관계를 예상할 수 있다.

LymphoTrack 제품군 중에는 SHM 전용으로 개발된 Kit가 존재하며, Lead-primer와 JH-primer를 프라이머 쌍으로 사용한 PCR 증폭 산물은 조합된 VH-JH-DH 영역을 거의 전부 대상화하고 있다. 하지만 제조사 자료를 기반으로, IgH FR1부터 J 영역까지를 대상으로 검사를 진행하는 것으로도 충분히 대체가 가능하다. [\[그림5\]](#)



[\[그림5\]](#) IgH FR1-primer와 Lead-primer somatic hypermutation 일치도 ^[3]

LymphoTrack 검사 사용 방법

염기서열과 길이를 기준으로 unique read 단위로 표시하는 방법과 1~2개의 Mismatch를 동일한 DNA 가닥으로 반영한 merge group 방식으로 분석할 수 있다. “V-gene” 열과 “J-gene” 열을 통해 재배열된 선택된 Gene segment 종류를 확인할 수 있으며, “Mutation rate to partial V-gene(%)” 열은 Somatic hypermutation 수준(> 2.0%)과 대비하여 판독 가능하다. “In-frame”은 재배열 과정 중 Indel 발생 가능성에 따라 Frameshift 가능성과 SNV에 의한 Stop codon으로 아미노산 수준의 변이가 발생할 가능성도 확인할 수 있다. [\[그림6. 위\]](#) 판독 기준은 검체당 총 염기서열 가닥 수가 5만 개 이상이 확보가 되어야 하며, 전체 염기서열 중 차지하는 비율이 2.5% 이상의 가닥이 1~2개인 조건과 전체 조건을 통과한 가닥의 비율이 4번째 빈도 순위의 가닥의 비율 대비 5배 이상이어야 하는 조건을 동시에 충족하여야 한다. [\[그림6. 위\]](#)

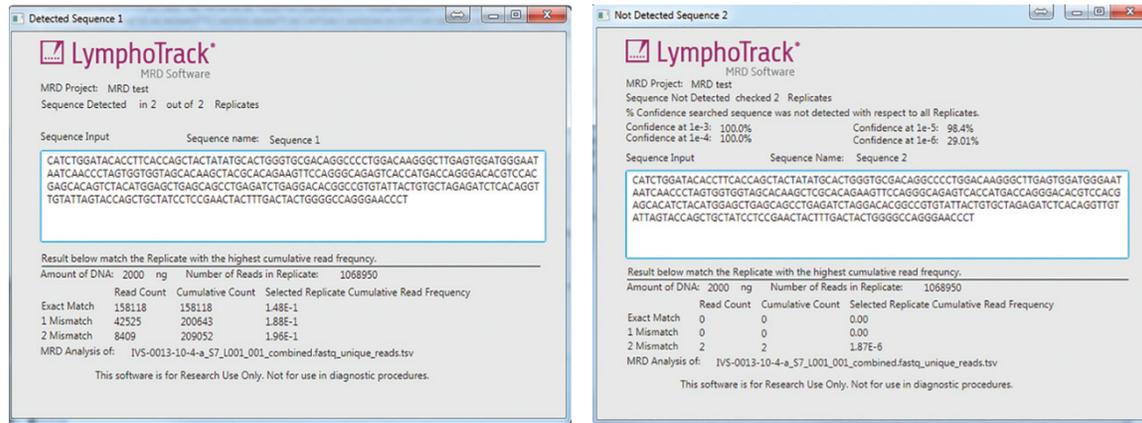
Rank	Sequence	Length	Merge count	V-gene	J-gene	% total reads	Cumulative %	Mutation rate to partial V-gene (%)	In-frame (Y/N)	No Stop codon (Y/N)	V-coverage
1	GCCTCCGATTCA	266	176876	IGHV3-74_02	IGHJ4_02	36.82	36.82	11.11	Y	Y	100.00
2	GCCTCTGGATTCA	266	124972	IGHV3-23_04	IGHJ4_02	26.01	62.83	1.76	Y	Y	99.12
3	GCCTCTGGATTCA	266	15372	IGHV3-23_04	IGHJ4_02	3.20	66.03	3.96	Y	Y	99.12
4	GCCTCTGGATTCA	266	5827	IGHV3-23_04	IGHJ4_02	1.21	67.24	1.76	Y	Y	99.12
5	GCCTCTGGATTCA	278	2364	IGHV3-23_04	IGHJ4_02	0.49	67.73	6.61	Y	Y	99.12
6	GTTTGGATATAA	301	1342	IGHV5-51_01	IGHJ6_02	0.28	68.01	9.29	Y	Y	100.00
7	GTTTGGATATAA	301	883	IGHV5-51_01	IGHJ6_02	0.18	68.20	8.85	Y	Y	100.00
8	GCCTCTGGATTCA	266	856	IGHV3-23_04	IGHJ4_02	0.18	68.37	2.20	Y	Y	99.12
9	GCCTCTGGATTCA	266	737	IGHV3-23_04	IGHJ4_02	0.15	68.53	3.52	Y	Y	99.12
10	GCCTCTGGATTCA	290	642	IGHV3-21_02	IGHJ6_02	0.13	68.66	4.41	Y	Y	100.00

