



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학박사 학위논문

치료 표적이 되는 유전자 재배열을 가지고 있는  
갑상선암의 임상병리학적 특성

The clinical and pathological characteristics of thyroid cancer  
with targeted gene fusions

울산대학교 대학원

의 학 과

김 미 화

치료 표적이 되는 유전자 재배열을 가지고 있는  
갑상선암의 임상병리학적 특성

지도교수 김 원 구

이 논문을 의학박사 학위 논문으로 제출함

2023 년 5 월

울산대학교 대학원

의 학 과

김 미 화

김미화의 의학박사학위 논문을 인준함

심사위원	김원배	(인)
심사위원	김원구	(인)
심사위원	송동은	(인)
심사위원	전민지	(인)
심사위원	송의연	(인)

울 산 대 학 교 대 학 원

2023년 5월

## 감사의 글

전공의 2년 차 9월, 내분비학을 전공하고자 선생님들께 처음 인사를 드렸던 때가 어제 같은데 어느덧 박사학위 논문을 제출하게 되었습니다. 그동안 많은 가르침과 도움을 주신 분들께 감사드립니다.

우선, 부족한 저에게 늘 좋은 기회를 주시고 이끌어 주신 김원구 선생님께 가장 진심 어린 깊은 감사를 드립니다. 그리고 늘 바쁜 와중에도 세심한 가르침을 주시고 아낌없는 조언을 해 주신 전민지 선생님께 깊은 감사를 드립니다.

다음으로, 인생에 대한 많은 가르침을 주신 송영기 선생님, 늘 따뜻한 지도 및 전적인 지원을 해 주신 김원배 선생님, 학문에 대해 늘 새로운 접근법을 제시해 주신 김태용 선생님께 감사드립니다. 임상연구를 하는 동안, 늘 다방면으로 도와주시고 바쁜 와중에도 논문 심사를 위해 조언과 격려를 해 주신 송동은선생님과 송의연 선생님께 감사드립니다.

많은 시간을 저와 함께하면서 덕분에 즐거운 임상강사 생활을 할 수 있게 해준 안종화 선생님, 장아름 선생님 그리고 김채아 선생님 감사합니다. 그동안, 내분비내과 의사로서 성장할 수 있도록 많은 가르침을 주신 이기업, 박중열, 김민선, 고정민, 이우제, 고은희, 이승훈, 김범준, 정창희, 민세희, 조윤경, 오혜선 선생님께도 깊은 감사의 말씀을 올립니다.

마지막으로 저를 잘 키워주고 지지해준 부모님과, 가장 소중하고 사랑하는 남편에게 감사의 마음을 전합니다.

2023년 5월

김 미 화

## 국문요약

**서론:** 유전자 재배열은 암의 병인에 중요한 역할을 하며 진단 및 예후 예측 표지자로 사용되고 있다. 갑상선암에서 *BRAF* 유전자 돌연변이가 가장 흔히 발견되지만, 유전자 재배열도 6-80%로 다양한 빈도로 보고되고 있다. 최근 특정 유전자 재배열에 대한 표적 치료제들이 개발이 되면서 임상적으로 그 역할의 중요성이 강조되고 있다. 치료표적이 되는 유전자 재배열을 갖고 있는 환자들을 비용효과적으로 선별하기 위해서는 해당 환자들의 임상병리학적 특성에 대한 깊은 이해가 필요하다. 이 연구에서 우리는 *BRAF* 유전자 돌연변이가 없는 분화갑상선암 환자들을 대상으로 유전자 재배열의 빈도를 확인하고, 이 환자들의 임상병리학적 특성을 확인하고자 한다. 또한 병리학적 소견을 통해 유전자 재배열이 의심되어 검사를 진행한 환자와 무작위로 포함되어 검사된 환자의 유전자 재배열 빈도 차이를 조사하여 병리소견을 통한 선별의 효용성에 대해 확인하고자 한다.

**재료 및 방법:** *BRAF* 유전자 돌연변이가 없는 분화갑상선암 환자들 중에서 내분비 전문 병리학자가 유전자 재배열이 의심되는 갑상선암 환자 44 명을 선별하여 전향적으로 유전자 재배열 검사와 Pan-TRK 면역조직화학염색을 시행하였다. 병리 슬라이드 소견을 바탕으로 다결절성 침윤, 광범위한 기질의 섬유화, 혼합된 다양한 성장양상과 다양한 정도의 핵의 이형성, 종양세포의 투명한 세포질 변화, 그리고 빈번한 림프절 전이를 보이는 경우가 해당되었다. 또한 45 명의 *BRAF* 유전자 돌연변이가 없는 분화갑상선암 환자들도 무작위로 포함되어 총 89 명의 환자가 이 연구에 참여하였다. 모든 환자들의 수술병리조직에서 mRNA 를 추출한후, Archer 사의 Fusionplex panel 을 이용하여 유전자 재배열을 분석하였고 각 유전자 재배열 빈도를 국내 외 발표된 연구들의 결과와 비교를 하였다. 다음으로 유전자 재배열이 있는 환자들의 임상병리학적 특성을 확인하고, *TERT* 프로모터 돌연변이와 유전자 재배열과의 연관성, pan-TRK 면역조직화학 염색의 *NTRK* 유전자 재배열 예측도에 대해서도 분석하였다.

**결과:** 연구에 포함된 89 명의 환자들의 나이의 중앙값은 46.9 세였고 28 명 (31.5%)가 남성이었다. 갑상선 유두암 (papillary thyroid carcinoma, PTC) 환자가 83 명 그리고 갑상선 여포암 (follicular thyroid carcinoma, FTC) 환자가 6 명이었다. *BRAF* 유전자 돌연변이가 없는 89 명의 분화갑상선암 환자들 중 55 명 (61.8%)의 환자들에서 유전자 재배열이 있는 것으로 확인되었고 그 중 *TERT* 프로모터 변이가 동반되어 있는 경우는 한 명도 없었다. 치료 표적이 되는 유전자 재배열 중에서 *NTRK* 유전자 재배열 (*NTRK3* 19.1%, *NTRK1*

6.7%)이 25.8%로 가장 많았고 다음으로 *RET* (17.9%), 그리고 *ALK* (7.9%) 유전자 재배열 순서로 많았다. 이는 다른 연구 들에서 보고한 빈도보다 높았으나, 무작위로 포함시킨 환자만 대상으로 분석했을 때에는 전체 유전자 재배열 40%, *RET* 15.6%, *NTRK3* 6.7%, *NTRK1* 4.4%, *ALK* 4.4%로 다른 연구들과 비슷하거나 조금 높은 빈도를 보였다. 내분비 병리학자가 조직학적 소견을 보고 선별한 44 명의 환자 중 유전자 재배열은 37 명 (84.1%) 에서 보여 무작위 선별된 환자들의 40.0%보다 유의미하게 높았으며 ( $p < 0.001$ ), 특히 *NTRK3* 의 경우 조직학적 소견을 보고 선별한 환자 군에서는 34.1%에서 발견되어 무작위 선별된 환자들의 빈도 (6.7%)보다 유의미하게 높았다 ( $p = 0.003$ ). 유전자재배열은 전형적 갑상선 유두암 (classic PTC)에서 82.3%로 가장 많았고 다음으로 여포변이 유두암 (follicular variant-PTC) 환자에서 21.1%로 확인되었다. 유전자 재배열이 있는 55 명의 환자들의 나이는 중앙값 41.6 세 (사분위수 34.3–51.6)로 유전자 재배열이 없는 환자들에 비교하여 유의미하게 젊었다 ( $p < 0.001$ ). 유전자 재배열이 있는 환자들의 원발 종양의 크기는 중앙 값 1.6 cm (사분위수 0.9–2.2)로 재배열이 없는 경우인 3.0 cm 에 비교하여 유의미하게 작았다 ( $p < 0.001$ ). 하지만 육안적 및 현미경적 갑상선 외 침윤은 유전자 재배열이 있는 환자 중에서 40 명 (72.7%)에서 확인되어 유전자 재배열이 없는 경우 (38.2%)에 비교하여 유의미하게 많았다 ( $p = 0.002$ ). 유전자 재배열이 있는 갑상선암은 경부 림프절 전이도 38 명 (69.1%)에서 보여 유의미하게 더 많았고 ( $p = 0.003$ ), 림프침범 (lymphatic invasion)도 49 명 (89.1%)에서 나타나서 유전자 재배열이 없는 환자들에 비해 유의미하게 많았다 ( $p < 0.001$ ). 44 명의 pan-TRK 면역조직화학염색을 시행한 환자 44 명 중, 12 명은 양성, 32 명은 음성으로 확인되었다. 이 검사의 *NTRK* 유전자 재배열 예측에 대한 민감도는 58%, 특이도는 96%, 그리고 각각 92%와 75%의 양성 예측도와 음성 예측도를 보였다.

**결론:** *BRAF* 유전자 돌연변이가 없는 분화갑상선암 환자에서는 비교적 많은 61.8%에서 유전자 재배열이 확인되었다. 병리 슬라이드 소견에서 다결절성 침윤, 광범위한 기질의 섬유화, 혼합된 다양한 성장양상과 다양한 정도의 핵의 이형성, 종양세포의 투명한 세포질 변화 등을 확인하고 유전자 재배열이 의심되어 선별한 환자 들의 유전자 재배열은 무작위 선별된 환자보다 유의미하게 높았으며 특히 *NTRK3* 유전자 재배열을 효율적으로 선별할 수 있었다. 유전자 재배열이 있는 분화 갑상선암 환자들은 재배열이 없는 환자들에 비해, 유의미하게 나이가 어렸으며, 원발 종양의 크기는 작았으나 갑상선 외 침윤과 림프절 전이는 오히려 더 많았다. *TERT* 프로모터 변이가 있는 경우에는 유전

자 재배열을 동반한 환자는 발견되지 않았다. Pan-TRK 면역조직화학염색은 민감도는 비교적 낮고, 특이도는 높은 검사였다. 이번 연구를 통해 *BRAF* 유전자 돌연변이가 없는 분화갑상선암에서의 유전자 재배열의 빈도와 유전자 재배열의 있는 환자들의 임상병리학적 특성을 확인하였다. 이를 바탕으로 앞으로 비용 효과적인 선별 검사와 진단 프로토콜을 개발하는 것은 갑상선암 환자들 특히 방사성요오드 불응성 전이 갑상선암 환자들의 개별화된 표적치료 결정에 도움이 될 것이다.

**중심단어:** 갑상선암, 유전자 재배열, 치료 표적, 임상병리학적 특성



## 차 례

감사의 글 .....	i
국문요약 .....	ii
차례 .....	v
표 목차 .....	vii
그림 목차 .....	viii
서론 .....	1
연구대상 및 방법 .....	5
1. 연구대상 .....	5
2. 연구방법 .....	
2-1. <i>BRAF</i> 유전자 돌연변이 검사와 환자 선별과정 .....	7
2-2. 유전자 재배열에 대한 차세대 염기서열 분석 .....	7
2-3. pan-TRK 면역조직화학염색 .....	19
3. 통계적 분석 .....	20
연구결과 .....	21
1. <i>BRAF</i> 유전변이가 없는 갑상선암 환자들의 임상 병리학적 특성 .....	21
2. <i>BRAF</i> 유전변이가 없는 갑상선암 환자들의 유전자 재배열 .....	23
2-1. 연구에 포함된 분화갑상선암 환자들의 유전자 재배열 빈도 .....	23
2-2. 국내 외 보고된 <i>BRAF</i> 유전자 돌연변이가 없는 분화갑상선암 유전자 재배열과의 비교 .....	36
3. 유전자 재배열 여부에 따른 임상 병리학적 특성 차이 .....	38
3-1. 나이에 따른 유전자 재배열 차이 .....	40
3-2. 원발 종양의 조직형에 따른 유전자 재배열 차이 .....	41
3-3. 원발 종양의 크기에 따른 유전자 재배열 차이 .....	42
3-4. 갑상선 외 침윤에 따른 유전자 재배열 차이 .....	43
3-5. 림프절 전이에 따른 유전자 재배열 차이 .....	44
4. <i>TERT</i> 프로모터 돌연변이와 유전자 재배열의 연관성 .....	45
5. Pan-TRK 면역조직화학염색과 <i>NTRK</i> 유전자 재배열 연관성 .....	46
고찰 .....	47
결론 .....	53

참고문헌.....	54
영문요약.....	58

## 표 목차

<b>Table 1.</b> List of gene fusions in FusionPlex panel .....	7
<b>Table 2.</b> Details of targeted 137 genes in FusionPlex panel .....	8
<b>Table 3.</b> Baseline clinicopathological characteristics of patients with thyroid cancer with wild type <i>BRAF</i> .....	21
<b>Table 4.</b> Gene fusions identified in patients with thyroid cancer with wild type <i>BRAF</i> .....	23
<b>Table 5.</b> Details of gene fusions identified in each patient with thyroid cancer with wild type <i>BRAF</i> .....	25
<b>Table 6.</b> Comparison of gene fusions in differentiated thyroid carcinoma with wild type <i>BRAF</i> from TCGA and SNU data .....	36
<b>Table 7.</b> Comparison of clinicopathological factors of patients with differentiated thyroid carcinoma according to the presence of gene fusions .....	38
<b>Table 8.</b> The result of pan-TRK immunohistochemistry stain and <i>NTRK</i> fusion.....	45

## 그림 목차

<b>Figure 1.</b> Study design and patient enrollment .....	5
<b>Figure 2.</b> BRAF and Pan-TRK immunohistochemistry stain. (A). Extensive fibrosis (B). Clear cytoplasm and nuclear dysplasia. (C). V600E BRAF IHC. (D). Pan-TRK IHC .....	18
<b>Figure 3.</b> Gene fusions identified in 89 patients with thyroid cancer. (A). Numbers of gene fusions in each patient, (B) <i>TERT</i> promoter, (C) gene fusions, (D) Clinicopathological characteristics of each patient .....	24
<b>Figure 4.</b> Comparison of gene fusions according to age of the patients .....	39
<b>Figure 5.</b> Comparison of gene fusions according to histopathological subtype .....	40
<b>Figure 6.</b> Comparison of gene fusions according to primary tumor size (cm) .....	41
<b>Figure 7.</b> Comparison of gene fusions according to extrathyroidal extension .....	42
<b>Figure 8.</b> Comparison of gene fusions according to cervical lymph node metastasis .....	43
<b>Figure 9.</b> Comparison of gene fusions according to presence of <i>TERT</i> promoter mutation .....	44

## 서론

최근 차세대 염기서열 분석 (Next-Generation Sequencing, NGS) 기술이 빠르게 발전하면서 갑상선암의 발암과정 및 갑상선암 세포 내 분자 표적과 신호전달경로에 대한 이해가 높아졌다 (1). 2014 년 발표된 The Cancer Genome Atlas (TCGA) 프로젝트에는 갑상선 암의 게놈 지형 (genetic landscape)에 대해 포괄적인 분석을 하였고 분화 갑상선암 (differentiated thyroid carcinoma, DTC)의 상대적으로 낮은 종양변이부담 (tumor mutational burden)을 보여주었다 (1). 분화갑상선암은 높은 발병률에 비교하여, 대부분 진행이 느리고 사망률 또한 낮은데, 갑상선암 고유의 유전적 특성이 그 원인일 수 있다 (2-4). 분화갑상선암을 분자병인적 측면에서 분류하면 대부분 *B-Raf proto-oncogene (BRAF)*, *RAS*, 그리고 유전자 재배열 (gene fusion)과 같은 암유발변이에 의해 발생한 것으로 나눌 수 있다(1, 4-6). 이러한 암유발 유전자 변이는 세포의 증식과 분화, 접착, 이동 및 사멸을 조절하는 세포신호경로를 활성화시키게 되어 암발생에 중요한 역할을 하게 된다(7). 또한 telomerase reverse transcriptase (*TERT*) 프로모터 변이, 종양억제유전자, phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) 경로 유전자 등 추가로 변이가 발생하면서 진행성 분화갑상선암, 저분화 갑상선암 (poor differentiated thyroid carcinoma, PDTC)과 미분화 갑상선암 (anaplastic thyroid carcinoma, ATC)이 발생할 수 있다 (8-11). 이런 갑상선암의 유전적 특성에 대한 이해가 높아지면서 최근 갑상선암의 진단, 예후 예측 및 환자 개인별 맞춤 치료에도 큰 변화가 발생하고 있다 (12).

유전자 재배열은 갑상선암을 포함한 다양한 암에서 driver 또는 passenger 변이로 알려져 있고 암의 진단 및 예후 예측의 표지자로 사용되고 있다 (13-15). 예를 들어, 발암성 수용체 타이로신 인산화효소 (oncogenic receptor tyrosine kinase) 재배열은 리간드 비의존적으로 mitogen activated protein kinase (MAPK)와 PI3K/AKT 신호전달체계를 활성화시켜 종양 발생의 원인이 된다고 알려져 있으며 갑상선암에서 흔히 발견되는 rearranged during transfection (*RET*), neurotrophic tyrosine receptor tyrosine kinase (*NTRK*)와 anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) 등 유전자 재배열이 이 경우에 해당된다 (15-17). 이외에도 갑상선암에서는 *BRAF*, Paired Box 8 (*PAX8*) 등 다양한 유전자 재배열이 보고되었고 각 유전자 재배열 유형의 빈도는 갑상선암 조직형에 따라 다양하나 적게는 단일 사례부터 많게는 80%까지 보고되고 있다 (15, 18-20). TCGA 연구에서는 484 명의 갑상선 유두암 환자들의 유전자 재배열을 분석하였고 그중 74 명 (15.3%)에서 유전자 재배열이 확인되었다 (1). 국내 분화갑상선암 환자들을 대상으로 한 연구에서는 155 명

환자 중 23 명 (14.8%)에서 유전자 재배열이 확인되었다 (21). 또한 유럽의 한 연구에 따르면, 132 명의 방사성요오드 불응성 진행성 갑상선암 환자들을 대상으로 유전자 재배열을 분석하였을 때 7 명 (5.3%)에서 유전자 재배열이 있는 것으로 확인되었다 (22). 이러한 연구 들에서는 유전자 재배열이 확인된 모든 환자들은 갑상선암에서 가장 흔히 발견되었던 *BRAF* 점 돌연변이를 동반하지 않았다 (1, 21, 22). 기타 다른 연구에서도 *RET* 유전자 재배열이 *BRAF* 유전자 돌연변이와는 상호 배타적 (mutually exclusive)으로 발생함을 보고한 바 있다 (23, 24). 따라서, *BRAF* 유전자 돌연변이가 없는 갑상선암에서는 유전자 재배열의 빈도가 조금 더 흔히 발견될 것이라고 예측할 수 있다.

