

KSGD

News Forum

Vol.10
June 2020

ksgd.org | 발행인 전창호 | 간행이사 고대현 | 간행위원 박혜원 김영은 서수현 | 편집 Hicomp Int.

Focus on

COVID-19 분자진단검사 경험 공유

Technology Trend

Ion Torrent™ NGS 시퀀서의 Oncomine™
제품군과 액체생검용 Oncomine™
Pan-Cancer Cell-Free Assay

Oncomine™ Pan-Cancer Cell-Free Assay 사용자 경험

Notable Research

Increased burden of ultra-rare
structural variants localizing to boundaries
of topologically associated domains in
schizophrenia

최신 보험정보

학회뉴스

연간 후원사 안내



COVID-19 분자진단검사 경험 공유

김남희 / 박현웅

서울특별시 보라매병원 진단검사의학과

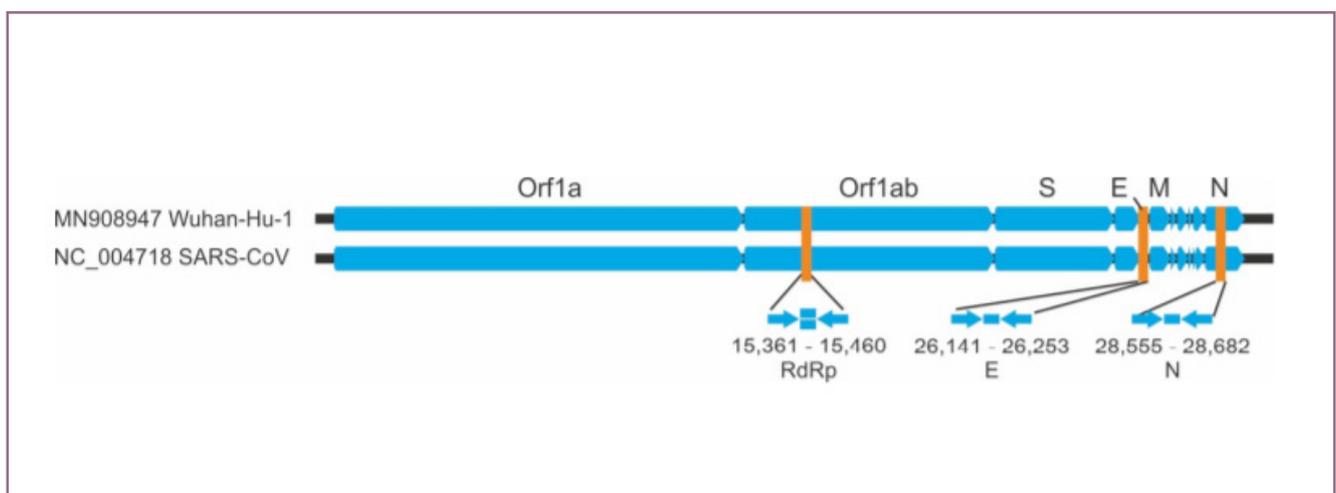
2019년 12월 중국 우한지역에서 다수의 원인 불명의 폐렴 환자가 보고된 후, 환자의 검체에서 새로운 종류의 코로나바이러스를 분리한지 약 6개월이 흘렀다. 이 질병은 중국을 넘어 여러 국가로 퍼져나갔으며 2020년 1월 30일 WHO에서 국제적 공중보건 비상상태를 선포하기 이르렀다. 신종바이러스는 유전적 계통도를 따라 SARS-CoV-2로 명명되었고, 감염증의 명칭은 COVID-19로 정해졌다. 전 세계가 COVID-19 종식을 위해 노력하였으나 3월 11일 대유행인 판데믹이 선언되었고, (5월 11일 기준) 213개 국가·지역에서 360여만명의 COVID-19 환자가 발생하고 25만여만명의 사망자가 발생하였다.

우리나라는 전파 초반인 2020년 2월 중순, 대구 대형 교회에서 발발한 대규모 집단감염으로 한때 일일 확진자가 1000명에 이르기도 하였으나, 적극적인 역학조사와 바이러스 유전자 검사를 시행하고 고강도 사회적 거리두기를 도입함으로써 확산 추세는 감소되었다. 하지만 수도권에서는 직장, 종교, 의료시설 등에서의 소규모 집단 감염이 산발적으로 일어났으며 해외에서 입국한 유학생과 재외국민으로 인하여 입원 병상 포화에 이르렀다. 필자들이 근무하는 서울특별시 보라매병원은 국내 환자 발생 초기부터 외부 선별진료소를 설치하여 운영하는 중이며, 현재까지 누적 180여명의 확진 환자가 입원하여 치료받고 있는 중이다. 또한 무증상/경증이며 기저질환이 없는 환자 (집중치료가 필요하지 않은 환자)들이 입소해 있는 서울형치료센터에 의료진들을 파견하여 환자들을 돌보고 있다. 필자들은 보라매병원에서의 SARS-CoV-2 유전자 검사의 검사실적 경험을 독자들과 나누고자 한다.



보라매병원에 입원한 COVID-19 확진 환자들의 검사 결과들을 후향적으로 분석해보면, 진단을 받고 입원/입소한 초반에는 상기도 검체에서 하기도 검체보다 더 높은 viral load를 보이는 경향성이 있다. 그리고 viral load가 감소하여 퇴원을 앞둔 시점에는 하기도에서 더 오랫동안 바이러스가 검출되는 경향성이 있다. 추가로, 일부 환자에 대해서는 임상과의 협의 하에 비호흡기 검체에서 COVID-19 검사도 시행하였는데, 혈장(plasma)에서는 65명의 환자 중 4명에게서 아주 낮은 수준의 바이러스가 검출되었다. 대변에서는 50명의 환자 중 39명의 환자에서 바이러스가 검출되었으며, 이중 소아환자들은 호흡기 검사에서 음성이 확인된 이후에도 대변에서 바이러스 유전자를 확인할 수 있었다. (참고: 퇴원 1-2주 뒤 외래에 방문한 소아 환자들의 대변에서 양성이 확인되기도 하였다.) 소변에서는 1세 미만 2명의 환자에서만 낮은 농도로 확인되었으나, 이는 검체 채취상의 오염을 배제할 수 없었다.

COVID-19의 검사실적 진단의 기준 방법은 real-time RT-PCR이다. SARS-CoV-2 real-time RT-PCR은 세계적으로 다양한 프로토콜이 제시되었으며, 각 프로토콜마다 SARS-CoV-2에서 검출하는 유전자부위에 대한 차이가 존재하기도 한다. WHO와 질병관리본부의 지침은 두개의 유전자를 사용하는 2단계 해석 알고리즘을 사용하는 것이다. 두 기관 모두 E 유전자를 PCR 선별검사로 시행하고, orf1b 유전자의 RdRp 부위를 PCR 확인검사로 사용하도록 권고하고 있다. 국내에서 COVID-19의 체외 진단목적으로 긴급 사용 승인된 상용시약들(5월 11일 기준 6개: 코젠, 씨젠, 솔젠트, 에스디바이어, 센서, 바이오세움, 바이오코어)은 상기의 두 개의 유전자 부위 외의 다른 유전자들 (N, ORF1a)을 검출하기도 한다. 질병관리본부와 대한진단검사의학회는 어떠한 키트를 사용하건, 키트에서 검사하는 모든 유전자가 검출되었을 때만 양성(positive)으로 해석하고 한 개의 유전자라도 음성일 경우 미결정(indeterminate or invalid)이나 음성(negative)로 해석하도록 권고한다.



(그림 1) SARS-CoV-2의 유전자 검사 타겟 (출처: WHO homepage)

문제는, 모든 유전자에서 유전자 증폭이 이른 PCR cycle (낮은 Ct값)에서 나타나는 명확한 양성인 경우와 모든 유전자에서 증폭이 되지 않은 명확한 음성을 제외한 애매한 영역, 불분명한 범위인 grey zone이 존재하기에 결과 판독 시 어려움이 발생한다는 것이다. 초진 환자를 진단할 때 뿐만 아니라, 확진 환자의 격리해제 검사 기준이 “24시간 이상의 간격으로 연속 2회 real-time RT-PCR 결과가 음성인 충족되는 것”이므로 추적관찰시에도 양성/미결정/음성 판정이 중요하다.

SARS-CoV-2 유전자 검사에 영향을 주는 요소는 다양하다. 먼저, 상기도 검체, 특히 비인두 검체의 경우에는 환자에게서 얼마나 제대로 검체를 채취했는지에 따라, 하기도 검체인 가래의 경우 올바른 채담 과정과 함께 검사실에서 검체 전처리 과정을 얼마나 최적화하여 수행했는지에 따라 유전자 증폭 결과가 달라질 수 있다. 일부의 PCR 결과는 비특이적으로 PCR반응이 일어나는 것인지, 낮은 농도의 바이러스 증폭으로 생긴 것인지 구분이 어려울 때가 있다. 따라서 정확한 판독을 위한 재검의 시행 여부와 검사의 최적화 결정에 진단검사의학과 전문의들의 종합적 판단이 특히 필수적으로 요구된다.