Total reads for sample is ≥50,000	One or two reads ≥ 2.5% and ≥ 5X the % reads for the 4 th most frequent unique sequence	Evidence of clonality detected
	Top read is ≥ 2.5%, but the top read is < 5X the % reads for the 4 th most frequent unique sequence.	No evidence of clonality detected
	Three or more reads ≥ 2.5%	No evidence of clonality detected ¹
	All reads < 2.5%	No evidence of clonality detected

▶ [\[그림6\]](#) LymphoTrack Merge 분석 결과표와 SHM 분석값 (Red Parenthese)와 양성 판독 기준(아래) ^[3]

Technology Trend

MRD 분석 소프트웨어는 진단 시에 우세한 IgH clonal gene rearrangement로 확인된 염기서열을 이용하여, 추적조사에서 확인된 염기서열 가닥들과 대조하는 군집 분석 알고리즘을 통해 잔존하는 혈액 종양 세포의 비율을 추산한다. MRD가 확인된 검체의 분석 결과에서는 추적 대상의 염기서열 대비 Exact match와 1 Mismatch, 2 Mismatch의 조건으로 존재하는 염기서열 개수와 비율을 판독에 참고할 수 있다. 반면에 MRD가 발견되지 않은 검체의 분석 결과에서는 0.1~0.0001% 민감도 범위에서 MRD가 존재하지 않을 가능성을 신뢰구간으로 확인할 수 있으며, 일반적으로 사용하는 95% 신뢰구간을 기준으로 판독에 적용할 수 있다. [그림7]



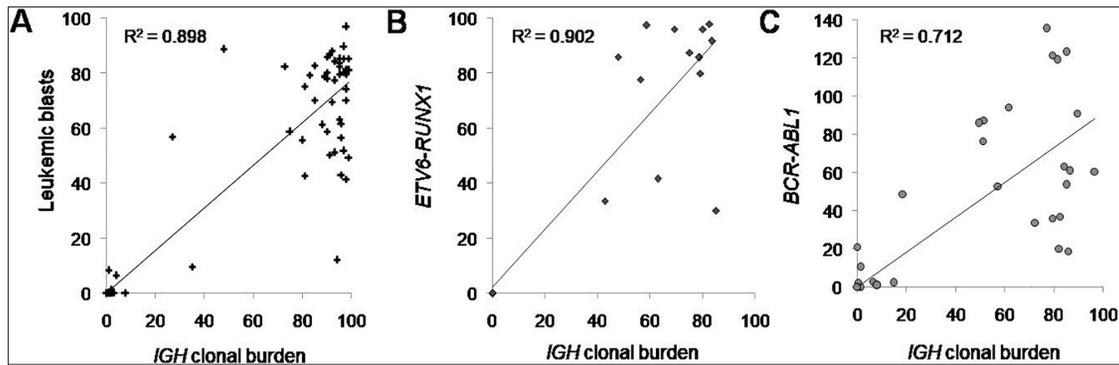
[그림7] LymphoTrack MRD 분석 소프트웨어 결과. Detected(좌), Not detected(우) [2]

[참고문헌]

- [1] P. W. Raess and A. Bagg. The Role of Molecular Pathology in the Diagnosis of Cutaneous Lymphomas. Pathology Research International doi:10.1155/2012/913523)
- [2] ㈜다우바이오메디카 제공
- [3] Maria Arcila. NGS-Based Clonality Testing Assessing Clonality Status, Somatic Hypermutation and Monitoring Minimum Residual Disease (MRD). AMP WEBINAR 2017.)
- [4] Chatree Chai-Adisaksopha and Jennifer R. Brown. FCR achieves long-term durable remissions in patients with IGHV-mutated CLL. Blood 2017 130:2278-2282.)

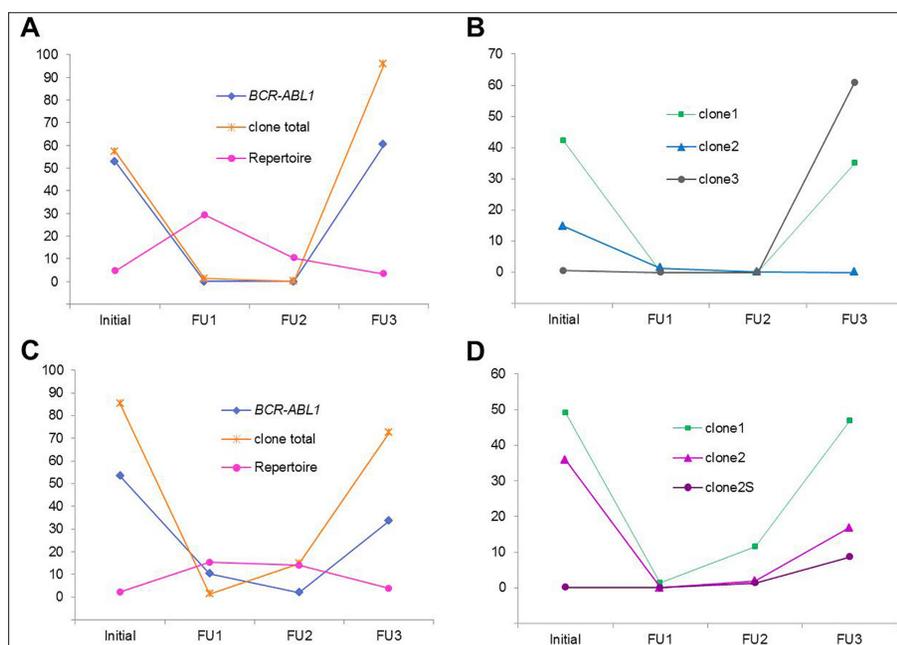
급성림프모구백혈병의 미세잔존질환 추적을 위한 면역글로불린재배열 분석의 이용

