



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

표적 차세대 염기서열 분석기법을 활용한
진행성 갑상선 암 환자의 유전자 변이 및
예후와의 연관성 분석

Genetic profile of advanced thyroid carcinomas using targeted next
generation sequencing and its relation to clinical prognosis

울산대학교대학원
의 학 과
송 의 연

표적 차세대 염기서열 분석기법을 활용한
진행성 갑상선 암 환자의 유전자 변이 및
예후와의 연관성 분석

지도교수 김 원 구

이 논문을 의학박사 학위 논문으로 제출함

2022년 2월

울산대학교 대학원
의 학 과
송 의 연

송의연의 의학박사학위 논문을 인준함

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

울 산 대 학 교 대 학 원

2022년 2월

감사의 글

어느덧 박사과정을 마치고 학위 논문을 제출하게 되었습니다. 미흡하지만 학위 논문을 마치면서 관심과 도움을 주신 분들께 존경과 감사의 마음을 올리고자 합니다.

학문의 길을 가고자 하였을 때에 기회를 주시고 이끌어 주시며 지도 및 여러 지원을 해 주신 김원구 지도 선생님께 깊은 감사를 드립니다.

학문에 대한 열정으로 동기 부여를 해주시고 귀감이 되어주신 송영기 선생님께 진심 어린 감사를 드립니다.

부족한 저를 가르쳐 주시고 격려하시며 전임의 기간 동안 지도해 주시고 연구 방향을 제시해주신 김원배 선생님께 깊은 감사를 드립니다.

변함 없는 관심과 가르침으로 이끌어 주시고 아낌없는 조언을 해주신 김태용 선생님께 진심으로 감사 드립니다.

바쁘신 가운데에도 사소한 내용들까지 세심하게 가르쳐 주신 전민지 선생님께 깊은 감사를 드립니다.

연구 데이터 수집과 진행을 위해 다방면으로 도와주시고 배려해 주신 송동은 선생님께 깊은 감사를 드립니다.

그리고 논문 심사를 위해 조언과 격려를 해주신 한지민 선생님께도 감사 드립니다.

전공의 시절부터 내분비-대사학 분야에 대해 관심을 가질 수 있도록 많은 가르침을 주셨던 서울아산병원 내분비-대사 내과 교실의 김기수, 이기엽, 박중열, 김민선, 고정민, 이우제, 고은희, 이승훈, 김범준, 정창희, 그리고 민세희 선생님께도 깊은 감사의 말씀을 올립니다.

마지막으로 오랜 시간 항상 사랑으로 지켜봐 주시고 응원해주신 부모님과, 가장 가까이에서 저를 지지해 준 남편 김좌훈, 그리고 너무나 소중한 사랑하는 아들 이빈이에게도 감사의 마음을 전합니다.

2021년 12월

송 의 연

국문요약

서론: 갑상선암 중 일부 진행성 갑상선 암은 예후가 매우 불량하고 치료가 어려운데, 원격 전이가 동반되거나 침습적 변이형 분화 갑상선암 (DTC), 저분화 갑상선 암 (PDTC) 또는 역형성 갑상선 암 (ATC)과 같은 드물지만 공격적인 아형이 이에 해당한다. 이러한 진행성 갑상선암의 체계적인 유전자 프로파일과 임상 결과와의 연관성에 관한 자료는 매우 제한적이다.

재료 및 방법: 진행성 갑상선 (원격 전이 또는 공격적 변이가 있는 DTC, PDTC, ATC) 환자 100 명의 원발 갑상선 종양 및 원격 전이 조직에서 50 개의 유전자를 사용한 표적 차세대 염기서열 분석이 시행되었다. 50 개 유전자 중 functional group (FG)을 구성하는 유전자는 histone methyltransferases (HMTs), SWI/SNF subunit, 그리고 the PI3K/AKT/mTOR 신호전달체계 세가지로 분류하여 분석하였다. 하위 그룹 분석 (subgroup analyses)을 시행하여 *BRAF*^{V600E} 돌연변이가 있는 PTC 환자 50 명에서 FG 돌연변이가 사망률에 미치는 영향을 평가하였다.

결과: 100 명의 환자로부터 얻은 118 개의 조직 중 99 개 조직은 원발성 종양, 19 개는 원격 전이 조직이었다. 원발성 종양에서 관찰된 가장 흔한 돌연변이는 *BRAF*^{V600E} 돌연변이 (58%)였고, 그 다음이 *TERT* 프로모터 (41%) 및 *RAS* (16%) 돌연변이였다. *TP3*는 6%에서 변이가 발견되었다. FG를 구성하는 HMTs, SWI/SNF subunit 및 PI3K/AKT/mTOR 신호전달체계와 관련 유전자의 돌연변이는 각각 30.3%, 10.1% 및 13.1%에서 확인되었다. 갑상선 원발 종양과 이에 상응하는 원격 전이 조직 15 쌍과 서로 다른 부위의 원격 전이 조직 1 쌍에서 돌연변이 상태를 분석한 결과 일치도가 높았다. *TERT* 프로모터 (56% vs. 58%) 및 *BRAF*^{V600E} (41% vs. 42%)뿐만 아니라 HMTs (42% vs. 37%), SWI/SNF subunit (12% vs. 10%) 및 PI3K/AKT/mTOR 신호전달체계 (22% vs. 26%)에서 유사한 돌연변이 빈도가 관찰되었다. 동일한 주요 초기 및 후기 돌연변이가 원발 종양-원격 전이 조직 쌍에 항상 존재함을 확인할 수 있었다. *BRAF*^{V600E} 돌연변이가 있는 갑상선 유두암 (PTC) 환자의 하위 그룹 분석에서 15 명의 환자는 *BRAF*^{V600E} 돌연변이만 있었고 (그룹 1), 22 명은 *BRAF*^{V600E} 와 FG 이외의 돌연변이가 있었고 (그룹 2), 13 명은 *BRAF*^{V600E} 와 FG 돌연변이(그룹 3)가 있었다. 전체 생존 (overall survival, OS)은 FG 돌연변이가 있는 환자에서 그렇지 않은 환자보다 유의하게 낮았고($p=0.001$), 그룹 3의 환자는 생존율이 가장 낮았다($p=0.004$). OS는 FG 돌연변이 부위 개수 (없거나 1개 또는 2개)에 따라 유의하게 달랐는데, FG 돌연변이가 2개 있는 군이 나머지 군에 비하여 OS가 낮았다

($p=0.005$). FG 돌연변이의 존재는 사망률 증가와 독립적으로 연관됨이 확인되었다 (위험비 11.65, 95% 신뢰 구간 1.39–97.58, $p=0.024$).

결론: 원격 전이가 있는 진행된 갑상선암에서 *BRAF*^{V600E}, *TERT* 프로모터 및 *RAS* 돌연변이가 빈번하게 발견되었다. 원발 갑상선 종양과 상응하는 원격 전이 조직의 유전적 프로파일은 높은 일치도를 보였다. 또한, *BRAF*^{V600E}의 돌연변이와 FG를 코딩하는 유전자의 공존은 높은 사망률과 관련이 있습니다. *BRAF*^{V600E} 돌연변이를 동반한 PTC에서 FG 돌연변이 여부의 식별은 이 군의 위험도를 분류하는 데 유용한 지표가 될 것으로 생각한다.

중심단어: Genetic profile, next generation sequencing, mutation, advanced thyroid cancer, distant metastasis, functional group

차 례

감사의 글	i
국문요약	ii
표 목차	vi
그림 목차	vii
서론	1
연구대상 및 방법	3
1. 연구대상	3
2. DNA 추출 및 표적 차세대 염기서열 분석기법(NGS)	4
3. 분석 과정	6
4. 환자 분류	7
5. 일차 결과지표 (Primary outcome)	7
6. 통계적 분석	7
연구결과	8
1. 진행성 갑상선암 환자의 기저 임상 병리학적 특성	8
2. 진행성 갑상선암의 원발 종양의 유전자 돌연변이	10
1) Drivers 돌연변이	10
2) <i>TERT</i> 프로모터 돌연변이	10
3) 종양억제유전자 (tumor suppressor genes) 돌연변이	10
4) 주요 functional groups 의 돌연변이	11
3. 진행성 갑상선 암종간의 주요 유전자 돌연변이 비교	13
1) Driver 유전자, <i>TERT</i> 프로모터, 및 종양억제유전자 돌연변이의 비교	13
2) 주요 functional groups 유전자의 돌연변이 비교	15
4. 진행성 갑상선 암의 원발 종양 및 원격 전이 조직의 matched pair 에서의 돌연변이 비교	18
5. 방사성요오드 avidity 여부에 따른 조직의 주요 유전자 돌연변이 비교	21
6. Non-ATC 와 ATC 조직에서의 주요 유전자 돌연변이 비교	22
7. <i>BRAF</i> ^{V600E} -mutant 진행성 PTC 환자들에서의 생존율 분석	23
1) Functional group 유전자 돌연변이 여부에 따른 기저 임상 병리학적 특성의 비교	23

2) Functional group 유전자 돌연변이 여부에 따른 전체 생존율 비교	26
3) 각각의 functional group 유전자 부위 (site)의 돌연변이 개수 및 여부 그리고 <i>TERT</i> 프로모터 돌연변이 여부에 따른 전체 생존율 비교	27
4) Functional group 유전자 돌연변이가 전체 생존율에 미치는 영향.....	29
고찰	30
결론	35
참고문헌	36
영문요약	39

표 목차

Table 1. Number of patients and tissue samples included in the study.....	3
Table 2. List of 50 target genes	5
Table 3. Genes encoding functional groups.....	6
Table 4. Baseline clinicopathological characteristics of patients with advanced thyroid carcinoma	9
Table 5. Comparison of mutational profiles in pathologic subtypes of thyroid carcinoma: PTC from TCGA, PTC, FTC, PDTC in current study, PDTC from MSKCC group, ATC in current study, and ATC from the MSKCC group	17
Table 6. Baseline clinicopathological characteristics of patients with advanced PTC harboring <i>BRAF</i> ^{V600E} mutation.....	24
Table 7. Baseline clinicopathological characteristics in genomic subgroups based on the presence of additional mutation in patients with advanced PTC harboring <i>BRAF</i> ^{V600E} mutation	25
Table 8. Prognostic impact of mutation in genes encoding functional groups on survival in patients with advanced PTC harboring <i>BRAF</i> ^{V600E} mutation	29

그림 목차

Figure 1. Mutations in 99 primary thyroid tumors. (A) Numbers of mutations, (B) driver genes, (C) *TERT* promoter, (D) tumor suppressor genes, (E) key pathways and functional groups, and (F) other genes 12

Figure 2. Comparison of *BRAF*^{V600E}, *RAS*, *TERT* promoter, and *TP53* mutations: (A) PTC from TCGA, (B) PTC, (C) FTC, (D) PDTC in current study, (E) PDTC from MSKCC group, (F) ATC in current study, and (G) ATC from the MSKCC group..... 14

Figure 3. Comparison of mutations in histone methyltransferases, SWI/SNF subunits, the PI3K/AKT/mTOR pathway, and total functional groups: (A) PTC from TCGA, (B) PTC, (C) FTC, (D) PDTC in current study, (E) PDTC from MSKCC group, (F) ATC in current study, and (G) ATC from the MSKCC group..... 16

Figure 4. Mutations in matched pairs. (A) Numbers of mutations, (B) driver genes, (C) *TERT* promoter, (D) *ZFH3*, (E) key pathways and functional groups, and (F) other genes 19

Figure 5. Frequency of mutations in *TERT* promoter, *BRAF*^{V600E}, histone methyltransferases, SWI/SNF subunits, and PI3K/AKT/mTOR pathway in primary tumors and distant metastases 20

Figure 6. Mutational comparison between radioactive iodine avid and non-avid samples of distant metastasis. non-ATCs and ATCs 21

Figure 7. Mutational comparison between non-ATCs and ATCs..... 22

Figure 8. Overall survival curve (A) of patients with advanced PTC according to presence of mutations in functional groups and (B) among three genomic subgroups: *BRAF*^{V600E} only (group 1) vs. *BRAF*^{V600E} + additional mutations other than functional groups (group 2) vs. *BRAF*^{V600E} + mutations in functional groups (group 3) 26

Figure 9. Overall survival curves (A) according to the numbers of mutation sites in functional groups. Survival curves according to the presence of mutations in (B) HMTs, (C) PI3K/AKT/mTOR pathway, (D) SWI/SNF chromatin remodeling complex, and (E) *TERT* promoter 28

서론

최근 갑상선 암의 유전적 특성과 임상 양상과의 연관성에 대하여 놀라운 발전이 이루어졌다. *BRAF*의 점 돌연변이는 분화 갑상선암(differentiated thyroid carcinoma, DTC)의 대표적인 돌연변이이며 이 중 V600E 돌연변이가 가장 흔하다 (1). 이 돌연변이는 종양의 크기가 크고, 갑상선 외 침범이 빈번하고, 림프절 전이가 발생하고, 암 관련 사망률이 증가하는 등과 같은 공격적인 임상 양상과 관련이 있다고 알려져 있다 (2-4). *RAS* 계열 유전자와 관련된 유전적 변형은 DTC의 또 다른 뚜렷한 특징을 나타낸다 (5, 6). *RAS* 돌연변이는 여포성 갑상선 암 (follicular thyroid carcinoma, FTC) 발병 초기에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌고 (7), 여러 공격적인 특성과 나쁜 임상 예후와도 관련이 있다고 알려져 있다 (8, 9). 갑상선 암의 공격적인 임상 양상과 관련하여 *TERT* 프로모터 돌연변이도 매우 중요한데 (10-12), 특히, *BRAF*^{V600E} 돌연변이와 *TERT* 프로모터 돌연변이가 공존하는 경우, 사망률이 매우 높다는 것이 보고되었다 (13). 이에 따라 미국 갑상선 협회 진료지침 상 *BRAF*^{V600E}와 *TERT* 프로모터 돌연변이 상태가 갑상선 암의 위험 계층화 (risk stratification) 기준 중 하나로 포함되어 있다 (14).