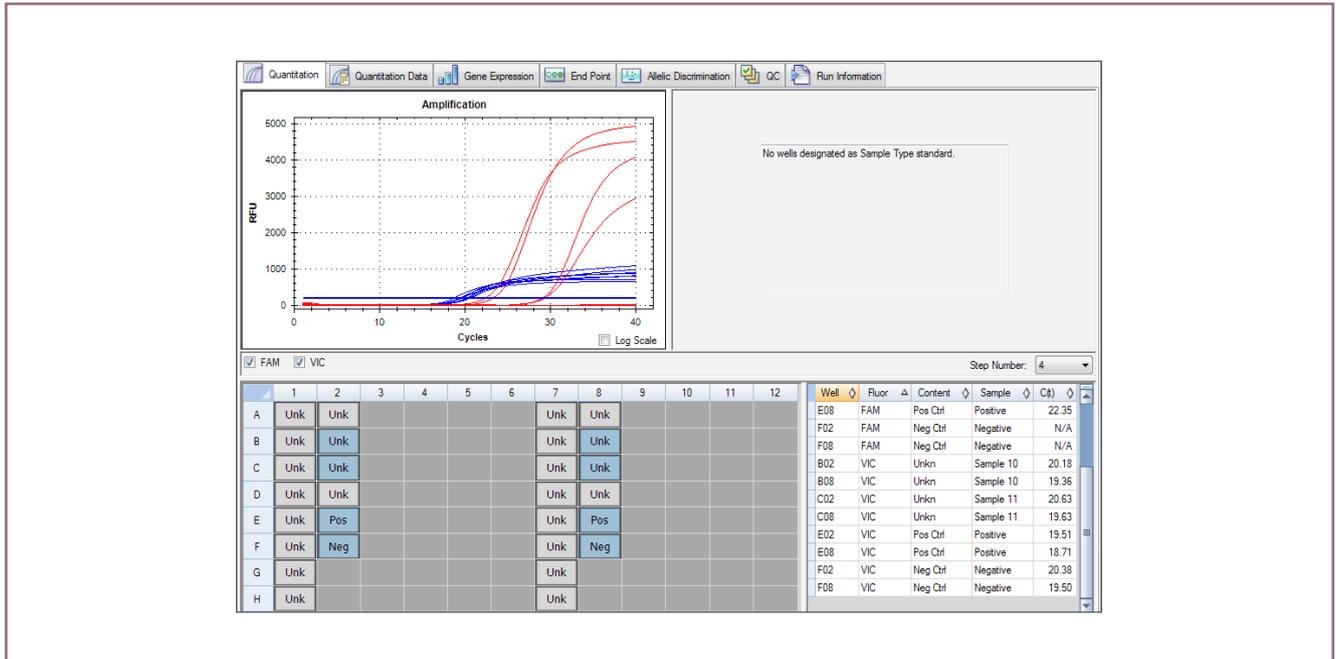


또한 각 검사기관별로 선택하는 핵산 추출법과 PCR 키트에 따라 증폭 cycle 값이 달라지며, 같은 방법을 택하더라도 PCR 기기에서 설정한 역치값에 따라 Ct값에 차이가 생기게 된다. 문제는, 현재 사용하고 있는 real-time PCR 키트들이 긴급 승인 제품들이기 때문에 임상 평가 자료가 미비하여 회사에서 제공한 기준에만 따르면 모호한 범위가 생기게 되며, 아직까지 확실한 기준점이 마련되지 못하였다. 이러한 문제점들을 해결하기 위해 대한진단검사의학회는 검사기관들 간의 외부정도관리를 시행하여 표준화에 애쓰고 있다.

COVID-19의 Real-time RT-PCR은 검사가 까다롭고 정확성을 극도로 요구하는 검사이다. 그리고 접수부터 보고까지 약 6시간으로 검사시간이 길고, 여러 검체를 모아서 한번에 처리해야하는 검사이기도 하다. 따라서 숙련된 임상 병리사가 검사를 수행해야만 한다. 하지만 임상에서는 검사시간의 단축, 그리고 잦은 검사 빈도에 대한 요구도가 매우 높다. 그래서 최근 COVID-19의 검사실적 연구는 더 빠른 검사를 위한 현장용 진단 키트의 도입에도 관심을 두고 있다. 현장용 분자 진단검사 제품인 Cepheid사의 Xpert® Xpress SARS-CoV-2는 FDA로부터 긴급사용승인을 취득했으며, 다수의 업체에서 항체/항원 검사 키트 개발을 하였고, 국내 승인 후 시판을 목전에 두고 있다.

상기에 언급한 COVID-19 검사의 경험들은 비단 COVID-19 뿐만 아니라 real-time PCR을 이용하여 병원체의 유전자를 확인하고 진단하는 모든 감염병에 해당되는 이야기일 것이다. 다만 COVID-19에 의해 진단검사의 중요성과 어려움이 수면위로 떠오른 것이고, 이로 인해 다양한 논의가 시작되었다고 볼 수 있다. 아직 우리는 COVID-19에 맞서 고군 분

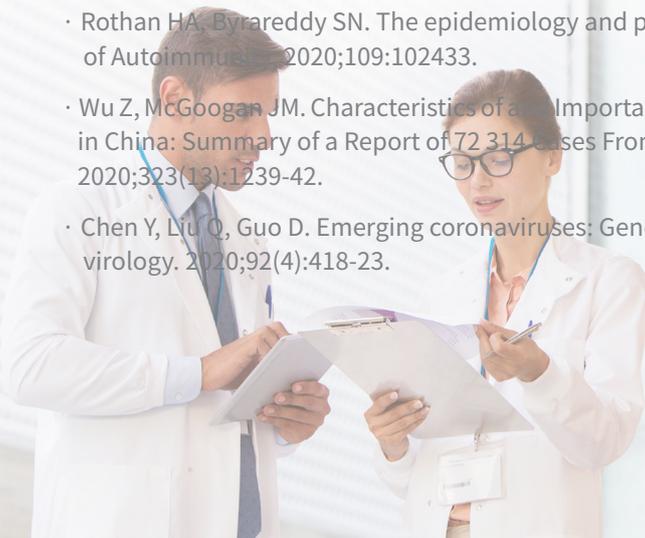
투 중이다. 하지만 우리는 경험을 쌓고 데이터를 축적하며 곧 이 위기를 이겨낼 것이며, 미래에 새로운 바이러스와 맞닥뜨렸을 때 현재보다도 더 신속하고 유연하게 대응할 수 있을 것이다.



(그림 2) 긴급 승인 시약을 이용하여 검사한 SARS-CoV-2의 유전자 검사 결과 일부

[참고문헌]

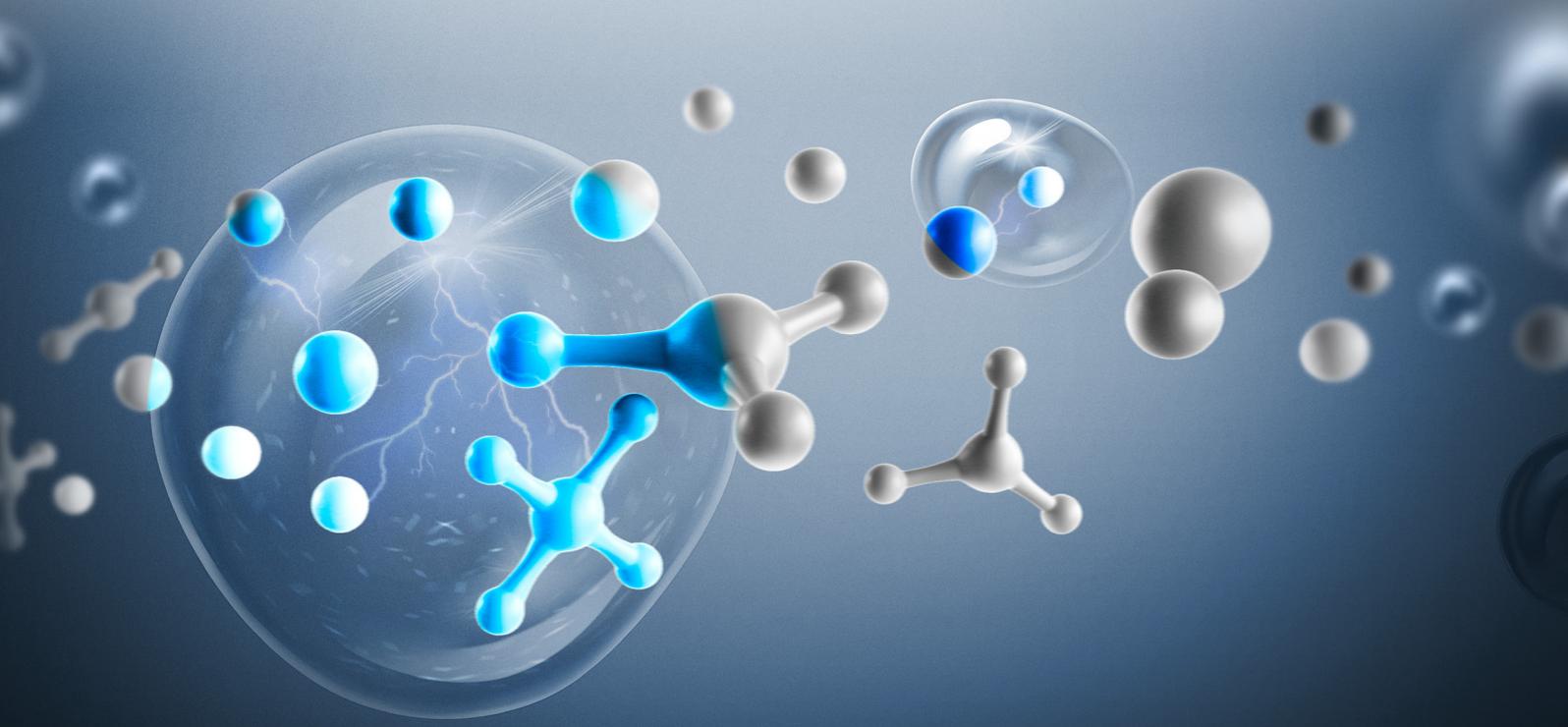
- Corman V, Bleicker T, Brünink S. Diagnostic detection of Wuhan coronavirus 2019 by real-time RT-PCR. Geneva: World Health Organization, January 13, 2020.
- 질병관리본부. 코로나바이러스감염증-19 대응지침. 제8판. <https://www.cdc.go.kr/board/board.es?mid=a20507020000&bid=0019> Accessed May 11, 2020. Document in Korean.
- 질병관리본부, 대한진단검사의학회. 코로나바이러스감염증-19 검사실 진단 지침. 제3판. http://www.kslm.org/rang_board/list.html?num=16622&code=covid19_press Accessed March 11, 2020. Document in Korean.
- Corman V, Bleicker T, Brünink S. Diagnostic detection of Wuhan coronavirus 2019 by real-time RT-PCR. Geneva: World Health Organization, January 13, 2020.
- Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. 2020;395(10224):565-74.
- Rothan HA, Byrareddy SN. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *Journal of Autoimmunity*. 2020;109:102433.
- Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of an Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA*. 2020;323(13):1239-42.
- Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of medical virology*. 2020;92(4):418-23.