김명신 (가톨릭의대 서울성모병원 진단검사의학과)



[그림 1] IGH clonal burden과 골수 모세포 비율 및 융합유전자 정량과의 상관성 분석

미세잔존질환(Minimal Residual Disease, MRD)은 혈액종양의 예후를 예측하는데 매우 중요한 역할을 한다. 면역글로불린 재배열 (Immunoglobulin gene rearrangement)을 이용한 MRD 추적 검사는 여러 림프구성 혈액종양에 사용할 수 있으며 최근 차세대염기서열 분석법(Next-Generation Sequencing, NGS)으로도 효율적으로 이를 분석할 수 있게 되었다. NGS는 예민도가 높고 기존에 사용되고 있는 유세포분석법이나 정량PCR법에 비하여 검사시간 표준화가 가능하기 때문에 임상검사실에서도 쉽게 이용할 수 있다. 서울성모병원 진단검사의학과에서는 NGS를 이용하여 B세포 급성림프모구백혈병(Precursor B-acute Lymphoblastic Leukemia, B-ALL)에서 MRD 분석을 시행하고 이의 임상적용을 위해 고려해야 할 점들을 정리하여 보고하였다.^[1] 연구는 47명의 B-ALL 환자에서 얻은 74개의 골수 검체를 대상으로 수행하였고, InVivoScribe사의 LymphoTrack® IGH FR1/2/3 assay panel과 IGK assay panel을 사용하여 진단 시 클론성 재배열과 MRD를 분석하였다. 분석 프로그램은 LymphoTrack®Dx Assay와 Vidjil platform 두 가지를 사용하였다. FR1, FR2, FR3 primer를 순차적으로 적용하였을 때, 모든 B-ALL 환자에서 IGH clonality를 검출할 수 있고 정량은 9.47%-96.77%의 분포를 보였다. IGK clonality는 70%의 환자에서 관찰되었고 IGH clonal burden이 낮은 환자에서 IGK clonal burden이 높게 측정되는 경우 MRD 추적에 유용하게 사용할 수 있을 것으로 생각되었다. IGH clonal burden은 기존의 MRD 지표인 골수 모세포 비율(%), 종양특이 융합유전자 정량(BCR-ABL1, ETV6-RUNX1) 및 유세포분석법과 잘 일치하였다. [그림 1]



[그림 2] B-ALL 환자에서 치료 후 클론별 IGH clonal burden 및 repertoire 변화

각각의 클론은 치료에 서로 다르게 반응하며 진단 시 미량으로 존재하던 IGH clone이 질병 재발 시에 증가하여 마치 새로운 클론이 나타난 것처럼 보이는 경우도 관찰되었다.

[그림 2 B의 Clone3, 2D의 Clone2S] IGH clonal burden은 MRD를 정확히 분석할 수 있을 뿐만 아니라 추가적으로 IGH rearrangement의 Repertoire diversity를 분석할 수 있어 정상 면역기능 회복에 대한 정보를 동시에 얻을 수 있는 장점이 있다. [그림 2]

MRD 양성인 환자에서는 강도 높은 치료를 해야 한다는 것은 이미 여러 연구에서 밝혀진 바 있으며 MRD 추적에는 민감도가 $\ll 1/10^4$, 0.01% 매우 높은 검사 방법을 사용해야 한다. NGS를 이용한 면역글로불린 클론성 분석은 B-ALL 환자에서 좋은 MRD 추적 검사법으로 빠른 시기에 임상검사로서 환자들의 치료방향 설정에 이용할 수 있기를 기대한다.

[참고문헌]

- [1] Jo I, Chung NG, Lee S et al. Considerations for monitoring minimal residual disease using immunoglobulin clonality in patients with precursor B-cell lymphoblastic leukemia. Clin Chim Acta 2019;488:81-89.
- [2] Berry DA, Zhou S, Higley H et al. Association of minimal residual disease with clinical outcome in pediatric and adult acute lymphoblastic leukemia: A Meta-analysis. JAMA Oncol 2017;3:e170580.