갑상선 암의 게놈 지형 (genetic landscape)에 대한 포괄적인 분석과 현저한 진전에도 불구하고, 대부분의 연구는 DTC에 초점이 맞추어져 있다. 한 예로, The Cancer Genome Atlas (TCGA) 프로젝트에는 동종 코호트 (homogeneous cohort) 구축을 위해 갑상선 유두암 (papillary thyroid carcinoma, PTC)만 포함되어 있다 (15). 저분화 갑상선암 (poorly differentiated thyroid carcinoma, PDTC), 미분화 갑상선암 (anaplastic thyroid carcinoma, ATC), 원격 전이를 동반하거나 침습적 변이를 가진 DTC와 같은 진행성 갑상선 암의 돌연변이 특징에 대한 자료는 제한적이다. 현재까지 PDTC 및 ATC와 관련된 가장 광범위한 연구는 Landa 등이 다양한 functional group 관련 유전자 (histone methyltransferases [HMTs], *SWI/SNF* chromatin remodeling complex, 그리고 *PIK3/AKT/mTOR* pathway)의 돌연변이 상태를 평가하여 이 두 암 종의 유전적 특성을 분석한 연구이다 (11). 이후 최근에 57개의 ATC를 제외한 진행성 갑상선암의 유전적 특징을 functional group 관련 돌연변이를 기반으로 조사한 연구가 발표되었다 (16). 그 이후로는 이러한 공격적인 형태의 갑상선 암, 특히 원격 전이가 있거나 침습적 변이를 가진 암에 대해 유사한 접근 방식을 이용한 연구는 수행되지 않았다. 원격 전이는 불량한 임상 경과와 가장 강력한 지표 중 하나이며 (14), DTC가 있는 환자의 약 10%에서 발생하여 심각한 생존 저하를 초래한다 (17, 18). 침습적 변이 여부도 PTC의 중요한

risk stratification 요소인데, 이는 classic PTC 보다 불량한 예후를 보인다 (14). 하지만 TCGA 프로젝트에 침습적 변이 PTC 로는 키큰세포변이 (tall cell variant, TCV) PTC 35 명 (7.5%) 만이 포함되어 있고, 침습적 변이 PTC 에 대한 유전적 특징 관련 연구는 거의 없다. 원격 전이 또는 침습적 변이를 동반한 DTC 와 더불어 PDTC, ATC 와 같은 진행성 갑상선암은 상당한 임상적 미충족 의료수요가 있기 때문에, 이들의 유전자 돌연변이 특징에 대한 체계적인 연구는 특히 중요하다고 할 수 있다.

한편, 앞서 언급한대로 $BRAF^{V600E}$ 유전자 변이가 갑상선 암, 특히 PTC 에서 가장 흔하게 발견되는 돌연변이인데, 이는 PTC 의 60% 정도에서 발견되고 (4, 13), TCV PTC 의 80-100 %, 원주세포변이 (columnar cell variant, CCV) PTC 의 33% 정도에서 발견된다 (19-21). 같은 $BRAF^{V600E}$ 돌연변이를 가진 PTC ($BRAF^{V600E}$ mutant PTC)라 하더라도 임상 양상은 매우 양호한 것부터 치명적인 것까지 다양한데, 이러한 사실은 $BRAF^{V600E}$ mutant PTC 에 상당한 임상적 다양성 (clinical diversity)이 존재하고, 추가적인 유전적 변형의 존재가 이 그룹의 공격성을 설명할 수 있음을 시사한다. 현재까지 $BRAF^{V600E}$ mutant PTC 와 예후 측면에서 oncogenic synergism 이 밝혀진 돌연변이는 *TERT* 프로모터 돌연변이가 유일한데 PTC 에서 $BRAF^{V600E}$ 와 *TERT* 프로모터 돌연변이가 공존하는 경우 각각 개별의 돌연변이가 있을 때보다 사망률이 현저하게 높다는 것이 알려져 있다 (13). 이 외에는 현재까지 $BRAF^{V600E}$ mutant PTC 의 risk stratification 이 가능한 다른 유전적 변이는 검증된 바 없다.

이 연구에서 우리는 차세대 염기서열 분석기법을 통하여 진행성 갑상선암의 유전자 돌연변이를 확인하였다. 진행성 갑상선암은 원격 전이가 있는 DTC, 침습적 변이형 PTC, PDTC 및 ATC 로 정의하고 이들에서 유전적 특징 및 functional group 돌연변이 상태를 조사하고자 하였다. 갑상선암의 유전자 돌연변이를 확인하였다. 또한, 원격 전이 조직이 있는 환자에서는 원격 전이 조직에서도 돌연변이 상태를 분석하여 원발 부위의 상태와 비교하고자 하였다. 나아가, 이러한 돌연변이 상태가 이들의 예후와 연관이 있는지도 조사하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

본 연구는 원격 전이가 있는 DTC, 침습적 변이형 PTC, PDTC 및 ATC 환자 100 명으로 부터 얻어진 원발성 갑상선 종양 및 원격 전이 조직 샘플 118 개를 사용하였다 (표 1). 조직은 1994 년에서 2017 년 사이 서울아산병원에서 수술한 검체에서 수집되었고, 내분비 전문 병리학자가 모든 샘플을 검토하였다. 118 개의 조직 중 원발 조직은 99 개이었고, 19 개의 조직은 원격 전이 부위의 샘플이었다. 원발 종양과 원격 전이의 matched pair 는 15 건이었고, 다른 두 곳의 원격 전이 부위의 matched pair 는 1 건이 있었다. 연구에 포함된 모든 환자로부터 사전 동의를 얻었고 서울아산병원 기관심사위원회는 모든 자료 수집과 후속 분석을 승인하였다.

Table 1. Number of patients and tissue samples included in the study

	N
Number of tumors included in the study	118
Total number of primary thyroid tumor tissues analyzed	99
Total number of distant metastases tissues analyzed	19
Number of matched pairs of a thyroid tumor and distant metastases	15
Number of matched pairs of distinct distant metastases sites	1

2. DNA 추출 및 표적 차세대 염기서열 분석기법(NGS)

표적 NGS 는 총 50 개의 유전자에 대해 수행되었다 (표 2). 이 50 개의 유전자는 문헌 검토를 통해 갑상선 암에서 비교적 빈번한 돌연변이로 알려진 것들로 선정이 되었다 (15, 16). 연구에 참여한 병리학자가 formalin-fixed, paraffin-embedded 샘플에서 DNA 추출을 위한 조직 블록을 제작하였다. 게놈 DNA 는 각 블록에서 2-5 μ m 두께의 절편에서 추출되었다. 제조사의 프로토콜에 따라 PicoGreen 및 Nanodrop (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 사용하여 DNA 의 정량화 및 정성화 평가를 수행하였다. Agilent SureSelect Target Enrichment 프로토콜 (버전 B.3, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)을 사용하여 표준 엑솜 캡처 라이브러리 (standard exome capture libraries)를 생성하였다. 즉, 1 ug 의 DNA 가 adaptive focused acoustic 기술 (Covaris Inc., Woburn, MA, USA)에 의해 fragmented 되었다. DNA 라이브러리는 Agilent 어댑터를 사용한 end repair, A-tailing, 그리고 ligation 의 순차적 과정에 의해 준비되었다. 엑솜 캡처를 위해 250 ng 의 DNA 라이브러리를 SureSelect exome capture baits 와 hybrid 하였다. 얻어진 DNA 를 증폭한 후, 최종 정제된 것은 qPCR Quantification Protocol Guide (Illumina, San Diego, USA)에 따라 정량화하고 TapeStation DNA ScreenTap e(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 정성화하였다. 마지막으로 시퀀싱을 위해 HiSeq™ 2500 플랫폼(Illumina, San Diego, USA)을 사용하였다.

Table 2. List of 50 target genes

<i>TERT</i> promoter	<i>BRAF</i>	<i>NRAS</i>	<i>HRAS</i>	<i>KRAS</i>
<i>EIF1AX</i>	<i>TP53</i>	<i>RB1</i>	<i>NF1</i>	<i>NF2</i>
<i>PTEN</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>ATM</i>	<i>MEN1</i>	<i>ARID1B</i>
<i>TSHR</i>	<i>MED12</i>	<i>RBM10</i>	<i>ARID2</i>	<i>POLE</i>
<i>PPM1D</i>	<i>STK11</i>	<i>CHEK2</i>	<i>ZFHX3</i>	<i>BDP1</i>
<i>KMT2A</i>	<i>KMT2C</i>	<i>TG</i>	<i>EZH1</i>	<i>APC</i>
<i>AKT1</i>	<i>SPOP</i>	<i>ALK</i>	<i>RET</i>	<i>PIK3C2G</i>
<i>PIK3CG</i>	<i>AKT3</i>	<i>TSC2</i>	<i>MTOR</i>	<i>ARID1A</i>
<i>ARID1B</i>	<i>ARID5B</i>	<i>SMARCB1</i>	<i>PBRM1</i>	<i>ATRX</i>
<i>KMT2D</i>	<i>MSH2</i>	<i>FGFR3</i>	<i>PDGFRB</i>	<i>ERBB3</i>

3. 분석 과정

먼저 Burrows-Wheeler Aligner (버전 0.7.12)를 사용하여 시퀀싱된 관독값을 human reference genome (NCBI build 37)에 매핑하였다. 이후 Picard-tools (버전 1.130)를 사용하여 PCR duplicate 들을 제거하였다. 중복 제거는 Genome Analysis Toolkit (GATK 버전 3.4.0)을 사용하여 재정렬되었다. 각 샘플에 대한 변이 유전자형 분석은 GATK 의 Haplotype Caller 로 수행되었으며 이러한 변이는 SnpEff (버전 4.1g), dbSNP (버전 142), 1000 게놈 프로젝트 (3 단계), ClinVar 및 ESP6500 에 의거하였다. 일반적인 생식세포 변이 (germ-line variant) 또는 위양성 변이는 수동으로 걸러졌다. 흔한 변이 발생이 알려진 드라이버 돌연변이 (driver mutation)는 빈번한 순서로 제시하였다. 이외 다른 유전자 변이는 이전 연구에 따라 세 가지 functional group 으로 분류되었다 (11): histone methyltransferases (HMTs), SWI/SNF chromatin remodeling complex, 그리고 PIK3/AKT/mTOR pathway. 각 functional group 을 구성하는 유전자는 표 3 에 정리되어 있다. 샘플의 표적 병변의 평균 길이는 155.6 에서 2705.4 사이였다.

Table 3. Genes encoding functional groups

Functional groups	Genes
Histone methyltransferases (HMTs)	<i>KMT2A, KMT2C, KMT2D, SETD2</i>
SWI/SNF chromatin remodeling complex	<i>ARID1A, ARID1B, ARID2, ARID5B, SMARCB1, PBRM1, ATRX</i>
PIK3/AKT/mTOR pathway	<i>PIK3CA, PTEN, PIK3C2G, PIK3CG, PIK3C3, PIK3R1, PIK3R2, AKT1, AKT3, TSC1, TSC2, mTOR</i>

4. 환자 분류

유전자 돌연변이와 예후와의 분석을 위한 subgroup analyses 를 위해 50 명의 $BRAF^{V600E}$ mutant PTC 환자들이 선정되었다. 이들은 추가적인 돌연변이 여부에 따라 다음과 같이 3 개의 그룹으로 분류되었다: $BRAF^{V600E}$ 돌연변이만 있는 그룹 (그룹 1), $BRAF^{V600E}$ 돌연변이 + functional group 이외의 다른 유전자에 돌연변이가 있는 그룹 (그룹 2), $BRAF^{V600E}$ 돌연변이 + functional group 돌연변이가 있는 그룹 (그룹 3).

또한, 이전 연구들의 암종별 돌연변이 상태를 본 연구의 결과와 비교하기 위하여 TCGA 프로젝트의 PTC (PTC-TCGA, n=402) 및 MSKCC 그룹의 PDTC (PDTC-MSKCC, n=84) 와 ATC (ATC-MSKCC, n=33) 로 분류하여 비교분석하였다.

5. 일차 결과지표 (Primary outcome)

예후 분석을 위한 subgroup 분석에서 일차 결과지표는 전체 사망률이었다. Overall survival (OS)는 처음 수술 받은 날짜로부터 사망한 날짜까지의 기간으로 정의하였고, 세 그룹간의 OS 가 비교되었다.

6. 통계적 분석

통계적 분석은 R version 3.4.0 과 R library survival, car, 그리고 Cairo (R Foundation for Statistical Computing, 빈, 오스트리아; <http://www.R-project.org>)을 이용하였다. 연속형 변수(continuous variables)는 중앙값 (사분위수) 또는 평균 \pm 표준편차로 표현하였다. 범주형 변수(categorical variables)는 숫자와 퍼센트로 표현하였다. 환자들의 임상 병리학적 특징에 대한 비교는 Student's t-test 와 Chi-squared test 를 사용하였다. Kaplan-Meier 방법을 이용하여 그룹 간 생존곡선을 그렸다. 사망률에 대한 분석에는 Cox-proportional hazard model 을 이용하였고, 보정 변수로는 나이, 성별, 종양 크기, 다발성, 갑상선의 침범, 림프절 전이, 원격 전이 여부를 포함시켰다. 생존위험도는 위험비(Hazard ratio, HR)와 95% 신뢰구간(95% Confidence intervals, 95% CI)으로 나타내었다. 통계적 유의성은 p 값으로 표현하였으며, p 값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 차이를 보이는 것으로 간주하였다.

연구 결과

1. 진행성 갑상선암 환자의 기저 임상 병리학적 특성

본 연구에 포함된 100 명의 중 32 명 (32%)은 classic PTC 였고, 25 명 (25%)은 TCV PTC, 11 명 (11%)은 CCV PTC, 11 명 (11%)은 FTC, 5 명 (5%)은 PDTC, 그리고 16 명 (16%)은 ATC 였다. 이들의 나이의 중앙값은 50 세 (사분위수 40–64)이었고 57 명 (57%)이 여성 이었다. 원발 종양의 크기는 중앙값 2.5 cm (사분위수 1.7–4.0)이었다. 42 명 (42%)에서 병리 검사에서 현미경적 갑상선 외 침윤이 확인되었고, 33 명 (33%)에서는 수술 시 육안적인 갑상선 외 침윤이 확인되었다. 경부 림프절 전이는 총 80 명 (80%)에서 발견되었다. 또한 64 명 (64%)의 환자에서 원격전이가 동반되어 있었는데, 수술 당시부터 이미 원격 전이가 있었던 환자 (synchronous distant metastasis)는 38 명 (38%)이었고, 수술 이후 원격 전이가 발생한 환자 (metachronous distant metastasis)는 26 명 (26%)이었다. 원격전이 장기로는 폐가 47%로 가장 흔한 부위였고, 이어서 뼈 (27%) 그리고 뇌 (4. %) 순이었다. 이와 5 명 (5%)는 간, 부신, 그리고 췌장과 같은 기타 장기에 원격 전이가 발생하였다. American Joint Committee on Cancer Tumor Node Metastasis (AJCC TNM) 8 판 기준에 따르면, 43 명 (43%)은 1 기, 25 명 (25%)는 2 기, 2 명 (2%)는 3 기, 그리고 29 (29%)는 4 기에 해당하였다. 본 연구에 포함된 진행성 갑상선암 환자들의 기저 임상 병리학적 특성은 표 4 에 요약되어 있다.