Ion Torrent™ NGS 시퀀서의 Oncomine™ 제품군과 액체생검용 Oncomine™ Pan-Cancer Cell-Free Assay

써모피셔사이언티픽

방대한 양의 유전자 분석을 저비용으로 정확하게 분석하는 NGS (Next Generation Sequencing) 기술의 발달로 암환자들에 대한 NGS 임상검사와 그에 따른 정밀의료가 빠르게 도입되고 있다. 미국 NCI-MATCH^[1], NCI-COG Pediatric MATCH^[2], 일본 SCRUM-Japan^[3], 캐나다 Personalize My Treatment (PMT) 국가단위 프로그램^[4] 등에서 Ion Torrent™ NGS 장비와 AmpliSeq™ PCR 앰플리콘 기술을 기반으로 하는 패널 유전자 검사가 활발하게 진행되고 있다. 이러한 ‘Basket’ 또는 ‘Umbrella’ 형태의 임상연구로 기존 표적치료제가 승인된 암종 외에 동일한 유전 변이를 가진 다양한 암종에도 임상적 효과를 보이는 결과들이 연이어 발표되고 있고, 암환자에 대한 정밀의료 적용도 계속 확대되고 있다.



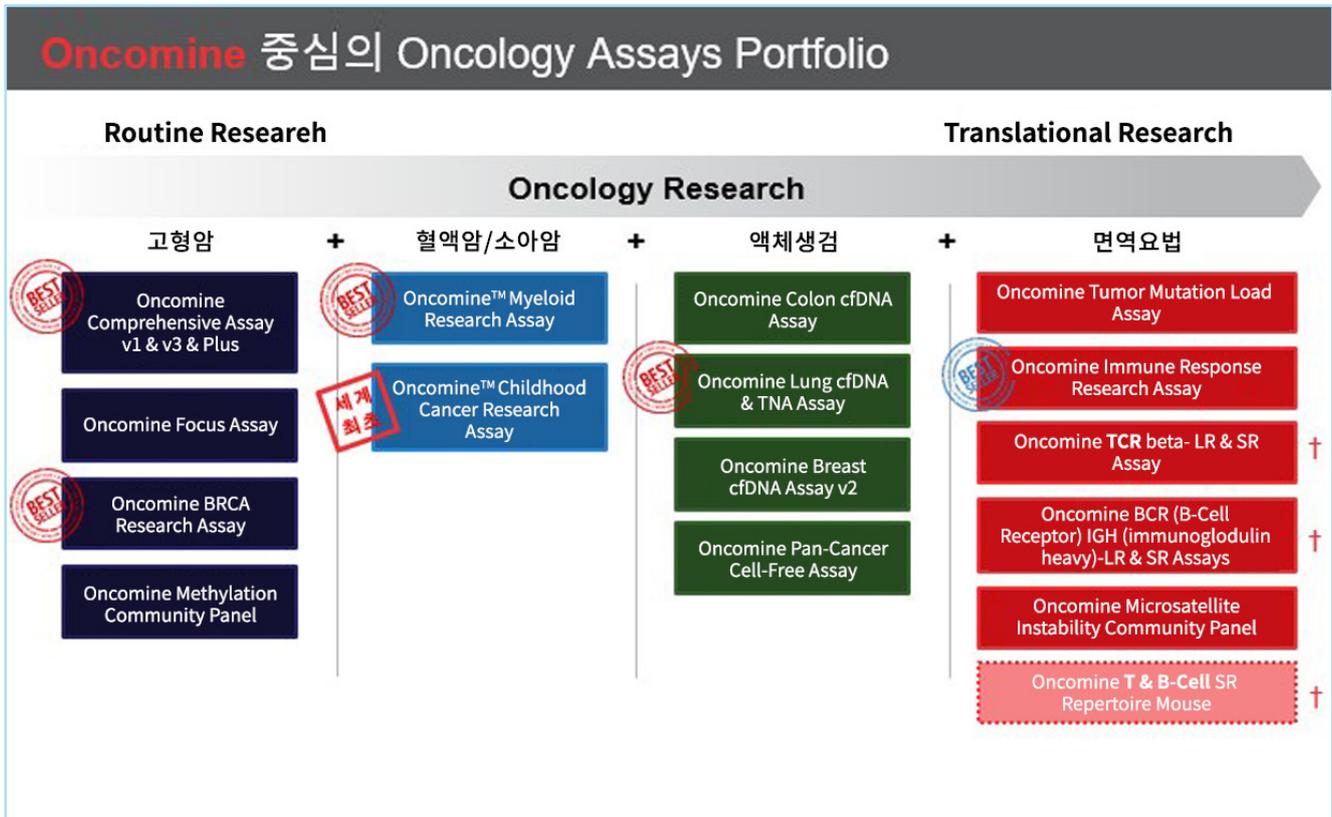


Figure 1. 써모 피셔 사이언티픽에서 NGS solution으로 제공하는 Oncomine™ Portfolio. †: LR (long read)는 혈액을, SR (short-read)는 FFPE를 검사대상으로 한다.

한국은 2017년 3월부터 고형암 10종, 혈액암, 유전성암 NGS 유전자 검사에 대해 선별급여가 가능해졌고, 2019년 5월에는 고형암 NGS 검사가 전체 암종으로 확대되었다. 써모 피셔 사이언티픽은 암 유전자 검사에 초점을 맞춘 Oncomine™ 브랜드의 제품 포트폴리오를 확대 개발하고, 이어지는 분석과 임상 리포트 전체 작업 흐름까지 검증된 NGS 시퀀싱 솔루션을 지원하고 있다 (Figure 1). NCI-MATCH, SCRUM-Japan 등에서 엄밀하게 검증된 Oncomine Comprehensive Assay 시리즈는 최적화된 패널, 실험기술, 분석 및 지원 솔루션으로 [5][6] 가장 많은 한국 병원들에 도입된 고형암 NGS 패널

로 자리를 잡았고, 2020년 현재는 OCA v3와 OCA plus가 한국에도 도입되었다. Oncomine BRCA Research Assay는 BRCA 유전자 NGS 검사로, Oncomine Myeloid Research Assay는 골수혈액암에 대한 대표적인 NGS 패널로 사용되고 있다. 그 외에 T-cell/B-cell repertoire, 림프구 면역 반응을 포함한 면역종양학 관련 패널들도 다양하게 활용되고 있다.