Recurrent de novo에 대한 확률 계산

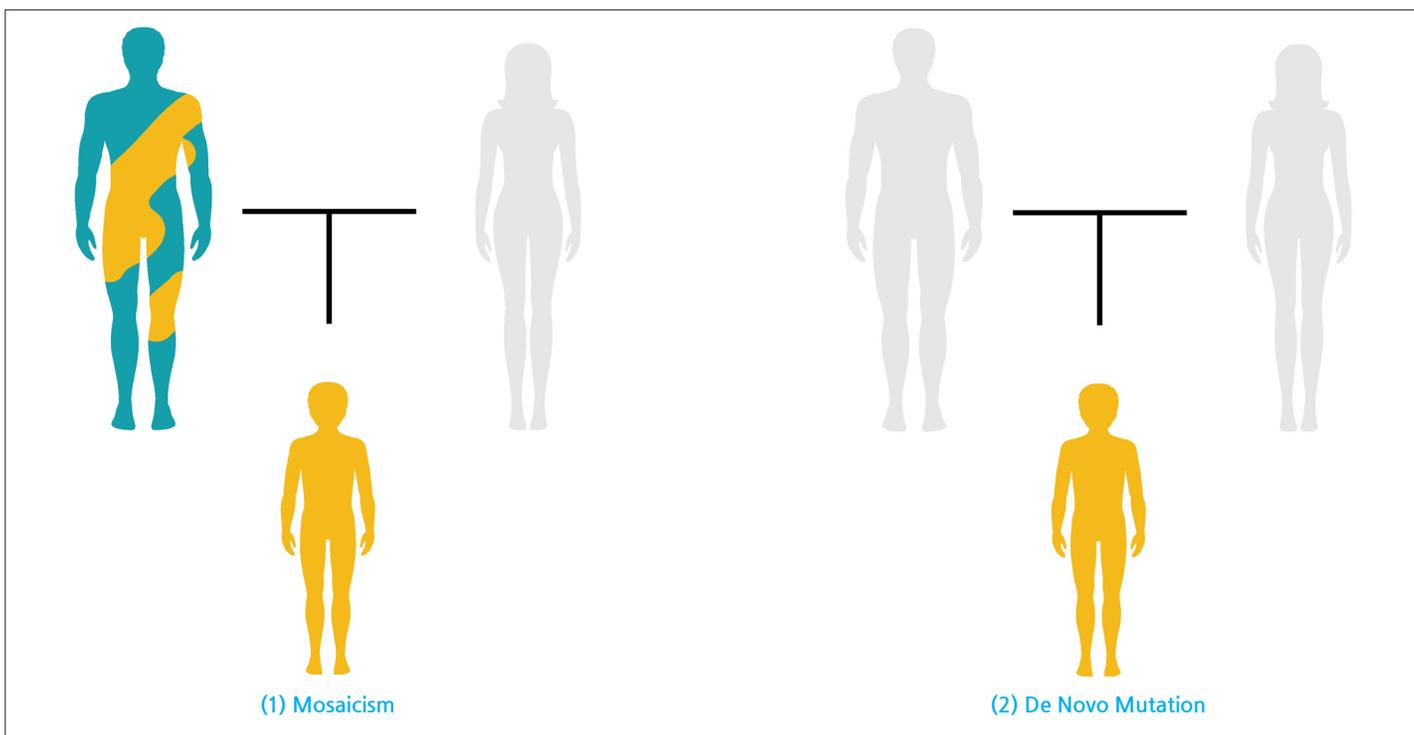
Multiple Transmissions of De Novo Mutations in Families

최종문 (녹십자의료재단)

희귀 질환의 유전자 분석에서 De novo mutation은 특별한 존재입니다. De novo는 부모에서 없는 변이가 그다음 세대에서 새롭게 나타나는 현상입니다. De novo mutation이 발생한 경우 우성 유전 질환에서 부모는 이상이 없어도 그 자식에서 유전적 이상이 나타날 수 있습니다.