Table 4. Baseline clinicopathological characteristics of patients with advanced thyroid carcinoma

	Value (N = 100)
Pathology	
Classic PTC	32 (32%)
Tall cell variant PTC	25 (25%)
Columnar cell variant PTC	11 (11%)
FTC	11 (11%)
PDTC	5 (5%)
ATC	16 (16%)
Age (years)	50 (40–64)
Gender (female)	57 (57%)
Primary tumor size (cm)	2.5 (1.7–4.0)
Extrathyroidal extension	
Microscopic	42 (42%)
Gross	33 (33%)
Multifocality (yes)	41 (41%)
Lymph node metastases (yes)	80 (81%)
Distant metastases	
Synchronous	38 (38%)
Metachronous	26 (26%)
Metastatic sites	
Lung	47 (47%)
Bone	27 (27%)
Brain	4 (4%)
Others (liver, adrenal gland, pancreas)	5 (5%)
AJCC TNM 8th stage at initial diagnosis	
I	43 (43%)
II	25 (25%)
III	2 (2%)
IV	29 (29%)

Abbreviations: AJCC TNM, American Joint Committee on Cancer Tumor Node Metastasis; ATC, anaplastic thyroid carcinoma; FG, functional group; FTC, follicular thyroid carcinoma; PDTC, poorly differentiated thyroid carcinoma; PTC, papillary thyroid carcinoma.

2. 진행성 갑상선암의 원발 종양의 유전자 돌연변이

99 개의 원발 종양 조직에서 표적 NGS 를 시행하였고, 이들에게서 중앙값 3 (사분위수 2-4)개의 체세포 돌연변이가 발견되었다 (그림 1A). 돌연변이 중 가장 흔한 것은 *BRAF*^{V600E} (58%) 이었고, 그 다음으로 *TERT* 프로모터 (41%), *KMT2C* (18%), *RAS* (16%) 순으로 확인되었다.

2-1. Drivers 돌연변이

BRAF^{V600E} 돌연변이는 총 57 개의 샘플 (58%)에서 확인이 되었는데, 이들 중 19 개는 classic PTC, 31 개는 침습적 변이형 PTC, 1 개는 PDTC, 6 개는 ATC 였다. (그림 1B). *BRAF*^{V600E} 돌연변이가 없는 환자들에서는 *NRAS*, *KRAS*, 그리고 *HRAS* 가 각각 12 개 (12.1%), 3 (3.0%), 그리고 1 (1.0%)에서 발견되었다. 16 개의 *RAS* 돌연변이를 가진 샘플 중 10 건이 FTC, 2 건이 각각 PDTC 와 ATC, 1 건이 각각 classic PTC 와 침습적 변이형 PTC 에서 확인되었다. 거의 모든 *RAS* 돌연변이 검체에서는 *TERT* 프로모터 돌연변이가 동반되었다. 다른 driver 돌연변이로는 *ALK* (4%), *NFI* (4%), 그리고 *APC* (3%)이 관찰되었다.

2-2. *TERT* 프로모터 돌연변이

TERT 프로모터 돌연변이는 총 41 건 (41%)의 조직에서 관찰되었다 (그림 1C). 45% (14/31)의 classic PTC, 16.7% (6/36) 의 침습적 변이형 PTC, 82% (9/11)의 FTC, 20% (1/5)의 PDTC, 그리고 59% (11/16)의 ATC 가 *TERT* 프로모터 돌연변이를 동반하였다. 이 중 C228T (77.2%) 가 가장 흔하였고, C250T (14.3%), C228A (5.7%), C242T (2.8%)순으로 확인되었다.

2-3. 종양억제유전자 (tumor suppressor genes) 돌연변이

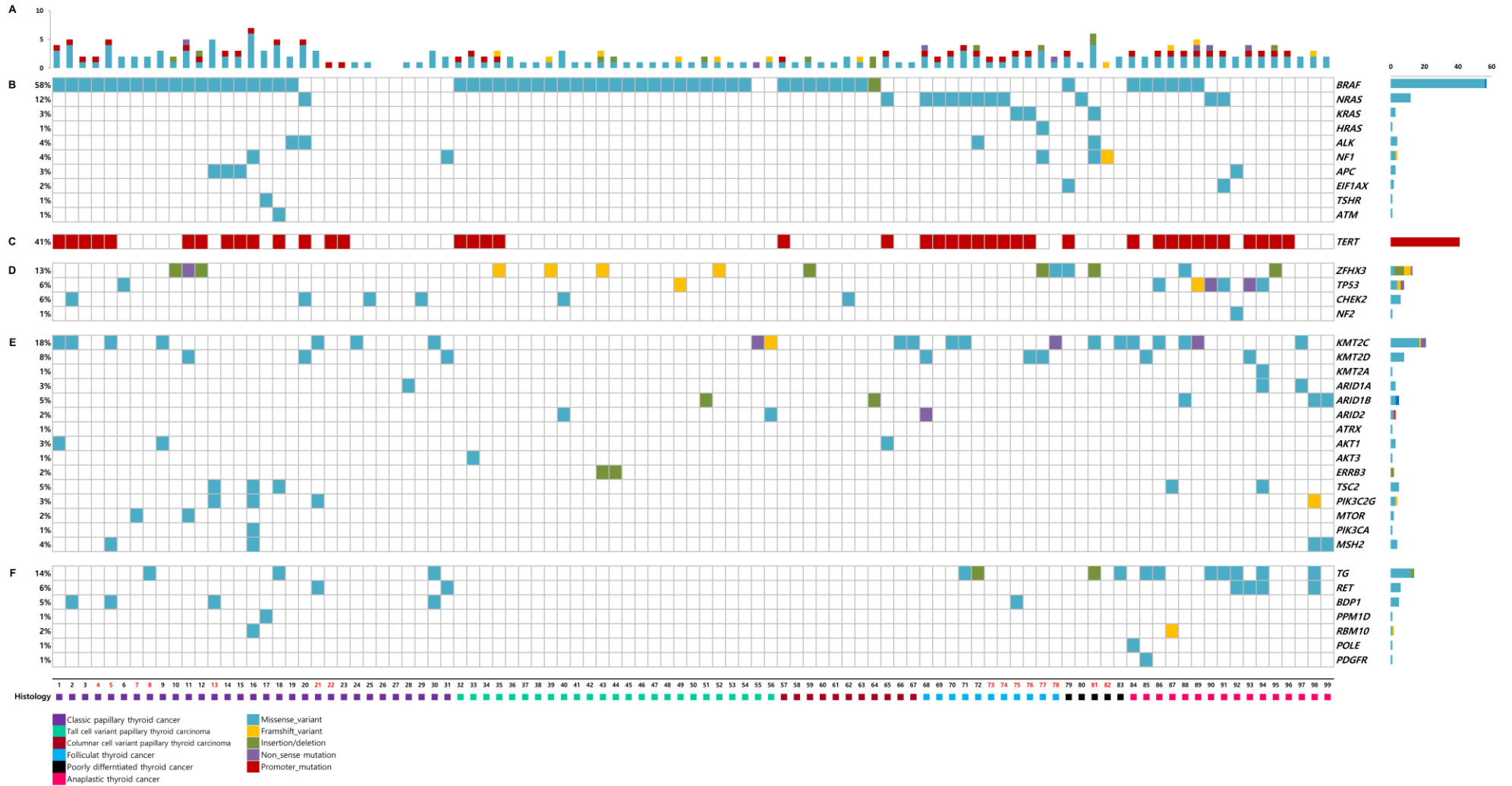
ZFHX3 는 몇몇 암종에서 종양억제자의 역할을 한다는 것이 밝혀진 유전자인데, 본 연구에서 총 13 조직 (13%)에서 변이가 발견되었는데, classic PTC 에서 3 건, 침습적 변이형 PTC 에서 5 건, FTC 에서 2 건, PDTC 에서 1 건, 그리고 ATC 에서 2 건이 확인되었다 (그림 1D). 두 번째로 흔한 종양억제유전자 돌연변이는 *TP53* 돌연변이로써 총 6 건 (6%)에서 확인되었고 이는 진행성 갑상선암에서 특징적으로 발견되는 변이이다. *TP53* 돌연변이는 유독 ATC 에서 많이 보였다 (7 개 중 6 개). 이와 동일한 비율로

CHEK2 (6%) 돌연변이가 확인되었는데, classic PTC 에서 4 건으로 가장 많이 관찰되었고 나머지 2 건은 침습적 변이형에서 확인되었다. *NF2* 는 1%에서 변이가 보였다.

2-4. 주요 functional groups 의 돌연변이

HMTs 를 구성하는 *KMT2C*, *KMT2D*, and *KMT2A* 유전자의 돌연변이는 30.3% (30/99) 에서 확인되었다 (그림 1E). 조직형으로 분류해보면, classic PTC 에서 10 건, 침습적 변이형에서 4 건, FTC 에서 6 건, PDTC 에서 2 건, 그리고 ATC 에서 8 건이 관찰되었다. SWI/SNF chromatin remodeling complex 를 구성하는 유전자의 돌연변이는 10.1% (10/99)에서 발견되었는데, *ARID1A* 유전자에서 3% (3/99), *ARID1B* 에서 5% (5/99), *ARID2* 에서 1% (1/99), *ATRX* 에서 1% (1/99)이었다. Classic PTC 에서 1 건, 침습적 변이형에서 3 건, FTC 에서 1 건, 그리고 ATC 에서 5 건이 관찰되었고 PDTC 에서는 돌연변이가 보이지 않았다. PI3K/AKT/mTOR pathway 유전자에서는 13.1% (13/99)에서 돌연변이가 확인되었는데, classic PTC 에서 8 건, 침습적 변이형에서 2 건, 그리고 ATC 에서 3 건이 관찰되었다. FTC 나 PDTC 에서는 변이가 확인되지 않았다. 이 외의 유전자의 돌연변이 상태는 그림 1F에 나타나있다.

Figure 1. Mutations in 99 primary thyroid tumors. (A) Numbers of mutations, (B) driver genes, (C) *TERT* promoter, (D) tumor suppressor genes, (E) key pathways and functional groups, and (F) other genes. Sample numbers in red letters indicate samples with available distant metastases tissues.

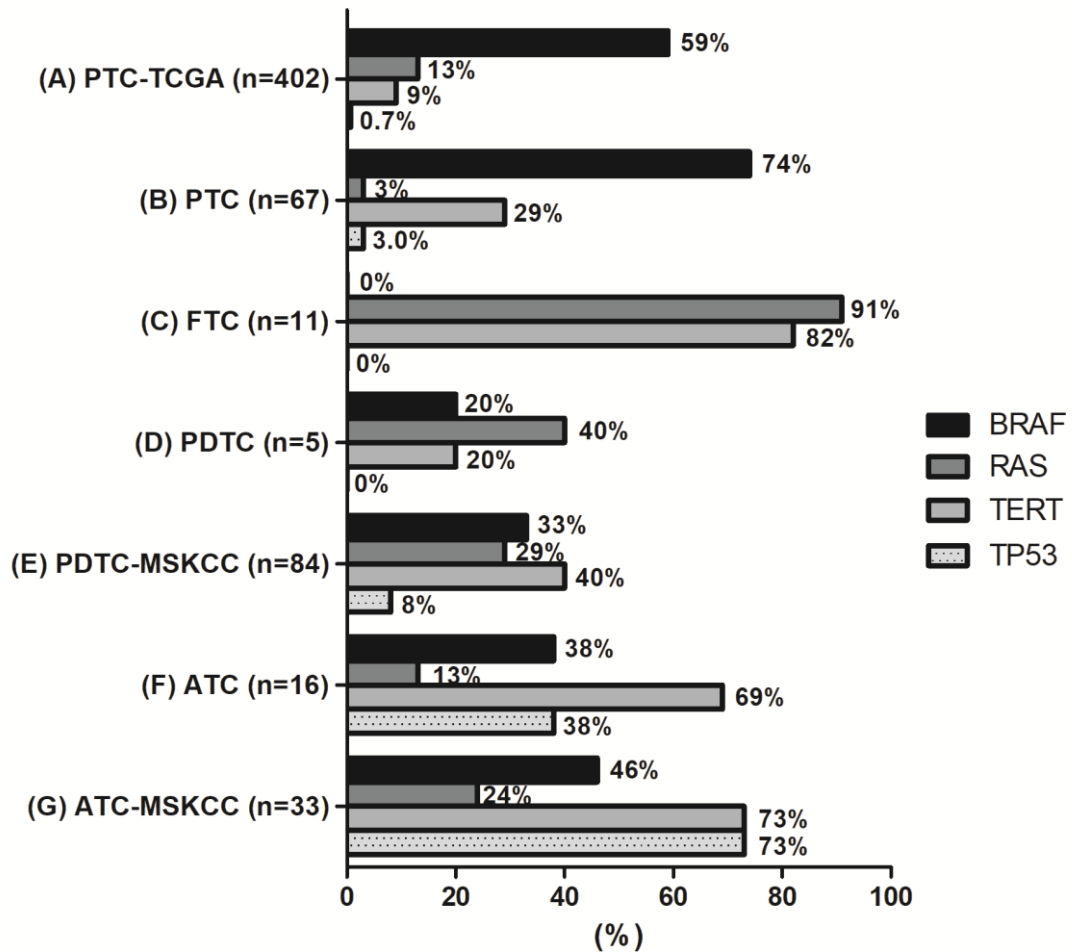


3. 진행성 갑상선 암종간의 주요 유전자 돌연변이 비교 (그림 2)