최근에는 특정 유전자 재배열에 대한 표적치료제가 개발되고 Food and Drug Administration (FDA)에서 승인되면서 갑상선암 환자 들에서도 환자 개인별 맞춤 의료 혹은 정밀의료의 임상적인 중요성이 대두되고 있다. *NTRK* 억제제인 larotrectinib, entrectinib 은 *NTRK* 유전자 재배열이 있는 갑상선암을 포함한 여러 고형암에서 성인과 소아 환자 모두에서 좋은 결과를 보여주었다 (25-28). 특히, larotrectinib 은 *NTRK* 유전자 재배열이 있는 갑상선암 환자에서 사용하였을 때 7%에서 완전관해 (complete response)를 보였고 대부분의 경미한 부작용만 보여 높은 효율성과 안전성을 보여주었다(27). 선택적 *RET* 억제제인 selpercatinib 은 이전에 sorafenib 혹은 lenvatinib 치료 이후 진행된 *RET* 유전자 재배열을 동반한 전이성 갑상선 유두암 환자에서 79%의 객관적 반응률 (objective response rate)을 보여주었고 대부분의 조절 가능한 부작용만 발생하였다 (29). Pralsetinib 의 경우 V804L/M 변이가 있는 갑상선 수질암을 표적으로 하는 다른 선택적 *RET* 억제제로, *RET* 유전자 재배열을 동반한 진행성 또는 전이성 갑상선유두암 환자를 대상으로 한 임상연구에서 89%의 객관적 반응률을 발표하였다 (30). 현재까지 임상연구들은 두 약제 모두 *RET* 유전자 돌연변이가 있는 갑상선 수질암 환자와 유전자 재배열이 있는 갑상선 유두암 환자에서의 환자 개인별 맞춤의료의 좋은 선택임을 제시하였다 (29, 30). 폐암에서 처음으로 승인되었던 *ALK* 억제제인 crizotinib 도 *ALK* 유전자 재배열이 있는 갑상선암에서도 효과적인 표적 치료제가 될 수 있으며 (31-33), 특히 최근의 한 연구에서는 sodium iodide symporter (NIS) 재분화에도 도움이 될 수 있음을 보고하였다 (34). 따라서 2023 년 개정된 미국 National Comprehensive Cancer Network (NCCN) 임상진료지침에서는 진행성 혹은 전이 갑상선암에 대해 *ALK*, *NTRK*, *BRAF* 그리고 *RET* 등 치료 표적이 되는 유전자 재배열을 적극적으로 검사하고 치료선택에 고려하도록 권고하고 있다 (12).

이처럼 유전자 재배열의 중요성은 강조되고 있지만, 상대적으로 다양하고 낮은 빈도로 발견되고 있고 검사의 비용적인 측면을 고려하였을 때 모든 갑상선암 환자 들을 대상으로 검사를 진행할 수 없다. 환자 개인별 맞춤 의료를 실행함에 가장 중요한 것은 각 유전자 변이를 정확히 진단하는 것인데 효과적인 진단 방법은 각 유전자 변이마다 다양하다. 유전자 변이 진단함에 있어서는 다양한 방법이 있는데 fluorescence in situ hybridization (FISH), reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), 면역화학 조직염색 (immunohistochemistry, IHC), 그리고 NGS 등이 포함된다. 대부분의 검사들은 특정 유전자에 한정되어 검사를 할 수 있고 다양한 유전자 변이와 재배열을 동시에 진단하기에는 한계가 있다. 특히, 유전자 재배열 진단에 있어서 IHC의 효용성은 각 유전자마다 상이하다 (35, 36). European Society for Medical Oncology(ESMO)에서는 *NTRK*의 경우 pan-TRK IHC를 RNA-NGS에 선행해서 시행하거나 동시에 시행하는 것을 권고하기도 하나, *RET*의 경우 IHC가 선행 검사로서 권장되지 않고 있다(35, 36). 유전자 재배열이 동반된 갑상선암의 병리학적 소견에 대해서는 보고된 연구가 적고 주로 *NTRK* 유전자 재배열이 있는 갑상선암에 대한 연구였고 일부 *ALK*와 *ROS1* 그리고 *MET* 유전자 재배열이 포함된 연구도 있었다(37-44). 유전자 재배열이 있는 갑상선암의 경우 흔히 다결절성 침윤, 광범위한 기질의 섬유화, 혼합된 다양한 성장양상과 투명한 세포질, 그리고 빈번한 림프절 전이가 있었다(37-44). 수술 이후 갑상선암 조직에서 해당 소견을 보이는 환자들을 대상으로 유전자 검사를 하였을 경우, 유전자 재배열 선별검사의 효용성을 높일 수 있는지에 대해서는 연구된 적이 없다. 따라서 비용효과적으로 유전자 재배열이 있는 갑상선암 환자를 선별하는 프로토콜이 필요하고 이를 위해서는 해당 환자들의 임상병리학적 특성에 대한 체계적인 이해가 필요하다. 하지만 아직까지는 이에 대한 연구가 충분하지는 않고 특히 다른 유전자 변이와의 연관성 및 유전자 검사 전 IHC를 통한 선별검사의 효용성에 대해서는 알려진 것이 매우 적다.

최근에는 갑상선암으로 수술을 받은 대부분의 환자들의 수술 검체에서 *BRAF* 점 돌연변이와 *TERT* 프로모터 유전자 변이 검사를 진행하고 있기 때문에 이를 활용하여 유전자 재배열을 확인하기 위한 검사가 필요한 환자를 선별하기 용이해졌다. 이 연구에서 우리는 *BRAF* 유전자 돌연변이가 없는 분화갑상선암 환자 들을 대상으로 유전자 재배열의 빈도를 확인하고, 이 환자들의 임상병리학적 특성을 확인하고자 한다. 또한 병리학적 소견을 통해 유전자 재배열이 의심되어 검사를 진행한 환자와 무작위로 포함되어 검사된 환자의 유전자 재배열 빈도 차이를 조사하여 병리소견을 통한 선별의

효용성에 대해 확인하고자 한다. 마지막으로, *TERT* 프로모터 돌연변이와 유전자 재배열과의 연관성에 대해서도 조사하였고, pan-TRK IHC 를 시행한 일부 환자들을 대상으로 *NTRK* 유전자 재배열 예측도에 대해서도 함께 알아보하고자 한다.

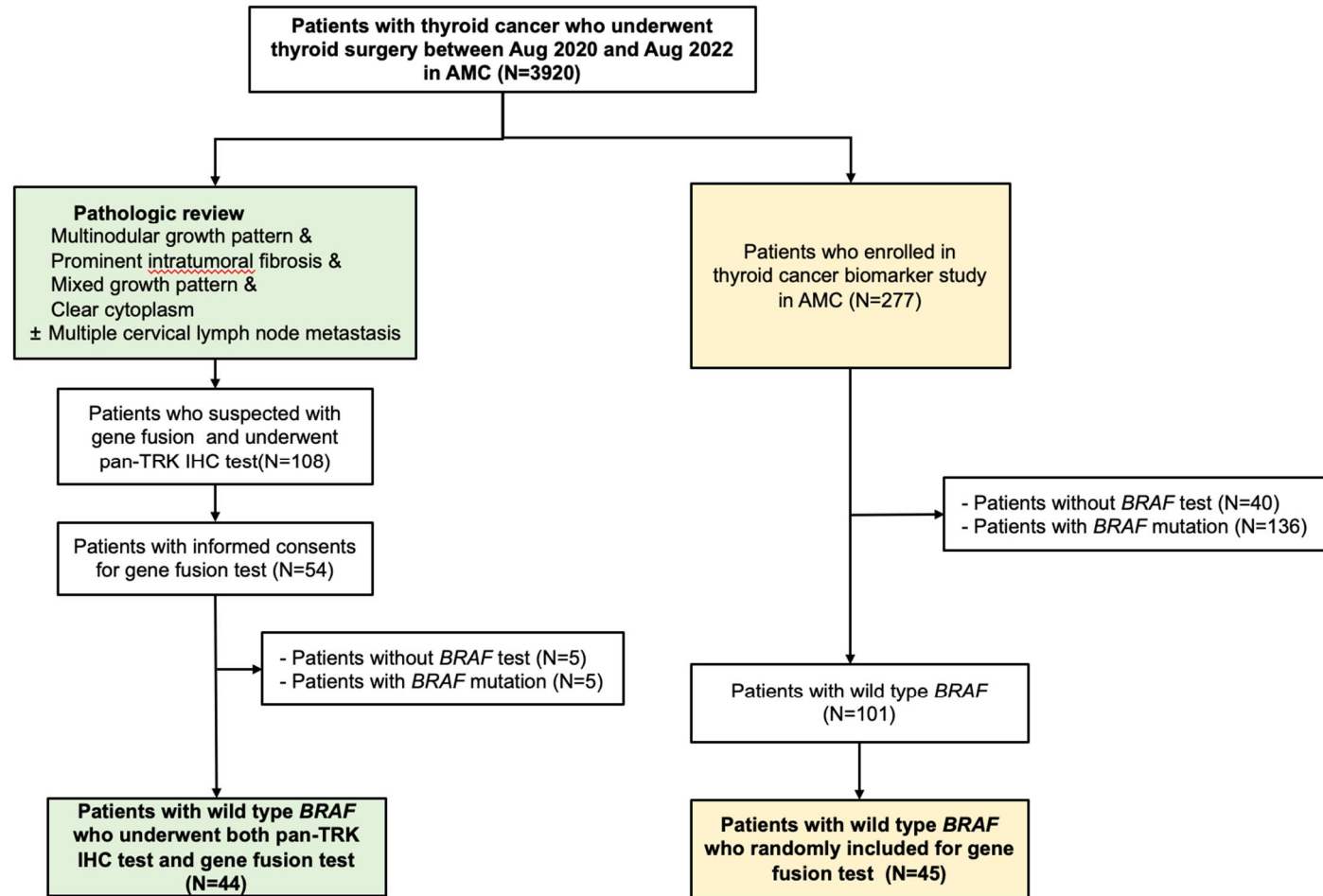


## 연구 대상 및 방법

### 1. 연구 대상

본 연구는 2020년 8월부터 2022년 8월까지 서울아산병원에서는 갑상선암으로 수술을 받은 환자들 중에서 *BRAF* 유전자 돌연변이가 없는 환자들을 대상으로 하였다 (그림 1). 경험이 많은 내분비 전문 병리학자가 갑상선암 수술을 시행한 환자들의 Hematoxylin and Eosin (H&E) stain 슬라이드 조직학적 소견을 리뷰하고 유전자 재배열이 의심되는 108 명의 환자들을 선별하여 Pan-TRK IHC를 실시하였다. 유전자 재배열이 의심되는 병리학적 소견으로는, 그동안 출간된 문헌고찰을 통해 다결절성 침윤, 광범위한 기질의 섬유화, 혼합된 다양한 성장양상과 다양한 정도의 핵의 이형성, 그리고 종양세포의 투명한 세포질 변화가 모두 보이는 경우를 포함하였고 빈번한 림프관 전이를 보이는 경우도 일부 포함되었다 (37-44). 이 중에서 54 명의 환자들 유전자 검사 진행에 동의하였고 그 중에서 *BRAF* 유전자 검사를 진행하지 않은 5 명과 *BRAF* 돌연변이가 없는 5 명을 제외하였다. 따라서 44 명의 *BRAF* 돌연변이가 없는 갑상선암 환자들 병리소견을 보고 선별된 후 전향적으로 Pan-TRK IHC와 유전자 재배열검사를 진행하였다. 추가로, 동일 기간에 수술한 갑상선암 환자들 중 277 명의 환자들 갑상선암 biomarker 연구에 포함되었다. 그 중에서 *BRAF* 유전자 검사를 진행하지 않은 40 명과 *BRAF* 돌연변이가 없는 136 명을 제외하였다. 내분비내과 의사가 101 명 중 45 명을 무작위로 선별하여 유전자 재배열 검사를 진행하였다. 따라서 최종적으로 89 명의 환자들의 Formalin Fixed Paraffin Embedded (FFPE) 검체가 수집되고 유전자 재배열 검사를 진행하였다. 연구에 포함된 모든 환자로부터 사전 동의를 얻었고 서울아산병원 기관심사위원회는 모든 자료수집과 후속 분석을 승인하였다.

**Figure 1.** Study design and patients in this study



Abbreviations: AMC, Asan Medical Center; IHC, immunohistochemistry

## 2. 연구 방법

### 2-1. *BRAF* 유전자 돌연변이 검사와 환자 선별과정

수술을 받은 모든 환자들의 FFPE 조직에서 DNA 분리 후에 real-time PCR 방법으로 *BRAF* 유전자 돌연변이를 확인하였다. PNAclamp *BRAF* Mutation Detection Kit (Panagene Inc., Daejeon, Korea) 를 이용하여 *BRAF* 유전자의 codon 600 에서 V600E, V600D, V600R & V600A 등 다양한 돌연변이를 검출하였다. 대립유전자 특이적(allele-specific) 프라이머를 사용하는 real-time PCR 기반 분석으로 V600E 돌연변이를 0.01% 돌연변이 대립유전자 빈도까지 검출 가능하다 (45). 또한, 연구에 포함된 환자들 중 대부분에서 *TERT* 프로모터 돌연변이 검사를 진행하였다. Sanger sequencing 을 사용하여 *TERT* 프로모터를 포함하는 chr5:1295160-1295345 를 분석하였고 이는 C228T (chr5:1295228)과 C250T (Chr5:1295250)을 포함하며 20% 종양 세포의 검출 한계로 돌연변이 대립유전자를 검출할 수 있다(46, 47).

### 2-2. 유전자 재배열에 대한 차세대 염기서열 분석

환자들의 FFPE 조직에서 Maxwell RNA prep kit 을 이용하여 RNA 를 추출하였다. 추출한 RNA 는 Quant-iT BR assay kit 을 이용하여 시료를 희석하여 농도를 측정하고 NanoDrop 장비를 이용하여 OD 를 측정한 다음 200ng FFPE RNA input 으로 library preparation 을 진행하였다. 1<sup>st</sup> cDNA 합성 이후 PreSeq RNA QC assay 를 진행하여 Cq<28.3 을 통과 기준으로 하였다. Panel 은 FusionPlex Lung v2, FusionPlex AMC solid tumor v2, 그리고 FusionPlex Pan Solid v2, 총 3 가지 종류를 사용하였고 각각 17 개 유전자, 108 개 유전자 그리고 137 개의 유전자를 선별한다 (표 1, 표 2). 각 유전자의 exon 과 assay type 은 표 2 에 자세히 기술되어 있다. 89 명의 환자 중 47 명은 FusionPlex lung v2 패널, 12 명은 FusionPlex AMC solid tumor v2, 그리고 30 명의 환자들은 FusionPlex Pan Solid v2 Panel 로 검사를 진행하였다. Archer 사의 FusionPlex Protocol #LA 135.1 에 따라 Novaseq sequencer 를 사용하였으며, 마지막으로 유전자 재배열 분석은 Archer Anlysis V6.2.7 를 이용하였다.

**Table 1. List of gene fusions in FusionPlex panel**

FusionPlex Pan Solid Tumor v2 137 Genes, 3.5M								
FusionPlex AMC 108 Genes, 3.5M								
FusionPlex Lung v2 17 Genes, 1M								
<i>ALK</i>	<i>AKT1</i>	<i>EPC1</i>	<i>GRB7</i>	<i>MUSK</i>	<i>PLAG1</i>	<i>THADA</i>	<i>ACVR2A</i>	<i>PAX8</i>
<i>BRAF</i>	<i>AKT3</i>	<i>ERBB4</i>	<i>HMGA2</i>	<i>MYB</i>	<i>PPARG</i>	<i>TMPRSS2</i>	<i>AKT2</i>	<i>PDGFD</i>
<i>EGFR</i>	<i>AR</i>	<i>ERG</i>	<i>HRAS</i>	<i>MYBL1</i>	<i>PRKACA</i>	<i>USP6</i>	<i>ARHGAP6</i>	<i>PHKB</i>
<i>ERBB2</i>	<i>ARHGAP26</i>	<i>ESR1</i>	<i>IDH1</i>	<i>MYOD1</i>	<i>PRKCA</i>	<i>VGLL2</i>	<i>CRTC1</i>	<i>PRDM10</i>
<i>FGFR1</i>	<i>AXL</i>	<i>ESRRA</i>	<i>IDH2</i>	<i>NCOA1</i>	<i>PRKCB</i>	<i>YAPI</i>	<i>EGF</i>	<i>PRKACB</i>
<i>FGFR2</i>	<i>BCOR</i>	<i>ETV1</i>	<i>INSR</i>	<i>NCOA2</i>	<i>RAF1</i>	<i>YWHAE</i>	<i>FGF1</i>	<i>PRKCD</i>
<i>FGFR3</i>	<i>BRD3</i>	<i>ETV4</i>	<i>JAK2</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>RELA</i>		<i>FOXR2</i>	<i>PRKD1</i>
<i>KRAS</i>	<i>BRD4</i>	<i>ETV5</i>	<i>JAK3</i>	<i>NOTCH2</i>	<i>RSPO2</i>		<i>IGF1R</i>	<i>PRKD2</i>
<i>MET</i>	<i>CAMTA1</i>	<i>ETV6</i>	<i>JAZF1</i>	<i>NR4A3</i>	<i>RSPO3</i>		<i>KIT</i>	<i>PRKD3</i>
<i>NRG1</i>	<i>CCNB3</i>	<i>EWSR1</i>	<i>MAML2</i>	<i>NRAS</i>	<i>SS18</i>		<i>MYC</i>	<i>RAD51B</i>
<i>NTRK1</i>	<i>CCND1</i>	<i>FGR</i>	<i>MAP2K1</i>	<i>NUMBL</i>	<i>STAT6</i>		<i>MBTD1</i>	<i>SS18L1</i>
<i>NTRK2</i>	<i>CD274</i>	<i>FOS</i>	<i>MAST1</i>	<i>PAX3</i>	<i>TAF15</i>		<i>MDM2</i>	<i>WWTR1</i>
<i>NTRK3</i>	<i>CIC</i>	<i>FOSB</i>	<i>MAST2</i>	<i>PDGFB</i>	<i>TCF12</i>		<i>MGEA5</i>	
<i>NUTM1</i>	<i>CSF1</i>	<i>FOXO1</i>	<i>MEAF6</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>TERT</i>		<i>NCOA3</i>	
<i>PIK3CA</i>	<i>CSF1R</i>	<i>FOXO4</i>	<i>MKL2</i>	<i>PDGFRB</i>	<i>TFE3</i>		<i>NFATC2</i>	
<i>RET</i>	<i>CTNNB1</i>	<i>FUS</i>	<i>MN1</i>	<i>PHF1</i>	<i>TFEB</i>		<i>NFE2L2</i>	
<i>ROS1</i>	<i>DNAJB1</i>	<i>GLI1</i>	<i>MSMB</i>	<i>PKN1</i>	<i>TFG</i>		<i>NFIB</i>	

**Table 2. Details of targeted 137 genes in Fusin Plex panel**

Gene	Accession	Exon	Assay Type	Description
ACVR2A	NM_001616	1,2,3	Fusion	5'
AKT1	NM_005163	2,3,4,5,mid-exon5	Fusion	5'
AKT2	NM_001626	2*,5	Fusion	5'
	NM_001626	11	Fusion	3'
AKT3	NM_005465	2,3,4,9	Fusion	5'
	NM_005465	6,7,8	Fusion	3'
ALK	NM_004304	2,4,6,8,10,12,14,16,17,18,19,intron19,20,mid-exon20,21,22,23,26	Fusion, ALK ATI, Internal deletion(ALK $\Delta$ 2-17, ALK $\Delta$ 2-3)	5'
	NM_004304	1,2	Internal deletion (ALK $\Delta$ 2-17, ALK $\Delta$ 2-3)	3'
AR	NM_001011645	1	Fusion	3'
	NM_000044	1,2,3,4,5,6,7,8*	Fusion, ARv7	3'
ARHGAP26	NM_015071	2,10,11,12	Fusion	5'
ARHGAP6	NM_006125	2	Fusion	5'
AXL	NM_021913	11	Fusion	5'
	NM_021913	18,19,mid-exon20,20	Fusion	3'
BCOR	NM_017745	8	Fusion	5'
	NM_001123385	mid-exon2,3,4,mid-exon4,5,6,7,8,9,11,15	Fusion, Internal Tandem Duplication	5'
	NM_001123385	2,4,mid-exon4, 6,7,mid-exon7,10,12,14,15	Fusion, Internal Tandem Duplication	3'
BRAF	NM_004333	2,3,4,5,7,8,9,10,11,12,15,16	Fusion, Kinase Domain Duplication, BRAF $\Delta$ 2-10, BRAF $\Delta$ 4-10, BRAF	5'