그러나 환자의 전신 상태가 좋지 않아 조직검사를 시행하지 못하거나, 병변의 위치상 조직검사가 어려운 경우, 이전의 방사선치료로 조직채취 가능한

Lung				Breast				Colon		
Oncomine Lung cfDNA Assay		Oncomine Lung Cell-Free Total Nucleic Acid Assay		Oncomine Breast cfDNA Assay		Oncomine Breast cfDNA Assay v2		Oncomine Colon cfDNA Assay		
ALK	MET	ALK	MET	AKT1	FBXW7	AKT1	FBXW7	AKT1	ERBB2	NRAS
BRAF	NRAS	BRAF	NRAS	EGFR	KRAS	CCND1	FGFR1	APC	FBXW7	PIK3CA
EGFR	PIK3CA	EGFR	PIK3CA	ERBB2	PIK3CA	EGFR	KRAS	BRAF	GNAS	SMAD4
ERBB2	ROS1	ERBB2	RET	ERBB3	SF3B1	ERBB2	PIK3CA	CTNNB1	KRAS	TP53
KRAS	TP53	KRAS	ROS1	ESR1	TP53	ERBB3	SF3B1	EGFR	MAP2K1	
MAP2K1		MAP2K1	TP53			ESR1	TP53			
<ul style="list-style-type: none"> • 11 genes • DNA only • 35 amplicons • 169 hotspots and indels 		<ul style="list-style-type: none"> • 12 genes • Single library from DNA and RNA • 58 amplicons • >169 hotspots and indels • 49 fusions: ALK, RET, ROS1 • CNV: MET • MET exon 14 skipping (3) 		<ul style="list-style-type: none"> • 10 genes • DNA only • 26 amplicons • 152 hotspots and indels 		<ul style="list-style-type: none"> • 12 genes • Single library to detect SNVs and CNVs • 76 amplicons • >152 hotspots and indels • CNVs: CCND1, ERBB2, FGFR1 • More complete coverage of TP53 		<ul style="list-style-type: none"> • 14 genes • DNA only • 49 amplicons • 236 hotspots and indels 		
Pan-cancer										
Oncomine Pan-Cancer Cell-Free Assay										
Hotspot genes					Tumor suppressor genes		CNV genes		Gene fusions	
AKT1	EGFR	FLT3	KRAS	PDGFRA	APC		CCND1	ERBB2	ALK	FGFR3
ALK	ERBB2	GNA11	MAP2K1	PIK3CA	FBXW7		CCND2	FGFR1	BRAF	MET
AR	ERBB3	GNAQ	MAP2K2	RAF1	PTEN		CCND3	FGFR2	ERG	NTRK1
ARAF	ESR1	GNAS	MET	RET	TP53		CDK4	FGFR3	ETV1	NTRK3
BRAF	FGFR1	HRAS	MTOR	ROS1			CDK6	MET	FGFR1	RET
CHEK2	FGFR2	IDH1	NRAS	SF3B1			EGFR	MYC	FGFR2	ROS1
CTNNB1	FGFR3	IDH2	NTRK1	SMAD4						
DDR2	FGFR4	KIT	NTRK3	SMO						
<ul style="list-style-type: none"> • 52 genes • Single library from DNA and RNA 					<ul style="list-style-type: none"> • 272 amplicons • >900 hotspots and indels 		<ul style="list-style-type: none"> • Extended coverage of TP53 • 96 fusions 		<ul style="list-style-type: none"> • 12 CNVs • MET exon 14 skipping 	

Table 1. 6종의 Oncomine™ cell-free assay의 유전자 구성

병변이 없거나 섬유화, 괴사 등의 이유로 고형암 조직을 얻지 못하는 암환자들은 이러한 정밀의료의 혜택을 받지 못하는 안타까운 상황에 놓이기도 한다. 이러한 암환자군에게 적용 가능한 혈액내 유리 DNA (cell-free DNA)를 이용한 액체생검(Liquid Biopsy)은 높은 검사심도(depth)와 분자표지 기술(molecular barcode tag) 등으로 0.1% 검출한계(LOD, limit of detection)가 가능한 Oncomine™ NGS 솔루션을 사용할 수 있는데, 다양한 암종에서 암의 진화 분석 및 환자 부담이 최소화된 진단, 암전이에 대한 예후 모니터링 등으로 발전시킬 필요성이 대두되었다^{[7][8]}.

써모 피셔 사이언티픽은 Ion Torrent S5 장비에서 혈액내 유리 DNA (cell-free DNA) 분석이 가능한 6종류의 Oncomine™ 액체생검 Assay를 출시했고(2020년 5월 기준), 그 외에도 미세잔존 변이 검출이 가능한 액체생검 NGS 제품 등도 개발 중이다. 암종별로 Oncomine™ Colon cfDNA Assay, Oncomine™ Lung cfDNA Assay가 나온 후에, ALK, RET, ROS1을 포함한 49개 RNA fusion과 유전자 복제수 변이(CNV) 분석까지 확장된 Oncomine™ Lung Cell-Free Total Nucleic Acid Assay를 출시했고, ERBB2 (HER2) 유전자 등의 CNV 분석도 가능한 새로운 버전의 Oncomine™

Breast cfDNA Assay v2도 뒤를 이었다. 가장 최근 출시된 Oncomine™ Pan-Cancer Cell-Free Assay(Table 1)는 다양한 암 관련 처방과 900건 이상의 최신 임상시험(Met exon14 skip, RET, NTRK 등)에 관계된 유전자 52종을 대상으로 중요 유전자 변이 검출 및 96개 fusions, 12개 CNVs 분석을 가능하게 하고, 검증 백서도 참조할 수 있다^[9]. Oncomine™ 액체생검 제품들은 기존 AmpliSeq™ 기술에서 무작위로 생성되는 에러를 제거하기 위해 한 단계 더 발전한 molecular barcode 기술을 적용한 tag-sequencing으로, 20 ng DNA

Validation component	SNV/indel	CNV	Fusion
Analytical sensitivity	>99.9% at 0.5% AF 80% at 0.1% AF	>99% at >1.34- fold amplification	>99% at 0.4%
Analytical specificity	>99.9%	>99.9%	>99.9%
Accuracy	>99%	>99%	>99%
Repeatability	98%	>99%	>99%
Reproducibility	99% in reference materials	99% in reference materials	>99% in reference materials
	97% in clinical samples	97% in clinical samples	>99% in clinical samples
Positive predictive value	98.4% above 0.5% AF	>99% above 1.34-fold amplification	>99% above 0.4%
	93.7% above 0.1% AF		

Table 2. Oncomine™ Pan-Cancer cell-free assay의 검증 요약

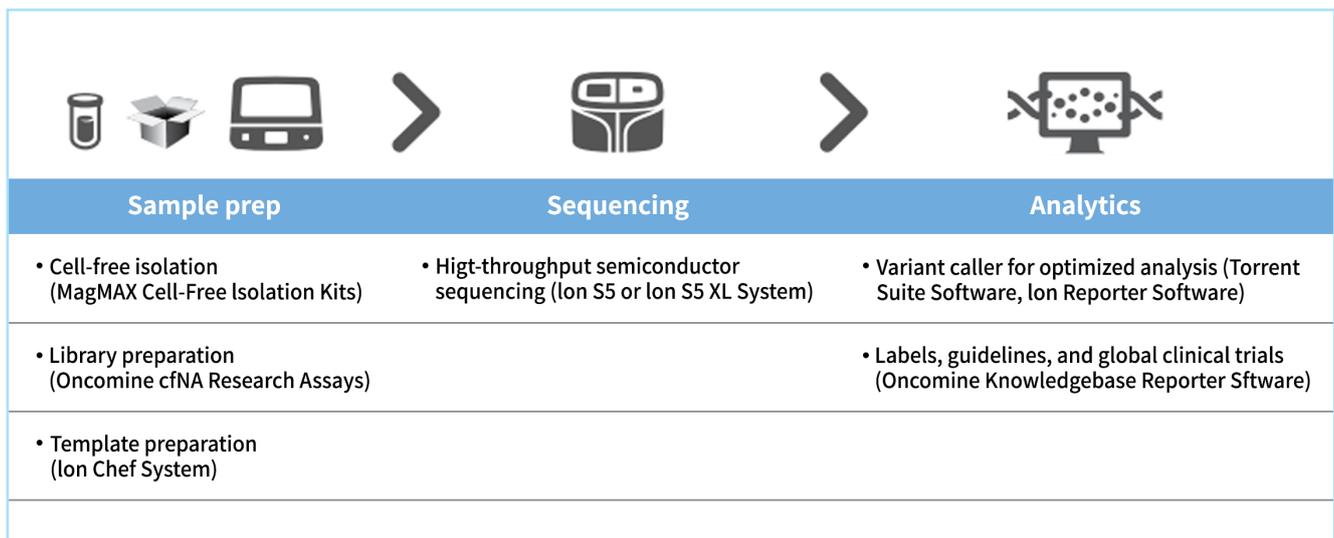


Figure 2. Oncomine™이 제공하는, 샘플 준비에서 Ion S5 System NGS 시퀀싱, 기본 서버와 Ion Reporter 서버를 통한 분석 및 리포트까지 완료되는 전체 작업 흐름

기준 0.1% 검출한계(LOD)로 혈액내 유리 DNA/RNA 분석이 가능하다(Table 2). Oncomine™ Pan-Cancer Cell-Free Assay는 Ion S5 XL의 540 chip에서 4개, 550 chip에서 8개 샘플을 동시에 분석할 수 있으며, 모든 액체생검 Assay에서는 샘플 준비부터 최종 분석과 임상 근거 리포트까지 전체 작업을 Oncomine 솔루션으로 제공한다(Figure 2).