3-1. Driver 유전자, *TERT* 프로모터, 및 종양억제유전자 돌연변이의 비교

본 연구에 포함된 조직들에서의 돌연변이 상태와 이전 연구들에서 보고된 돌연변이 상태를 암종별로 비교해보았다. TCGA 의 PTC (PTC-TCGA, n=402), 본 연구의 PTC (원격전이를 동반한 PTC와 침습형변이의 PTC, n=67), 본 연구의 FTC (n=11), 본 연구의 PDTC (n=5), MSKCC 의 PDTC (PDTC-MSKCC, n=84), 본 연구의 ATC (n=16), 그리고 MSKCC 의 ATC (ATC-MSKCC, n=33)이 포함되었다. 병리조직형에 따른 *BRAF*^{V600E}, *RAS*, *TERT*, *TP53* 돌연변이의 비교는 그림 2에 정리되어 있다. 먼저, PTC-TCGA 의 경우 59%에서 *BRAF*^{V600E}, 13%에서 *RAS*, 9%에서 *TERT*, 0.7%에서 *TP53* 변이가 확인되었는데 (그림 2A), 본 연구의 PTC 에서도 74%에서 *BRAF*^{V600E} 돌연변이가 가장 흔하였지만 변이율은 본 연구가 더 높았다. *RAS* 변이는 3%로 상대적으로 적었고, *TERT* 는 29%로 더 높았으며 *TP53* 은 3%에서 확인되었다 (그림 2B). 본 연구의 PTC 는 원격전이가 동반되었거나 침습적 변이형인 반면 TCGA 의 경우 대부분 classic PTC 인 만큼 돌연변이율에서 차이를 많이 보였다. FTC 의 경우 본 연구에서 *BRAF*^{V600E} 돌연변이는 확인되지 않았고, 91%에서 *RAS* 변이가 있었으며 *TERT* 프로모터 변이도 82%에서 동반되었다 (그림 2C). *TP53* 돌연변이는 확인되지 않았다. 다음으로, PDTC 를 비교해보면, 본 연구의 PDTC 의 경우 20%에서 *BRAF*^{V600E}, 40%에서 *RAS*, 20%에서 *TERT* 가 확인되었고, *TP53* 변이는 확인되지 않았다 (그림 2D). PDTC-MSKCC 에서는 33%에서 *BRAF*^{V600E}, 29%에서 *RAS*, 40%에서 *TERT*, 8%에서 *TP53* 변이가 관찰되어 전체적인 경향은 비슷하게 확인되었다 (그림 2E). 마지막으로 ATC 의 경우 본 연구에서는 38%에서 *BRAF*^{V600E}, 13%에서 *RAS*, 69%에서 *TERT*, 38%에서 *TP53* 변이가 확인되었는데 (그림 2F) ATC-MSKCC 의 경우 46%에서 *BRAF*^{V600E}, 24%에서 *RAS*, 73%에서 *TERT*, 73%에서 *TP53* 변이가 관찰되어 (그림 2G) 전체적인 돌연변이율이 본 연구보다 높았고 특히 *TP53* 에서 차이가 컸다.

Figure 2. Comparison of *BRAF*^{V600E}, *RAS*, *TERT* promoter, and *TP53* mutations: (A) PTC from TCGA, (B) PTC, (C) FTC, (D) PDTC in current study, (E) PDTC from MSKCC group, (F) ATC in current study, and (G) ATC from the MSKCC group



3-2. 주요 functional groups 유전자의 돌연변이 비교 (그림 3)

앞서 정의한 각각의 주요 functional groups의 유전자 돌연변이 및 전체 돌연변이율을 암종간 비교를 해보았다. 먼저 PTC-TCGA의 경우 HMTs 및 SWI/SNF chromatin remodeling complex의 돌연변이에 대한 각각의 정확한 변이율은 확인이 어렵고, PI3K/AKT/mTOR pathway 유전자의 변이는 5%, 전체적인 functional groups의 통합 변이율은 20%로 확인이 되었다 (그림 3A). 반면 본 연구에서 PTC의 경우 21%에서 HMTs, 6%에서 SWI/SNF subunit, 15%에서 PI3K/AKT/mTOR pathway 유전자의 변이가 확인되었으며, 전체 functional groups 돌연변이는 35%였다 (그림 3B). 즉, PTC-TCGA와 비교하였을 때 functional groups 돌연변이는 본 연구에서 높은 비율로 확인이 되었다. FTC의 경우 55%에서 HMTs, 9%에서 SWI/SNF subunit 변이가 확인이 되었고, PI3K/AKT/mTOR pathway 유전자의 변이는 관찰되지 않았다 (그림 3C). 전체 functional groups 돌연변이는 55%였다. 다음으로 PDTC의 경우, 본 연구에서는 HMTs에서만 40% 변이율이 확인되었고 나머지 두 functional group의 변이는 관찰되지 않았다 (그림 3D). 반면 PDTC-MSKCC의 경우, 7%에서 HMTs, 6%에서 SWI/SNF subunit, 11%에서 PI3K/AKT/mTOR pathway 유전자의 변이가 확인되었으며, 전체 functional groups 돌연변이는 20%였다 (그림 3E). 본 연구와 비교하였을 때 HMTs의 변이율은 낮은 반면 다른 두 functional group 변이는 높았으나, 전체 functional group의 돌연변이는 본 연구에서 더 빈번히 관찰되었다. 마지막으로 ATC의 경우, 본 연구에서는 50%에서 HMTs, 31%에서 SWI/SNF subunit, 19%에서 PI3K/AKT/mTOR pathway 유전자의 변이가 확인되었으며, 전체 functional groups 돌연변이는 69%였다 (그림 3F). ATC-MSKCC의 경우 24%에서 HMTs, 36%에서 SWI/SNF subunit, 39%에서 PI3K/AKT/mTOR pathway 유전자의 변이가 확인되었고 전체 functional groups 돌연변이율은 61%로서 (그림 3G) 본 연구와 비교하였을 때 각 functional group의 변이율은 차이가 있으나 전체적인 변이율은 비슷하였다. 각 functional group을 구성하는 유전자의 돌연변이의 빈도는 표 5에 정리되어 있다.

Figure 3. Comparison of mutations in histone methyltransferases, *SWI/SNF* subunits, the *PI3K/AKT/mTOR* pathway, and total functional groups: (A) PTC from TCGA, (B) PTC, (C) FTC, (D) PDTC in current study, (E) PDTC from MSKCC group, (F) ATC in current study, and (G) ATC from the MSKCC group

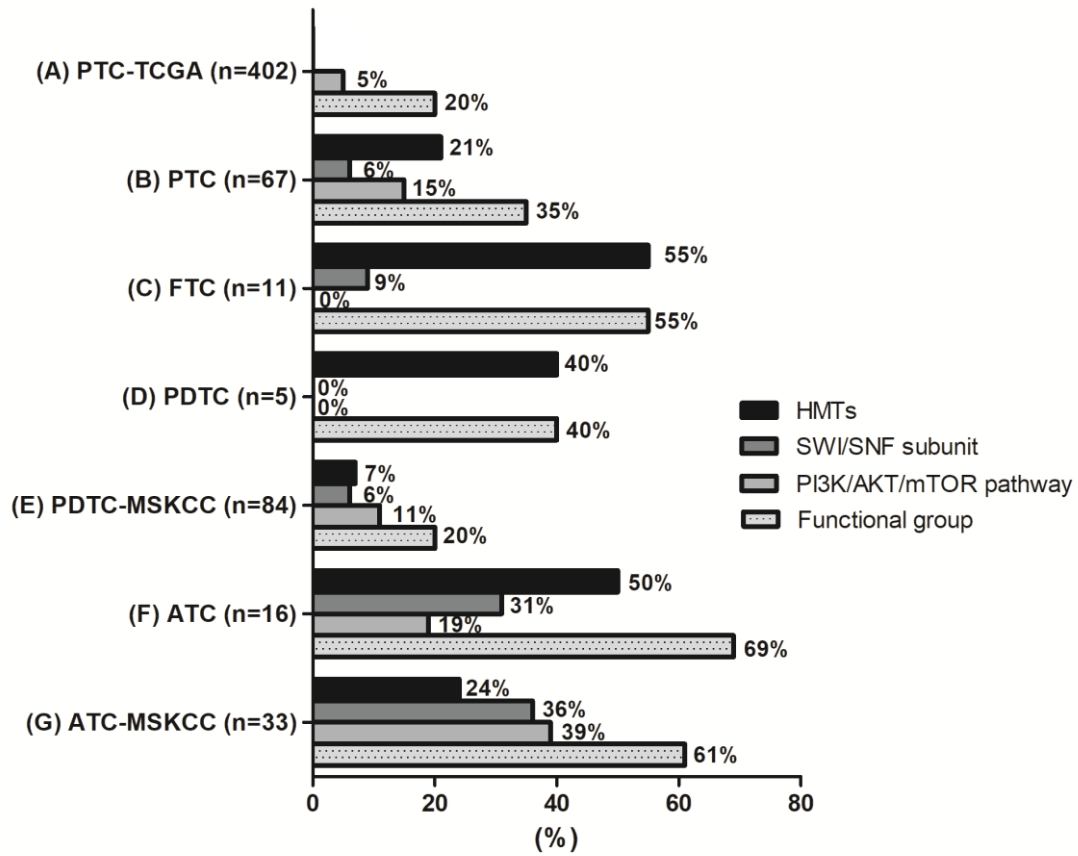


Table 5. Comparison of mutational profiles in pathologic subtypes of thyroid carcinoma: PTC from TCGA (PTC-TCGA), PTC, FTC, PDTC in current study, PDTC from MSKCC group (PDTC-MSKCC), ATC in current study, and ATC from the MSKCC group (ATC-MSKCC)

Pathological subtypes of thyroid cancer	PTC-TCGA (n=402)	PTC (n=68)	FTC (n=11)	PDTC (n=5)	PDTC-MSKCC (n=84)	ATC (n=16)	ATC-MSKCC (n=33)
Key pathways and functional groups	20%	35%	55%	40%	20%	69%	61%
HMTs	-	21%	55%	40%	7%	50%	24%
<i>KMT2A</i>	1%	0%	0%	0%	4%	6%	9%
<i>KMT2C</i>	1%	16%	27%	40%	2%	13%	3%
<i>KMT2D</i>	0%	4%	27%	0%	1%	13%	15%
<i>SETD2</i>	0.2%	-	-	-	0%	-	3%
SWI/SNF complex	-	6%	9%	0%	6%	31%	36%
<i>ARID1A</i>	0%	1%	0%	0%	1%	13%	9%
<i>ARID1B</i>	1%	3%	0%	0%	4%	19%	9%
<i>ARID2</i>	0.2%	0%	9%	0%	1%	0%	3%
<i>ARID5B</i>	0.2%	0%	0%	0%	0%	0%	3%
<i>SMARCB1</i>	0%	0%	0%	0%	0%	0%	6%
<i>PBRM1</i>	0%	0%	0%	0%	1%	0%	6%
<i>ATRX</i>	0.2%	1%	0%	0%	0%	0%	6%
PI3K/AKT/mTOR pathway	5%	15%	0%	0%	11%	19%	39%
<i>PIK3CA</i>	0.4%	1%	0%	0%	2%	0%	18%
<i>PTEN</i>	1%	0%	0%	0%	4%	0%	15%
<i>PIK3C2G</i>	0.2%	4%	0%	0%	1%	6%	6%
<i>PIK3CG</i>	0.2%	0%	0%	0%	1%	0%	6%
<i>PIK3C3</i>	0%	-	-	-	1%	-	0%
<i>PIK3R1</i>	0.2%	-	-	-	1%	-	0%
<i>PIK3R2</i>	0.2%	-	-	-	0%	-	3%
<i>AKT1</i>	0.6%	4%	0%	0%	0%	0%	0%
<i>AKT3</i>	1%	1%	0%	0%	1%	0%	0%
<i>TSC1</i>	0.8%	-	-	-	1%	-	0%
<i>TSC2</i>	0.2%	4%	0%	0%	0%	13%	3%
<i>MTOR</i>	0%	3%	0%	0%	1%	0%	6%

Abbreviations: TCGA, The Cancer Genome Atlas; PTC: papillary thyroid carcinoma; PDTC, poor differentiated thyroid carcinoma; ATC, anaplastic thyroid carcinoma; HMTs, histone methyltransferase.

4. 진행성 갑상선 암의 원발 종양 및 원격 전이 조직의 **matched pair** 에서의 유전자 돌연변이 비교

갑상선 원발 종양 및 원격 전이 조직간의 **matched pair** 15 쌍과 2 개의 다른 원격 전이 부위 조직 1 쌍에서 같은 표적 NGS 를 시행하였다. 분석에 포함된 조직형은 classic PTC 8 쌍, FTC 5 쌍과 1 의 triad (40 번 검체), PDTC 2 쌍이었다. 총 34 개 샘플에서 3 개 (사분위수 2-4) 체세포 돌연변이의 중앙값이 검출되었고, 원격 전이 조직만에서도 동일하게 3 개 (사분위수 2-4) 돌연변이 중앙값이 확인되었다 (그림 4A). *TERT* 프로모터 돌연변이는 전체 샘플의 53%와 원격 전이의 58% (11/19)로 가장 흔하게 발견되었다 (그림 4C). 그 다음으로 흔한 돌연변이는 *BRAF*^{V600E} 돌연변이로써 13 개 샘플 (38%)에 존재하였다 (그림 4B). *RAS* 돌연변이는 13 개 조직 (39%)에서 관찰되었는데, *KRAS* 7 개, *NRAS* 4 개, *HRAS* 2 개였다. 모두 원발 부위와 전이 부위 쌍으로 유전자 변이가 발견되었고, *BRAF*^{V600E} 돌연변이와 상호 배타적이었다 (그림 4B). 이외에 흔히 보인 돌연변이는 driver 유전자 돌연변이인 *NF1* (18%), 종양 억제 유전자인 *ZFH3*(18%), HMTs 의 *KMT2C*(26%), 그리고 기타 *TG*(21%) 및 *BDP1*(18%)와 같은 돌연변이였다. 그림 4 에서 동일한 샘플 번호를 가진 원발 종양 조직과 매칭된 전이 조직의 쌍을 비교해보면, 대부분의 유전자 돌연변이는 전이 유형(synchronous or metachronous)에 관계 없이 거의 항상 일치하는 양상을 보였다. 원발 부위와 비교하여 원격 전이 조직에서 추가적으로 빈번한 돌연변이는 관찰되지 않았다.