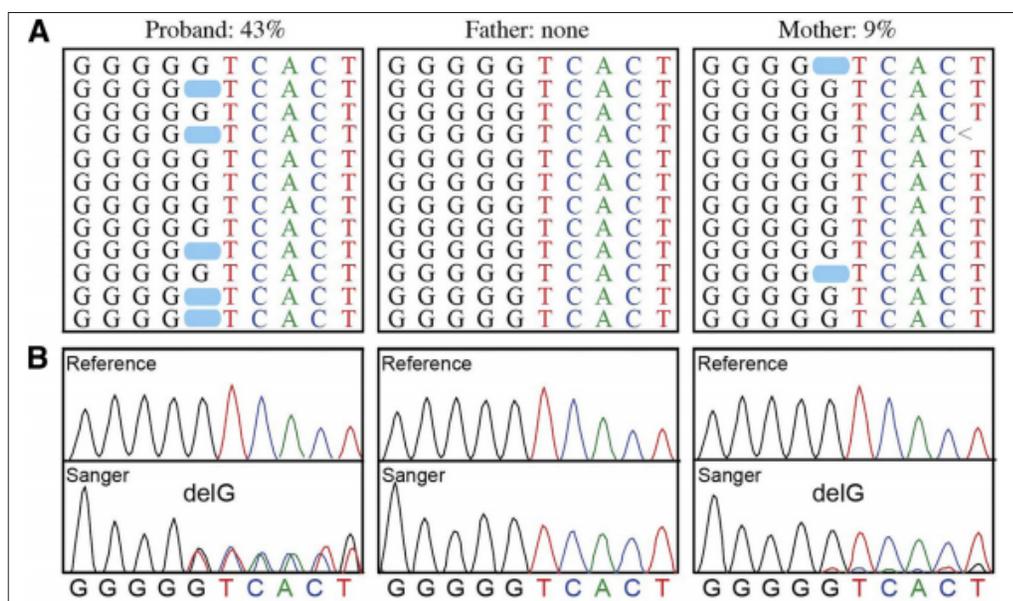
그 발생 빈도는 주로 부친의 연령과 관련이 있습니다. 기존 보고에 따르면, 부친의 연령이 29.7세라고 가정할 때 한 세대가 지날 때마다 한 개의 Nucleotide 당 약 1.20×10^{-8} 의 확률로 발생합니다.^[1] 인간 유전자는 약 30억 개의 염기 쌍으로 구성되므로, 한 세대마다 평균 38개 정도의 De novo 변이가 새로 발생하게 됩니다. 만약 그 변이가 중요한 유전자의 Critical한 위치에서 발생한다면, 유전 질환이 발생합니다. 다행히 인간 유전자 중 실제 단백질을 코딩하는 부분은 약 2%에 지나지 않습니다. 산술적으로는 Coding region에는 De novo는 보통 없거나 일반적으로는 한 두 개 일 것입니다. 또한 Coding region에 생긴 모든 변이가 생존에 영향을 주는 것은 아니고, 그중 일부만 문제를 일으킵니다. 오히려 그중 일부는 생존에 유리한 방향으로 작용하여 진화의 원동력으로 작용해 왔습니다. 검사 영역에서는 Coding region에 De novo variant를 발견하면, 그리고 그 임상 양상이 해당 유전자 이상의 알려진 Phenotype과 잘 일치한다면 이는 확률 상으로 우연의 일치로 발생하기엔 그 가능성이 희박하다고 여기므로, Pathogenic일 가능성이 높다고 여깁니다. 2015 ACMG/AMP Classification²에서도 De novo는 Strong evidence로 분류하고 있습니다.

De novo 여부는 Proband에서 발견된 변이가 부모에서 존재하는지 여부를 확인해서 파악 가능합니다. 일반적으로 Sanger sequencing으로 확인해서 Proband가 가진 변이가 부모에서 발견되지 않으면 De novo로 유전되었을 가능성이 높다고 판단하게 됩니다. De novo mutation은 DNA가 복제 에러가 우연히 발생하는 것이므로 발생 원리 상 동일한 위치에 동일한 변이가 다시 나타나는 것은 거의 있을 수 없는 일입니다. 벼락 맞을 확률이 28만 분의 1이라고 하니 형에게서 생긴 De novo가 동생에게서 동일하게 생길 확률은 벼락 맞을 확률 보다는 명백히 낮을 것 같습니다. 하지만 실제로는 De novo라고 생각했던 변이가 Recurrent하게 발견되는 것이 보다 자주 발견됩니다.



[그림1] Difference of Mosaicism and De Novo Mutation

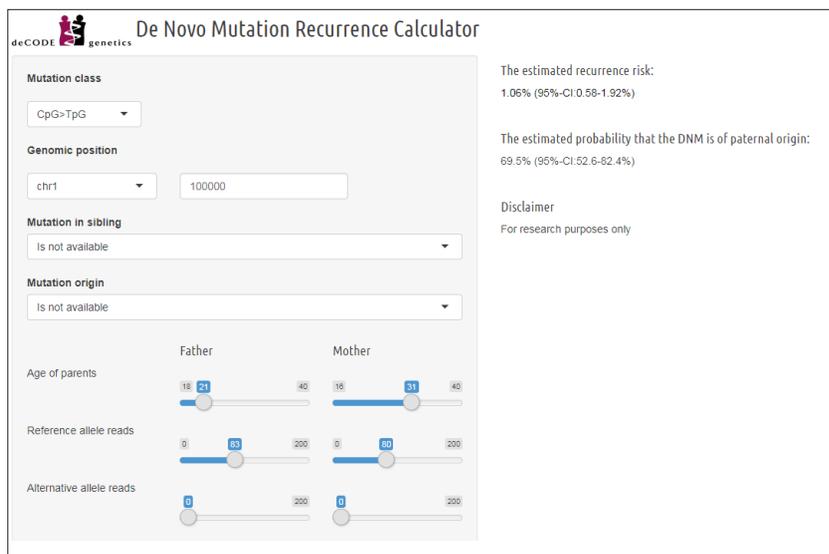
이는 Mosaicism과 관련이 있습니다. [그림1] 모자이시즘(Mosaicism)은 한 개체 내에서 두 가지 이상의 유전형이 공존하는 것으로, 그중 Gonadal mosaicism은 변이가 있는 세포가 생식 세포를 포함한 경우를 말합니다. 만약 Gonadal mosaicism이 주로 생식선 세포에 이환되어 있는 경우 정상 Phenotype을 가지나 이상 형질이 다음 세대에 전달될 수 있습니다. Mosaicism이 비율이 낮을수록 혈액 DNA 염기 서열 분석 검사에서 변이 신호가 매우 약하게 검출되지 않거나 경우에 따라서는 검출이 불가능하기도 합니다. [그림2]