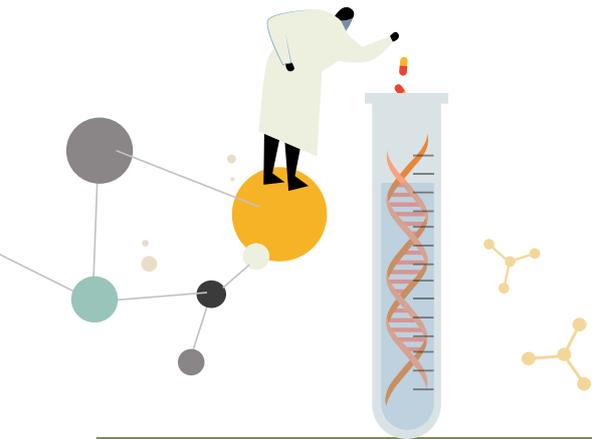
유럽, 캐나다, 일본의 11개 연구소에서 Oncomine Lung cfDNA Assay를 교차 검증한 내용이 AMP (Association for Molecular Pathology) Global Congress에서 보고되었다. 0.1% 비율의 변이에 대해 평균 94.8% sensitivity와 99.8%의 specificity가 얻어졌고, 특히 폐암 표적치료제 Osimertinib의 중요 마커인 EGFR T790M 변이를 협업한 모든 연구소에서 찾아내는 데 성공했다^[10]. 또한, Oncomine™ Pan-cancer assay를 사용해 정상인의 혈액 유리 DNA/RNA에서 0.08% 변이 확인 후 추후 실제 암 발병과의 연관성을 보인 결과 등도 속속 발표되었다^[11]. 2018년에는 AmpliSeq™ HD 기술이 등장하여 기존 AmpliSeq™ 기술보다 월등하게 높아진 민감도의 정확성을 확보한 custom Cell-Free 패널 디자인도 가능해져서, 진단검사 영역에서 대량의 유전자 표적에 대한 액체생검 시퀀싱과 정밀의료를 범용적으로 적용할 수 있을 것으로 기대된다.





[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-oncomein-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] 보건복지부 고시 2018-88호
- [9] <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CSD/Reference-Materials/oncomein-pan-cancer-assay-white-paper.pdf>
- [10] <https://www.genomeweb.com/cancer/thermo-fisher-lung-liquid-biopsy-assay-reproducible-across-labs-study-presented-amp-global>
- [11] Alborelli et al. Cell Death and Disease (2019) 10:534



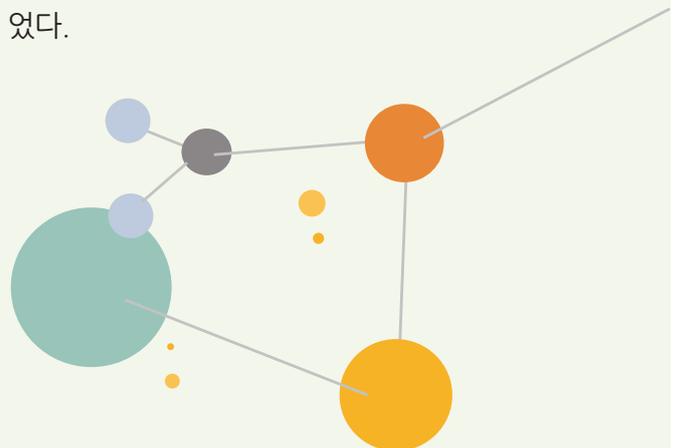
OncoPrint™ Pan-Cancer Cell-Free Assay 사용자 경험

이경아
연세대학교 의과대학

강남세브란스병원 진단검사의학과에서는 2019년 8월부터 조직을 얻기 어려운 진행성, 전이성, 재발성 고형암 환자를 대상으로 진단, 치료 및 예후 판정 등에 임상적으로 유용한 체세포 돌연변이를 검출하기 위한 목적으로 OncoPrint pan-cancer cell-free assay 및 AmpliSeq HD 기반 custom 패널을 함께 사용하여 cell free tumor (ct) DNA/RNA NGS 패널 검사를 시행하고 있다. 최근 상품화되어 있는 참조 물질들을 활용하면 검출한계 부근의 대립유전자 빈도를 가진 변이나, 염기서열변이 이외에 카피수변이, 융합변이 등 다른 종류의 변이까지 분석적 성능 검증이 가능하기 때문에 여기에서는 이러한 기술적 검증 자료보다는 저자가 경험한 실제 환자 결과를 공유하고자 한다.

ctDNA는 조혈 세포 등 비종양성 세포 유리 핵산에 의해 희석되거나 또는 종양 자체의 특성때문에 유리 핵산 중 종양으로부터 기원한 핵산의 비율

이 매우 낮게 존재하는 경우가 많다. 그러므로 해당 암종의 유전체 프로파일링 특성이 ctDNA 결과에서도 일관되게 관찰되는지 확인하는 과정은 ctDNA 해석에 도움이 된다. 예를 들어 TP53 유전자 돌연변이는 고등급장액성난소암 환자의 96%에서 관찰되므로 ctDNA 결과에서 이러한 특성을 확인함으로써 분석된 DNA가 종양으로부터 유래한 것인지 확인하는데 도움이 된다. 본 기관에서 시행한 난소암 환자 모두에서 TP53 변이를 확인할 수 있었으며 이 중 29%에서 PARP 억제제 치료 결정에 직접적인 도움을 줄 수 있는 BRCA1 유전자의 병인성 변이 (tier 1)를 함께 검출할 수 있었다.



NCCN 가이드라인에서는 진행성 또는 전이성 폐암에서 EGFR, ALK, ROS1, BRAF 등의 주요 생체표지자를 포함한 분자유전학적 프로파일링을 권고하고 있는데 실제 이런 환자에서 조직 검체 채취가 어려운 경우가 많기 때문에 NCCN 가이드라인의 'Principles of molecular and biomarker analysis' 섹션에서 ctDNA 적응증을 구체적으로 제시하고 있다. 본 저자는 1세대 또는 2세대 EGFR tyrosine kinase inhibitor (TKI) 치료 후 질병이 진행된 39명의 환자를 대상으로 Oncomine pan-cancer cell-free 패널을 이용하여 NGS 분석을 수행한 결과 (unpublished data) EGFR 활성화 변이를 76.9%, 3세대 TKI의 표적이 되는 T790M 변이를 35.8%의 빈도로 검출하였다. T790M 변

이 이외에 EGFR TKI 저항성과 연관된 KRAS 변이, PIK3CA 변이 BRAF 변이, ERBB2 변이, EGFR 증폭, EGFR/CDK4 증폭, CDK6/KRAS/CCND1 증폭, EGFR/CDK6 증폭, ERBB2 증폭 등이 단독 또는 T790M 변이와 함께 관찰되었다. ERBB2 활성화 변이와 같이 최근 NCCN 가이드라인에서는 전이성 비소세포암에서 검사가 권고되는 새로운 생체표지자를 지속적으로 업데이트 하고 있으며, 위와 같은 새로운 저항성 획득 기전을 표적으로 다양한 글로벌 임상 시험이 진행 중에 있다. 이에 따라 환자에게 좀 더 포괄적인 검사 결과를 제공할 수 있는 Pan-cancer 패널을 이용한 ctDNA 검사가 임상적으로 유용하게 활용될 것으로 생각된다.



Increased burden of ultra-rare structural variants localizing to boundaries of topologically associated domains in schizophrenia