그림 5 에서는 몇몇 유전자의 돌연변이의 빈도를 원격 전이가 존재하는 원발 종양 (63 개 샘플)과 원격 전이 조직(19 개 샘플)에서 비교하여 나타내었다. 가장 흔했던 *TERT* 프로모터와 *BRAF*^{V600E} 유전자는 모두 원발성 종양과 원격 전이 사이에서 유사한 빈도를 보였다. 즉, 원발 종양의 56% 및 원격 전이의 58% (11/19)에서 *TERT* 프로모터 돌연변이가 관찰되었고 (그림 5A), 원발 종양의 41% 및 원격 전이 조직의 42% (8/19)에서 *BRAF*^{V600E} 돌연변이가 확인되었다 (그림 5B). 또한 HMTs, SWI/SNF subunit 및 PI3K/AKT/mTOR pathway 의 돌연변이 역시 원발 종양과 원격 전이 조직 간에 유사한 빈도로 관찰되었다 (그림 5C-E).

Figure 4. Mutations in matched pairs. (A) Numbers of mutations, (B) driver genes, (C) *TERT* promoter, (D) *ZFH3*, (E) key pathways and functional groups, and (F) other genes. Pairs of the primary thyroid tumor and matched distant metastasis are arranged from left to right. Sample numbers in blue letters indicate samples with synchronous metastases and red letters indicate those with metachronous metastases. Sample numbers with quotation marks indicate the distant metastases samples. Reused with permission and modified after *Endocr Relat Cancer*. 2020 May;27(5):285-293.

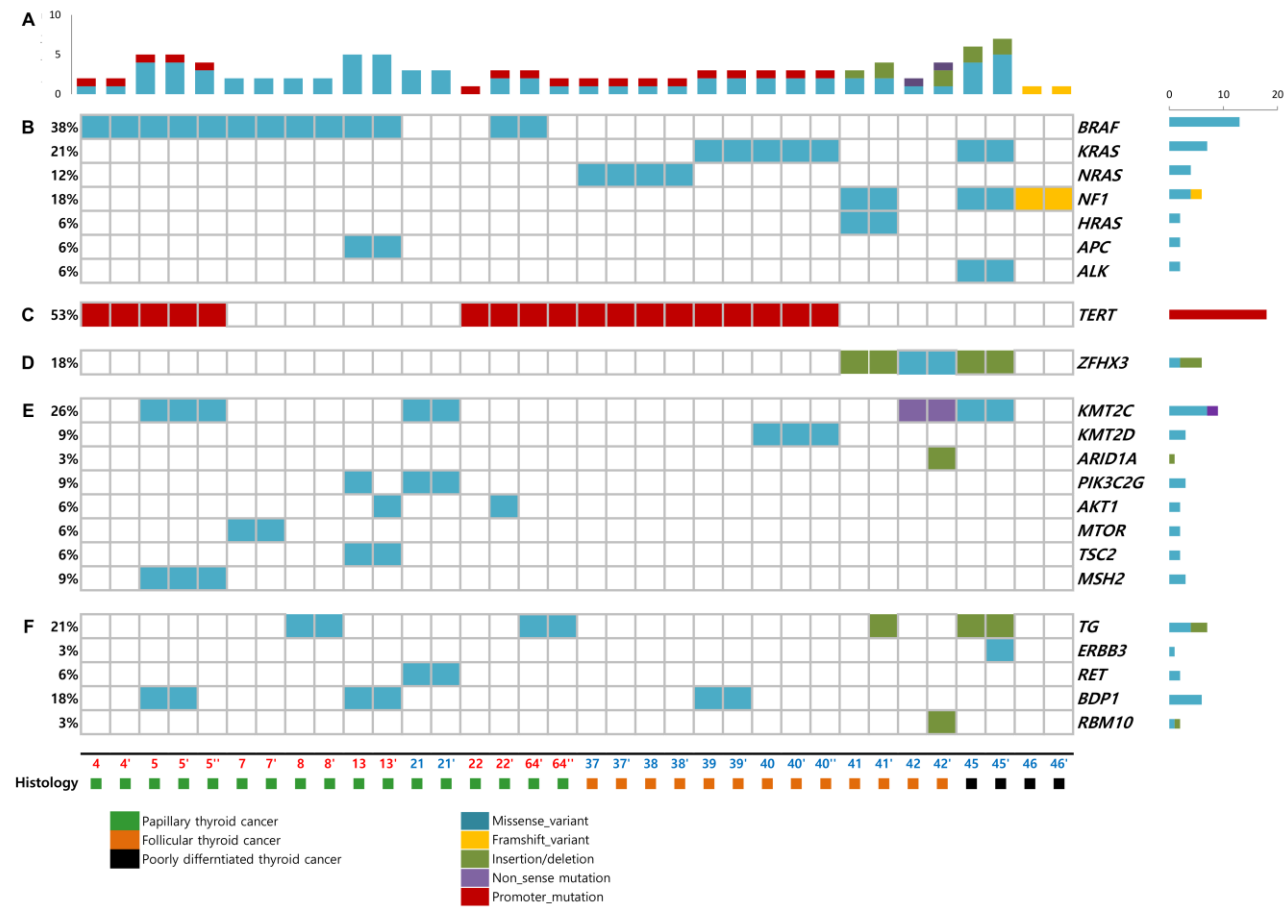
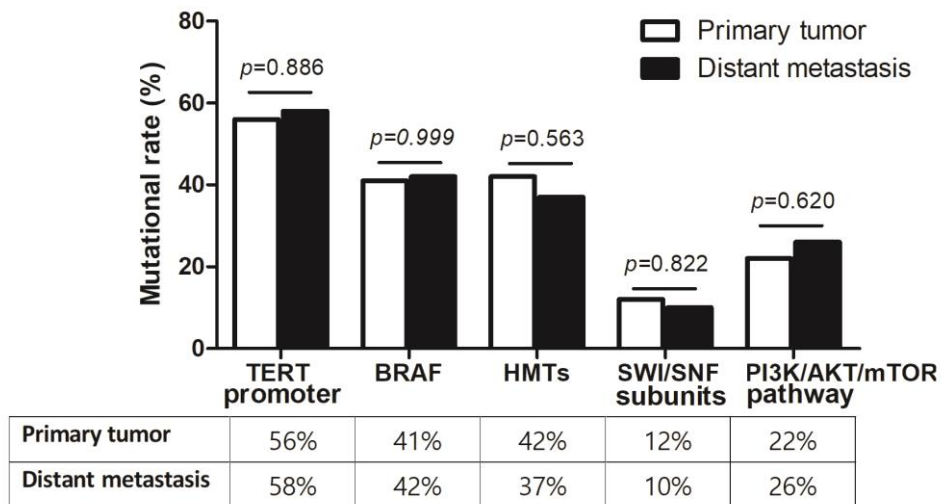


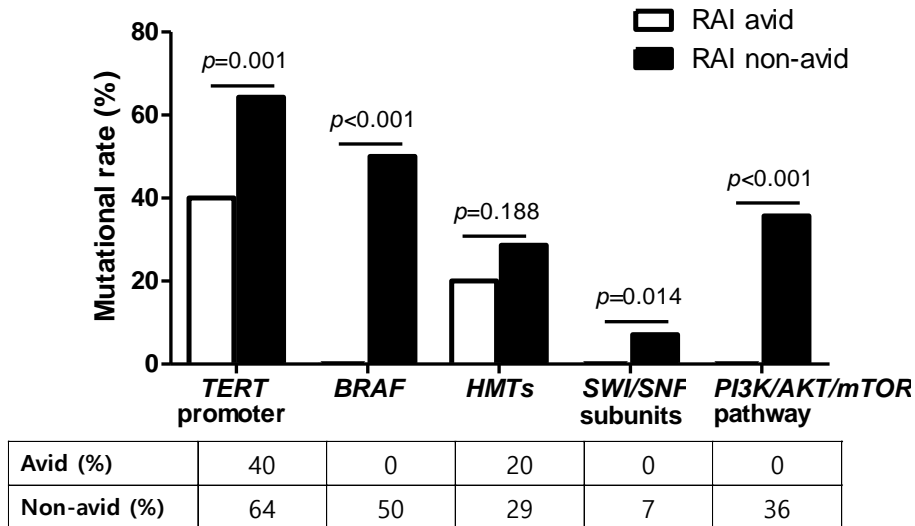
Figure 5. Frequency of mutations in *TERT* promoter, *BRAF*^{V600E}, histone methyltransferases, SWI/SNF subunits, and PI3K/AKT/mTOR pathway in primary tumors and distant metastases. Reused with permission and modified after *Endocr Relat Cancer*. 2020 May;27(5):285-293.



5. 방사성요오드 섭취 여부에 따른 조직의 주요 유전자 돌연변이 비교

원격 전이 조직의 방사성요오드 (radioactive iodine, RAI) avidity 섭취 여부에 따른 주요 유전자 돌연변이 상태를 비교해보았다 (그림 6). *TERT* 프로모터 돌연변이는 RAI avid 한 조직에서는 40%, avid 하지 않은 조직에서는 64% 확인되어 통계적으로 유의한 차이를 보였다 ($p=0.001$). *BRAF*^{V600E} 돌연변이도 avid 한 조직에서는 0%이나 avid 하지 않은 조직에서는 50%로, 두 군간 유의한 차이를 보였다 ($p<0.001$). 비슷하게, SWI/SNF subunits 구성 유전자의 돌연변이율도 RAI avid 한 샘플에서는 0%, avid 하지 않은 샘플에서는 7%로 ($p=0.014$), PI3K/AKT/mTOR pathway 구성 유전자의 돌연변이는 RAI avid 한 조직에서는 발견되지 않았고 avid 하지 않은 조직에서는 36% 로 차이를 보였다 ($p<0.001$). 반면, HMTs 유전자 돌연변이는 두 군간에 유의한 차이를 보이지 않았다 (20% vs. 29%, $p=0.188$).

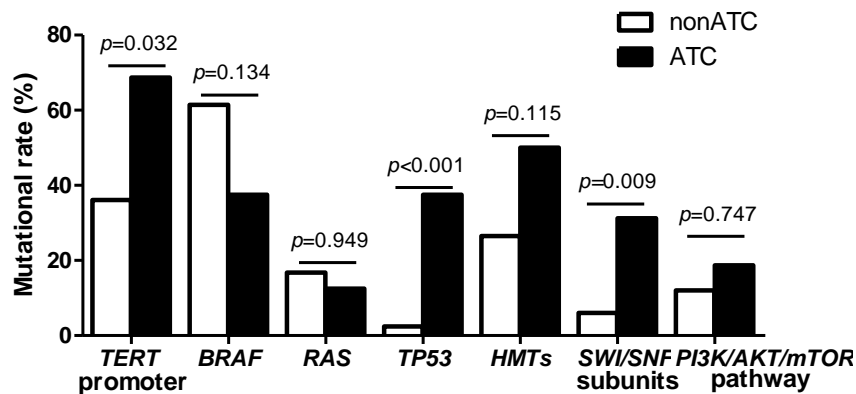
Figure 6. Mutational comparison between radioactive iodine avid and non-avid samples of distant metastasis. RAI, radioactive iodine.



6. Non-ATC 와 ATC 조직에서의 주요 유전자 돌연변이 비교

본 연구에 포함된 여러 갑상선 암종들을 non-ATC 와 ATC 로 나누어 주요 유전자 돌연변이 상태를 비교하였다 (그림 7). *TERT* 프로모터 돌연변이는 non-ATC 에서는 36%, ATC 에서는 69% 확인되었고 $p=0.032$ 로 유의하게 차이가 났다. 반면 *BRAF*^{V600E} 돌연변이는 non-ATC 에서 61%로 더 높았고 ATC 에서는 37%로 확인되었으나 두 군간의 유의한 차이는 보이지 않았다 ($p=0.134$). ATC 에서 non-ATC 보다 유의하게 돌연변이율이 높았던 유전자는 *TP53* (2% vs. 37%, $p<0.001$), SWI/SNF subunits 구성 유전자 (6% vs. 31%, $p=0.009$)이었다. *RAS*, HMTs, 그리고 PI3K/AKT/mTOR pathway 구성 유전자의 돌연변이는 non-ATC 와 ATC 조직에서 유의한 차이는 확인되지 않았다.

Figure 7. Mutational comparison between non-ATCs and ATCs. ATC, anaplastic thyroid carcinoma.



Non-ATC (%)	36	61	17	2	26	6	12
ATC (%)	69	37	12	37	50	31	19

7. *BRAF*^{V600E}-mutant 진행성 PTC 환자들에서의 생존율 분석

7-1. Functional group 유전자 돌연변이 여부에 따른 기저 임상 병리학적 특성의 비교

BRAF^{V600E} 돌연변이가 있는 진행성 PTC 환자 총 50 명에 대하여 functional group 유전자 돌연변이 여부에 따라 특징을 비교해보았다 (표 6). 50 명 중 classic PTC 환자는 19 명 (38.0%), TCV PTC 환자는 23 명 (46.0%), CCV PTC 환자는 8 명 (16.0%)이었다. 이 환자들 중 37 명 (74.0%)은 functional group 에 돌연변이가 없었으며, 13 명 (26.0%)은 하나 이상의 functional group 에 돌연변이가 있었다. Functional group 돌연변이가 없는 환자들에서 가장 흔한 병리 타입은 TCV PTC (54.1%)인 반면, functional group 돌연변이가 있는 환자들에서는 classic PTC 가 69.2%로 가장 흔하였다. Functional group 돌연변이가 있는 환자는 없는 환자보다 유의하게 나이가 많았지만 성별, 원발 종양의 크기, 갑상선 외 침범, 다발성, 그리고 림프절 전이는 두 그룹 간에 차이가 없었다. 한편, 원격 전이의 비율은 functional group 돌연변이가 있는 환자에서 유의하게 더 높았는데 ($p=0.017$), synchronous 전이 (15.4% vs 10.8%) 및 metachronous 전이 (53.8% vs 16.2%) 모두 functional group 에서 높게 관찰되었다.

이들 50 명을 추가적인 돌연변이 여부에 따라 3 개의 그룹으로 분류하여 기저 임상 병리학적 특성을 비교해보았다 (표 7): *BRAF*^{V600E} 돌연변이만 있는 그룹 (그룹 1, n=15), *BRAF*^{V600E} 돌연변이 + functional group 이외의 다른 유전자에 돌연변이가 있는 그룹 (그룹 2, n=22), *BRAF*^{V600E} 돌연변이 + functional group 돌연변이가 있는 그룹 (그룹 3, n=13). 그룹 1 환자들에서 TCV PTC 가 가장 흔한 반면 (73.3%) 그룹 2 와 3 에서는 classic PTC 가 가장 흔하였다. 나이는 각 그룹에서 중앙값 40 세, 52 세, 59 세로 유의한 차이를 보였다 ($p=0.005$). 원격 전이는 그룹 2 와 3 에서만 발견되었다.