			△2-8, BRAF △3-8, BRAF △4-8	
	NM_004333	1,2,3,7,8,10,13,14,18	Fusion, Kinase Domain Duplication, BRAF △2-10, BRAF △4-10, BRAF △2-8, BRAF △3-8, BRAF △4-8	3'
BRD3	NM_007371	9,10,11,12	Fusion	3'
BRD4	NM_058243	2*	Fusion	5'
	NM_058243	10,11,12,13,14	Fusion	3'
CAMTA1	NM_015215	8,9,mid-exon9,10	Fusion	5'
	NM_015215	3	Fusion	3'
CCNB3	NM_033031	2*,3,4,5,6,mid-exon6,7	Fusion	5'
CCND1	NM_053056	1*,2,3,4,5	Fusion	5'
	NM_053056	1,2,3,4,mid-exon5*	Fusion	3'
	NM_053056	5*	Fusion	3'
CIC	NM_015125	12	Fusion	5'
	NM_015125	14,15,16,17,18,mid-exon19,19,mid- exon20,20*	Fusion	3'
CRTC1	NM_015321	1,2,3,4	Fusion	3'
CSF1	NM_000757	2,3,4,5,6	Fusion	5'
	NM_000757	5,6,7,8*,mid-exon9*	Fusion	3'
	NM_172212	9*	Fusion	3'
CSF1R	NM_005211	11,12,13	Fusion	5'
DNAJB1	NM_006145	1,2	Fusion	3'
EGF	NM_001963	16,17,18,19	Fusion	5'
EGFR	NM_005228	7,8,9,14,15,16,17,18,19,20	Fusion, Exon2-7	5'

			skipping(EGFRvIII), Kinase Domain Duplication	
	NM_005228	1,24,25,mid-exon25,26	Fusion, Exon2-7 skipping(EGFRvIII), Kinase Domain Duplication	3'
EPC1	NM_025209	9,10,11	Fusion	3'
ERBB2	NM_004448	4,5,13,15,17	Fusion, Exon16 skipping ( $\Delta$ 16HER)	5'
	NM_004448	15,23,24,25,mid-exon26,26	Fusion, Exon16 skipping ( $\Delta$ 16HER)	3'
ERBB4	NM_005235	2,3,4,14,15,16,17,18,23	Fusion	5'
ERG	NM_004449	2*,3*,4,5,6,7,8,9,10,11	Fusion	5'
ESR1	NM_000125	5,6,7,8	Fusion	5'
	NM_000125	1,2,3,4,5,6,7	Fusion	3'
ESRRA	NM_004451	2,3	Fusion	3'
ETV1	NM_004956	3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13	Fusion	5'
ETV4	NM_001986	2,3,4,5,6,7,8,9,10	Fusion	5'
ETV5	NM_004454	2*,3,7,8,9	Fusion	5'
ETV6	NM_001987	2,3,4,5,6,7	Fusion	5'
	NM_001987	1,2,3,4,5,6	Fusion	3'
EWSR1	NM_005243	8	Fusion	5'
	NM_005243	4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14	Fusion	3'
FGF1	NM_00800	mid-exon2,2	Fusion	5'
FGFR1	NM_015850	2*,3,4,5,6,7,8,9,10,11,17	Fusion, Kinase Domain Duplication	5'
	NM_015850	12,17	Fusion, Kinase Domain Duplication	3'
FGFR2	NM_000141	2*,3,5,6,7,8,9,10	Fusion	5'

	NM_000141	16,17,18	Fusion	3'
FGFR3	NM_000142	3,5,8,9,10,11,12,13,14	Fusion	5'
	NM_000142	16,17,intron17,mid-exon18	Fusion	3'
FGR	NM_005248	2*,3	Fusion	5'
FOS	NM_005252	mid-exon4	Fusion	3'
FOSB	NM_006732	1*,mid-eoxn1*,1,2	Fusion	5'
FOXO1	NM_002015	1*,2,3*	Fusion	5'
	NM_002015	1*,2*,3*	Fusion	3'
FOXO4	NM_005938	2,mid-exon2,3	Fusion	5'
FOXR2		cryptic upstream exon2, 3(chrX:55562068, chrX:55634636)	Fusion	5'
FUS	NM_004960	3,4,5,mid-exon6,6,7,8,9,10,11,13,14	Fusion	3'
GLI1	NM_005269	4,5,6,7	Fusion	5'
	NM_005269	4,5,mid-exon5,6,7	Fusion	3'
GRB7	NM_005310	10,11,12	Fusion	5'
HMGA2	NM_003483	1,2,3,4,mid-exon5*,5*	Fusion	3'
IGF1R	NM_000875	13,14,15	Fusion	5'
INSR	NM_000208	2,12,13,14,15,16,17,18,19	Fusion	5'
	NM_000208	20,21,22	Fusion	3'
JAK2	NM_004972	6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20	Fusion	5'
	NM_004972	9,10,11,12,22	Fusion	3'



JAK3	NM_000215	10,11,12,17,18,19	Fusion	5'
	NM_000215	23	Fusion	3'
JAZF1	NM_175061	2,3,4	Fusion	3'
KIT	NM_000222	8	Fusion	5'
	NM_000222	1	Fusion	3'
MAML2	NM_032427	2,3	Fusion	5'
	NM_032427	2	Fusion	3'
MAP2K1	NM_002755	2	Fusion	5'
MAST1	NM_014975	7,8,9,18,19,20,21	Fusion	5'
MAST2	NM_015112	2,3,5,6	Fusion	5'
	NM_015112	15,16,17	Fusion	3'
MBTD1	NM_017643	3*	Fusion	5'
	NM_017643	15,16,17	Fusion	3'
MDM2	NM_002392	5,9	Fusion, Expression	5'
	NM_002392	2,4,6,8,10	Fusion, Expression	3'
MEAF6	NM_001270875	4,5	Fusion	3'
MET	NM_000245	2,4,5,6,13,14,15,16,17,21	Fusion, Exon14 skipping(MET $\Delta$ ex14)	5'
	NM_000245	2,13	Fusion, Exon14 skipping(MET $\Delta$ ex14)	3'
MGEA5	NM_012215	4,5,6,7,8,9,12,13,14,15	Fusion, Expression	5'
MKL2	NM_014048	11,12,13	Fusion	5'
MN1	NM_002430	1,2	Fusion	3'

MSMB	NM_002443	2,3,4	Fusion	3'
MUSK	NM_005592	7,9,10,12,13,14,15	Fusion	5'
MYB	NM_001130173	7,8,9,11,12,13,14,15,16	Fusion	3'
MYBL1	NM_001080416	8,9,mid-exon10,10,11,12,13,14,15	Fusion	3'
MYC	NM_002467	1*,mid-exon1*,2,3	Fusion, Expression	5'
NCOA1	NM_147223	11,12,13,14,15	Fusion	5'
NCOA2	NM_006540	11,12,13,14,intron14,15,16,22	Fusion	5'
	NM_006540	14	Fusion	3'
NCOA3	NM_006534	2*,13,14,15,16	Fusion	5'
	NM_006534	20	Fusion	3'
NFATC2	NM_012340	2,3,9,10	Fusion	5'
NFE2L2	NM_006164	1,2,3,4,5	Exon skipping, Fusion	5'
NFIB	NM_001369458	10,11	Fusion	5'
	NM_005596	9*,mid-exon9	Fusion	5'
	NM_005596	2	Fusion	3'
NOTCH1	NM_017617	2,4,24,29,30,31	Fusion	3'
	NM_017617	5,24,25,26,27,28,29	Fusion, Exon Skipping(NOTCH1 Δ 2-27,NOTCH1 Δ 21-27,NOTCH1 Δ 3-27,NOTCH1 Δ 3-28)	5'
NOTCH2	NM_024408	24,25,26,27,28,29	Fusion	5'
	NM_024408	5,6,7	Fusion	3'
NR4A3	NM_173200	2*,3*,4,5,7,9	Fusion, Expression	5'
	NM_173200	8	Fusion, Expression	3'

NRG1	NM_001159996	1*,3,4,5	Fusion	5'
	NM_004495	1,2,3,4,5,6	Fusion	5'
	NM_013958	1*	Fusion	5'
	NM_013959	1*,3	Fusion	5'
	NM_013962	1*	Fusion	5'
	NM_013962	1	Fusion	3'
NTRK1	NM_001007792	1,2	Fusion	5'
	NM_002529	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14	Fusion	5'
NTRK2	NM_006180	4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18	Fusion	5'
	NM_006180	11,14	Fusion	3'
NTRK3	NM_001007156	15	Fusion	5'
	NM_002530	3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16	Fusion	5'
	NM_002530	13,14,15,17	Fusion	3'
NUMBL	NM_004756	2,3	Fusion	5'
NUTM1	NM_175741	2*,3,mid-exon3,4,5,mid-exon6,6	Fusion	5'
PAX3	NM_181459	2,4,8	Fusion, Expression	5'
	NM_181459	3,5,6,7,8	Fusion, Expression	3'
PAX8	NM_003466	3	Fusion	5'
	NM_003466	1*,2,6,7,8,9,10	Fusion	3'
PDGFB	NM_002608	2,3	Fusion	5'

PDGFD	NM_025208	5,6,7	Fusion	5'
PDGFRA	NM_006206	10,11,12,mid-exon12,13,14,15	Fusion, PDGFRA $\Delta$ 8,9	5'
	NM_006206	7	Fusion, PDGFRA $\Delta$ 8,9	3'
PDGFRB	NM_002609	8,9,10,11,12,mid-exon12,13,14	Fusion	5'
PHF1	NM_024165	1*,2	Fusion	5'
	NM_024165	10,11,12	Fusion	3'
PHKB	NM_000293	4	Fusion	3'
PIK3CA	NM_006218	2,15	Fusion	5'
PKN1	NM_002741	10,11,12,13	Fusion	5'
PLAG1	NM_002655	1,2,3,4	Fusion	5'
PPARG	NM_015869	1,2,3	Fusion	5'
PRDM10	NM_020228	13,14	Fusion	5'
PRKACA	NM_002730	2	Fusion	5'
PRKACB	NM_182948	2,3,4	Fusion	5'
PRKCA	NM_002737	4,5,6,9,15	Fusion	5'
PRKCB	NM_002738	1,3,7,8,9	Fusion	5'
PRKCD	NM_006254	9,10,11,12,15	Fusion	5'
	NM_006254	18	Fusion	3'
PRKD1	NM_002742	2,10,11,12,13	Fusion	5'
PRKD2	NM_016457	10,11,12,13	Fusion	5'
PRKD3	NM_005813	10,11,12,13	Fusion	5'

RAD51B	NM_133509	8	Fusion	5'
	NM_133509	3,4,5,6,7,8,9	Fusion	3'
RAF1	NM_002880	2*4,5,6,7,8,9,10,11,12	Fusion	5'
	NM_002880	4,5,6,7,8,9	Fusion	3'
RELA	NM_021975	1,2,3,4,11	Fusion	5'
RET	NM_020630	2,4,6,8,9,10,11,mid-exon11,12,13,14	Fusion	5'
ROS1	NM_002944	2,4,7,31,32,33,34,35,36,37	Fusion	5'
RSPO2	NM_178565	1,2*,3*	Fusion	5'
RSPO3	NM_032784	2	Fusion	5'
SS18	NM_001007559	2,3,4,5,6,10,11	Fusion	5'
	NM_001007559	4,5,6,8,9,10	Fusion	3'
SS18L1	NM_198935	1,2,3,8,9,10	Fusion	3'
STAT6	NM_001178078	1*,2*,3,4,5,6,7,15,16,17,18,19,20	Fusion	5'
TAF15	NM_139215	6,7	Fusion	5'
	NM_139215	5,6,7,9	Fusion	3'
TCF12	NM_207036	4,5,6	Fusion	3'
TERT	NM_198253	2,3,5,7,10,11,12	Fusion, Expression	5'
	NM_198253	3,9,15	Fusion, Expression	3'
TFE3	NM_006521	2,3,4,5,6,7,8	Fusion	5'
	NM_006521	2,3,4,5,6	Fusion	3'
TFEB	NM_007162	1*,2*,3,mid-exon3,4,mid-exon4,mid-exon5,6	Fusion	5'
	NM_007162	9, mid-exon10	Fusion	3'
TFG	NM_006070	6	Fusion	5'
	NM_006070	3,4,5,6,7,mid-exon8	Fusion	3'

THADA	NM_022065	24,25,26,27,28,29,30,31,36,37	Fusion	3'
TMPRSS2	NM_001135099	1	Fusion	3'
	NM_005656	1*,2,3,4,5,6	Fusion	3'
USP6	NM_004505	1*,mid-exon1*,2*,3	Fusion	5'
VGLL2	NM_182645	1,2,3,intron3,4	Fusion	3'
WWTR1	NM_015472	3,4	Fusion	5'
	NM_015472	3,4	Fusion	3'
YAP1	NM_001130145	1,mid-exon1,2,3,4,8,9	Fusion	5'
	NM_001130145	1,2,3,4,5,6,7	Fusion	3'
YWHAE	NM_006761	5	Fusion	3'

\*Indicates exons that are entirely untranslated region (UTR), or for which the UTR is targeted.

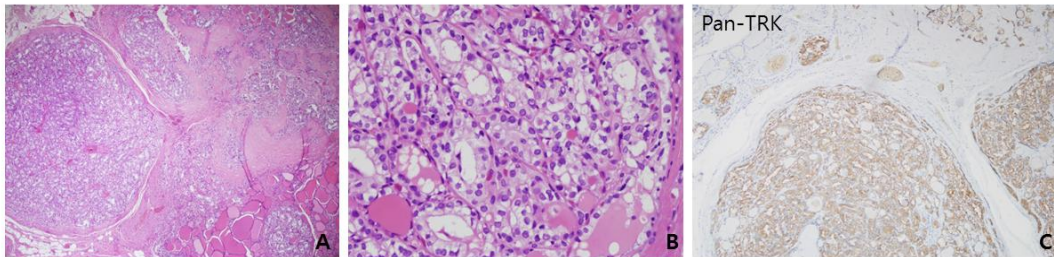
\*\*The mutations listed are targeted by the assay design. Version 6.3 and earlier of Archer Analysis may not support RNA SNV/InDel variant calling at exon junctions depending on the sequence context (SNVs  $\leq$  5bp, Indels  $\leq$  30bp).

\*\*\*ALK-ATI currently requires review outside of Archer Analysis.

### 2-3. Pan-TRK 면역조직화학 염색

내분비 전문 병리학자가 44 명의 선별된 환자들의 FFPE 검체에서 유전자 재배열이 의심되는 조직소견을 포함하는 블록을 선정하여 전체 슬라이드에 Pan-TRK 면역조직화학염색을 실시하였다. 조직학적 소견에서 다결절성 침윤, 광범위한 기질의 섬유화 (그림 2A), 혼합된 다양한 성장양상과 다양한 정도의 핵의 이형성, 종양세포의 투명한 세포질 변화 (그림 2B)를 보이는 경우 유전자 재배열이 의심되어 선별되었다. Pan-TRK 항체는 rabbit monoclonal antibody, clone EPR17341, VENTANA pan-TRK Assay, Roche Tissue Diagnostics/Ventana 를 1:16 비율로 희석하여 BenchMark XT automatic immunostaining device (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) 자동화 염색 기계로 면역조직화학염색을 실시하였다. 전체 종양세포들 중에서 1% 이상의 종양세포들의 세포질, 세포막, 혹은 핵에 양성으로 염색되는 경우 최종 양성으로 보고하였다 (그림 2C).

**Figure 2. Pan-TRK immunohistochemistry stain (A). Multinodular growth with intratumoral stromal fibrosis (B) Clear cytoplasm and mild nuclear atypia (C) Positive pan-TRK IHC**



Abbreviations: IHC, immunohistochemistry

### 3. 통계적 분석

본 연구의 통계적 분석은 R version 3.4.0 과 R library moonBook, tidyverse, 그리고 Cairo (R Foundation for Statistical Computing, 빈, 오스트리아; <http://www.R-project.org>) 을 이용하였다. 연속형 변수(continuous variables)는 중앙값과 사분위수로 표현하였고 범주형 변수(categorical variables)는 숫자와 비율 (%)로 표현하였다. 임상 병리학적 특징에 대한 비교는 연속형 변수의 경우 Wilcoxon rank-sum test 및 Mann Whitney U-test 를 이용하였고, 범주형 변수의 경우 Chi-squared test 를 사용하였다. Post-hoc analysis 에는 Fisher's least significant difference 를 사용하였다. 통계적 유의성은  $p$  값으로 표현하였으며,  $p$  값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 차이를 보이는 것으로 간주하였다.



## 연구 결과

### 1. *BRAF* 유전변이가 없는 갑상선암 환자들의 임상 병리학적 특성

본 연구에 포함된 *BRAF* 유전변이가 없는 갑상선암 환자들의 임상병리학적 특성은 표 3에 요약되어 있다. 분석된 89명의 환자들의 나이의 중앙값은 46.9세 (사분위수 39.0–59.4) 이었고 28명 (31.5%)이 남성이었다. 전체 환자 중, 갑상선 유두암 (papillary thyroid carcinoma, PTC) 환자가 83명 그리고 갑상선 여포암 (follicular thyroid carcinoma, FTC) 환자가 6명이었다. 전형적 갑상선유두암 (classical PTC) 환자가 62명 (69.7%)으로 가장 많았으며, 다음으로 여포 변이 유두암 (follicular variant PTC) 환자가 19명 (21.3%), 그리고 2명은 키 큰 세포 변이 유두암 (tall cell subtype PTC) 이었다. 갑상선 원발 종양의 크기는 1.8cm (사분위수 1.1–1.3)이었고, 41명 (46.1%)에서 현미경적 갑상선 외 침윤 (microscopic extrathyroidal extension, ETE) 및 12명 (13.5%)에서 수술 시 육안적인 갑상선 외 침윤 (gross ETE) 이 확인되었다. 36명 (40.4%)의 환자 들에서는 갑상선암이 다발성 (multifocality)으로 발견되었다. 경부 림프절 전이는 총 49명 (55.1%)에서 발견되었고 이 중 28명 (31.5%)은 측경부 림프절 전이를 보였다. 전이된 림프절 크기는 중앙값 6.0 mm (사분위수 3.0–12.0)이었고 14명의 환자 들에서 림프절 외 침윤 (extranodal extension) 이 확인되었다. 31명 (34.8%)의 환자들이 갑상선 반절제술 (hemithyroidectomy)만 시행 받았고 6명은 반절제술에 이어 잔존갑상선절제술 (completion thyroidectomy)을 받았다. 52명 (58.4%)의 환자들은 처음부터 갑상선전절제술을 시행 받았다. 전체 환자 중, 55명 (61.8%)이 방사성요오드 치료를 받았으며 방사성요오드 용량은 중앙값 100 mCi (50-150) 였다. 5명 (5.6%)의 환자들은 갑상선암 진단 당시 원격전이가 확인되었고, American Joint Committee on Cancer Tumor Node Metastasis (AJCC TNM) 8판 기준에 따르면, 69명 (77.5%)은 1기, 15명 (16.9%)은 2기, 1명 (1.1%)은 3기, 그리고 4명 (4.5%)은 4기에 해당되었다.