[그림2] Mosaic JAG1 Mutation in Maternal Blood2

발견되기도 합니다. 하지만 그렇게 되기 위해서는 좋은 검사 퀄리티가 뒷받침되는 상황에서 배아 발생 과정 상 조혈계 세포 일부도 Mosaicism이 있어야 합니다. NGS 검사실 환경에서 Sanger sequencing으로 Proband의 부모를 확인할 때에는 Customized primer를 실험실에서 직접 Primer 3를 비롯한 각종 프라이머 설계 툴로 직접 설계해서 실험하는 것이 일반적이라, Mosaicism 여부를 Sanger로 확인할 땐 노이즈인지 시그널인지 구분이 어려운 경우가 많습니다.

기존 논문에 보고된 바에 따르면 부모에서 검출되지 않는 변이의 적게는 0.048%, 많게는 9.4%에서 ssDNMs라고 되어 있습니다. 유전 상담에서 De novo가 의심되는데 다음 아이도 동일한 이상이 있을 확률이 0에서 10%라고 보호자에게 설명한다면 설명하는 입장서나 듣는 입장에서 서로 괴로울 것입니다. 이번에 소개 드릴 논문은 ssDNMs에 대한 보다 정확한 통계 데이터를 제공하며 환자에 따라 보다 정확하게 ssDNMs의 비율을 추정하는 실용적인 방법을 제공했다는 것입니다. 35X로 Whole genome sequencing을 한 1,548 Icelandic trio^[4]를 바탕으로 시행되었고, Trio의 변이의 유무 확인뿐 아니라 Haplotype까지 확인하여 De novo가 부/모 중 누구로부터 유래했는지도 조사했습니다. 검사 결과 일반적인 De novo mutation은 주로 부친으로부터 유래되었으며(79.4%), 부모의 연령이 증가함에 따라 증가하는 경향을 보였습니다. 그러나 ssDNMs의 경우 남녀 비율에 별다른 차이가 크지 않으며, 나이에 따라서는 전체 De novo 대비 ssDNMs의 비율은 오히려 감소하는 것으로 나왔습니다. ssDNMs는 태아 발생에서 발생하나 De novo는 나이가 먹어 감에 따라 생식 세포 하나하나에



[Fig. 3] Web Interface of Recurrence De Novo Calculator.

Nature genetics에 2018년에 등재된 Multiple transmission of de novo mutation in families^[3] 논문을 보면 반복적으로 De novo처럼 보이는 현상이 발생하는 것을 ssDNMs(Sheared by siblings de novo mutations)이라고 명명하고 일반적인 De novo와 분리해서 말하고 있습니다. ssDNMs는 발생 2~3주째 발생하는 Primordial germ cell specification 과정과 그 이후의 생식선 발달 과정에서 생긴 변이로 인해 여러 개의 정자나 난자가 동일한 변이를 가지는 것에 대해 지칭합니다. 이러한 변이는 생식선 세포뿐 아니라 Somatic cell에도 같이 존재하는 경우가 있습니다. 이 경우 Sanger sequencing 검사에서 낮은 Peak로

유전적 이상이 발생하여 생기는 것이기 때문으로 생각됩니다. 보다 정확한 ssDNMs의 확률에 대해 추정하기 위해 변이의 유형과 Sequencing 결과에서 Reference와 Alternative read의 수, 동일 Mutation이 있는 형제의 여부 등까지 통합한 계산 모델을 만들었습니다.^[3] (<https://de-novo-risk.decode.is/>) ssDNMs는 낮게는 0.011%에서 많게는 28.5%까지 계산됩니다. 만약 Trio로 검사한 NGS 데이터에서 Target region에 충분한 Depth가 나왔거나, 부모 Sanger sequencing 검사에서 노이즈와 구분이 잘 가지 않는 낮은 Peak가 확인되는 경우 이 계산기를 통해 대략적인 확률을 추정해 보면 유전 상담에서 많은 도움이 되지 않을까 생각합니다.