Table 6. Baseline clinicopathological characteristics of patients with advanced PTC harboring *BRAF*^{V600E} mutation

	Total (N = 50)	No mutation in FG (n=37)	Mutation in FG (n=13)	p- value
Pathology				0.026
Classic PTC	19 (38.0%)	10 (27.0%)	9 (69.2%)	
TV PTC	23 (46.0%)	20 (54.1%)	3 (23.1%)	
CCV PTC	8 (16.0%)	7 (18.9%)	1 (7.7%)	
Age (years)	49.5 (38.0–59.5)	48.0 (35.0–55.0)	58.9 (48.9–68.4)	0.025
Gender (female)	29 (58.0%)	23 (62.2%)	6 (46.2%)	0.497
Primary tumor size (cm)	2.3 (1.5–3.2)	2.1 (1.4–2.8)	3.0 (1.5–3.8)	0.341
Extrathyroidal extension				0.535
Microscopic	23 (46%)	17 (45.9%)	6 (46.2%)	
Gross	19 (38%)	15 (40.5%)	4 (30.8%)	
Multifocality (yes)	21 (42.0%)	16 (43.2%)	5 (38.5%)	0.801
LN metastases (yes)				0.482
N1a	15 (30.0%)	12 (32.4%)	3 (23.1%)	
N1b	30 (60.0%)	22 (59.4%)	8 (61.5%)	
Distant metastases				0.017
Synchronous	6 (12.0%)	4 (10.8%)	2 (15.4%)	
Metachronous	13 (26.0%)	6 (16.2%)	7 (53.8%)	
AJCC TNM 8th stage				0.248
I	33 (66.0%)	27 (73.0%)	6 (46.2%)	
II	12 (24.0%)	7 (18.9%)	5 (38.5%)	
III	1 (2.0%)	1 (2.7%)	0 (0.0%)	
IV	4 (8.0%)	2 (5.4%)	2 (15.4%)	

Abbreviations: FG, functional group; PTC, papillary thyroid carcinoma; TV, tall cell variant; CCV, columnar cell variant; AJCC TNM, American Joint Committee on Cancer Tumor Node Metastasis

Table 7. Baseline clinicopathological characteristics in genomic subgroups based on the presence of additional mutation in patients with advanced PTC harboring *BRAF*^{V600E} mutation

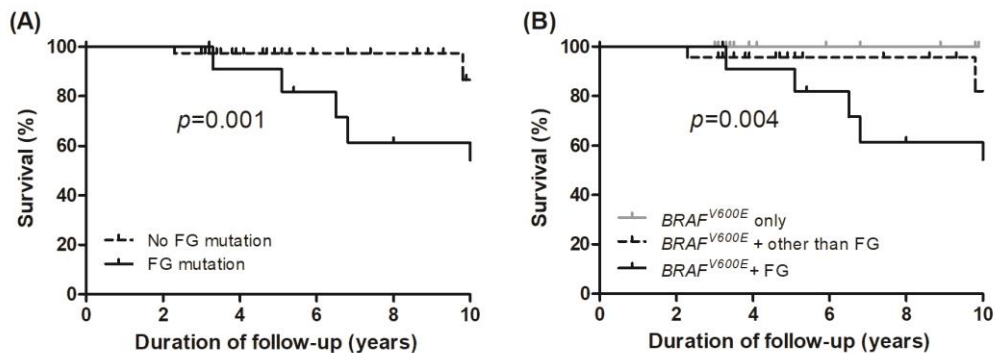
	<i>BRAF</i> ^{V600E} only (n=15)	<i>BRAF</i> ^{V600E} + additional mutation other than FG (n=22)	<i>BRAF</i> ^{V600E} + FG (n=13)	<i>p</i> - value
Pathology				0.004
Classic PTC	0 (0%)	10 (45.5%)	9 (69.2%)	
TV PTC	11 (73.3%)	9 (40.9%)	3 (23.1%)	
CCV PTC	4 (26.7%)	3 (13.6%)	1 (7.7%)	
Age (years)	40.0 (33-48)	52 (40-60)	59 (49-68)	0.005
Gender (female)	10 (66.7%)	13 (59.1%)	6 (46.2%)	0.527
Primary tumor size (cm)	2.2 (1.4-2.6)	2.0 (1.8-3.0)	3.0 (1.5-3.8)	0.573
Extrathyroidal extension				0.535
Microscopic	7 (46.7%)	10 (45.4%)	6 (46.2%)	
Gross	5 (33.3%)	10 (45.4%)	4 (30.8%)	
Multifocality (yes)	5 (33.3%)	11 (50.0%)	5 (38.5%)	0.661
LN metastases (yes)				0.826
N1a	5 (33.3%)	7 (31.8%)	3 (23.1%)	
N1b	9 (60.0%)	13 (59.1%)	8 (61.5%)	
Distant metastases				0.003
Synchronous	0 (0.0%)	4 (18.2%)	2 (15.4%)	
Metachronous	0 (0.0%)	6 (27.3%)	7 (53.8%)	
AJCC TNM 8th stage				0.051
I	15 (100.0%)	12 (54.5%)	6 (46.2%)	
II	0 (0.0%)	7 (31.8%)	5 (38.5%)	
III	0 (0.0%)	1 (4.5%)	0 (0.0%)	
IV	0 (0.0%)	2 (9.1%)	2 (15.4%)	

Abbreviations: FG, functional group; PTC, papillary thyroid carcinoma; TV, tall cell variant; CCV, columnar cell variant; AJCC TNM, American Joint Committee on Cancer Tumor Node Metastasis

7-2. Functional group 유전자 돌연변이 여부에 따른 전체 생존율 (OS) 비교

Functional group 유전자의 돌연변이 존재 여부에 따라 $BRAF^{V600E}$ -mutant 진행성 PTC의 OS를 비교하였다 (그림 8). 그림 8A에서 볼 수 있듯이, functional group 돌연변이가 있는 환자는 돌연변이가 없는 환자보다 OS가 유의하게 낮았다 (HR=6.96, 95% CI 1.88–25.74, $p=0.001$). 앞서 정의한 3개의 그룹으로 나누어 OS를 비교하였을 때에도 유의한 차이를 보였는데 (그림 8B, log-rank $p=0.004$), 그룹 3에서 가장 생존율이 낮음을 확인할 수 있었다.

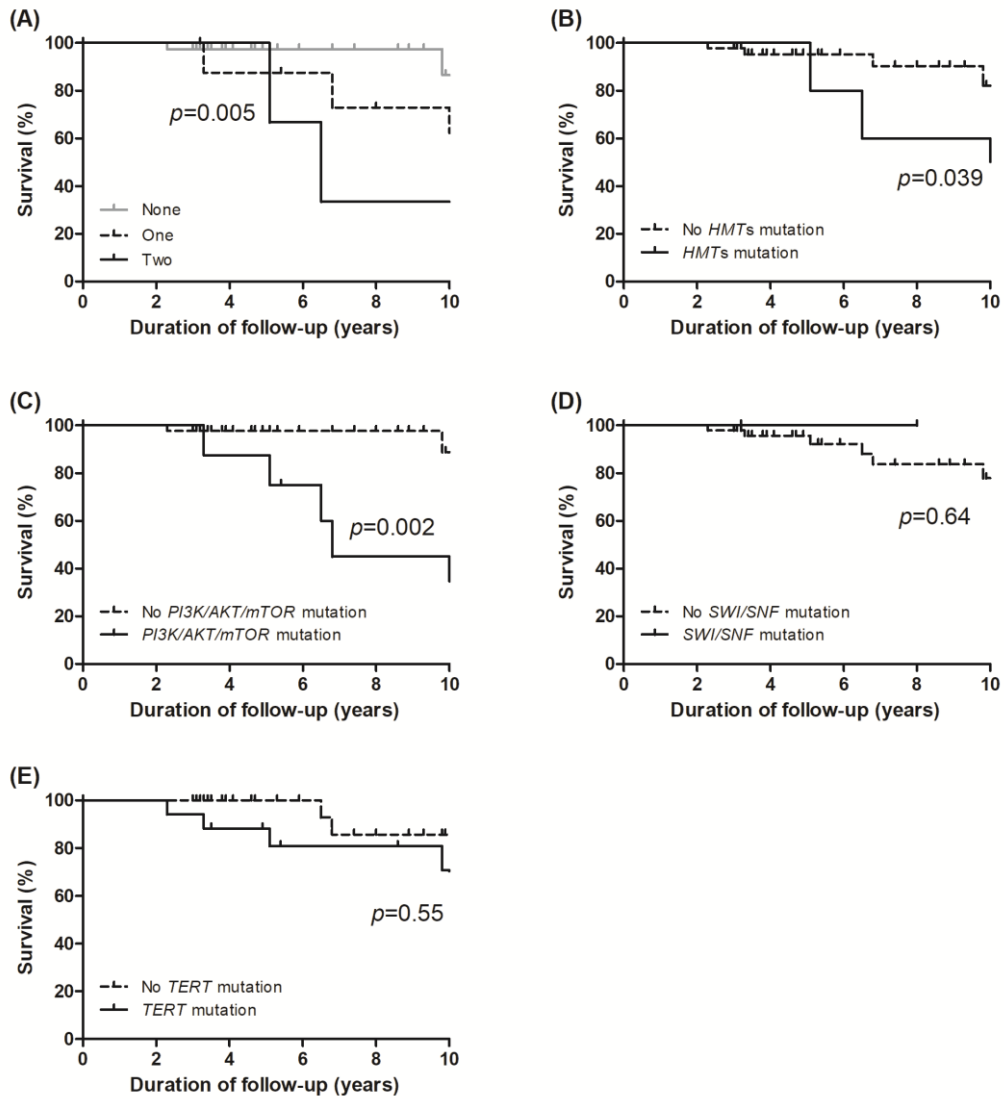
Figure 8. Overall survival curve (A) of patients with advanced PTC according to presence of mutations in functional groups and (B) among three genomic subgroups: $BRAF^{V600E}$ only vs. $BRAF^{V600E}$ + additional mutations other than functional groups vs. $BRAF^{V600E}$ + mutations in functional groups (group 3). FG, functional groups.



7-3. 각각의 functional group 유전자 부위 (site)의 돌연변이 개수 및 여부 그리고 *TERT* 프로모터 돌연변이 여부에 따른 전체 생존율 비교

다음으로, functional group 유전자 돌연변이 부위의 개수 (0 vs. 1 vs 2 부위)에 따른 생존 곡선을 비교하였다 (Figure 9A). OS의 유의한 차이가 세 그룹 사이에서 관찰되었는데, functional group 유전자들 중에서 2가지 돌연변이가 존재하는 환자들의 생존률이 가장 낮았다 (log-rank $p=0.005$). 각각의 functional group에 따른 OS을 살펴보면, HMTs 그리고 PI3K/AKT/mTOR pathway 유전자들에 돌연변이가 있는 경우에서 없는 경우보다 생존율이 유의하게 나뉘었다 ($p=0.039$ 및 $p=0.002$, 그림 9B 및 9C). 그러나 *SWI/SNF* subunit에의 돌연변이 존재는 통계적으로 유의한 생존율의 차이를 나타내지 않았다 ($p=0.064$, 그림 9D). 또한, *TERT* 프로모터 돌연변이 여부도 생존율과 유의한 연관관계를 보이지는 않았다 ($p=0.55$, 그림 9E).

Figure 9. Overall survival curves (A) according to the numbers of mutation sites in functional groups. Survival curves according to the presence of mutations in (B) HMTs, (C) PI3K/AKT/mTOR pathway, (D) SWI/SNF chromatin remodeling complex, and (E) TERT promoter



7-4. Functional group 유전자 돌연변이가 전체 생존율에 미치는 영향

다변량 분석을 수행하여 functional group 유전자 돌연변이가 OS 에 미치는 영향을 평가하였다 (표 8). 그 결과, functional group 돌연변이의 존재는 adjusted HR 이 11.65 (95% CI 1.39–97.58, $p=0.024$)으로 독립적으로 사망 위험을 증가시켰다. Functional group 유전자 돌연변이가 없는 경우를 기준으로 보았을 때, 3 개의 functional group 유전자 중 한 부위에 돌연변이가 있는 경우 사망률이 HR 11.53 (95% CI 2.69–49.4, $p=0.001$)으로 증가하였고, 3 개 중 두 부위에 돌연변이가 있는 경우 사망률은 HR 60.12(95% CI 10.63–340.2, $p < 0.001$)으로 더 높아짐을 확인하였다. 그룹 1, 2, 그리고 3 을 비교한 결과, 그룹 3 은 그룹 1 보다 사망 위험이 더 높았으며(HR=13.96, 95% CI 1.67–116.9, $p=0.015$) 그룹 2 는 그룹 1 보다 낮은 생존율과 관련이 없었다 (HR=1.20, 95% CI 0.14–10.04, $p=0.867$).

Table 8. Prognostic impact of mutation in genes encoding functional groups on survival in patients with advanced PTC harboring $BRAF^{V600E}$ mutation

	Adjusted HR (95% CI)*	<i>p</i> -value
Mutation in functional groups		
Presence vs. absence	11.65 (1.39–97.58)	0.024
Number of mutations in functional groups		
One site vs. none	11.53 (2.69–49.4)	<0.001
Two sites vs. none	60.12 (10.63–340.2)	<0.001
Comparisons in groups		
Group 2 vs. Group 1	1.20 (0.14–10.04)	0.867
Group 3 vs. Group 1	13.96 (1.67–116.9)	0.015

*Adjusted by age, sex, tumor size, multifocality, extrathyroidal extension, lymph-node metastasis, distant metastasis. Group 1: $BRAF^{V600E}$ only; Group 2: $BRAF^{V600E}$ + additional mutations other than functioning groups; Group 3: $BRAF^{V600E}$ + mutations in functional groups.