**Table 3. Baseline clinicopathological characteristics of patients with thyroid cancer with wild type *BRAF***

	<b>Value (N = 89)</b>
<b>Age (years)</b>	46.9 (39.0–59.4)
<b>Gender (male)</b>	28 (31.5%)
<b>Histology</b>	
<b>Classic PTC</b>	62 (69.7%)
<b>Follicular variant PTC</b>	19 (21.3%)
<b>Tall cell subtype PTC</b>	2 (2.2%)
<b>Follicular thyroid carcinoma</b>	6 (6.7%)
<b>Primary tumor size (cm)</b>	1.8 (1.1–3.2)
<b>Extrathyroidal extension</b>	
<b>Microscopic</b>	41 (46.1%)
<b>Gross</b>	12 (13.5%)
<b>Multifocality (yes)</b>	36 (40.4%)
<b>Lymph node metastases (yes)</b>	
<b>N1a</b>	21 (23.6%)
<b>N1b</b>	28 (31.5%)
<b>Metastatic lymph node size (mm)</b>	6.0 (3.0–12.0)
<b>Extranodal extension (yes)</b>	14 (15.7%)
<b>Lymphocytic thyroiditis (yes)</b>	32 (36.0%)
<b>Vascular Invasion (yes)</b>	16 (18.0%)
<b>Lymphatic Invasion (yes)</b>	66 (74.2%)
<b>Distant metastases (yes)</b>	5 (5.6%)
<b>Extent of surgery</b>	
<b>Hemithyroidectomy</b>	31 (34.8%)
<b>Hemithyroidectomy with completion</b>	6 (6.7%)
<b>Total thyroidectomy</b>	52 (58.4%)
<b>RAI ablation (yes)</b>	55 (61.8%)
<b>Initial dose of RAI (mCi)</b>	100 (50–150)
<b>AJCC TNM 8<sup>th</sup> stage at initial diagnosis</b>	
<b>I</b>	69 (77.5%)
<b>II</b>	15 (16.9%)
<b>III</b>	1 (1.1%)
<b>IV</b>	4 (4.5%)

Abbreviations: PTC, papillary thyroid carcinoma; RAI, radioactive iodine; AJCC TNM, American Joint Committee on Cancer Tumor Node Metastasis

## 2. *BRAF* 유전변이가 없는 분화갑상선암 환자들의 유전자 재배열

### 2-1. 연구에 포함된 분화갑상선암 환자들의 유전자 재배열 빈도

89 개의 원발 종양 조직에서 유전자 재배열 분석을 시행하였고, 55 명 (61.8%)에서 유전자 재배열이 확인되었다 (표 4). 각각의 환자에서 확인된 유전자 재배열의 위치와 상대적인 빈도수에 대한 자세한 내용은 표 5 에 정리되어 있다. 51 명의 환자 들에서 한 종류의 유전자 재배열이 확인되었고 4 명의 환자 들에서는 두 종류의 유전자 재배열이 확인되었다 (그림 3, Patient No. 14,15,20, 그리고 39). *NTRK3* 유전자 재배열이 17 명 (19.1%)에서 보여 가장 많았고, 다음으로 *RET* 유전자 재배열 16 명 (17.9%), *ALK* 유전자 재배열 10 명 (7.9%) 순서로 많았다. *NTRK1* 과 *NTRK3* 는 총 23 명 (25.8%)으로 높은 빈도로 확인되었다. 갑상선암에서 잘 알려진 *ETV6-NTRK3* 가 12 명 (13.5%)에서 확인되어 가장 많았고 다음으로 *CCDC6-RET* 재배열 10.1%, *STRN-ALK* 재배열이 7.9%, 그리고 *NCOA4-RET* 6.7% 순서로 많았다. 이외 *BRAF* 유전자 재배열은 3 명 (3.3%), *PAX8* 와 *MET* 유전자 재배열은 각각 1 명 (1.1%)에서 확인되었다. *FGFR3* 유전자 재배열은 4 명 (4.5%)에서 확인되었으며, 이중 3 명 (그림 1, Patient No. 14,15, 그리고 20) 은 각각 *NTRK1*, *RET* 유전자 재배열과 동반되어 있었고 1 명의 환자 (Patient No. 49) 만 *FGFR3* 단일 유전자 재배열이 있는 것으로 확인되었다.

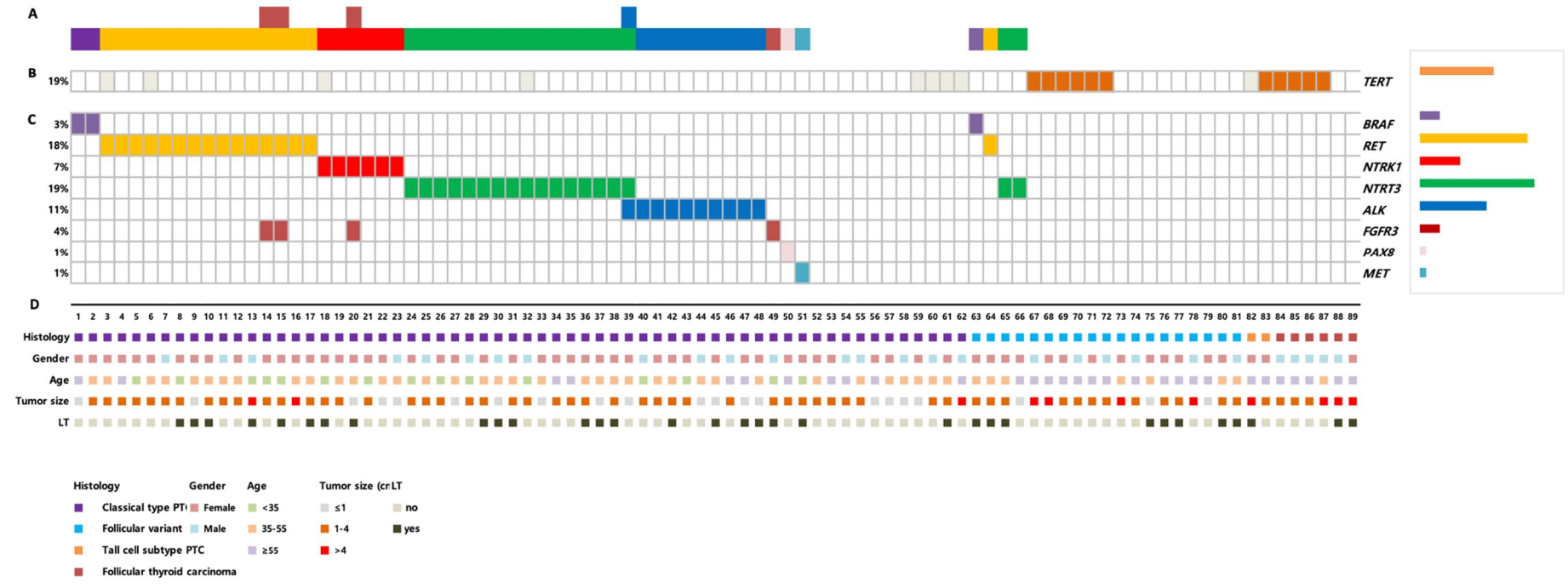
H&E 슬라이드를 보고 유전자 재배열이 의심되어 전향적으로 pan-TRK 면역조직화학염색을 시행한 44 명의 환자와 무작위로 선별된 45 명의 환자에서 유전자 재배열 빈도를 비교하였다 (표 4). 병리학적인 소견을 보고 선별된 환자들 중 전체 유전자 재배열은 37 명 (84.1%)에서 보여 무작위 선별된 환자들의 40.0%보다 유의미하게 높은 빈도를 보였다 ( $p < 0.001$ ). 특히, *NTRK3* 의 경우 34.1%와 6.7%로 유의미한 차이를 보였으며 ( $p = 0.003$ ), *NTRK1* 의 경우 9.1%로 4.4%보다 많긴 하였으나 통계적으로 유의미하지 않았다 ( $p=0.652$ ). *RET*, *ALK* 유전자 재배열도 마찬가지로 병리학적인 소견을 보고 선별된 환자에서 더 높은 빈도로 보이긴 하나 유의미하지 않았다. *BRAF* 유전자 재배열의 경우 3 명 모두 무작위로 선별된 환자에서 확인되었다.

**Table 4. Gene fusions identified in patients with thyroid cancer with wild type *BRAF***

	<b>Total patients (N = 89)</b>	<b>Patients screened for pan-TRK IHC stain (N=44)</b>	<b>Patients with random enrollment (N=45)</b>	<b><i>p</i> value</b>
<b>Patients with gene fusions</b>	55 (61.8%)	37 (84.1%)	18 (40.0%)	<0.001
<b>One type</b>	51 (57.3%)	35 (79.5%)	16 (35.6%)	
<b>Two types</b>	4 (4.5%)	2 (4.5%)	2 (4.4%)	
<b><i>RET</i></b>	16 (17.9%)	9 (20.5%)	7 (15.6%)	0.745
<i>CCDC6-RET</i>	9 (10.1%)	2 (4.5%)	7 (15.6%)	
<i>NCOA4-RET</i>	6 (6.7%)	6 (13.6)	0 (0%)	
<i>SPECCIL-RET</i>	1 (1.1%)	1 (2.3%)	0 (0%)	
<b><i>NTRK3</i></b>	17 (19.1%)	15 (34.1%)	3 (6.7%)	0.003
<i>ETV6-NTRK3</i>	12 (13.5%)	10 (22.7%)	3 (6.7%)	
<i>EML4-NTRK3</i>	2 (2.2%)	2 (4.5%)	0 (0%)	
<i>SQSTM1-NTRK3</i>	3 (3.3%)	3 (6.8%)	0 (0%)	
<b><i>NTRK1</i></b>	6 (6.7%)	4 (9.1%)	2 (4.4%)	0.652
<i>TPR-NTRK1</i>	2 (2.2%)	1 (2.3%)	0 (0%)	
<i>IRF2BP2-NTRK1</i>	1 (1.1%)	1 (2.3%)	0 (0%)	
<i>SQSTM1-NTRK1</i>	1 (1.1%)	1 (2.3%)	0 (0%)	
<i>TPM3-NTRK1</i>	1 (1.1%)	0 (0%)	1 (2.2%)	
<i>TFG-NTRK1</i>	1 (1.1%)	1 (2.3%)	1 (2.2%)	
<b><i>ALK</i></b>	10 (11.2%)	8 (18.2%)	2 (4.4%)	0.086
<i>STRN-ALK</i>	7 (7.9%)	5 (11.4%)	2 (4.4%)	
<i>EML4-ALK</i>	2 (2.2%)	2 (4.5%)	0 (0%)	
<i>CTSB-ALK</i>	1 (1.1%)	1 (2.3%)	0 (0%)	
<b><i>BRAF</i></b>	3 (3.3%)	0 (0%)	3 (6.7%)	0.248
<i>MBP-BRAF</i>	1 (1.1%)	0 (0%)	1 (2.2%)	
<i>POR-BRAF</i>	1 (1.1%)	0 (0%)	1 (2.2%)	
<i>MACF1-BRAF</i>	1 (1.1%)	0 (0%)	1 (2.2%)	
<b><i>FGFR3</i></b>	4 (4.5%)	2 (4.5%)	2 (4.4%)	0.999
<i>IGH-FGFR3</i>	3 (3.3%)	2 (4.5%)	1 (2.2%)	
<i>TMBIM4-FGFR3</i>	1 (1.1%)	0 (0%)	1 (2.2%)	
<b><i>PAX8-PPARG</i></b>	1 (1.1%)	0 (0%)	1 (2.2%)	
<b><i>TFG-MET</i></b>	1 (1.1%)	1 (2.3%)	0 (0%)	0.991

Abbreviations: IHC, immunohistochemistry

Figure 3. Gene fusions identified in 89 patients with thyroid cancer. (A). Numbers of gene fusions in each patient, (B) *TERT* promoter mutation, (C) Gene fusions, (D) Clinicopathological characteristics of each patient



Abbreviations: PTC, papillary thyroid carcinoma; LT, lymphocytic thyroiditis

**Table 5. Details of gene fusions identified in each patient with thyroid cancer with wild type *BRAF***

Patient No.	Genes	% Read	Genomic Location	Fusions (v6.2.7)
1	MBP :: BRAF	29.14	chr18:74817167,chr7:140487384	<p>GSP2s Filters Reads (#/%) Start Sites            BRAF_chr7_140487350_24_...A1_GSP2            BRAF_chr7_140482902_25_...A1_GSP2            BRAF_chr7_140481463_25_...A1_GSP2            1219 / 29.14 104</p>
2	MACF1 :: BRAF	24.22	chr1:39723700,chr7:140481493	<p>GSP2s Filters Reads (#/%) Start Sites            BRAF_chr7_140481463_25_...A1_GSP2            BRAF_chr7_140477828_25_...A1_GSP2            936 / 24.22 162</p>
3	NCOA4 :: RET	88.68	chr10:51586411,chr10:43612032	<p>GSP2s Filters Reads (#/%) Start Sites            RET_chr10_43612037_23_...A1_GSP2            RET_chr10_43613843_23_...A1_GSP2            RET_chr10_43615005_19_...A1_GSP2            1904 / 88.68 199</p>
4	CCDC6 :: RET	90.64	chr10:61665880,chr10:43612032	<p>GSP2s Filters Reads (#/%) Start Sites            RET_chr10_43612037_23_...A1_GSP2            RET_chr10_43613843_23_...A1_GSP2            RET_chr10_43615005_19_...A1_GSP2            2439 / 90.64 182</p>
5	SPECC1L :: RET	93.47	chr22:24734445,chr10:43612032	<p>GSP2s Filters Reads (#/%) Start Sites            RET_chr10_43612037_23_...A1_GSP2            RET_chr10_43613843_23_...A1_GSP2            RET_chr10_43615005_19_...A1_GSP2            1488 / 93.47 153</p>
6	NCOA4 :: RET	86.91	chr10:51582939,chr10:43612032	<p>GSP2s Filters Reads (#/%) Start Sites            RET_chr10_43612037_23_...A1_GSP2            RET_chr10_43613843_23_...A1_GSP2            1521 / 86.91 148</p>

7	CCDC6 :: RET	93.88	chr10:61665880,chr10:43612032	
8	NCOA4 :: RET	97.55	chr10:51582939,chr10:43612032	
9	NCOA4 :: RET	62.44	chr10:51586411,chr10:43612032	
10	CCDC6 :: RET	87.79	chr10:61665880,chr10:43612032	
11	NCOA4 :: RET	86.34	chr10:51582939,chr10:43612032	
12	CCDC6 :: RET	95.32	chr10:61665880,chr10:43612032	

13	CCDC6 :: RET	93.67	chr10:61665880,chr10:43612032	
14	CCDC6 :: RET	82.65	chr10:61665880,chr10:43612032	
14	TMBIM4 :: FGFR3	42	chr12:66563665,chr4:1806198	
15	CCDC6 :: RET	88.76	chr10:61665880,chr10:43612032	
15	IGH :: FGFR3	10	chr14:106208682,chr4:1806216	
16	NCOA4 ::RET	96.46	chr10:51582939,chr10:43612032	



17	CCDC6 :: RET	78.18182	chr10:61665880,chr10:43612032	
18	SQSTM1:: NTRK1	62.43	chr5:179251323,chr1:156844363	
19	TPR :: NTRK1	94.49	chr1:186319355,chr1:156844363	
20	IGH :: FGFR3	13.28	chr14:106208682,chr4:1806216	
20	TFG :: NTRK1	94.65	chr3:100447702,chr1:156844363	
21	TPM3 :: NTRK1	87.25	chr1:154142876,chr1:156844363	

22	IRF2BP2:: NTRK1	98.73	chr1:234742817,chr1:156844322	
23	TPR :: NTRK1	97.7551	chr1:186320462,chr1:156844698	
24	ETV6 :: NTRK3	56.84	chr12:12006495,chr15:88576276	
25	SQSTM1:: NTRK3	78.91	chr5:179252226,chr15:88576276	
26	ETV6 :: NTRK3	51.47	chr12:12022903,chr15:88576276	
27	ETV6 :: NTRK3	25.78	chr12:12006495,chr15:88576276	

28	SQSTM1:: NTRK3	60.67	chr5:179251323,chr15:88576276	<p> <small>CSFP2s</small>   <small>Filters</small>   <small>Reads (#/%)</small>   <small>Start Sites</small>            NTRK3_chr15_88576246_22_+_A1_GSP2            NTRK3_chr15_88483945_23_+_A1_GSP2            NTRK3_chr15_88476390_20_+_A1_GSP2            3892 / 60.67   273         </p>
29	ETV6 :: NTRK3	55.4	chr12:12006495,chr15:88576276	<p> <small>CSFP2s</small>   <small>Filters</small>   <small>Reads (#/%)</small>   <small>Start Sites</small>            NTRK3_chr15_88576246_22_+_A1_GSP2            888 / 55.40   93         </p>
30	ETV6 :: NTRK3	39.93	chr12:12006495,chr15:88576276	<p> <small>CSFP2s</small>   <small>Filters</small>   <small>Reads (#/%)</small>   <small>Start Sites</small>            NTRK3_chr15_88576246_22_+_A1_GSP2            NTRK3_chr15_88524544_34_+_A1_GSP2            2573 / 39.93   215         </p>
31	ETV6 :: NTRK3	14.87	chr12:12006495,chr15:88576276	<p> <small>CSFP2s</small>   <small>Filters</small>   <small>Reads (#/%)</small>   <small>Start Sites</small>            NTRK3_chr15_88576246_22_+_A1_GSP2            ETV6_chr12_12006495_23_+_A1_GSP2            724 / 14.87   158         </p>
32	ETV6 :: NTRK3	43.18	chr12:12006495,chr15:88576276	<p> <small>CSFP2s</small>   <small>Filters</small>   <small>Reads (#/%)</small>   <small>Start Sites</small>            NTRK3_chr15_88576246_22_+_A1_GSP2            ETV6_chr12_12006495_23_+_A1_GSP2            ETV6_chr12_11992188_24_+_A1_GSP2            1063 / 43.18   182         </p>
33	EML4 :: NTRK3	42.08	chr2:42472827,chr15:88576276	<p> <small>CSFP2s</small>   <small>Filters</small>   <small>Reads (#/%)</small>   <small>Start Sites</small>            NTRK3_chr15_88576246_22_+_A1_GSP2            NTRK3_chr15_88483945_23_+_A1_GSP2            802 / 42.08   147         </p>

34	ETV6 :: NTRK3	19.94	chr12:12006495,chr15:88576276	<p> <small>GSP2s</small>  <small>NTRK3_chr15_88576246_22_+_A1_GSP2</small>  <small>ETV6_chr12_12006495_23_+_A1_GSP2</small>  <small>ETV6_chr12_11992188_24_+_A1_GSP2</small>  <small>NTRK3_chr15_88483945_23_+_A1_GSP2</small> </p>
35	ETV6 :: NTRK3	21.2	chr12:12006495,chr15:88576276	<p> <small>GSP2s</small>  <small>NTRK3_chr15_88576246_22_+_A1_GSP2</small> </p>
36	ETV6 :: NTRK3	24.56957	chr12:12006495,chr15:88576276	<p> <small>GSP2s</small>  <small>NTRK3_chr15_88576246_22_+_A1_GSP2</small>  <small>ETV6_chr12_12006495_23_+_A1_GSP2</small>  <small>ETV6_chr12_11992188_24_+_A1_GSP2</small> </p>
37	EML4::NTRK3	51.25561	chr2:42472827,chr15:88576276	<p> <small>GSP2s</small>  <small>NTRK3_chr15_88576246_22_+_A1_GSP2</small>  <small>NTRK3_chr15_88824544_34_+_A1_GSP2</small> </p>
38	ETV6::NTRK3	36.45135	chr12:12006495,chr15:88576276	<p> <small>GSP2s</small>  <small>ETV6_chr12_12006495_23_+_A1_GSP2</small>  <small>NTRK3_chr15_88576246_22_+_A1_GSP2</small>  <small>ETV6_chr12_11992188_24_+_A1_GSP2</small>  <small>NTRK3_chr15_88483945_23_+_A1_GSP2</small> </p>
39	EML4 :: ALK	35.71	chr2:42522656,chr2:29446394	<p> <small>GSP2s</small>  <small>ALK_chr2_29446355_20_+_A1_GSP2</small>  <small>ALK_chr2_29446286_24_+_A1_GSP2</small> </p>