김영은

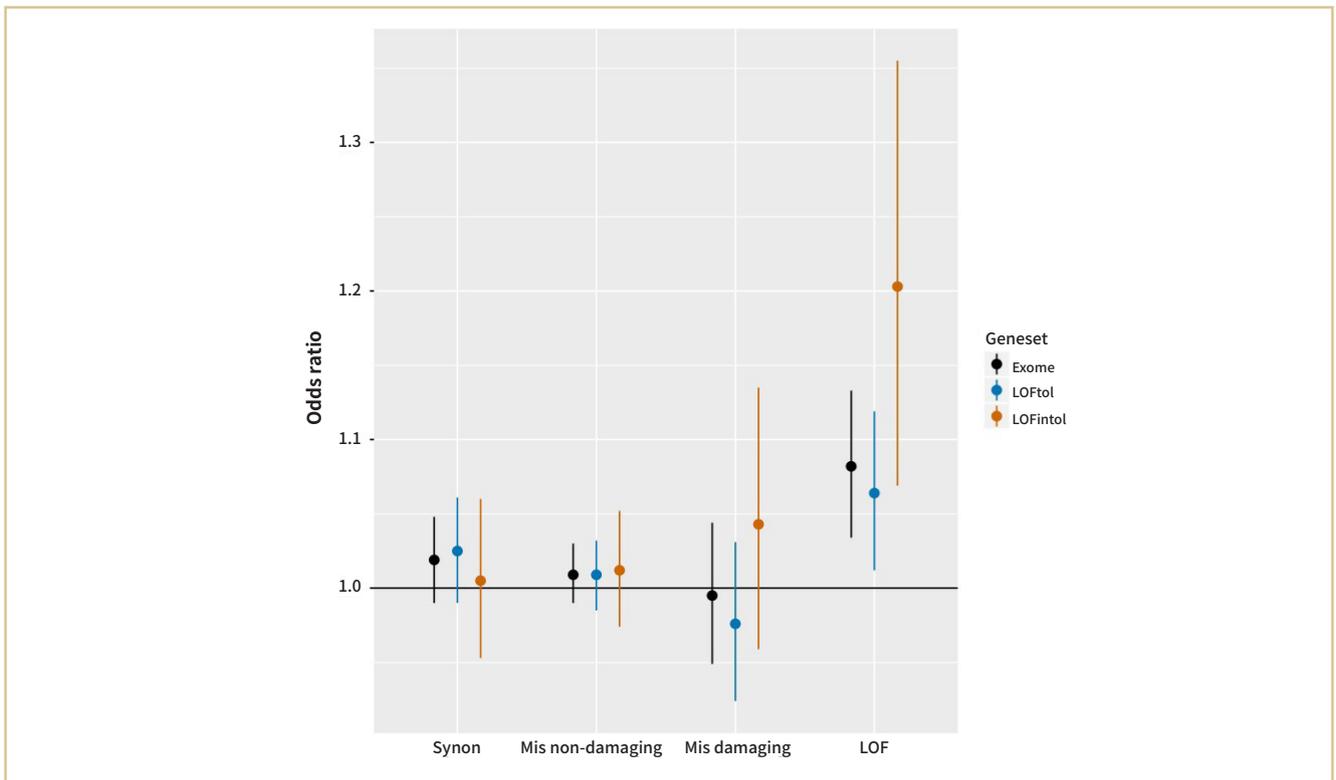
한양대학교병원 진단검사의학과

Schizophrenia의 유전적 배경에 대해 첫 번째 연구가 발표된 이후, 해당 질환에 유전적 원인이 기여할 것이라는 많은 연구 결과들이 보고되었습니다. Schizophrenia의 inheritance는 유전적 요인과 비유전적 요인이 복합적으로 작용하며, pedigree-heritability는 약 60-65%, twin-heritability는 81%로 알려져 있습니다. 이 질환의 유전적 원인을 밝히기 위해 많은 연구가 진행되었고, 주로 genome-wide association study (GWAS)나 whole exome sequencing (WES)이 이용되었습니다.

하지만 GWAS나 WES는 전체 genome의 일부에 대해서만 정보를 얻는 한계점이 있어, 최근에는 high-coverage (30x) WGS 데이터를 이용한 분석이 시도되고 있습니다. 21,620명의 WGS 데이터를 이용한 TOPMed 연구에서는 낮은 linkage disequilibrium (LD)를 보이는 영역에 존재하는 드문 genetic variation (minor allele frequency 0.0001-0.1)와 protein-coding region 밖에 존재하는 변이들을 이용하여 키와 body mass index에 관한 heritability를 밝힌 바 있습니다 [1].

이렇듯, WGS는 structural variants (SVs)를 포함하여 염기서열 수준의 해상도에서 전체 genome의 변이를 검출할 수 있으며, GWAS나 WES에서 확인할 수 없는 regulatory variant나 드문 SVs를 확인할 수 있어 기존의 방법에 비해 유전적 원인을 더 완벽하게 밝혀낼 수 있을 것으로 기대됩니다.





[Fig 1] Burden of coding ultra-rare SNVs and indels

최근 1162명의 스웨덴 schizophrenia 환자와 936명의 ancestry-matched 대조군에 대해 high-coverage WGS을 시행한 분석 결과가 출판되었습니다[2]. 이 연구의 목적은 기존 기술로는 밝혀낼 수 없었으나 WGS로는 확인 가능한 유전 변이들이 schizophrenia에 미치는 영향을 알아내는 것이었습니다. 또한 드문 변이에 의한 임상 양상의 차이를 설명하기 위해 WGS를 이용한 heritability를 분석하였고, noncoding variants의 역할을 확인하기 위해 기존에 알려진 sequence constraints와 인간 뇌를 이용한 functional genomic annotation을 참고했습니다. 특히, 기존WES와 CNV 연구에서 schizophrenia의 위험도에 기여한다고 알려진 극희귀 변이 (ultra-rare variant, URVs)에 초점을 맞추어 분석하였습니다.

1) SNVs와 indel을 포함한 URVs는 WGS case/control 코호트에서 한 차례 보고되고 독립된 인구 집단에서 보고된 바 없는 변이로 정의하였습니다. 또한 환자군과 대조군 사이의 대조 분석을 위해 관심 있는 유전 영역에서 발견된 모든 event를 이용하여 burden test를 시행하였습니다.

1104명의 환자군과 921명의 대조군에서 URVs의 burden test를 시행한 결과, 환자군에서는 인당 평균 4262개, 대조군에서는 4249개의 URV가 발견되어 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았습니다 ($P=0.4225$). Damaging protein-coding URVs를 중심으로 분석한 결과에서는 환자군에서 LOF URVs가 더 많이 발견되었으며, 특히 LOF intolerant genes ($pLI > 0.9$ in non psychiatric subset of ExAC)에서 뚜렷한 것으로 나타났습니다. [Fig 1] 이는 동일 환

자들에서 시행한 WES의 LOF intolerable genes에 대한 OR보다 높은 수치로, protein-coding region 분석에 있어 WGS가 WES보다 design, coverage, exome capture에 의한 영향을 받지 않으므로 더 나은 장점이 있음을 보여줍니다.

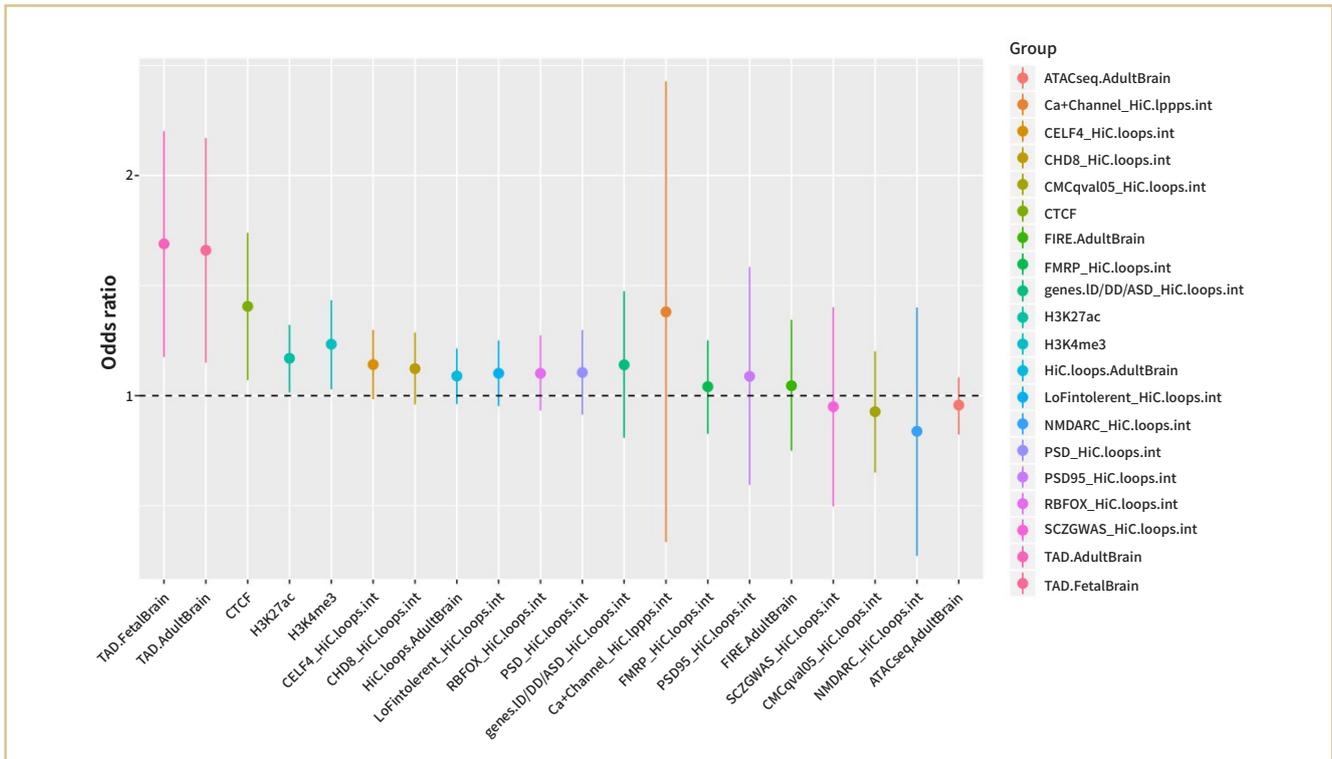
2) Noncoding ultra-rare SNV/indels는 GENCODE protein-coding transcripts의 splice dinucleotide 나 coding region의 서열을 변화시키지 않는 변이로 정의하였습니다. 또한 highly constrained region의 변이에 중점을 두어 분석하였으며, 이는 context-dependent tolerance score (CDTS) 1% 미만, 혹은 genomic evolutionary rate profiling (GERP) 4 이상으로 정의하였습니다. 이 조건을 만족하는 noncoding URVs는 환자군과 대조군 사이에 통계적인 차이가 관찰되지 않았습니다 (OR = 1.009, P=0.0342).