고찰

DTC는 갑상선 암의 90% 이상을 차지하며 (22), 10년 생존율이 85~95%로 예후가 매우 좋은 암 중 하나이다 (23, 24). 그러나 이러한 DTC 환자의 약 10%에서 원격 전이가 발생하고, 원격 전이 발생 후 전체 10년 생존율은 약 40%로 감소한다 (25). 특히, TCV 또는 CCV와 같이 침습적 변이가 있는 경우 이러한 원격 전이 발생이 더 흔하면서 RAI 치료에 저항성을 보일 수 있어 더욱 예후가 나쁘다 (26, 27). 또한 PDTc와 같은 드문 유형의 갑상선 암은 갑상선 암의 약 1-15%를 차지하며 대부분 원격 전이로 인해 질병-특이 사망률(disease-specific mortality)이 발생한다 (28). 가장 예후가 나쁘다고 알려진 ATC는 갑상선 암의 1~2%만 차지하지만, 최대 50%의 사망률에 기여한다 (29). 이렇듯 예후가 현저히 불량한 진행성 갑상선 암에 대한 정확한 유전자 프로파일 (genetic profile)을 파악하는 것은 정밀 의학 및 표적 요법의 시대에 매우 중요한 요소이다.

본 연구에서는 우선 표적 NGS를 시행하여 진행성 갑상선 암에서 주요 유전자 돌연변이 상태를 식별하고자 하였다. 그 결과, *BRAF*^{V600E} (58%)와 *TERT* 프로모터 (41%) 돌연변이가 이들에서 가장 흔한 돌연변이임을 확인하였다. 이후 원발 종양과 원격 전이 조직의 돌연변이 상태가 일치하는지 평가하였는데, 두 부위의 유전적 프로파일은 유사한 패턴을 보였고, 원격 전이 조직에서도 *TERT* 프로모터 (58%) 및 *BRAF*^{V600E} (42%) 돌연변이가 가장 흔한 변이로 확인되었다. 또한, 이전 연구에서 사용된 유사한 접근 방식인 functional groups의 유전자 돌연변이 상태를 두 부위에서 조사해보았는데, HMTs, *SWI/SNP* subunit, *PI3K/AKT/mTOR* pathway의 유전자 돌연변이를 모두 원발 종양과 원격 전이 조직에서 비슷하였다. 중요한 점은 동일한 주요 초기 및 후기 돌연변이가 각각의 원발 종양-원격 전이 쌍에 항상 존재하였다는 점인데, 이는 원격 전이의 유전적 프로파일을 원발 종양의 분석으로부터 유추될 수 있음을 시사한다. 원격 전이 조직에서만 특별히 더 흔한 유전자 돌연변이는 확인되지 않았다. 또한 non-ATC와 ATC는 *BRAF*, *RAS*, HMT 및 *PI3K/AKT/mTOR* 경로에서 유사한 돌연변이 비율을 보였지만, *TERT* 프로모터, *TP53*, *SWI/SNP* subunits 돌연변이는 ATC에서 유의하게 높게 관찰되었다.

TERT 프로모터 돌연변이는 고위험 갑상선 암의 잘 알려진 지표이다 (10-12). *TERT*가 체세포 변이 또는 epigenic modulation을 통해 재활성화되면 텔로미어의 연장에 의해 암의 발달 및 진행이 초래된다 (30). 이 *TERT* 돌연변이는 본 연구에서 갑상선 원발 종양 (41%)과 원격 전이 (58%)에서 매우 높은 변이율을 보였는데, 이는 TCGA 연구의 PTC 샘플에서 확인된 9.4%와 대조를 이룬다. 반면, MSKCC 연구에서 PDTc의 40%,

ATC 의 73%가 *TERT* 프로모터 돌연변이를 동반하고 있어 고위험 지표임을 확인할 수 있다. 이전 연구들에서 *TERT* 프로모터 돌연변이와 원격 전이 발생과의 연관성에 대해 보고된 바 있다 (31-34). 본 연구에서는 64%의 환자들이 원격 전이를 갖고 있었기 때문에 이러한 높은 *TERT* 프로모터 돌연변이가 설명될 수 있다. *BRAF*^{V600E} 돌연변이 역시 갑상선 암의 공격적 특징과 관련된 돌연변이로 잘 알려져 있다 (2-4). 본 연구에서는 원발 갑상선 종양의 58%와 원격 전이 조직의 42%가 *BRAF*^{V600E} 돌연변이를 갖고 있었는데, 대부분이 PTC 환자의 조직이었다 (73.7%, 57 개 중 42 개). 특히 침습적 변이형 PTC 환자에서는 89%가 *BRAF*^{V600E} 돌연변이를 보였다. 이는 이전 연구들에서 TCV PTC 에서 높은 *BRAF*^{V600E} 돌연변이율 (80 – 100%)을 보고한 내용과 일치한다 (19, 35). 한편 *TERT* 프로모터 돌연변이와 달리 원격 전이 위험 증가와의 연관성은 불분명하지만 (36, 37), 본 연구에서는 원격 전이를 동반한 원발 종양과 원격 전이 조직 사이에서 *BRAF*^{V600E} 돌연변이율은 높은 일치도를 보였다.

본 연구에서 종양 억제 유전자 중 가장 높은 돌연변이율을 보인 유전자는 *ZFH3* 이었고 13%에서 확인이 되었다. Zinc finger homeobox 전사 인자 (transcription factor) 인 *ZFH3* 의 손실이 세포 증식과 MYC 발현을 증가시킴으로써 일부 고형암에서 종양 억제 유전자로 기능하는 것으로 보고되었다 (38, 39). 특히 비소세포폐암 환자에서 *ZFH3* 의 돌연변이가 있는 경우 림프절 전이의 위험이 높고 생존율이 저하된다고 알려져 있는데, 갑상선암에서 이 유전자와 질병 경과에 대해서는 알려진 바가 거의 없다. TCGA 프로젝트는 PTC 환자에서 *ZFH3* 돌연변이의 1.7%를 보고한 반면 본 연구에서는 진행성 갑상선암에서 돌연변이 비율의 13%로 관찰되어, *ZFH3* 와 고위험 갑상선암 사이의 연관성을 짐작해볼 수 있으나, 이에 대해서는 추가 연구가 필요하다. 두 번째로 흔한 종양 억제 유전자의 돌연변이는 *TP53* 이었고 6%에서 확인이 되었다. *TP53* 돌연변이는 인간의 다양한 암종에서 발견되고 tumor progression 과 관련이 있다고 알려져 있다 (40, 41). *TP53* 돌연변이는 진행성 갑상선암에서도 매우 특징적인 소견인데 (42, 43), MSKCC 그룹의 연구에서 PDTC 의 8%, ATC 의 73%에서 돌연변이가 관찰되었다 (11). 이 때 *TP53* 돌연변이가 있는 환자들의 중앙 생존기간 (median survival time) 은 오직 10 개월이었던 반면, *TP53* wild type 에서는 124 개월이었다. 본 연구에서는 PDTC 의 0%, ATC 의 38%에서만 *TP53* 이 관찰되어 상대적으로 돌연변이율이 낮았다. 이는 PDTC 의 경우 조직 샘플 수가 5 개 뿐이었고, ATC 도 16 개로 조직이 충분하지 못해, 샘플 수 차이에서 기인했을 가능성이 있다.

본 연구에서 다뤄진 중요한 부분은 원발 갑상선 종양과 원격 전이 조직 사이의 유사한 주요 유전자 돌연변이 상태이다. 원발 조직과 원격 전이 조직 사이의 유전적 관계에 대해서는 알려진 바가 많지 않다. 본 연구의 연구진은 최근 미세 PTC의 돌연변이 프로파일과 림프절 전이 조직 간의 유사한 유전적 변이 상태를 확인하여 보고한 바 있다 (44). 하지만 이 연구에는 원격 전이 조직 전이에 대한 자료는 포함되지 않았다. 이전 Melo 등에 의한 연구에서는 3가지 유전자에 초점을 맞추어 원발 종양, 림프절 및 원격 전이 간의 유전적 프로파일의 유사도를 조사하였는데, 여기에 포함된 유전자는 *TERT* 프로모터, *BRAF*^{V600E} 및 *NRAS* 이었다 (33). 이 연구에서는 원발 종양의 유전자형과 림프절 전이의 유전형의 일치도는 높지만, 원발 종양(15.9%)과 원격 전이(52.4%) 간의 *TERT* 프로모터 돌연변이 빈도는 유의한 차이가 있다고 보고했다. 이는 본 연구의 결과와 일치하지 않는데, 아마도 환자 집단의 차이가 이러한 불일치를 유발했을 것이라고 생각된다. 즉, 인용된 연구에서 PTC 환자는 전체 환자의 88.2% (180/204)를 차지했으며 전체 PTC 환자 중 원격 전이가 있는 환자는 35명에 불과했다. FTC에서 원격 전이가 있는 환자는 14명 (6.9%)이었고 PDTC와 ATC에서 원격 전이가 있는 환자는 7명(3.4%)이었다. 전체적으로, 인용된 연구 환자의 27.9%가 원격 전이를 가졌으며, 이는 PDTC (5%) 및 ATC(16%)의 비율이 상대적으로 높고 64%의 원격전이율을 갖은 본 연구와 큰 차이를 보인다. 본 연구에서 확인된 높은 원발 종양과 원격 전이 사이의 유전자형 일치도로부터 우리는 원격 전이가 원발성 갑상선 종양에서 유래하고 새로운 유전적 변이의 획득이 필요하지 않을 수 있음을 짐작할 수 있다. 대신, tumor microenvironment와 같은 다른 요인이 원격 전이 과정에서 중요한 역할을 할 가능성이 있겠다. 원격 전이 과정의 정확한 기전을 밝히기 위해서는 추가 분석이 필요하다.

한편, *BRAF*^{V600E} 돌연변이가 종양 크기, 갑상선의 침범, 림프절 전이, 사망률 증가와 연관이 있다는 보고들이 많음에도 불구하고, *BRAF*^{V600E} 돌연변이가 있는 PTC의 임상 예후는 매우 양호한 것에서부터 매우 공격적인 것에 이르기까지 다양하다. 이는 이러한 *BRAF*^{V600E} 돌연변이가 있는 PTC 유형 내에 유전적 다양성이 있음을 의미하고 이들에게서 *BRAF*^{V600E} 돌연변이 외 추가적인 유전적 변이가 위험 계층화 (risk stratification) 위해 필요함을 시사한다. 이에 본 연구에서는 하위 분석으로, *BRAF*^{V600E} 돌연변이를 가진 PTC 환자 50명을 대상으로 유전자형에 따른 OS를 분석하였다. 그 결과 HMTs, SWI/SNF subunit, 또는 *PI3K/AKT/mTOR* pathway의 하나 이상의 돌연변이 존재가 이들의 사망률 증가와 관련이 있음을 확인하였다. 이러한 결과는 다양한 임상 병리학적 위

험 인자를 보정한 후에도 유지되었다. 또한, functional group 두 가지에 돌연변이가 있는 환자는 한 가지에 돌연변이가 있는 환자보다 OS 가 더 낮았으며 이는 functional group 의 돌연변이가 생존에 미치는 점진적인 영향 (incremental effect) 를 보여준다. 반면, functional group 돌연변이 이외에 다른 추가적인 변이는 *BRAF*^{V600E} 돌연변이를 가진 PTC 환자의 생존률에 영향을 덜 미친다는 것이 관찰되었다.

세 가지 functional group 인 HMTs, SWI/SNF subunit, 그리고 PI3K/AKT/mTOR pathway 는 Landa 등에 의한 PDTC 와 ATC 의 유전자형을 분석 한 연구에서 처음으로 갑상선암에서 정의되었다 (11). 이 연구에서 PDTC 의 20% 와 ATC 의 61%에서 functional group 돌연변이가 확인되었다. 3 가지의 functional group 중 가장 흔한 돌연변이는 PI3K/AKT/mTOR pathway 의 돌연변이였는데, PDTC 에서 11%, ATC 에서 39%가 확인되었다. 반면 본 연구에서 functional group 돌연변이 중 가장 흔했던 것은 HMT 의 돌연변이였다. PTC 의 21%, ATC 의 55%, PDTC 의 40%, 그리고 ATC 의 50%에서 관찰되어 전반적으로 모든 타입에서 높은 돌연변이율을 보였다. HMT 돌연변이 여부에 따른 생존률을 분석한 결과 HMT 의 돌연변이가 있는 경우 없는 경우보다 유의하게 생존률이 저하됨을 확인할 수 있었다. 이는 높은 비율의 HMT 돌연변이가 종양의 공격성과 관련되었을 가능성을 시사하는데, 향후 연구에서 진행성 갑상선암 외에 초기 DTC 환자들에서 HMT 돌연변이율을 추가로 비교 분석하여 갑상선 암이 HMT 돌연변이를 획득함에 따라 어떠한 공격적인 성격을 얻게 되고 이것이 어떻게 생존률 저하로 이어지는지 추가 분석이 필요할 것으로 생각된다. 한편, 본 연구의 분석에서 *BRAF*^{V600E} 돌연변이를 가진 PTC 환자만을 대상으로 하였을 때 functional group 돌연변이율은 26% (13/50)이었다. 이는 TCGA 의 PTC 에서 functional group 돌연변이 비율 20%와 본 연구의 원격 전이가 있는 PTC 에서의 43.7%, 공격적인 변이가 있는 PTC 에서의 34%의 범위 사이에 있다. Functional group 의 변이와 관련된 유전자형-표현형 (genotype-phenotype) 관계에 대한 정보는 매우 제한적이다. 이전 쥐를 이용한 연구에서는 SWI/SNF subunit 의 손실이 RAI 불응성과 관련이 있고 *BRAF*^{V600E} 돌연변이를 가진 PTC 에서 mitogen-activated protein kinase inhibitor 기반 재분화 (redifferentiation) 치료에 대한 내성이 있음을 보고하였다 (45). 이에 대해서는 인간에서 연구된 바는 없어 검증이 필요하다. 또한 최근에 *BRAF*^{V600E} 돌연변이를 가진 PTC 환자 225 명을 대상으로 한 연구에서 PI3K/AKT/mTOR pathway 의 변이가 병기와 관련 없이 질병-특이 사망률을 증가시킨다고 보고하였다 (46). 이런 접근 방식은 *BRAF*^{V600E} 돌연변이를 가진 PTC 환자

의 risk stratification 을 개선하는데 유용했지만, functional group 중 PI3K/AKT/mTOR pathway 에만 제한되었다. 본 연구에서는 다른 두 functional group 의 돌연변이 영향을 추가로 평가하였고, functional group 돌연변이의 존재 및 정도에 따라 환자들의 예후를 예측 및 분류할 수 있었다.