39	SQSTM1:: NTRK3	57.04	chr5:179252226,chr15:88576276	<p>GSP2s: NTRK3_chr15_88576246_22_+_A1_GSP2, NTRK3_chr15_88483945_23_+_A1_GSP2</p> <p>Filters: [checked] [radio]</p> <p>Reads (#/%) 4223 / 57.04</p> <p>Start Sites 182</p> <p>exon:5 (SQSTM1), exon:14 (NTRK3)</p>
40	EML4 :: ALK	96.47	chr2:42522656,chr2:29446394	<p>GSP2s: ALK_chr2_29446355_20_+_A1_GSP2, ALK_chr2_29446286_24_+_A1_GSP2, ALK_chr2_29445431_22_+_A1_GSP2, ALK_chr2_29445229_26_+_A1_GSP2, ALK_chr2_29445665_25_+_A1_GSP2</p> <p>Filters: [checked] [radio]</p> <p>Reads (#/%) 4430 / 96.47</p> <p>Start Sites 198</p> <p>exon:13 (EML4), exon:20 (ALK)</p>
41	STRN :: ALK	85.56	chr2:37143221,chr2:29446394	<p>GSP2s: ALK_chr2_29446355_20_+_A1_GSP2, ALK_chr2_29446286_24_+_A1_GSP2, ALK_chr2_29445431_22_+_A1_GSP2</p> <p>Filters: [checked] [radio]</p> <p>Reads (#/%) 1582 / 85.56</p> <p>Start Sites 147</p> <p>exon:3 (STRN), exon:20 (ALK)</p>
42	STRN ::ALK	90.55	chr2:37143221,chr2:29446394	<p>GSP2s: ALK_chr2_29446355_20_+_A1_GSP2, ALK_chr2_29446286_24_+_A1_GSP2, ALK_chr2_29445431_22_+_A1_GSP2</p> <p>Filters: [checked] [radio]</p> <p>Reads (#/%) 297 / 90.55</p> <p>Start Sites 62</p> <p>exon:3 (STRN), exon:20 (ALK)</p>
43	STRN :: ALK	94.63	chr2:37143221,chr2:29446394	<p>GSP2s: ALK_chr2_29446355_20_+_A1_GSP2, ALK_chr2_29446286_24_+_A1_GSP2, ALK_chr2_29445431_22_+_A1_GSP2, ALK_chr2_29445229_26_+_A1_GSP2</p> <p>Filters: [checked] [radio]</p> <p>Reads (#/%) 1444 / 94.63</p> <p>Start Sites 143</p> <p>exon:3 (STRN), exon:20 (ALK)</p>
44	STRN :: ALK	74.51	chr2:37143221,chr2:29446394	<p>GSP2s: ALK_chr2_29446355_20_+_A1_GSP2, ALK_chr2_29446286_24_+_A1_GSP2, ALK_chr2_29445431_22_+_A1_GSP2</p> <p>Filters: [checked] [radio]</p> <p>Reads (#/%) 76 / 74.51</p> <p>Start Sites 25</p> <p>exon:3 (STRN), exon:20 (ALK)</p>

45	CTSB :: ALK	71.85554	chr8:11725510,chr2:29451932	<p> <small>GSP2s</small>  <small>ALK_ch2_29451882_22_-A1_GSP2</small>  <small>ALK_ch2_29450487_24_-A1_GSP2</small>  <small>ALK_ch2_29448887_37_-A1_GSP2</small> </p>
46	STRN :: ALK	80.62016	chr2:37143221,chr2:29446394	<p> <small>GSP2s</small>  <small>ALK_ch2_29446355_20_-A1_GSP2</small>  <small>ALK_ch2_29446286_24_-A1_GSP2</small> </p>
47	STRN::ALK	87.5	chr2:37143221,chr2:29446394	<p> <small>GSP2s</small>  <small>ALK_ch2_29446355_20_-A1_GSP2</small>  <small>ALK_ch2_29446286_24_-A1_GSP2</small>  <small>ALK_ch2_29446481_22_-A1_GSP2</small> </p>
48	STRN :: ALK	92.81046	chr2:37143221,chr2:29446394	<p> <small>GSP2s</small>  <small>ALK_ch2_29446355_20_-A1_GSP2</small>  <small>ALK_ch2_29446286_24_-A1_GSP2</small>  <small>ALK_ch2_29446481_22_-A1_GSP2</small> </p>
49	IGH :: FGFR3	40	chr14:106208682,chr4:1806216	<p> <small>GSP2s</small>  <small>FGFR3_ch4_1806206_21_-A1_GSP2</small> </p>
50	PAX8::PPARG	50.70027	chr2:113994178,chr3:12421203	<p> <small>GSP2s</small>  <small>PAX8_ch2_113994184_20_-A1_GSP2</small>  <small>PPARG_ch3_12421207_26_-A1_GSP2</small>  <small>PAX8_ch2_113999155_21_-A1_GSP2</small>  <small>PPARG_ch3_12422826_24_-A1_GSP2</small> </p>

51	TFG :: MET	26.51	chr3:100455560,chr7:116414935	
63	POR :: BRAF	55.12	chr7:75601779,chr7:140487384	
64	CCDC6 :: RET	92.68	chr10:61665880,chr10:43612032	
65	ETV6 :: NTRK3	13.21	chr12:12006495,chr15:88576276	
66	ETV6 :: NTRK3	26.24	chr12:12006495,chr15:88576276	

## 2-2. 국내 외 보고된 *BRAF* 유전자 돌연변이가 없는 분화갑상선암 유전자 재배열과의 비교

본 연구에 포함된 환자들의 유전자 재배열을 이전 연구 들에서 보고된 유전자 재배열과 비교해보았다 (1, 21). 본 연구에 포함된 전체 *BRAF* 유전변이가 없는 갑상선암 (n=89), TCGA 의 *BRAF* 유전변이가 없는 갑상선 유두암 (n=244), 그리고 국내에서 발표한 *BRAF* 유전변이가 없는 분화갑상선암 (n=88) 환자들이 포함되었고 표 6 에 정리되어 있다 (1, 21). 전체 유전자 재배열이 확인된 환자는 본 연구의 경우 61.8%로 이전 연구들보다 높았고, 특히 *RET*, *NTRK1*, *NTRK3*, 그리고 *ALK* 의 경우 모두 다른 연구에 비교하여 높았다. 각각의 유전자 재배열에서 가장 흔한 *CCDC56::RET*, *ETV6::NTRK3*, *STRN::ALK* 파트너가 각각 10.1%, 13.5%, 그리고 7.9%로 다른 연구들보다 더 높은 빈도를 보였다. 본 연구에서 *FGFR2* 유전자 재배열은 확인되지 않았고, 다른 연구 들에서 확인되지 않은 *FGFR3* 유전자 재배열이 4.5%로 확인되었다. *BRAF* 유전자 재배열의 경우 다른 연구와 비슷하게 3.3%의 빈도로 발견되었다. 89 명 중 무작위로 연구에 포함된 45 명을 따로 분석하여 비교해보면 전체 유전자 재배열은 40%로 다른 두 연구보다 여전히 높지만, *RET* 과 *NTRK* 포함하여 큰 차이가 나지 않음을 알 수 있다.



**Table 6. Comparison of gene fusions in differentiated thyroid carcinoma with wild type *BRAF* from TCGA and SNU data**

	Current study Total patients (N=89)	Current study random enrollment (N=45)	TCGA data (N=244)	SNU data (N=88)
<b>Total gene fusions</b>	55 (61.8%)	18 (40.0%)	74 (30.3%)	23 (26.1%)
<b><i>BRAF</i></b>	3 (3.3%)	3 (6.7%)	13 (5.3%)	3 (3.4%)
<i>SND1::BRAF</i>	-	-	3 (1.2%)	1 (1.1%)
<i>MACF1::BRAF</i>	1 (1.1%)	1 (1.1%)	1 (0.4%)	-
<b><i>RET</i></b>	16 (17.9%)	7 (15.6%)	33 (13.5%)	4 (4.5%)
<i>CCDC6::RET</i>	9 (10.1%)	7 (15.6%)	21 (8.6%)	3 (3.4%)
<i>NCOA4::RET</i>	6 (6.7%)	-	5 (2.0%)	1 (1.1%)
<b><i>NTRK1</i></b>	6 (6.7%)	2 (4.4%)	4 (1.6%)	1 (1.1%)
<i>SQSTM1::NTRK1</i>	1 (1.1%)	-	1 (0.4%)	1 (1.1%)
<i>IRF2BP2::NTRK1</i>	1 (1.1%)	-	1 (0.4%)	-
<b><i>NTRK3</i></b>	17 (19.1%)	3 (6.7%)	6 (2.5%)	6 (6.8%)
<i>ETV6::NTRK3</i>	12 (13.5)	3 (6.7%)	5 (2.0%)	6 (6.8%)
<i>EML4::NTRK3</i>	2 (2.2%)	-	-	-
<b><i>ALK</i></b>	10 (11.2%)	2 (4.4%)	4 (1.6%)	1 (1.1%)
<i>STRN::ALK</i>	7 (7.9%)	2 (4.4%)	1 (0.4%)	1 (1.1%)
<i>EML4::ALK</i>	2 (2.2%)	-	1 (0.4%)	-
<b><i>MET</i></b>	1 (1.1%)	0 (0%)	1 (0.4%)	0 (0%)
<b><i>FGFR2</i></b>	0 (0%)	0 (0%)	2 (0.8%)	2 (2.3%)
<b><i>PAX-PPARG</i></b>	1 (1.1%)	1 (2.2%)	4 (1.6%)	2 (2.3%)
<b><i>FGFR3</i></b>	4 (4.5%)	2 (4.4%)	0 (0%)	0 (0%)

Abbreviations: TCGA, The cancer Genome Atlas; SNU, Seoul National University

### 3. 유전자 재배열 여부에 따른 임상 병리학적 특성 차이

본 연구에 포함된 *BRAF* 유전변이가 없는 분화갑상선암 환자들을 유전자 재배열 여부에 따라 두 그룹으로 나누었고 임상병리학적 특성을 표 7에 비교 정리하였다. 유전자 재배열이 있는 55 명의 환자들의 나이는 중앙값 41.6 세 (사분위수 34.3–51.6)로 유전자 재배열이 없는 대조군에 비교하여 유의미하게 젊었다 ( $p<0.001$ ). 또한 남자 환자가 (21.8%)로 유의미하게 더 적게 포함되었으며, 조직형으로 보았을 때에는 전통적인 유두암 환자가 대부분 (92.7%)을 차지하여 유의미한 차이를 보였다 ( $p<0.001$ ). 유전자 재배열이 있는 환자들의 원발 종양의 크기는 중앙 값 1.6 cm (사분위수 0.9–2.2)로 재배열이 없는 경우인 3.0 cm에 비교하여 유의미하게 작았다 ( $p<0.001$ ). 그러나, 육안적 및 현미경적 갑상선 외 침윤이 각각 12.7% 와 60%의 환자에서 확인되어 유전자 재배열이 없는 경우 (각각 23.5%와 14.7%)에 비교하여 유의미한 차이를 보였다 ( $p=0.002$ ). 유전자 재배열이 동반된 갑상선암에서의 림프침범 (lymphatic invasion)도 89.1%로 유전자 재배열이 없는 환자들의 50%에 비교하여 유의미하게 많았다 ( $p<0.001$ ). 종양의 경부 림프절 전이도 유전자 재배열이 동반된 갑상선암 환자 38 명 (69.1%)에서 보여 유전자 재배열이 없는 환자들에 비해 유의미하게 더 많았다 ( $p=0.003$ ). 하지만, 전이된 림프절의 크기나 림프절 외 침윤은 양군 사이에 통계적인 차이가 없었다. 병리학적 소견과 무관하게 무작위로 선별된 45 명의 환자에서 유전자 재배열에 따른 림프절 전이를 따로 분석하였을 때, 유전자 재배열이 있는 18 명의 경우 15 (83.3%)에서 림프절 전이가 있어 유전자 재배열이 없는 경우의 29.6%보다 유의미하게 더 많았다 ( $p<0.001$ ). 유전자 재배열이 있는 환자들의 수술조직에서 림프구성 갑상선염 (lymphocytic thyroiditis) 이 41.8%로 유전자 재배열이 없는 환자들의 26.5%에 비교하여 많이 발견되었으나 통계적으로 유의미하지는 않았다. 원격전이도 각각 2 명 (3.6%) 과 3 명 (8.8%)에서 보여 차이가 없었고, 5 명의 환자 모두 원격전이 일부 부위는 방사성요오드 섭취가 없는 방사성요오드 불응성을 보였다. 환자들의 나이가 상대적으로 젊고 원발 종양의 크기가 작아 (AJCC TNM) 8 판 기준에 따르면, 유전자 재배열이 있는 환자들을 경우 1기에 대부분 (89.1%)환자들이 포함되었다. 본 연구에 포함된 6 명의 갑상선여포암 환자들을 제외한 83 명의 환자들을 대상으로 분석하였을 때에도 유전자 재배열이 있는 환자들은 그렇지 않은 환자들에 비교하여, 유의미하게 젊은 나이, 작은 원발 종양의 크기, 더 많은 갑상선 외 침윤과 림프절 전이를 보였다.

**Table 7. Comparison of clinicopathological factors of patients with differentiated thyroid carcinoma according to the presence of gene fusions**

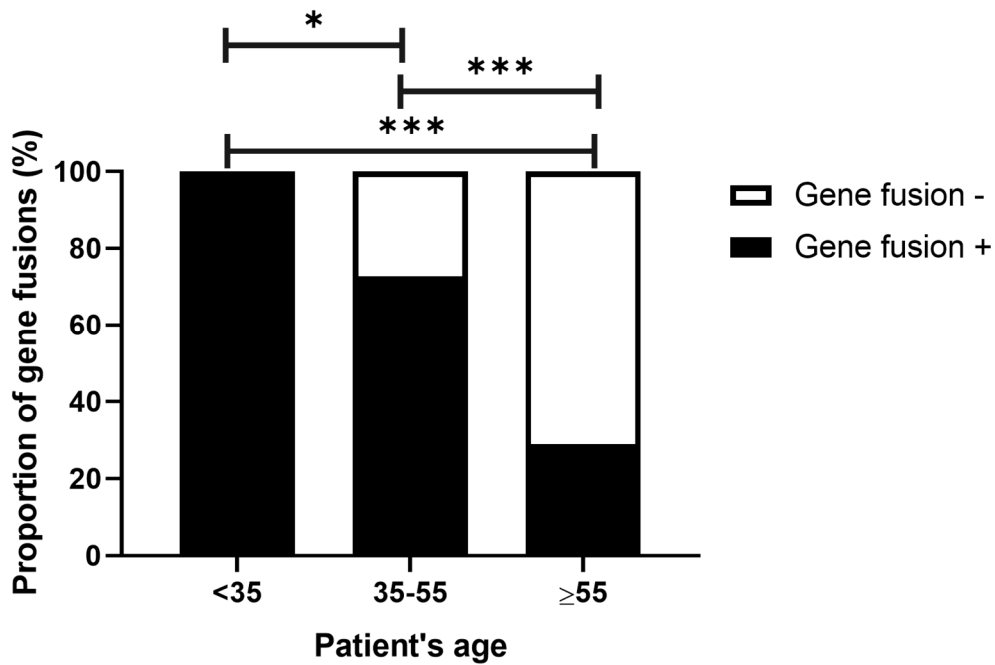
	<b>Gene fusion (N=55)</b>	<b>No gene fusion (N=34)</b>	<b>p- value</b>
<b>Age (years)</b>	41.6 (34.3–51.6)	60.1 (49.9–66.9)	<0.001
<b>Gender (male)</b>	12 (21.8%)	16 (47.1%)	0.024
<b>Histology</b>			<0.001
<b>Classic PTC</b>	51 (92.7%)	11 (32.4%)	<0.001
<b>Follicular variant PTC</b>	4 (7.3%)	15 (44.1%)	
<b>Tall cell subtype PTC</b>	0 (0%)	2 (5.9%)	
<b>Follicular thyroid carcinoma</b>	0 (0%)	6 (17.6%)	
<b>Primary tumor size (cm)</b>	1.6 (0.9–2.2)	3.0 (1.5–4.4)	<0.001
<b>Extrathyroidal extension</b>			0.002
<b>Microscopic</b>	33 (60.0%)	8 (23.5%)	
<b>Gross</b>	7 (12.7%)	5 (14.7%)	
<b>Multifocality (yes)</b>	21 (38.2%)	15 (44.1%)	0.740
<b>Vascular Invasion (yes)</b>	7 (12.7%)	9 (26.5%)	0.175
<b>Lymphatic Invasion (yes)</b>	49 (89.1%)	17 (50.0%)	<0.001
<b>Lymph node metastases (yes)</b>			0.003
<b>N1a</b>	16 (29.1%)	5 (14.7%)	
<b>N1b</b>	22 (40.0%)	6 (17.6%)	
<b>Metastatic lymph node size (mm)</b>	7.0 (3.0–13.0)	5.0 (2.5–7.0)	0.337
<b>Extranodal extension (yes)</b>	10 (18.2%)	4 (11.8%)	0.787
<b>Lymphocytic thyroiditis (yes)</b>	23 (41.8%)	9 (26.5%)	0.215
<b>Distant metastasis (yes)</b>	2 (3.6%)	3 (8.8%)	0.576
<b>AJCC TNM 8<sup>th</sup> stage</b>			0.009
<b>I</b>	49 (89.1%)	20 (58.8%)	
<b>II</b>	5 (9.1%)	10 (29.4%)	
<b>III</b>	0 (0%)	1 (2.9%)	
<b>IV</b>	1 (1.8%)	3 (8.5%)	

Abbreviations: PTC, papillary thyroid carcinoma; AJCC TNM, American Joint Committee on Cancer Tumor Node Metastasis

### 3-1. 나이에 따른 유전자 재배열 차이

환자들의 나이를 35 세 미만, 35 세 이상부터 55 세 미만, 그리고 55 세 이상으로 세 그룹으로 나누어서 유전자 재배열의 차이를 분석하였다 (그림 2). 세 그룹에 속하는 환자는 각각 14 명, 44 명 그리고 31 명이였다. 35 세 미만의 환자들은 100% 유전자 재배열을 보였고 이는 기타 두 그룹의 72.7%, 그리고 29.0%에 비교하여 유의미하게 높은 비율이였다 ( $p<0.05$  그리고  $p<0.001$ ). 또한, 55 세 이상의 환자들은 35 세부터 55 세 사이의 환자들에 비해서도 유의미하게 낮은 유전자 재배열 빈도를 보였다 ( $p<0.001$ )

Figure 4. Comparison of gene fusions according to age of the patients

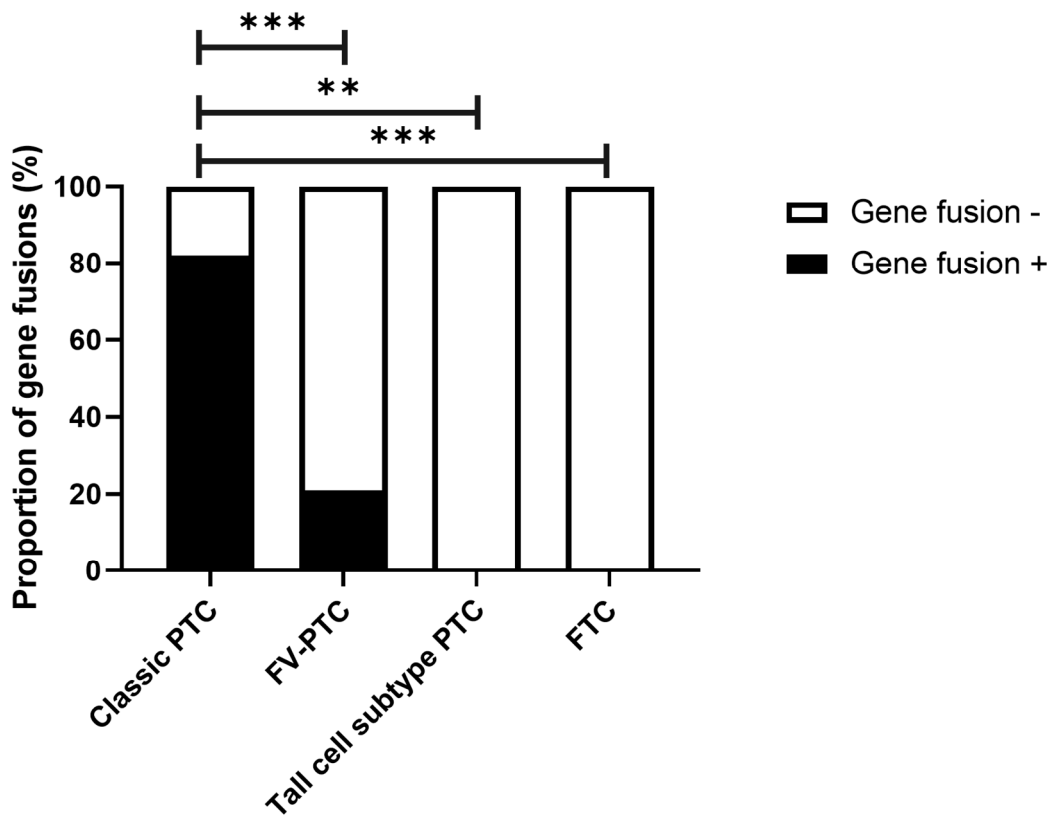


Asterisks \*\*\* indicate  $p<0.001$ , \* indicate  $p<0.05$ .