3) Ultra-rare SVs는 1162명의 환자군과 936명의 대조군 데이터로 시행되었으며, 기존에 알려진 pathogenic CNV나 드문 CNV를 가진 환자는 제외되었습니다. 총 6809개의 deletion, 1917개의 duplication, 729개의 inversion이 관찰되었습니다. 이 중 ultra-rare SVs는 WGS case/control 코호트에서 한 차례 보고되고 독립된 인구집단에서 보고된 바 없는 변이로 정의하였습니다. 기존 연구결과와 동일하게, ultra-rare deletion은 환자군에서 유의하게 더 많이 관찰되었고 (OR=1.086, P=0.0001, BH-FDR multiple-testing adjusted P=0.0029), ultra-rare duplication과 inversion은 두 집단간 비슷한 결과를 보였습니다. (duplication: OR=1.06, P=0.0920, adjusted P=0.2052; inversion: OR=1.015, P=0.2903, adjusted P=0.4009)

4) Human brain의 epigenomic annotation을 이용한 burden 분석은 유전자 조절에 영향을 미치는 functional elements를 침범하는 ultra-rare SVs의 양이 환자에서 더 많을 것이라는 가정 하에 시행되었습니다. 특히 functional element의 10% 이상을 침범하는 ultra-rare SVs에 중점을 두어 분석한 결과, 환자군에서 topologically associated domains (TADs) 경계에 영향을 주는 ultra-rare SVs가 더 많은 것을 확인할 수 있었습니다. (adult brain: OR=1.613, P=0.0037, adjusted P=0.0283; fetal brain: OR=1.581, P=0.0039, adjusted P=0.0283). TAD 경계 부위의 ultra-rare SVs는 유전자 발현의 비정상적인 조절을 유발할 것으로 추정됩니다. 그 외 다른 functional element 간의 차이는 관찰되지 않았습니다. [Fig 2]

Schizophrenia 환자에서 TAD 경계 부위의 ultra-rare SVs가 더 많이 발견된다는 사실이 아주 놀라운 것은 아닙니다. 이러한 변이들은 질환 발생에 있어 상대적인 위험도에 기여할 것으로 생각되며, 이 영역의 결실과 다른 질환들과의 연관성이 이미 보고된 바 있습니다. TAD 경계부위는 chromatic 구조를 유지하고 만드는데 중요한 역할을 합니다. 이 부위가 훼손될 경우 유전자가 적합하게 발현하기 위한 regulatory elements가 손상되며, 쥐를 이용한 실험에서는 사지 기형이 보고된 바 있습니다. 향후 이러한 변이들이 생물의 기능에 미치는 정확한 효과를 밝히기 위한 추가 실험이 필요할 것으로 생각됩니다.

WGS 데이터에서 noncoding variant를 분석하는 것은 데이터의 방대한 양과 사용할 수 있는 방법이 제한적이기 때문에 어려움이 있습니다. 최근, category-wise association study (CWAS)라는 방법이 autism spectrum disorder 환자의 WGS를 대상으로 시행된 바 있습니다[3]. 이 방법은 수



[Fig 2] Burden of ultra-rare SVs in brain epigenomic annotations and related analysis.

만개의 annotation category를 만든 다음 반복적으로 연관성을 분석하는 방법으로 위양성과 위음성의 가능성 사이에서 분석 방법의 조율이 필요합니다. 이 연구에서는 CWAS 방법을 적용하면서 인간과 포유류 사이에 잘 보존된 DNA 서열을 반영하였고, 인간의 뇌에서 얻어진 다양한 epigenomic annotation 정보를 이용하였으며, 신경정신 질환에 연관성이 알려진 유전자와 영역을 대상으로 분석함으로써 위양성과 위음성을 줄일 수 있었습니다.

결론적으로, WGS는 새로운 유전적 원인을 밝힐 수 있는 방법이지만, schizophrenia의 발생에 기여하는 드문 변이를 밝혀내기 위해서는 기존에 시행된 흔한 변이를 이용한 GWAS의 청사진을 참고해야 합니다. 또한 WGS는 저렴하지 않으며 대량의 데이터를 생산하므로 결과를 저장하거나 분석하는데 어려움이 있습니다. 따라서 이를 해결하기 위해 다양한 방법의 협력이 필수적이라 할 수 있습니다.

[참고문헌]

- [1] Wainschtein, P. et al. Recovery of trait heritability from whole genome sequence data. Preprint at <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/588020v1>
- [2] Matthew Halvorsen, Patrick F. Sullivan, Jin P. Szatkiewicz et al. Increased burden of ultra-rare structural variants localizing to boundaries of topologically associated domains in schizophrenia Nat Commun. 2020;11(1):1842.
- [3] Werling, D. M. et al. An analytical framework for whole-genome sequence association studies and its implications for autism spectrum disorder. Nat Genet. 2018;50:727-736.

최신 보험정보

항 목	제 목	세부인정사항		고 시
누840 조직형검사	누840나(04) HLA Typing DP의 급여기준	<p>누840라. ‘주’항 3종 이상 동시 시행하는 조직형 검사(HLA Typing)는 차세대염기서열분석법으로 시행한 경우로서 다음과 같은 요건을 모두 충족한 경우 요양급여함</p> <p style="text-align: center;">- 다음 -</p> <p>가. 적응증 : 신장, 췌장 및 조혈모세포 이식 대상 환자와 공여자</p> <p>나. 실시기관 : 「차세대 염기서열분석기반 유전자패널검사」의 시설, 인력, 장비에 대한 요건을 충족하는 기관</p>		보건복지부 고시 제 2020-049호 (2020년 3월 1일 시행)
	누840나(04) HLA Typing DP의 급여기준	<p>1. 누840나 조직형검사-[핵산증폭(저해상도)]-HLA Typing(Class II):DP는 장기이식 또는 조혈모세포 이식시 환자 및 공여자에게 시행하는 경우 인정함.</p> <p>2. 다만, 상기 1의 장기이식 환자의 경우에는 환자 혈청내 HLA-DP항체가 확인된 경우에만 인정함.</p>		보건복지부 고시 제 2020-070호 (2020년 4월 1일 시행)
		나. 핵산증폭-저해상도	(04) HLA Typing (Class II) : DP 신설	보건복지부 고시 제 2020-070호 (2020년 4월 1일 시행)
사람유전자 분자유전검사 -나580유전성 유전자 검사	유전성 유전자검사 항목별 유전자 종류	다. 염기서열분석 (3) 20회 초과 40회 이하	(85) CLCN1 Gene 신설	보건복지부 고시 제 2020-070호 (2020년 4월 1일 시행)

항 목	제 목	세부인정사항	고 시	비 고
<p>누658 핵산증폭</p>	<p>코로나바이러스 감염증-19 [실시간역전사중합 효소연쇄반응법] 검사의 급여기준</p>	<p>1. 코로나바이러스감염증-19 [실시간역전사중합효소연쇄반응법] 검사는 식품의약품안전처장이 긴급 사용을 승인한 검사 시약을 사용한 검사에 한해 ‘누-658 라. 핵산증폭-정성그룹4-메르스코로나바이러스[실시간역전사중합효소연쇄반응법] 소정점수를 산정 (단, 신종 감염병 관리의 목적으로 청구코드는 한시적으로 D6584, 검사항목별 세부코드는 (04)로 기재)하며 다음과 같이 요양급여를 인정함</p> <p style="text-align: center;">- 다 음 -</p> <p>가. 질병관리본부 「코로나바이러스감염증-19 대응 지침」*에 따른 확진환자, 의사환자, 조사대상 유증상자 등의 진단 및 추적관찰을 위해 실시하는 경우 인정함</p> <p>* 진단검사 시행 당일 유효한 질병관리본부「코로나바이러스감염증-19 대응 지침(지자체용)」의 사례정의를 기준으로 하며, 「감염병의 예방 및 관리에 관한 법률」제11조에 따라 관할 보건소를 거쳐 질병관리본부에 신고되어야 함</p> <p>나. 요양병원, 정신병원에 신규 입원하는 코로나19 관련 증상이 없는 환자에게 선별목적으로 실시하는 경우 1회 인정하며 「선별급여 지정 및 실시 등에 관한 기준」에 따라 본인부담률 50%로 적용함</p> <p>다. 상기 가. 및 나. 이외에 환자가 원하여 시행하는 경우 등은 전액 본인부담으로 함</p> <p>2. 동 검사를 요양급여로 실시할 수 있는 기관은 질병관리본부 예규 「감염병 체외진단용 의료기기 긴급 사용에 관한 규정」에 따라 지정을 받은 요양기관으로 함</p>	<p>보건복지부 고시 제2020-95호 (2020년 5월 13일 시행)</p>	<p>유효기간: 코로나 바이러스 감염증-19 검사의 급여 기준은 감염 병의 대유행 상황 종료에 따라 별도 안내시까지 한시적으로 적용한다.</p>

대한진단유전학회 2020년도 정기학술대회 연기 및 온라인 전환 안내

*** 세부일정 추후 홈페이지 공지사항에 안내할 예정입니다.**

대한진단유전학회는 오는 2020년도 정기학술대회를 온라인으로 개최하기로 최종 확정했다.