본 하위 분석에서 *TERT* 프로모터 돌연변이의 존재는 *BRAF*^{V600E} 돌연변이를 가진 PTC 환자에서 사망률 증가와 관련이 없었다. *TERT* 프로모터와 *BRAF*^{V600E} 돌연변이가 공존하면 시너지 효과로 특히 예후가 좋지 않다는 사실은 잘 알려져 있다 (13). 본 연구에서 둘의 시너지 효과에 대한 통계적 유의성이 나타나지 않은 이유는 작은 샘플 수에 기인할 것으로 생각된다. *TERT* 프로모터 돌연변이와 더불어서 본 연구에서 확인된 functional group 돌연변이 여부를 확인하는 것은 *BRAF*^{V600E} 돌연변이를 동반한 PTC 환자에서 중요한 예후 예측에 매우 중요하게 작용할 것이다.

이 연구의 한계점으로는 첫째, 오직 50 개의 유전자만을 대상으로 표적 NGS 를 시행하였다. 이것은 원발 갑상선 종양과 원격 전이 조직 사이의 유전적 연관성에 bias 를 일으켰을 가능성이 있다. 둘째, 재배열 (rearrangement)에 대한 자료를 얻을 수 없었다. 따라서 갑상선 암에서 자주 보고되는 유전자 변이인 *RET* 또는 *ALK* 재배열에 대한 데이터는 부족하다. 셋째, 샘플 수가 크기 못했다. 특히 침습적 변이형은 TCV 와 CCV 만 포함되었고, PDTC 는 오직 5 명뿐이었다. 이러한 한계에도 불구하고 본 연구는 진행성 갑상선암의 원발 종양과 원격 전이 조직에서 유전적 프로파일을 비교 분석했다는 점에서 강점을 가진다. 또한, functional group 돌연변이 여부가 예후에 미치는 영향을 포괄적으로 분석하였다. 향후 이러한 진행성 갑상선 암에서 더 많은 샘플 수로 유전자형에 대한 분석 및 예후와의 연관성에 대한 연구가 이루어질 필요가 있다.

결론

본 연구는 표적 NGS 를 시행하여 진행성 갑상선 암에서 주요 유전자 돌연변이 상태를 식별하고 원격 전이 조직의 돌연변이 상태와의 일치도를 평가하였으며, 일부 유전자 변이 상태와 사망률 간의 연관성에 대해 조사하였다. 그 결과, *TERT* 프로모터와 *BRAF*^{V600E} 돌연변이는 진행성 갑상선암에서 가장 흔한 두 가지 돌연변이임을 확인하였고, 원발 갑상선 종양과 이에 반응하는 원격 전이 조직 사이의 유전적 프로파일에서 높은 일치도를 관찰하였다. 이는 원격 전이 과정에서 추가적인 유전적 변이의 역할은 제한적이고, 종양 미세환경 (tumor microenvironment)와 같은 다른 요인에 대한 연구가 필요함을 시사한다. 마지막으로, *BRAF*^{V600E} 돌연변이와 functional group (HMT, *PI3K/AKT/mTOR* pathway 및 *SWI/SNF* subunit) 돌연변이의 공존은 *BRAF*^{V600E} mutant PTC 환자에서 높은 사망률을 나타냈다. 이러한 functional group 돌연변이와 생존률 사이의 강력한 연관성은 향후 *BRAF*^{V600E} 돌연변이를 가진 PTC 환자에서 치료 바이오마커 (therapeutic biomarker) 개발의 기초를 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Tavares C, Melo M, Cameselle-Teijeiro JM, Soares P, Sobrinho-Simoes M. ENDOCRINE TUMOURS: Genetic predictors of thyroid cancer outcome. *Eur J Endocrinol.* 2016;174(4):R117-26.
2. Kim TH, Park YJ, Lim JA, Ahn HY, Lee EK, Lee YJ, et al. The association of the BRAF(V600E) mutation with prognostic factors and poor clinical outcome in papillary thyroid cancer: a meta-analysis. *Cancer.* 2012;118(7):1764-73.
3. Li C, Lee KC, Schneider EB, Zeiger MA. BRAF V600E mutation and its association with clinicopathological features of papillary thyroid cancer: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(12):4559-70.
4. Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, Viola D, Elisei R, Bendlova B, et al. Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer. *Jama.* 2013;309(14):1493-501.
5. Nikiforov YE. Thyroid carcinoma: molecular pathways and therapeutic targets. *Mod Pathol.* 2008;21 Suppl 2:S37-43.
6. Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res.* 2012;72(10):2457-67.
7. Namba H, Rubin SA, Fagin JA. Point mutations of ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis. *Mol Endocrinol.* 1990;4(10):1474-9.
8. Fukahori M, Yoshida A, Hayashi H, Yoshihara M, Matsukuma S, Sakuma Y, et al. The associations between RAS mutations and clinical characteristics in follicular thyroid tumors: new insights from a single center and a large patient cohort. *Thyroid.* 2012;22(7):683-9.
9. Garcia-Rostan G, Zhao H, Camp RL, Pollan M, Herrero A, Pardo J, et al. ras mutations are associated with aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer. *J Clin Oncol.* 2003;21(17):3226-35.
10. 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.
11. Landa I, Ibrahimspasic 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.
12. 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.
13. 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.
14. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid.* 2016;26(1):1-133.
15. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell.* 2014;159(3):676-90.
16. Ibrahimspasic T, Xu B, Landa I, Dogan S, Middha S, Seshan V, et al. Genomic Alterations in Fatal Forms of Non-Anaplastic Thyroid Cancer: Identification of MED12 and RBM10 as Novel Thyroid Cancer Genes Associated with Tumor Virulence. *Clin Cancer Res.* 2017;23(19):5970-80.
17. Durante C, Haddy N, Baudin E, Leboulleux S, Hartl D, Travagli JP, et al. Long-term outcome of 444 patients with distant metastases from papillary and follicular thyroid carcinoma: benefits and limits of radioiodine therapy. *J Clin Endocrinol Metab.*

2006;91(8):2892-9.

18. Vaisman F, Carvalho DP, Vaisman M. A new appraisal of iodine refractory thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2015;22(6):R301-10.
19. Coca-Pelaz A, Shah JP, Hernandez-Prera JC, Ghossein RA, Rodrigo JP, Hartl DM, et al. Papillary Thyroid Cancer-Aggressive Variants and Impact on Management: A Narrative Review. *Adv Ther*. 2020;37(7):3112-28.
20. Chen JH, Faquin WC, Lloyd RV, Nosé V. Clinicopathological and molecular characterization of nine cases of columnar cell variant of papillary thyroid carcinoma. *Mod Pathol*. 2011;24(5):739-49.
21. Wong KS, Higgins SE, Marqusee E, Nehs MA, Angell T, Barletta JA. Tall Cell Variant of Papillary Thyroid Carcinoma: Impact of Change in WHO Definition and Molecular Analysis. *Endocr Pathol*. 2019;30(1):43-8.
22. Burns WR, Zeiger MA. Differentiated thyroid cancer. *Semin Oncol*. 2010;37(6):557-66.
23. 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.
24. 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.
25. Schlumberger MJ. Papillary and follicular thyroid carcinoma. *N Engl J Med*. 1998;338(5):297-306.
26. Silver CE, Owen RP, Rodrigo JP, Rinaldo A, Devaney KO, Ferlito A. Aggressive variants of papillary thyroid carcinoma. *Head Neck*. 2011;33(7):1052-9.
27. Roman S, Sosa JA. Aggressive variants of papillary thyroid cancer. *Curr Opin Oncol*. 2013;25(1):33-8.
28. Ibrahimasic T, Ghossein R, Carlson DL, Nixon I, Palmer FL, Shaha AR, et al. Outcomes in patients with poorly differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(4):1245-52.
29. Nagaiah G, Hossain A, Mooney CJ, Parmentier J, Remick SC. Anaplastic thyroid cancer: a review of epidemiology, pathogenesis, and treatment. *J Oncol*. 2011;2011:542358.
30. Song YS, Park YJ. Mechanisms of TERT Reactivation and Its Interaction with BRAFV600E. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2020;35(3):515-25.
31. Liu R, Xing M. TERT promoter mutations in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2016;23(3):R143-55.
32. Melo M, da Rocha AG, Vinagre J, Batista R, Peixoto J, Tavares C, et al. TERT promoter mutations are a major indicator of poor outcome in differentiated thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(5):E754-65.
33. Melo M, Gaspar da Rocha A, Batista R, Vinagre J, Martins MJ, Costa G, et al. TERT, BRAF, and NRAS in Primary Thyroid Cancer and Metastatic Disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(6):1898-907.
34. Qasem E, Murugan AK, Al-Hindi H, Xing M, Almohanna M, Alswailem M, et al. TERT promoter mutations in thyroid cancer: a report from a Middle Eastern population. *Endocr Relat Cancer*. 2015;22(6):901-8.
35. Khanafshar E, Lloyd RV. The spectrum of papillary thyroid carcinoma variants. *Adv Anat Pathol*. 2011;18(1):90-7.
36. Liu C, Chen T, Liu Z. Associations between BRAF(V600E) and prognostic factors and poor outcomes in papillary thyroid carcinoma: a meta-analysis. *World J Surg Oncol*. 2016;14(1):241.
37. Zhang Q, Liu SZ, Zhang Q, Guan YX, Chen QJ, Zhu QY. Meta-Analyses of Association Between BRAF(V600E) Mutation and Clinicopathological Features of Papillary

Thyroid Carcinoma. *Cell Physiol Biochem*. 2016;38(2):763-76.

38. Hu Q, Zhang B, Chen R, Fu C, A J, Fu X, et al. ZFH3 is indispensable for ER β to inhibit cell proliferation via MYC downregulation in prostate cancer cells. *Oncogenesis*. 2019;8(4):28.
39. Minamiya Y, Saito H, Ito M, Imai K, Konno H, Takahashi N, et al. Suppression of Zinc Finger Homeobox 3 expression in tumor cells decreases the survival rate among non-small cell lung cancer patients. *Cancer Biomark*. 2012;11(4):139-46.
40. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature*. 1991;351(6326):453-6.
41. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science*. 1991;253(5015):49-53.
42. Fagin JA, Matsuo K, Karmakar A, Chen DL, Tang SH, Koeffler HP. High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. *J Clin Invest*. 1993;91(1):179-84.
43. Nakamura T, Yana I, Kobayashi T, Shin E, Karakawa K, Fujita S, et al. p53 gene mutations associated with anaplastic transformation of human thyroid carcinomas. *Jpn J Cancer Res*. 1992;83(12):1293-8.
44. Jeon MJ, Chun SM, Lee JY, Choi KW, Kim D, Kim TY, et al. Mutational profile of papillary thyroid microcarcinoma with extensive lymph node metastasis. *Endocrine*. 2019;64(1):130-8.
45. Saqena M, Leandro-Garcia LJ, Maag JLV, Tchekmedyian V, Krishnamoorthy GP, Tamarapu PP, et al. SWI/SNF Complex Mutations Promote Thyroid Tumor Progression and Insensitivity to Redifferentiation Therapies. *Cancer Discov*. 2021;11(5):1158-75.
46. Pappa T, Ahmadi S, Marqusee E, Johnson HL, Nehs MA, Cho NL, et al. Oncogenic Mutations in PI3K/AKT/mTOR Pathway Effectors Associate with Worse Prognosis in BRAF(V600E) -Driven Papillary Thyroid Cancer Patients. *Clin Cancer Res*. 2021;27(15):4256-64.

영문요약

Background: Major clinical challenges exist with advanced thyroid carcinomas including differentiated thyroid cancers (DTCs) with distant metastases or aggressive variants, and rare but aggressive subtypes such as poorly differentiated thyroid carcinomas (PDTCs) or anaplastic thyroid carcinomas (ATCs). Limited data exist regarding genetic profile in these advanced thyroid carcinoma and its association with clinical outcome.

Methods: Targeted next-generation sequencing with 50 known thyroid cancer-related genes were performed in tissues from primary tumors and distant metastases of 100 patients with advanced thyroid carcinoma (DTC with distant metastases or aggressive variants, PDTC, ATC). The mutation in genes encoding functional groups (FGs) included alterations in histone methyltransferases, *SWI/SNF* subunit, and the *PI3K/AKT/mTOR* pathway. Subgroup analyses were performed to evaluate the association between FG mutation and overall survival (OS) in 50 patients with *BRAF*^{V600E} mutant papillary thyroid carcinoma (PTC).

Results: Of the 118 tissues obtained from 100 patients, 99 tissues were from primary tumors and 19 from distant metastases. The most prevalent mutation observed from the primary tumors was *BRAF*^{V600E} mutation (58%), followed by *TERT* promoter (41%) and *RAS* (16%) mutations. *TP3* was altered by 6%. Mutations in histone methyltransferases (HMTs), *SWI/SNF* subunit-related genes, and *PI3K/AKT/mTOR* pathway-related genes were present in 30.3%, 10.1%, and 13.1%, respectively. When the mutational status was analyzed in 15 matched pairs of thyroid tumors and their matched distant metastases and one pair of distant metastases with two distinct sites, the concordance was high. A similar frequency of mutations in *TERT* promoter (56% vs. 58%) and *BRAF*^{V600E} (41% vs. 42%) as well as histone methyltransferases (42% vs. 37%), *SWI/SNF* subunits (12% vs. 10%), and *PI3K/AKT/mTOR* pathway (22% vs. 26%) were noted. The same main early and late mutations were practically always present in individual primary tumor-metastasis pairs. In the subgroup analyses of patients with *BRAF* mutant PTCs, 15 patients only had the *BRAF*^{V600E}-mutation (group 1), 22 had *BRAF*^{V600E} and mutation other than FGs (group 2), and 13 had *BRAF*^{V600E} and FG mutation (group 3). OS was significantly lower in patients with FG mutations ($p=0.001$) than those without, and group 3 patients had the worst survival ($p=0.004$). OS significantly varied among none, one, or two FG mutation sites ($p=0.005$). Presence of FG mutation was independently associated with increased mortality (hazard ratio 11.65, 95% confidence interval 1.39–97.58, $p=0.024$).

Conclusions: Enrichment of *BRAF*^{V600E}, *TERT* promoter, and *RAS* mutations were detected in highly advanced thyroid cancers with distant metastasis. The genetic profiles of primary

thyroid tumors and their corresponding distant metastases showed a high concordance. Moreover, coexistence of mutations in *BRAF*^{V600E} and genes encoding FGs was associated with high mortality. Identification of FG mutation in *BRAF*^{V600E}-mutant PTCs may be valuable in risk stratifying this subtype.