### 3-2. 원발 종양의 병리조직형에 따른 유전자 재배열 차이

그림 3 은 환자들의 병리조직형에 따른 유전자 재배열의 빈도 차이를 나타내었다. *BRAF* 유전자 돌연변이가 없는 전통적인 유두암에서는 82.3%에서 유전자 재배열이 확인되었으며, 여포 변이 유두암에서는 21.1%에서 유전자 재배열이 나타났다. 키 큰 세포 변이 유두암이나 갑상선 여포암에서는 유전자 재배열이 확인되지 않았다. 전통적인 유두암에서는 다른 병리조직형에 비교하여 유의미하게 높은 유전자 재배열 빈도를 보였다 ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ , 그리고  $p < 0.001$ ).

Figure 5. The frequency of gene fusions according to histopathological subtype



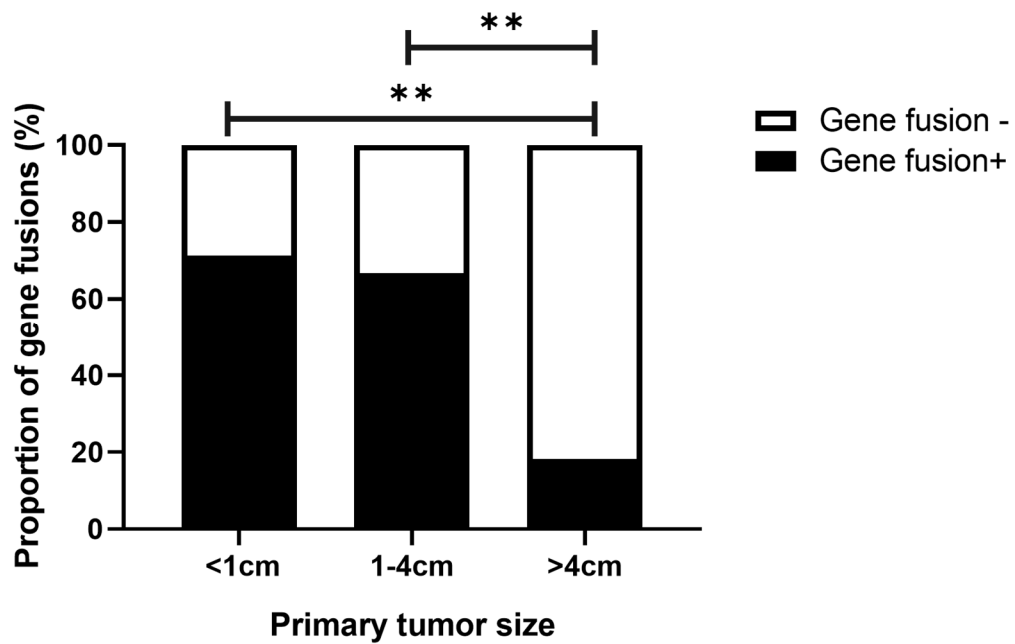
Abbreviations: PTC, papillary thyroid carcinoma; FV, follicular variant; FTC, follicular thyroid carcinoma.

Asterisks \*\*\* indicate  $p < 0.001$ , \*\* indicate  $p < 0.01$ .

### 3-3. 원발 종양의 크기에 따른 유전자 재배열 차이

원발 종양의 크기를 1 cm 이하, 1 cm 부터 4 cm 이하, 그리고 4 cm 보다 큰 경우로 나누어서 유전자 재배열의 빈도를 분석하였다 (그림 4). 세 그룹에 속하는 환자는 각각 21 명, 57 명, 그리고 11 명이였다. 종양의 크기가 상대적으로 작은 두 그룹은 각각 71.4%와 66.7%의 유전자 재배열을 보여, 종양의 크기가 4 cm 보다 큰 환자들에 비해 유의미하게 높은 유전자 재배열 빈도를 보였다 ( $p < 0.01$  그리고  $p < 0.01$ ).

Figure 6. Comparison of gene fusions according to tumor size (cm)

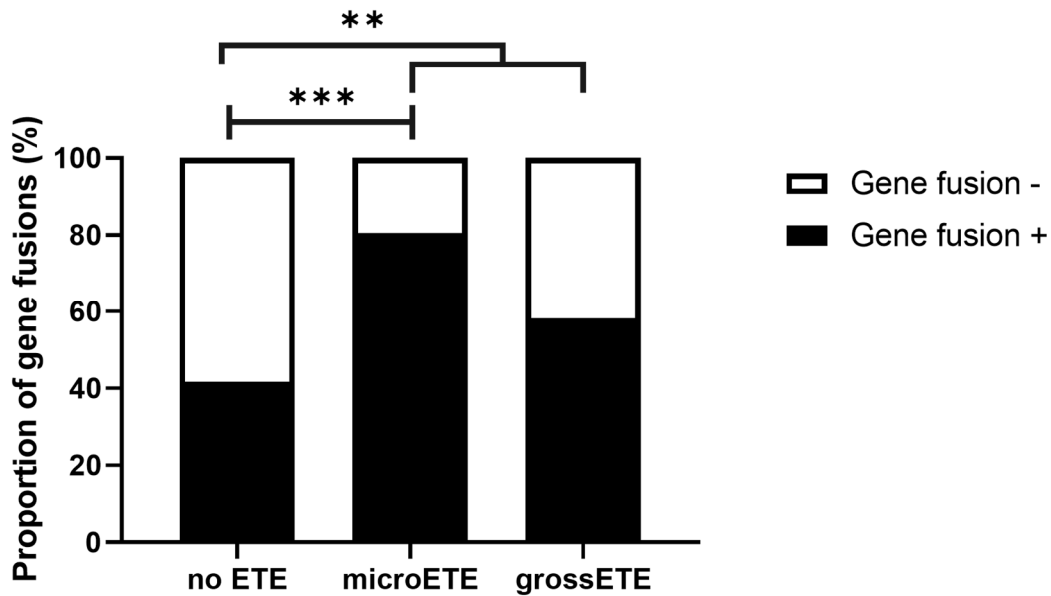


Asterisks \*\* indicate  $p < 0.01$ .

### 3-4. 갑상선 외 침윤에 따른 유전자 재배열 차이

갑상선암의 갑상선 외 침윤 여부에 따라 세분화하여 유전자 재배열을 분석하였다(그림 5). 갑상선 외 침범이 없는 경우에 (41.7%) 비교하여 미세 갑상선 외 침범이 있는 경우 (80.5%) 유의미하게 유전자 재배열이 유의미하게 더 많았고 ( $p<0.001$ ), 육안으로 갑상선 외 침범이 있는 경우는 (58.3%) 유전자 재배열이 더 많이 발견되기는 하였으나 통계적으로 유의미하지는 않았다. 현미경적 혹은 육안 갑상선 외 침윤이 있는 경우 (75.5%) 도 갑상선 외 침범이 없는 경우 (41.7%)에 비교하여 유의미하게 높은 유전자 재배열 빈도를 보였다 ( $p<0.01$ ).

Figure 7. Comparison of gene fusions according to extrathyroidal extension

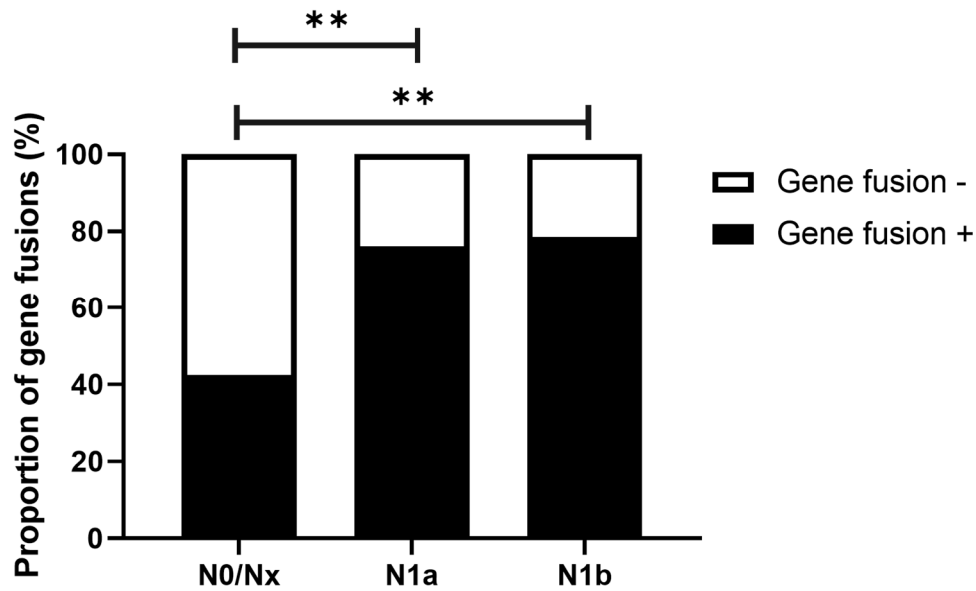


Abbreviations: ETE, extrathyroidal extension.  
Asterisks \*\*\* indicate  $p<0.001$ , \*\* indicate  $p<0.01$ .

### 3-5. 경부 림프절 전이에 따른 유전자 재배열 차이

그림 6은 경부 림프절 전이 유무와 위치에 따른 유전자 재배열의 빈도 차이를 보여주고 있다. 중앙 경부 림프절 전이 (N1a)가 있는 경우와 측경부 림프절 전이 (N1b)가 있는 경우 각각 76.2%와 78.6%의 유전자 재배열을 확인할 수 있었고, 림프절 전이가 없는 환자들 (42.5%) 보다 유의미하게 유전자 재배열 빈도가 높았다 ( $p<0.01$  그리고  $p<0.01$ ). 하지만, 림프절 전이의 범위 (N1a 와 N1b)에 따라서 유전자 재배열의 빈도는 통계적으로 유의미한 차이가 없었다.

Figure 8. Comparison of gene fusions according to cervical lymph node metastasis



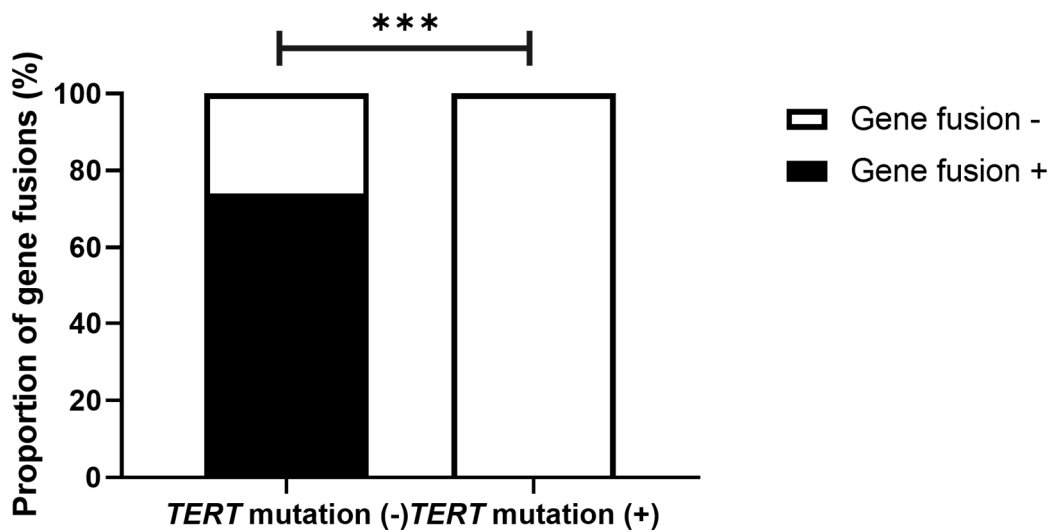
Asterisks \*\* indicate  $p<0.01$ .



#### 4. *TERT* 프로모터 돌연변이와 유전자 재배열의 연관성

본 연구에 포함된 89 명의 환자들 중 80 명에서 *TERT* 프로모터 유전자 돌연변이 검사가 시행되었다. 그 중 11 명 (13.8%)에서 유전자 변이가 확인되었으며 모두 C228T 변이로 확인되었다 (그림 1). 이들 중 6 명은 여포변이 유두암 환자였으며 1 명은 키 큰 세포 변이 유두암 환자였으며, 그리고 4 명은 갑상선 여포암 환자였다. 본 연구에 포함된 전통적인 유두암에서는 *TERT* 프로모터 돌연변이가 확인되지 않았다. *TERT* 프로모터 변이가 있는 환자들의 나이 중앙값은 66.8 세 (사분위수 57.8–70.0)로 변이가 없는 69 명의 환자들 45.1 세 (사분위수 37.4–56.4) 보다 유의미하게 많았다 ( $p < 0.001$ ). 69 명의 *TERT* 프로모터 변이가 없는 환자들 중에서는 73.9%의 유전자 재배열을 보였고, *TERT* 프로모터 변이가 있는 환자들은 유전자 재배열이 확인된 경우가 없어서 양군 사이에 유의미한 차이를 보였다 ( $p < 0.001$ , 그림 6)

Figure 9. Comparison of gene fusions according to presence of *TERT* promoter mutation



Asterisks \*\*\* indicate  $p < 0.001$ .

## 5. Pan-TRK 면역조직화학염색과 *NTRK* 유전자 재배열 연관성

본 연구에 포함된 89 명의 환자들 중 44 명에 대해 pan-TRK 면역조직화학염색을 시행하였고 12 명은 양성, 32 명은 음성으로 확인되었다. 이 환자들의 유전자 재배열을 통한 *NTRK* 유전자 재배열은 다음과 같다 (표 6). 즉, pan-TRK 면역조직화학염색은 58%의 민감도, 96%의 특이도, 92%의 양성예측도, 그리고 75%의 음성예측도를 보였다. *NTRK1* 유전자 재배열이 동반된 4 명의 환자들은 pan-TRK 면역조직화학염색에서 모두 양성이었다. *NTRK3* 유전자 재배열이 동반된 15 명의 환자들 중에서는 7 명 (46.7%)에서만 양성을 보였으나 양 군 사이에 통계적으로 유의미한 차이는 없었다 ( $p=0.177$ ).

**Table 8. The results of pan-TRK immunohistochemistry stain and *NTRK* fusion**

	<i>NTRK</i> fusion (+) (N=19)	<i>NTRK</i> fusion (-) (N=25)	Total
<b>Pan-TRK IHC stain</b>			
<b>Positive</b>	11(58%)	1 (4%)	12
<b>Negative</b>	8 (42%)	24 (96%)	32
<i>Sensitivity</i>		58%	
<i>Specificity</i>		96%	
<i>Positive Predictive Value</i>		92%	
<i>Negative Predictive Value</i>		75%	

## 고찰

갑상선암의 90%이상을 차지하는 분화 갑상선암은 10년 생존율이 85-95%로 예후가 매우 좋은 것으로 알려져 있다 (3, 48). 그러나 약 10%에서 원격 전이가 발생하며, 이 경우 10년 생존율이 40%까지 감소한다 (49). 이런 진행성 혹은 전이 갑상선암에 대해서는 정확한 유전자 프로파일을 확인하고 치료에 고려하는 것이 매우 중요하다. *NTRK* 억제제인 larotrectinib 과 entrectinib, *RET* 억제제인 selpercatinib 과 pralsetinib 은 갑상선암 환자들을 대상으로 한 연구에서 79-89%의 객관적 반응률을 보였고 심지어 larotrectinib 치료 군에서는 7%의 완전 관해라는 놀라운 치료효과를 보였다(27, 29, 30). 이러한 선택적 *NTRK* 억제제와 *RET* 억제제는 치료에 따른 부작용도 상대적으로 적어 유전자 재배열이 있는 환자들에게 훌륭한 치료 선택이 될 수 있다. 그러나, 유전자 재배열은 *BRAF*, *RAS* 유전자 돌연변이에 비교하여 상대적으로 낮은 빈도로 발견되고 검사의 비용이 비싸기에 현실적으로 모든 갑상선암 환자들에서 적용하기에는 제한점이 있다. 따라서 비용효과적으로 유전자 재배열이 있는 갑상선암 환자를 선별하는 프로토콜이 필요하며 이를 위해서는 해당 환자들의 임상병리학적 특성을 파악하는 것이 매우 중요하다.