[참고문헌]

- [1] Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. Nature. Aug 23; 488(7412): 471-475. (2012)
- [2] 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. May;17(5):405-24. (2015)
- [3] Multiple transmissions of de novo mutations in families. Nat Genet. Dec;50(12):1674-1680. (2018)
- [4] Parental influence on human germline de novo mutations in 1,548 trios from Iceland. Nature. Sep 28;549(7673):519-522. (2017)

항 목	제 목	세부인정사항	고시
사람유전자 분자유전검사 - 나580 유전성 유전자 검사	유전성 유전자 검사 항목별 유전자 종류	분류항목 다. 염기서열분석 (3) 20회 초과 40회 이하 유전자명 (82) TMRSS6 Gene (83) HEXB Gene (84) FRMD7 Gene	보건복지부 고시 제2018 - 242호 (2018년 11월 9일 시행)
사람유전자 분자유전검사 - 나583 비유전성 유전자 검사	비유전성 유전자 검사 항목별 유전자 종류	분류항목 다. 염기서열분석 (6) 12회 이상 유전자명 (05) RUNX1 Gene	보건복지부 고시 제2018 - 242호 (2018년 11월 9일 시행)
누593 염기서열분석 누624 염기서열분석	세균 rDNA 동정검사[염기서열분석], 진균 rDNA 동정검사[염기서열분석]의 급여기준	1. 누593가 염기서열분석-유전자형그룹3 (01) 세균 rDNA, 동정검사, 누624가 염기서열분석-유전자형그룹3 (01) 진균 rDNA 동정검사는 세균/진균감염의 정확한 진단을 위해 기존의 검사방법으로는 동정이 불가능하거나 곤란하여 실시한 경우 요양급여를 인정함 2. 상기 1.의 급여기준 이외에 시행하는 경우에는 「선별급여 지정 및 실시 등에 관한 기준」에 따라 본인부담률을 80%로 적용함	보건복지부 고시 제2018 - 268호 (2019년 1월 1일 시행)
누605 염기서열분석	항결핵약제 내성 결핵균 검사(피라지나미드) [염기서열분석]의 급여기준	누605가 염기서열분석-약제내성그룹2(01)항결핵약제 내성 결핵균 검사(피라지나미드)는 다음과 같은 경우 요양급여를 인정함 - 다음 - 가. 결핵 재발환자, 치료실패 환자, 치료 중단 후 재등록 환자 등에서 피라지나미드 약제 내성 결핵균이 의심되는 경우 나. 방광암에서 BCG치료 후 BCG감염이 의심되는 경우	보건복지부 고시 제2018 - 268호 (2019년 1월 1일 시행)
누605 염기서열분석	항결핵약제 내성 결핵균 검사(이소니아지드) [염기서열분석], 항결핵약제 내성 결핵균 검사(리팜피신)[염기서열분석]의 급여기준	누605가 염기서열분석-약제내성그룹2(02)항결핵약제 내성 결핵균 검사(이소니아지드), 누605가 염기서열분석-약제내성그룹2 (03) 항결핵약제 내성 결핵균 검사(리팜피신)는 다음과 같은 경우 요양급여를 인정함 - 다음 - 가. 누604나 핵산증폭-정성그룹3 항결핵약제 내성 결핵균 검사 (03) 리팜피신 [중합효소연쇄반응교잡반응법], (04) 이소니아지드[중합효소연쇄반응교잡반응법]과 항산균 약제감수성 결과가 일치하지 않는 경우 나. 누604나 핵산증폭-정성그룹4결핵균 및 리팜핀 내성 검사[실시간이중중합효소연쇄반응법]과 항산균 약제감수성 결과가 일치하지 않는 경우 다. 누604나 핵산증폭-정성그룹3 항결핵약제 내성 누605가 염기서열분석-약제내성그룹2(02)항결핵약제 내성 결핵균 검사(이소니아지드), 누605가 염기서열분석-약제내성그룹2 (03) 항결핵약제 내성 결핵균 검사(리팜피신)는 다음과 같은 경우 요양급여를 인정함 - 다음 - 가. 누604나 핵산증폭-정성그룹3 항결핵약제 내성 결핵균 검사 (03) 리팜피신 [중합효소연쇄반응교잡반응법], (04) 이소니아지드[중합효소연쇄반응교잡반응법]과 항산균 약제감수성 결과가 일치하지 않는 경우 나. 누604나 핵산증폭-정성그룹4결핵균 및 리팜핀 내성 검사[실시간이중중합효소연쇄반응법]과 항산균 약제감수성 결과가 일치하지 않는 경우 다. 누604나 핵산증폭-정성그룹3 항결핵약제 내성 결핵균 검사 (03) 리팜피신 [중합효소연쇄반응교잡반응법], (04) 이소니아지드[중합효소연쇄반응교잡반응법] 검사 결과를 확정할 수 없는(indeterminate, invalid) 경우 라. 누604나 핵산증폭-정성그룹4결핵균 및 리팜핀 내성 검사[실시간이중중합효소연쇄반응법] 결과를 확정할 수 없는(indeterminate, invalid) 경우	보건복지부 고시 제2018 - 268호 (2019년 1월 1일 시행)

세포유전분과

역할 및 업무	세포유전분야 검사관련 연구 및 관련 사업 수행
위원구성	위원장: 하정숙 위 원: 전경란, 장우리
2019년 사업계획	- 마이크로어레이 급여화에 따른 다양한 교육 프로그램 실시