연초부터 유행하기 시작한 코로나19 장기화 사태로 유관학회 학술행사가 줄줄이 취소되는 가운데, 대한진단유전학회는 학술대회 개최 여부를 두고 고심하다 개최 일정을 연기하고, 온라인으로 전환하여 개최하기로 하였다.

이번 정기학술대회에서는 COVID-19 관련 특강을 비롯하여 다양한 주제의 심포지엄을 토양여 진단유전분야의 단계별 전반적인 발표는 물론 세부 연구 분야까지 다룸으로써 해당 분야의 전문가들은 물론 이를 응용하고자 하는 관련 분야 연구자 및 관심 있는 회원 여러분들에게 진단유전분야의 발전과 변화에 관한 이해와 토론의 시간을 제공할 것이다.

자세한 프로그램 및 세부 일정은 학술대회
홈페이지(www.ksgd2020.org)를 통해서 공지할 예정이다.



행사문의 :
사무국 ksgd.office@gmail.com

P 플래티넘 PLATIUM



- **대표제품** KAPA Hyper Exome/Choice/Explorer, cobas CMV, cobas 6800/4800 system
- **회사소개** 스위스 헬스케어그룹인 로슈의 진단사업부 국내법인으로서 1990년 외국인 투자기업으로 창립되었으며 혈액, 체액, 조직 등을 검사하여 질병의 조기발견, 예방, 진단, 치료 및 모니터링을 위한 혁신적인 제품과 서비스를 공급하고 있습니다. 로슈진단은 로슈제약과의 공조를 통해 개인의 유전적, 조직적 특성을 진단해 최적의 치료법을 선택할 수 있도록 환자화 의료진 모두를 위한 맞춤형의료시대를 본격적으로 열어 인류의 삶의 질을 향상시킬 수 있도록 노력하고 있습니다. 또한 에이온휴잇(Aon Hewitt)이 선정한 '한국 최고의 직장(Best Employer in Korea)' 본상을 2015년, 2016년, 2017년 3회 연속 수상했으며, 2019년에는 Great Place To Work Institute주관 '대한민국 일하기 좋은 100대기업 대상'을 수상했습니다.

G 골드 GOLD



- **대표제품** Ion Torrent^TM Ion S5 XL(차세대 염기서열분석기, NGS), CytoScan® Dx (마이크로어레이, CMA)
- **회사소개** 써모피셔 사이언티픽 (ThermoFisher Scientific)은 전 세계 50여 개 국가, 약 70,000명의 직원들과 함께 연 매출 \$200억 이상을 달성하는 세계적인 과학 회사입니다. 써모피셔 사이언티픽은 고객들이 세상을 더욱 건강하고, 깨끗하며, 안전하게 만들 수 있도록 돕는다는 사명을 가지고, 생명과학 분야 연구 촉진, 복잡한 분석 난제 해결, 환자 진단 개선 및 의약품 개발, 실험실 생산성 향상에 주력하고 있습니다.

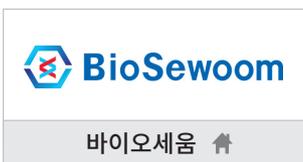
B 브론즈 BRONZE



- **대표제품** 타그리소 / 린파자
- **회사소개** 아스트라제네카는 현재 치료제가 극복하지 못한 난치병 치료의 한계를 뛰어넘고, 환자들의 삶을 변화시키는 의약품을 제공하기 위해 과학적 혁신을 추구하는 글로벌 바이오 제약회사입니다. 세 개의 주요 질환 분야인 암, 심혈관 및 신진대사 질환(CVMD), 그리고 호흡기 뿐만 아니라 자가면역질환, 전염병 및 신경과학질환 등의 치료제의 발굴, 개발, 공급에 집중하고 있습니다. 모든 일의 중심에 과학이 있고, 내리는 모든 결정에 과학을 앞세웁니다. 또한, 지금껏 알려지지 않은 것에 도전하고 한계를 넘기 위한 선택을 하며 매 순간 새로운 문을 엽니다.



- **대표제품** BRCAaccuTest PLUS / HEMEaccuTest / SOLIDaccuTest / NGeneAnalySys
- **회사소개** 엔젠바이오는 `15년 10월에 설립한 유전체분야소프트웨어 연구개발 및 판매를 하는 정밀의료 회사이며, 다년간의 NGS 기술역량과 경험을 기반으로 한 바이오 및 IT 전문 인력들이 암 체외진단 및 동반진단 분야 등에서 효과성과 안전성이 입증된 유전체분야진단시약 제조/개발과 서비스를 제공하고 있습니다.



- **대표제품** -
- **회사소개** (주)바이오세움은 PCR을 기반으로하는 체외진단용 의료기기를 개발 및 생산하며 다양한 품목군으로 구성된 70여개 제품이 있습니다. 당사 제품은 중앙, 감염성, 유전질환, HLA typing 관련 제품과 백혈병, 감염성관련 정량진단 제품을 개발, 제조하는 전문 의료기기 제조회사입니다. 품질, 서비스, 연구 등 모든 부분에서 고객만족의 극대화를 최고의 가치로 삼고 있으며 GMP 프로세스를 준수하고 있습니다.



- **대표제품** DES/CMA/NGS패널/G-NIPT
- **회사소개** GC녹십자지놈은 GC녹십자의 유전체분석 부문 자회사로서 산전 유전체 및 유전자 검사와 암유전체 분석, 개인별 약물반응 예측 등 유전체 분석을 통한 질병 진단 서비스 사업을 진행하고 있습니다. GC녹십자지놈은 향후 유전체 분석정보를 활용한 맞춤 치료를 실현하여 건강산업의 패러다임을 바꿔나가고, 유전체 분석 시장의 리더로 성장해 나갈 것입니다.

Roche Cell-Free DNA Collection Tube

정상 세포와 암세포 모두 세포가 괴사(*necrosis*)되거나 사멸(*apoptosis*)되는 중에 DNA 조각들을 혈액으로 방출시킵니다.¹

*Cell-Free DNA Collection Tube*는 *whole blood* 샘플을 채취하고 안정화하여 운반하는 것뿐 아니라, *cell-free DNA*의 분석을 위하여 유핵 세포들을 보존하는 *direct-draw tube*입니다.²

장점:

샘플의 안정성

- 세포용해를 방지하는 독점적 솔루션으로 효과적인 cfDNA의 검출이 가능합니다.
- K3EDTA는 혈액응고를 방지합니다.²

안전성 & 내구성

- EN ISO 13485³에 따라 제조되었습니다.
- 안전하고 내구성이 높은 폴리에틸렌 테레프탈레이트(polyethylene terephthalate: PET)로 만들어졌으며, 이는 이동과 샘플 원심분리 도중 비용과 샘플의 손실을 초래하는 유리 파손 사고를 최소화합니다.

* 로슈의 서비스와 유통망을 통해 지원 받으실 수 있습니다.



Roche Cell-Free DNA Collection Tube

Specifications	
Manufacturing	In accordance with ISO 9001 and EN ISO13485
Tube Volume	8.5 ml nominal liquid capacity
Tube Type	Plastic (PET)
Shelf Life	18 months
Storage Temperature	18° C - 25° C
Storage Temperature (채혈 후)	18° C - 25° C, 7일간 보관가능



제품에 등록된 사용설명서를 참고 하시기 바랍니다.

Product	Pack Size	Catalog Number
Roche Cell-Free DNA Collection Tube (수신 16-577호)	1 box of 50 tubes	07785666001
	24 boxes of 50 tubes (1200 tubes total)	07832389001

Roche Cell-Free DNA Collection Tube에 대해 더 많은 정보를 원하신다면 로슈 담당자에게 연락해주시길 부탁드립니다.

제품 상담 및 문의:
korea.lifescience@roche.com

Published by

 한국로슈진단 (주)
 서울특별시 강남구 테헤란로 108길 22
 서경빌딩 4층 우) 06174
 Roche Diagnostics Korea Co., Ltd

www.roche-sequencing.com

© 2016 Roche
 All rights reserved.

References

1. Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA_FEBRUARY 20 2014_J Clin Oncol 32:579-586.
2. IFU_cfDNA_IVD_EN_1014979EN Rev B
3. EN ISO 13485 Certificate
 Registration No.: SX 60117427 0001



대한진단유전학회

Korean Society for Genetic Diagnostics