본 연구에서 유전자 재배열이 확인된 55명의 환자들은 유전자 재배열이 없는 환자들에 비해, 유의미하게 나이가 어렸으며, 원발 종양의 크기는 작았다. 이전에 국내에서 보고한 한 연구에서도 비슷한 결과를 보였는데, 유전자 재배열이 있는 환자들은 driver-unknown (*BRAF*이나 *RAS* 등 small size mutation 과 유전자 재배열이 없는 경우) 환자들에 비교하였을 때 유의미하게 나이가 젊었다(21). 해당 연구에서 유전자 재배열이 있는 환자들의 수술조직에서 림프구성 갑상선염이 47.8%로 driver-unknown 환자들의 수술조직 (26.9%)에 비해 많이 발견이 되었으나 통계적으로 유의미하지 않았는데 이는 본 연구에서도 동일하게 보고되었다. 본 연구의 유전자 재배열이 있는 환자들 수술조직 41.8%에서 림프구성 갑상선염이 발견되었고 이 또한 유전자 재배열이 없는 환자들의 26.5%에 비교하여 더 높음을 알 수 있다. 림프구성 갑상선염과 유전자 재배열 연관성에 대해서는 앞으로 대규모 연구에서 확인이 필요하며 그 이전에 대해서도 연구가 필요할 것으로 생각한다. 이외 특징적인 병리학적 특징으로는 갑상선 외 침윤과 림프절 전이, 그리고 종양의 림프침범 (lymphatic invasion)이 유전자 재배열이 없는 환자들에 비교하여 유의미하게 많은 것을 확인할 수 있었다. 다른 한 연구에서도 비슷한 결과를 보고하였는데, 유전자 재배열이 있는 경우 림프혈관계 침범이 95%, 갑상선 외 침윤이 63%, 그리고 경부 림프절 전이가 79%로 흔하게 확인된다고 하였다 (38). 병리학적 소견을 보고

선별한 환자의 경우 림프절 전이가 있는 환자가 많이 포함되었을 가능성이 있어, 병리학적으로 무관하게 무작위로 선별된 45 명의 환자에서 유전자 재배열에 따른 림프절 전이를 따로 분석하였을 때에도 마찬가지로 유전자 재배열이 있는 경우 83.3%에서 림프절 전이가 있어 유전자 재배열이 없는 경우의 29.6%보다 유의미하게 더 많았다.

본 연구에서는 *BRAF* 유전자 돌연변이가 없는 환자들 중에서 89 명의 환자들을 선별하여 유전자 검사를 시행하였고 3 가지 종류의 다양한 패널로 유전자 재배열 검사를 진행하였다. 47 명은 17 개의 유전자를 선별하는 FusionPlex lung v2 패널로 검사를 하였고, 12 명은 108 개의 유전자를 선별하는 FusionPlex AMC solid tumor v2, 그리고 30 명의 환자들은 137 개의 유전자를 선별하는 FusionPlex Pan Solid v2 Panel 로 검사를 진행하였다. 실제 발견된 유전자 재배열을 보면 1 명의 환자에서만 FusionPlex Pan Solid v2 panel 에 포함된 *PAX8-PPARG* 유전자 재배열이 확인되었고 나머지 유전자 재배열은 모두 17 개의 유전자만을 포함한 FusionPlex Lung v2 패널에 포함된 유전자들이었다. 이 패널은 갑상선 암에서 자주 보고되는 *THADA*, *PPARG* 유전자 재배열을 포함하지 않았기에, 특정 유전자 재배열은 발견되지 않았거나 낮게 측정되었을 가능성 있다 (1, 15). 본 연구의 결과는 국내 갑상선암 환자를 대상으로 비용 효과적인 표적화 된 유전자 재배열 검사 패널을 개발할 때 큰 도움이 될 것이다.

이 연구에 포함된 89 명의 환자 중에서 55 명 (61.8%)에서 유전자 재배열이 확인되었고 *NTRK* (25.8%), *RET* (17.9%), 그리고 *ALK* (7.9%) 순서로 유전자 재배열이 확인되었다. 하지만 무작위로 선별된 45 명의 환자들을 대상으로 하였을 때에는 전체 유전자 재배열은 40%, *RET* 15.6%, *NTRK3* 6.7%, *NTRK1* 4.4%, *ALK* 4.4%, 그리고 *BRAF* 6.7%로 보였다 (표 4). 갑상선 유두암에 대한 이전 연구에서는 유전자 재배열이 전체적으로 6-46%, *RET* 유전자 재배열이 8-30%, *NTRK* 유전자 재배열이 2-5%, 그리고 *ALK* 유전자 재배열이 1-3%에 보고된 점을 고려하면 큰 빈도 차이는 보이지 않고 있다 (1, 15, 18, 38, 50-57). 본 연구가 *BRAF* 유전자 돌연변이가 없는 분화 갑상선암을 대상으로 하였기 때문에 표 4에서 제시한 것처럼 TCGA 연구나 국내 서울대에서 발표한 연구에서 *BRAF* 유전자 돌연변이가 없는 분화 갑상선암 환자들만 따로 분석을 하였고, 전체 89 명의 환자들은 여전히 빈도가 높으나 무작위 선별된 45 명의 환자들만 보았을 때에는 큰 차이가 없음을 알 수 있다(1, 21). 본 연구에서 *BRAF* 유전자 재배열은 3.3%로 보고되었는데 이는 다른 연구의 2.0-5.3%와 유사하다 (38). TCGA 연구에서 확인된 *MACF1::BRAF* 이외에도 *POR::BRAF*, *MACF1::BRAF* 유전자 재배열이 확인되었는데, 이들은 체르노빌 이후 발생

한 갑상선암 관련 연구에서 발표된 유전자 재배열 종류이다 (58).

본 연구에서는 이전 연구 들에서 보고되지 않았던 *FGFR3* 유전자 재배열이 환자 4 명 (Patient No. 14,15,20, 그리고 49)에서 발견되었고 이중 3 명은 다른 종류의 유전자 재배열 (*RET* 2 명, *NTRK1* 1 명) 과 동반되었다. 또한, *ALK* 와 *NTRK3* 유전자 재배열이 동시에 확인된 환자 (Patient No. 39)도 확인되었는데 이전 연구 들에서는 이중 유전자 재배열 (concomitant gene fusion)에 대해서는 보고가 없다. 따라서 위에 언급한 환자 5 명에 대해서는 Droplet Digital PCR 과 Sanger sequencing 을 통해 재확인이 필요하다. 이와 반대로 TCGA 연구와 국내 연구에서 0.8–2.3% 빈도로 확인되었던 *FGFR2* 유전자 재배열은 본 연구에서는 확인되지 않았는데 이는 해당 유전자 빈도가 낮고 포함된 환자 수가 적기 때문인 것으로 생각된다. 또한 갑상선암에서 *ROS1* 유전자 재배열은 매우 드물게 보고 되고 있으며 *ROS1::CCDC30*, *EZR::ROS1* 등 증례가 발표된 바가 있다 (42, 59). 그중 전이 성 갑상선 유두암 환자 한명은 *EZR::ROS1* 유전자 재배열이 확인되었고 해당 환자는 entrectinib 치료에 반응이 있었다(59).

*BRAF*의 점 돌연변이는 분화 갑상선암의 대표적인 돌연변이이며 이 중 V600E 돌연변이가 가장 흔하다(60). *BRAF* 유전자 돌연변이와 유전자재배열의 상관관계에 대해서는 아직 논란이 있다. TCGA 연구에서는 15.3%의 환자에서 유전자 재배열이 확인되었고 59.7%의 환자에서 *BRAF* 유전자 돌연변이가 확인되었으나 두 종류가 동반된 환자는 한 명도 없었다 (1). 국내 155 명 갑상선암 환자를 대상으로 한 연구에서도 마찬가지로 67 명의 *BRAF* 유전자 돌연변이가 확인된 환자와 23 명의 유전자 재배열이 확인된 환자들은 서로 다른 환자들이었다(21). 이렇듯, 많은 연구들은 갑상선암 환자에서 *RET* 을 포함한 유전자 재배열은 *BRAF* 돌연변이와 동시에 발생하지 않는다고 보고하였다(23, 24). 하지만 일부 연구들은 상반되는 결과를 보이며 *BRAF* 유전자 변이와 유전자 재배열이 함께 있는 경우가 2.5–19.4%로 다양하며, 종양의 임상병리학적 특징 및 환자의 임상적 예후 와도 연관된다고 보고하였다(61-64). 한 연구에서 54 명의 재발 PTC 환자 중 5 명 (9.3%)에서 *BRAF*<sup>V600E</sup> 돌연변이와 *RET* 유전자 재배열이 동시에 확인되었고, 이 환자들은 *BRAF* 돌연변이 단독으로 있는 환자들에 비해 유의미하게 나이가 많았다고 보고하였다 (63). 마찬가지로, 다른 연구에서도 *BRAF* 유전자 변이와 *RET* 유전자 재배열이 동시에 확인된 환자들은 stage III 혹은 IV 로 상대적으로 진행된 갑상선암 환자들이었다고 보고하였다 (62). 또 다른 연구에서는 72 명의 PTC 환자 중 *BRAF* 돌연변이와 *RET* 유전자 재배열이 동시에 있는 경우가 무려 14 명 (19.4%) 으로 많았으며, 종양의 stage 는

다른 경우에 비교하여 큰 차이가 없음을 보고하였다 (64). 2020년 12월부터 서울아산 병원에서 수술을 받은 모든 갑상선암 환자들의 검체에선 *BRAF* 유전자 돌연변이 검사를 진행하였고 2022년 4월까지 수술한 2666명의 갑상선암 환자 중 766명 (28.7%)에서 돌연변이가 있는 것으로 확인되었다 (unpublished data). 이 연구는 효율적인 유전자재배열 선별을 위해 *BRAF* 돌연변이가 없는 환자들을 대상으로 진행하였고 높은 빈도의 유전자 재배열을 확인하였다. 특히 내분비 병리학자가 병리소견을 보고 환자를 선별하였을 때, 유의미하게 높은 유전자 재배열이 동반된 환자를 선별할 수 있으며, 특히 매우 효율적으로 *NTRK3* 유전자 재배열을 선별할 수 있음을 보여주었다.

*TERT* 프로모터 돌연변이는 갑상선 암에서 불량한 예후와 연관되며, 진행성 분화 갑상선암, 저분화 갑상선암과 미분화 갑상선암에서 많이 나타나는 것으로 알려져 있다(8, 65-67). TCGA 연구에서는 2명의 환자에서 각각 *BRAF*, *RET* 유전자 재배열과 함께 *TERT* C228 유전자 변이가 함께 발견이 되었다 (1). 또 다른 연구 들에서는 *NTRK* 유전자 재배열 역시 *TERT* C228 변이와 동반되어 있는 사례들을 보고하였다 (37, 39). 방사성요오드 불응성 갑상선암을 대상으로 한 유럽의 한 연구에서, 132명의 환자 중 7명에서 유전자 재배열이 확인되었고, 그중 3명에서 각각 *RET*, *ALK*, *NTRK1* 유전자 재배열과 함께 *TERT* C228 변이가 동반되어 있었다 (22). 본 연구에서는 80명의 환자 들에서 C228T와 C250T 돌연변이를 분석하였고, *TERT* 프로모터 변이가 발견된 11명의 환자들은 모두 유전자 재배열을 보이지 않았다. 이 환자들은 각각 6명의 여포변이 유두암, 1명의 키큰세포 변이 유두암, 그리고 4명의 갑상선 여포암 환자들이었다. 본 연구에는 *BRAF*와 *TERT* 프로모터 돌연변이가 모두 없는 전통적인 유두암 환자들이 대부분 포함되고, 환자를 선별하는 과정에 상대적으로 젊은 환자들이 많이 포함된 것이 *TERT* 프로모터 변이와 유전자 재배열이 동반되는 환자가 발견되지 않은 원인일 수도 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서는 병리학자가 선별한 45명 환자들의 갑상선암 조직에 대해 pan-TRK IHC을 시행하였다. 폐암에 대한 연구에서 pan-TRK 면역조직화학염색은 다양한 폐암 조직형에 따라 발현이 낮고 *NTRK* 유전자 예측을 못한다고 보고하였다(68). 이와 반면에, 다른 한 연구에서는 21개의 *NTRK* 유전자 재배열이 있는 고형암 조직 중 20개 (95.2%)에서 pan-TRK IHC양성을 보였다고 발표하였으나 갑상선암 환자를 포함하지는 않았다 (69). 최근에 발표된 한 연구에서는 307명의갑상선 유두암 환자에서 pan-TRK IHC와 fluorescence *in situ* hybridization (FISH)를 시행하였고, 18명의 pan-TRK IHC 양성인 환자 중 2명 (11.1%)에서 각각 *NTRK1*과 *NTRK3* 유전자 재배열이 확인되었다 (43). 동일

한 연구에서 18 명의 미분화 갑상선암 환자 중 1 명에 Pan-TRK IHC 양성을 보였고 이 환자는 FISH 에서 유전자 재배열이 확인되었다(43). 반면에 본 연구에서는 pan-TRK IHC 양성을 보인 12 명의 환자 중 11 명 (92%)에서 양성을 보여 높은 양성예측도를 보여주었다. 따라서 모든 환자들에 대해 유전자 재배열 패널을 1 차적으로 사용하여 검사를 하기 힘들 때, 순차적으로 면역조직화학염색을 먼저 하고 다음으로 *NTRK* 변이가 배제가 안 되는 환자들에 대해 유전자 재배열 패널을 이용한 검사를 하는 것이 도움이 될 것이다. *NTRK* 뿐만이 아니라 *ALK* IHC 도 갑상선암 환자에서 효율적으로 *ALK* 재배열 유무를 선별할 수 있음을 보고하였다 (43, 57). 이는 앞으로 *RET*, *BRAF*, *ROS1* 등 단백질에 대한 면역조직화학염색도 확장할 수 있는 가능성을 제시하였다.

이 연구의 한계점으로는 첫째, 모든 *BRAF* 돌연변이가 없는 환자들을 대상으로 하였고 또 그 중에서도 환자를 선별하여 유전자 재배열 검사를 진행하였기에 선택 편향이 존재하고, 이로 인해 *NTRK* 를 포함한 대부분 유전자 재배열 빈도가 다른 연구들에 비해 상대적으로 높게 보고되었을 가능성이 있다. 하지만 보다 비용 효과적인 검사 프로토콜을 개발하고, 더 많은 유전자 재배열 환자를 포함하여 임상병리학적 특성을 확인하는 것에는 도움이 되었다. 둘째, *TERT* 프로모터 이외 *RAS* 등 중요한 driver 유전자 검사들은 진행되지 않아, 다른 유전자와 변이와의 연관성은 알기 어려웠다. 셋째, 본 연구에서 대부분의 유전자 재배열은 전통적인 유두암에서 보였고 키 큰 세포 변이 유두암과 갑상선 여포암에서는 확인되지 않았다. 갑상선 여포암에서 *PAX8-PPARG* 유전자 재배열은 보통 갑상선 여포암에서 발생하며 그 빈도는 보통 30-60% 로 비교적 높으나 (15), 본 연구에서는 포함된 갑상선 여포암 환자 수가 적어서 해당 유전자 재배열을 확인할 수 없었다. 또한, 키 큰 세포 변이 유두암을 포함한 aggressive variants 갑상선 유두암의 경우 *BRAF* 유전자 변이가 많게는 89%까지 동반되어 있어 (67), *BRAF* 유전자 변이가 없는 환자를 대상으로 한 본 연구에 2 명밖에 포함시킬 수 없었다. 이외, 저분화암과 미분화암 환자들도 포함시키지 못했다. 넷째, 이 연구에 포함된 환자들은 3 가지 패널로 검사를 진행하여 유전자 재배열 빈도 사이에 차이가 있을 수 있다. 하지만 치료 표적이 가능한 대부분 유전자 재배열은 Fusingplex lung v2 panel 에 포함되었고, 실제로 더 많은 유전자를 포함한 패널로 검사를 진행한 42 명의 환자 중 1 명에서만 *PAX8-PPARG* 유전자 재배열이 발견되어 전체적인 결과에 큰 영향은 없었을 것으로 보인다. 마지막으로 대부분 환자들이 수술 이후 마지막 추적까지 2 년이 경과되지 않아 아직 재발, 사망 등 예후와 연관해서는 분석이 이루어지지 않았다는 점이다. 하지만 이 연구는 유전

자 재배열이 동반된 갑상선암에 대한 이해와 개별화된 치료 방법에 대한 연구를 이어갈 수 있고, 또한 앞으로 환자의 예후를 분석하고 갑상선암 재분화 유도 연구에도 활용할 수 있다는 점에서 큰 장점이 있다.



## 결론

본 연구는 *BRAF* 유전자 돌연변이가 없는 갑상선암 환자들을 선별하여 Fusionplex panel 을 이용하여 유전자 재배열 검사를 진행하고 환자들의 임상병리학적 특징에 대해 조사하였다. 유전자 재배열이 있는 환자들은 재배열이 없는 환자들에 비해, 유의하게 나이가 어렸으며, 원발 종양의 크기는 작았으나 갑상선 외 침윤과 림프절 전이가 더 많았다. 유전자 재배열은 classic PTC 에서 가장 많이 보였으며, *TERT* 프로모터 변이와 동반된 환자는 없었다. 89 명의 환자 중에서 55 명 (61.8%)에서 유전자 재배열이 확인되었으며, 치료 표적이 되는 유전자 재배열 중에서 *NTRK* 유전자 재배열이 25.8%로 가장 많았고 다음으로 *RET* (17.9%), 그리고 *ALK* (7.9%) 유전자 재배열 순서로 많았다. 이는 다른 연구 들에서 보고한 빈도보다 높았으나, 무작위로 포함시킨 환자만 대상으로 분석했을 때에는 전체 유전자 재배열 40%, *RET* 15.6%, *NTRK3* 6.7%, *NTRK1* 4.4%, *ALK* 4.4%로 다른 연구들과 비슷하거나 조금 높은 빈도를 보였다.

주목할 점은, 내분비 병리학자가 조직학적 소견을 보고 선별한 44 명의 환자들은 무작위로 포함시킨 45 명 환자들에 비해 유의하게 높은 전체 유전자 재배열 특히 *NTRK3* 비율을 보여주었다. 따라서, 조직학적 소견에서 다결절성 침윤, 광범위한 기질의 섬유화, 혼합된 다양한 성장양상과 다양한 정도의 핵의 이형성, 종양세포의 투명한 세포질 변화, 그리고 빈번한 림프절 전이를 보이는 경우 유전자 재배열을 의심해보고 환자를 선별하는 것이 매우 효율적인 방법임을 제시하였다. 또한, pan-TRK IHC 의 경우 92%의 높은 양성예측도를 보여주었다. 따라서 병리학적 소견에 이어 면역조직화학염색을 순차적으로 진행하면 보다 효율적으로 유전자 재배열을 선별할 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구는 *BRAF* 돌연변이가 없는 젊은 환자에서 원발 종양의 크기는 비교적 작으나 갑상선 외 침윤이나 림프절 전이가 많을 때, 더불어 다결절성 침윤, 광범위한 기질의 섬유화 등 특징적인 병리학적 소견을 보일 때 치료 표적이 되는 *NTRK*, *RET*, 그리고 *ALK* 유전자 재배열 검사를 선별적으로 해보는 것이 도움이 될 수 있음을 제시하고 있다. 본 연구의 결과는 앞으로 비용 효과적인 유전자 재배열 선별검사와 진단 프로토콜을 개발하는데 도움이 될 것이며, 갑상선암 환자 특히 표적치료가 필요한 방사성요오드 불응성 전이 갑상선암 환자들의 개별화 치료 결정에도 큰 도움이 될 것이라 생각한다.