분자유전분과

역할 및 업무	분자유전 관련 신의료 기술 분석/신청 및 관련 연구 진행
위원구성	위원장: 이승태 위 원: (모집 중)
2019년 사업계획	- 학술 프로그램 주제 개발 - 2019년 주요 논문 및 국제 학회 프로그램 리뷰 - 춘계 및 추계 학회 주제 제안·연자 섭외

분자미생물분과위원회

역할 및 업무	분자미생물검사 및 관련된 연구의 활성화, 교육 등의 사업 수행
위원구성	위원장: 신정환 위 원: 성흥섭, 허희재, 김영진
2019년 사업계획	- 2019년 대한진단유전 학술대회 심포지엄 구성 (주제: Microbiome and metagenomics, NGS in molecular microbiology) 검사실 또는 개별 연구에 실질적으로 도움이 될 수 있는 정보를 중점적으로 구성 예정.

분자혈액분과

역할 및 업무	진단혈액분야 질환 관련 유전자 이상에 관한 연구와 검사의 개발과 임상적 적용, 질관리에 대한 학술활동을 수행
위원구성	위원장: 이영경 위 원: 조영욱, 김명신, 김미영, 신새암
2019년 사업계획	- 학술대회 세션 구성 - 분자혈액검사의 정도관리 - 혈액 질환 NGS 검사의 표준화

유전상담위원회

역할 및 업무	유전상담 연수강좌 개최 및 국내 현황 조사
위원구성	위원장: 공선영 위 원: 한성희, 유종하, 박서진, 김지은
2019년 사업계획	- 2019년 유전상담 연수강좌 진행 예정 - 2018년 유전상담 현황 설문조사 결과 분석 - 유전 상담 수가 동향 확인

생물정보위원회

역할 및 업무	검사실에서 생성되는 생물정보 자료를 수집하고 분석하며, 관련 연구 및 기타 사업 수행
위원구성	위원장: 최규태 위 원: 이준형 (모집 중)
2019년 사업계획	- 생물정보 표준화 사업의 일환으로, 국내 NGS 검사실 BI(Bioinformatics) 현황 설문조사 - KRGDDB 등 국내 population DB에 대한 현황 조사 및 표준화 작업 - 생물정보 분석 및 사업 수행을 위한 서버 구축

ELSI 위원회

역할 및 업무	유전진단 등을 둘러싼 윤리적·법적·사회적 쟁점들에 대한 이슈를 조사 및 진단유전의학분야내 합리적인 의료문화 형성을 위한 방안 모색
위원구성	위원장: 김나경 위 원: 홍가혜 (모집 중)
2019년 사업계획	- ELSI 위원회 조직 구성 및 관련 사업 기획 (의료 및 법·철학·윤리 등 분야의 다양한 전문가 초빙 목표)

2019 신입이사진 워크숍 개최

지난 1월 11일 파크하얏트 서울에서 2019 신입이사진 워크숍이 진행됐다. 신입이사진 출범 이후 첫 공식일정이었던 이번 워크숍에서는 학회 운영방안, 분과별 사업 및 활동계획 발표가 이뤄졌다. 전창호 신입 회장은 “급변하는 의료 환경 속에서 앞으로의 발전을 위해 학계 및 산업계 회원들의 폭넓은 참여와 학술활동을 이끌겠다”고 밝혔다.



'2019 대한진단유전학회 학술대회' 개최 안내

대한진단유전학회는 5월 29일부터 30일까지 이틀 간 더케이호텔 서울 컨벤션센터에서 2019 대한진단유전학회 학술대회를 개최한다. 이번 심포지엄에서는 주제강연을 비롯 한국유전자검사평가원과의 공동개최 교육세션, 구연발표를 포함한 총 26개의 세션이 진행된다. 자세한 등록 안내와 프로그램 정보는 추후 홈페이지에 업데이트될 예정이다.

대한진단유전학회 2019년 학술행사 일정

- NGS 워크숍 - 7월 중
- 유전상담 연수강좌 - 8월 23일
- 추계심포지엄 - 10월 중

위 일정은 진행에 따라 변동될 수 있습니다. 자세한 일정은 홈페이지를 통해 추후 공지.



Accurate Monitoring for CMV viral load

cobas CMV Testing¹⁾

- FDA 승인된 CMV 정량 검사법²⁾**
 - Solid Organ Transplant Patient (SOT)
 - Hematopoietic Stem Cell Transplant Patient (HSCT)
- WHO 표준화된 검사법**
 - 1st Human CMV WHO International Standard³⁾
- pp65 Antigenemia 보다 민감한 검사법⁴⁾**
 - 2018 International Consensus Guidelines in SOT (Ref.)⁵⁾
- 약제내성 검증 마친 검사법**
 - Ganciclovir, Valganciclovir, Cidofovir, Foscarnet 약제내성 검체 검출한계-직선범위 검증완료³⁾



Reference :

1) 2017.6.8. cobasCMV
 2) FDA PMA P160041
 3) cobasCMV Package Insert
 4) Beckmann et al. J Med Virol 2011; 83:2143-50.
 5) International Consensus Guidelines in SOT 2018

ProMA000764