## 참고문헌

1. Agrawal N AR, Aksoy BA, Ally A, Arachchi H, Asa SL, Auman JT, Balasundaram M, Balu S, Baylin SB. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell*. 2014;159(3):676-90.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-49.
3. Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR. A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995 [see comments]. *Cancer*. 1998;83(12):2638-48.
4. Song YS, Lim JA, Park YJ. Mutation Profile of Well-Differentiated Thyroid Cancer in Asians. *Endocrinology and metabolism (Seoul, Korea)*. 2015;30(3):252-62.
5. Nikiforov YE. Thyroid carcinoma: molecular pathways and therapeutic targets. *Mod Pathol*. 2008;21 Suppl 2(Suppl 2):S37-43.
6. Gianoukakis AG, Giannelli SM, Salameh WA, McPhaul LW. Well differentiated follicular thyroid neoplasia: impact of molecular and technological advances on detection, monitoring and treatment. *Mol Cell Endocrinol*. 2011;332(1-2):9-20.
7. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
8. Landa I, Ibrahimasic T, Boucai L, Sinha R, Knauf JA, Shah RH, et al. Genomic and transcriptomic hallmarks of poorly differentiated and anaplastic thyroid cancers. *J Clin Invest*. 2016;126(3):1052-66.
9. Yoo SK, Song YS, Lee EK, Hwang J, Kim HH, Jung G, et al. Integrative analysis of genomic and transcriptomic characteristics associated with progression of aggressive thyroid cancer. *Nat Commun*. 2019;10(1):2764.
10. Pozdeyev N, Gay LM, Sokol ES, Hartmaier R, Deaver KE, Davis S, et al. Genetic Analysis of 779 Advanced Differentiated and Anaplastic Thyroid Cancers. *Clin Cancer Res*. 2018;24(13):3059-68.
11. Song E, Jin M, Jang A, Jeon MJ, Song DE, Yoo HJ, et al. Mutation in Genes Encoding Key Functional Groups Additively Increase Mortality in Patients with BRAF(V600E)-Mutant Advanced Papillary Thyroid Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2021;13(22).
12. National Comprehensive Cancer Network. NCCN clinical practice guidelines in oncology: thyroid carcinoma. Plymouth Meeting: NCCN Guideline Version 1.2023 [Internet].
13. Davare MA, Tognon CE. Detecting and targeting oncogenic fusion proteins in the genomic era. *Biol Cell*. 2015;107(5):111-29.
14. Yoshihara K, Wang Q, Torres-Garcia W, Zheng S, Vegesna R, Kim H, et al. The landscape and therapeutic relevance of cancer-associated transcript fusions. *Oncogene*. 2015;34(37):4845-54.
15. Yakushina VD, Lerner LV, Lavrov AV. Gene Fusions in Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2018;28(2):158-67.
16. Stransky N, Cerami E, Schalm S, Kim JL, Lengauer C. The landscape of kinase fusions in cancer. *Nat Commun*. 2014;5:4846.
17. Amatu A, Sartore-Bianchi A, Siena S. NTRK gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumour types. *ESMO Open*. 2016;1(2):e000023.
18. Klugbauer S, Lengfelder E, Demidchik EP, Rabes HM. High prevalence of RET rearrangement in thyroid tumors of children from Belarus after the Chernobyl reactor accident. *Oncogene*. 1995;11(12):2459-67.
19. Smida J, Salassidis K, Hieber L, Zitzelsberger H, Kellerer AM, Demidchik EP, et al. Distinct frequency of ret rearrangements in papillary thyroid carcinomas of children and adults from Belarus. *Int J Cancer*. 1999;80(1):32-8.

20. Ciampi R, Nikiforov YE. RET/PTC rearrangements and BRAF mutations in thyroid tumorigenesis. *Endocrinology*. 2007;148(3):936-41.
21. Yoo SK, Lee S, Kim SJ, Jee HG, Kim BA, Cho H, et al. Comprehensive Analysis of the Transcriptional and Mutational Landscape of Follicular and Papillary Thyroid Cancers. *PLoS Genet*. 2016;12(8):e1006239.
22. van der Tuin K, Ventayol Garcia M, Corver WE, Khalifa MN, Ruano Neto D, Corssmit EPM, et al. Targetable gene fusions identified in radioactive iodine refractory advanced thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol*. 2019;180(4):235-41.
23. Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Lima J, Castro P, Preto A, et al. BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene*. 2003;22(29):4578-80.
24. Liang J, Cai W, Feng D, Teng H, Mao F, Jiang Y, et al. Genetic landscape of papillary thyroid carcinoma in the Chinese population. *J Pathol*. 2018;244(2):215-26.
25. Drilon A, Laetsch TW, Kummar S, DuBois SG, Lassen UN, Demetri GD, et al. Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion-Positive Cancers in Adults and Children. *N Engl J Med*. 2018;378(8):731-9.
26. Hong DS, DuBois SG, Kummar S, Farago AF, Albert CM, Rohrberg KS, et al. Larotrectinib in patients with TRK fusion-positive solid tumours: a pooled analysis of three phase 1/2 clinical trials. *Lancet Oncol*. 2020;21(4):531-40.
27. Waguespack SG, Drilon A, Lin JJ, Brose MS, McDermott R, Almubarak M, et al. Efficacy and safety of larotrectinib in patients with TRK fusion-positive thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol*. 2022;186(6):631-43.
28. Doebele RC, Drilon A, Paz-Ares L, Siena S, Shaw AT, Farago AF, et al. Entrectinib in patients with advanced or metastatic NTRK fusion-positive solid tumours: integrated analysis of three phase 1-2 trials. *Lancet Oncol*. 2020;21(2):271-82.
29. Wirth LJ, Sherman E, Robinson B, Solomon B, Kang H, Lorch J, et al. Efficacy of Selpercatinib in RET-Altered Thyroid Cancers. *N Engl J Med*. 2020;383(9):825-35.
30. Subbiah V, Hu MI, Wirth LJ, Schuler M, Mansfield AS, Curigliano G, et al. Pralsetinib for patients with advanced or metastatic RET-altered thyroid cancer (ARROW): a multi-cohort, open-label, registrational, phase 1/2 study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2021;9(8):491-501.
31. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2010;363(18):1693-703.
32. Shaw AT, Engelman JA. Ceritinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2014;370(26):2537-9.
33. Ji JH, Oh YL, Hong M, Yun JW, Lee HW, Kim D, et al. Identification of Driving ALK Fusion Genes and Genomic Landscape of Medullary Thyroid Cancer. *PLoS Genet*. 2015;11(8):e1005467.
34. Nikitski AV, Condello V, Divakaran SS, Nikiforov YE. Inhibition of ALK-Signaling Overcomes STRN-ALK-Induced Downregulation of the Sodium Iodine Symporter and Restores Radioiodine Uptake in Thyroid Cells. *Thyroid*. 2023;33(4):464-73.
35. Marchiò C, Scaltriti M, Ladanyi M, Iafrate AJ, Bibeau F, Dietel M, et al. ESMO recommendations on the standard methods to detect NTRK fusions in daily practice and clinical research. *Ann Oncol*. 2019;30(9):1417-27.
36. Belli C, Penault-Llorca F, Ladanyi M, Normanno N, Scoazec JY, Lacroix L, et al. ESMO recommendations on the standard methods to detect RET fusions and mutations in daily practice and clinical research. *Ann Oncol*. 2021;32(3):337-50.
37. Chu YH, Dias-Santagata D, Farahani AA, Boyraz B, Faquin WC, Nosé V, et al. Clinicopathologic and molecular characterization of NTRK-rearranged thyroid carcinoma (NRTC). *Mod Pathol*. 2020;33(11):2186-97.

38. Chu YH, Wirth LJ, Farahani AA, Nosé V, Faquin WC, Dias-Santagata D, et al. Clinicopathologic features of kinase fusion-related thyroid carcinomas: an integrative analysis with molecular characterization. *Mod Pathol.* 2020;33(12):2458-72.
39. Pekova B, Sykorova V, Mastnikova K, Vaclavikova E, Moravcova J, Vlcek P, et al. NTRK Fusion Genes in Thyroid Carcinomas: Clinicopathological Characteristics and Their Impacts on Prognosis. *Cancers (Basel).* 2021;13(8).
40. Ma Y, Zhang Q, Zhang K, liang Y, Ren F, Zhang J, et al. NTRK fusions in thyroid cancer: Pathology and clinical aspects. *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* 2023;184:103957.
41. Rabes HM, Demidchik EP, Sidorow JD, Lengfelder E, Beimfohr C, Hoelzel D, et al. Pattern of radiation-induced RET and NTRK1 rearrangements in 191 post-chernobyl papillary thyroid carcinomas: biological, phenotypic, and clinical implications. *Clin Cancer Res.* 2000;6(3):1093-103.
42. Ritterhouse LL, Wirth LJ, Randolph GW, Sadow PM, Ross DS, Liddy W, et al. ROS1 Rearrangement in Thyroid Cancer. *Thyroid.* 2016;26(6):794-7.
43. Nozaki Y, Yamamoto H, Iwasaki T, Sato M, Jiomaru R, Hongo T, et al. Clinicopathological features and immunohistochemical utility of NTRK-, ALK-, and ROS1-rearranged papillary thyroid carcinomas and anaplastic thyroid carcinomas. *Hum Pathol.* 2020;106:82-92.
44. Pekova B, Sykorova V, Dvorakova S, Vaclavikova E, Moravcova J, Katra R, et al. RET, NTRK, ALK, BRAF, and MET Fusions in a Large Cohort of Pediatric Papillary Thyroid Carcinomas. *Thyroid.* 2020;30(12):1771-80.
45. Smith GD, Zhou L, Rowe LR, Jarboe EA, Collins BT, Bentz JS, et al. Allele-specific PCR with competitive probe blocking for sensitive and specific detection of BRAF V600E in thyroid fine-needle aspiration specimens. *Acta Cytol.* 2011;55(6):576-83.
46. Liu X, Qu S, Liu R, Sheng C, Shi X, Zhu G, et al. TERT promoter mutations and their association with BRAF V600E mutation and aggressive clinicopathological characteristics of thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(6):E1130-6.
47. Xing M, Liu R, Liu X, Murugan AK, Zhu G, Zeiger MA, et al. BRAF V600E and TERT promoter mutations cooperatively identify the most aggressive papillary thyroid cancer with highest recurrence. *J Clin Oncol.* 2014;32(25):2718-26.
48. Han JM, Bae JC, Kim HI, Kwon S, Jeon MJ, Kim WG, et al. Clinical Outcomes of Differentiated Thyroid Cancer Patients with Local Recurrence or Distant Metastasis Detected in Old Age. *Endocrinol Metab (Seoul).* 2018;33(4):459-65.
49. Schlumberger MJ. Papillary and follicular thyroid carcinoma. *N Engl J Med.* 1998;338(5):297-306.
50. Prasad ML, Vyas M, Horne MJ, Virk RK, Morotti R, Liu Z, et al. NTRK fusion oncogenes in pediatric papillary thyroid carcinoma in northeast United States. *Cancer.* 2016;122(7):1097-107.
51. Lu Z, Zhang Y, Feng D, Sheng J, Yang W, Liu B. Targeted next generation sequencing identifies somatic mutations and gene fusions in papillary thyroid carcinoma. *Oncotarget.* 2017;8(28):45784-92.
52. Fenton CL, Lukes Y, Nicholson D, Dinauer CA, Francis GL, Tuttle RM. The ret/PTC mutations are common in sporadic papillary thyroid carcinoma of children and young adults. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(3):1170-5.
53. Liu RT, Chou FF, Wang CH, Lin CL, Chao FP, Chung JC, et al. Low prevalence of RET rearrangements (RET/PTC1, RET/PTC2, RET/PTC3, and ELKS-RET) in sporadic papillary thyroid carcinomas in Taiwan Chinese. *Thyroid.* 2005;15(4):326-35.
54. Guerra A, Sapio MR, Marotta V, Campanile E, Moretti MI, Deandrea M, et al. Prevalence of RET/PTC rearrangement in benign and malignant thyroid nodules and its clinical application. *Endocr J.* 2011;58(1):31-8.

55. Kelly LM, Barila G, Liu P, Evdokimova VN, Trivedi S, Panebianco F, et al. Identification of the transforming STRN-ALK fusion as a potential therapeutic target in the aggressive forms of thyroid cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(11):4233-8.
56. Pérot G, Soubeyran I, Ribeiro A, Bonhomme B, Savagner F, Boutet-Bouzamondo N, et al. Identification of a recurrent STRN/ALK fusion in thyroid carcinomas. *PLoS One*. 2014;9(1):e87170.
57. Park G, Kim TH, Lee HO, Lim JA, Won JK, Min HS, et al. Standard immunohistochemistry efficiently screens for anaplastic lymphoma kinase rearrangements in differentiated thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2015;22(1):55-63.
58. Efanov AA, Brenner AV, Bogdanova TI, Kelly LM, Liu P, Little MP, et al. Investigation of the Relationship Between Radiation Dose and Gene Mutations and Fusions in Post-Chernobyl Thyroid Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2018;110(4):371-8.
59. Liu SV, Macke LA, Colton BS, Imran SS, Christiansen J, Chow-Maneval E, et al. Response to Entrectinib in Differentiated Thyroid Cancer With a ROS1 Fusion. *JCO Precis Oncol*. 2017;1.
60. Tavares C, Melo M, Cameselle-Teijeiro JM, Soares P, Sobrinho-Simões M. ENDOCRINE TUMOURS: Genetic predictors of thyroid cancer outcome. *Eur J Endocrinol*. 2016;174(4):R117-26.
61. Zhang R, Dong L, Yu J. Concomitant Pathogenic Mutations and Fusions of Driver Oncogenes in Tumors. *Front Oncol*. 2020;10:544579.
62. Zou M, Baitei EY, Alzahrani AS, BinHumaid FS, Alkhafaji D, Al-Rijjal RA, et al. Concomitant RAS, RET/PTC, or BRAF mutations in advanced stage of papillary thyroid carcinoma. *Thyroid*. 2014;24(8):1256-66.
63. Henderson YC, Shellenberger TD, Williams MD, El-Naggar AK, Fredrick MJ, Cieply KM, et al. High rate of BRAF and RET/PTC dual mutations associated with recurrent papillary thyroid carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2009;15(2):485-91.
64. Guerra A, Zeppa P, Bifulco M, Vitale M. Concomitant BRAF(V600E) mutation and RET/PTC rearrangement is a frequent occurrence in papillary thyroid carcinoma. *Thyroid*. 2014;24(2):254-9.
65. Landa I, Ganly I, Chan TA, Mitsutake N, Matsuse M, Ibrahimspasic T, et al. Frequent somatic TERT promoter mutations in thyroid cancer: higher prevalence in advanced forms of the disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(9):E1562-6.
66. Liu X, Bishop J, Shan Y, Pai S, Liu D, Murugan AK, et al. Highly prevalent TERT promoter mutations in aggressive thyroid cancers. *Endocr Relat Cancer*. 2013;20(4):603-10.
67. Jin M, Song DE, Ahn J, Song E, Lee YM, Sung TY, et al. Genetic Profiles of Aggressive Variants of Papillary Thyroid Carcinomas. *Cancers (Basel)*. 2021;13(4).
68. Strohmeier S, Brcic I, Popper H, Liegl-Atzwanger B, Lindenmann J, Brcic L. Applicability of pan-TRK immunohistochemistry for identification of NTRK fusions in lung carcinoma. *Sci Rep*. 2021;11(1):9785.
69. Hechtman JF, Benayed R, Hyman DM, Drilon A, Zehir A, Frosina D, et al. Pan-Trk Immunohistochemistry Is an Efficient and Reliable Screen for the Detection of NTRK Fusions. *Am J Surg Pathol*. 2017;41(11):1547-51.

## 영문요약

**Background:** Gene fusions play important roles in pathogenesis of cancer and have been used as diagnostic and prognostic markers in various cancers. The prevalence of gene fusions in thyroid cancer is ranges from single cases up to 80%. As targeted therapies for actionable gene fusions have been developed, the clinical importance of targeted gene fusions is being emphasized. Study evaluating clinical and pathological features of patients with gene fusions is needed in order to screen gene fusions cost-effectively.

**Methods:** Among patients who diagnosed with thyroid cancer without *BRAF* gene mutation, an experienced endocrinology pathologist selected 44 patients with suspected gene fusion based on H&E slide findings and performed pan-TRK immunohistochemical (IHC) staining and gene fusion test prospectively. Pathological findings include multinodular growth pattern, prominent intratumoral fibrosis, clear cytoplasm and multiple cervical lymph node metastasis. During the same period, 45 patients with thyroid cancer without *BRAF* gene mutation were randomly included for gene fusion test. Therefore, a total of 89 formalin fixed paraffin embedded (FFPE) thyroid cancer tissues with wild type *BRAF* mutation were collected for gene fusion test. After extracting mRNA from FFPE, gene fusions were analyzed using Archer Fusionplex panels. The prevalence of each gene fusion was compared in patients who were selected by pathologist based on histological finding and who were randomly selected. We also compared the prevalence of gene fusions with the results of other studies. The difference of clinical and pathological characteristics of patients with gene fusions was evaluated. We also investigated the association between *TERT* promoter mutation and gene fusions. Finally, the predictive value of *NTRK* gene fusions by pan-TRK IHC was also analyzed.

**Results:** The median age of the total patients was 46.9 years old and 31.5% were male. Eithy-three patients were diagnosed with papillary thyroid carcinoma (PTC) and the other 6 were with follicular thyroid carcinoma (FTC). Among 89 patients with wild type *BRAF* thyroid cancer, 55 (61.8%) patients identified to have gene fusions. The most commonly detected gene fusion was *NTRK*, positive in 23 (25.8%) patients, including 17 *NTRK3* cases and 6 *NTRK1* cases. The second was *RET*, positive in 16 (17.9%) patients, followed by *ALK* in 10 (11.2%) patients and *BRAF* in 3 (3.3%) patients. This was higher than the frequency reported by other studies, however, the frequency of gene fusions in 45 patients who randomly included in this study was similar with previous studies, with 40% of total gene fusion, 15.6% of *RET*, 3.6% of *NTRK3*, 4.4% of *NTRK1*, and 4.4% of *ALK*. Of the 44 patients selected by pathologist based on histological findings, 37 patients (84.1%) had gene fusions, which was significantly higher than that of 40% of randomly selected patients ( $p < 0.001$ ). In particular, *NTRK3* showed a

significant difference between two groups (34.1% Vs 6.7%,  $p = 0.003$ ). Gene fusions were identified in 82.3% of patients with classic papillary thyroid carcinoma (PTC) and 21.1% of patients with follicular variant PTC. The median age of patients with gene fusion was 41.6 (interquartile range[IQR] 34.3–51.6), which was significantly younger than that of patients without gene fusions ( $p < 0.001$ ). The median size of primary tumor in patients with gene fusions was 1.6cm (IQR 0.9–2.2), which was significantly smaller than that (3.0cm) of tumor size in the other group ( $p < 0.001$ ). However, more extrathyroidal extension (72.7% Vs 38.2%), cervical lymph node (LN) metastasis (69.1% Vs 32.3%), and lymphatic invasion (89.1% Vs 50.0%) were identified in patients with gene fusions compared with patients without gene fusions. *TERT* promoter mutation was identified in 11 patients and none of them showed concomitant gene fusions. Pan-TRK IHC staining was performed in 44 patients, 12 showed positivity in result. The test showed a sensitivity of 58%, a specificity of 96%, a negative predictive value of 92%, and a positive predictive value of 75% for predicting NTRK gene fusions.

**Conclusions:** Most prevalence of the gene fusions in this study was relatively higher than those of other studies. The prevalence of gene fusions in patients who were selected after histological finding was higher than that of patients who were randomly enrolled, especially for *NTRK3* fusion. Patients with gene fusions were significantly younger than those without gene fusions. The primary tumor size was significantly smaller, but more ETE and cervical LN metastasis was identified in the patients with gene fusions. Pan-TRK IHC stain showed a low sensitivity but very high specificity. The current study will be helpful in developing a cost-effective screening protocol for patients with targeted gene fusions and would finally lead to optimal treatment for patients with thyroid cancer especially for those who had advanced or metastatic disease not amenable to RAI therapy.

**Key words:** thyroid cancer, gene fusion, target therapy, clinicopathological features