

NGS를 이용한 BRCA 유전자 돌연변이 분석에 관한 연구

지도교수 : 윤경아 교수님, 박경숙 교수님

회장/부회장 : 류정연 / 강다현, 최정훈

4학년 : 송민준

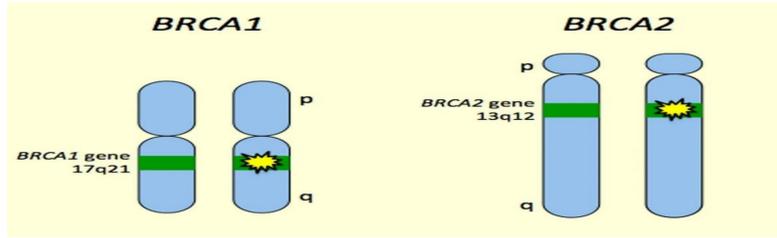
3학년 : 맹정아, 엄세빈, 최수현, 권주희, 김아정, 김예지, 김은아, 박가영, 임서영, 전영현, 김미르, 안인숙, 오예진, 전민혜

2학년 : 김해숙, 박민정, 정지연, 김다은, 김민서, 김지영

1학년 : 강희정, 김동화, 김민철, 김예담, 김은지, 노은영, 민문경, 이민제, 변은빈, 오승현, 최수진

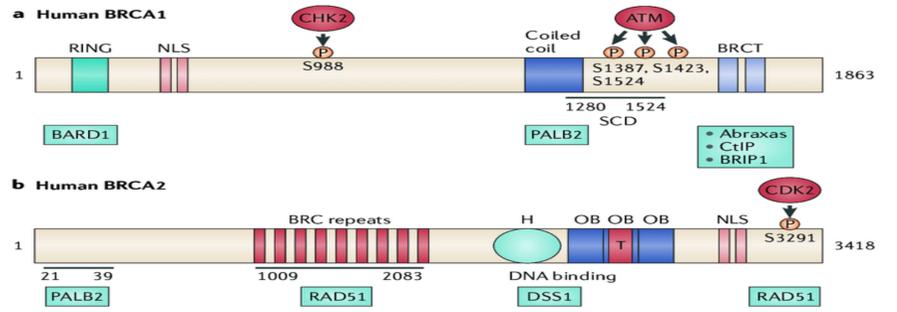
INTRODUCTION

매년 12,000명에 가까운 유방암 환자가 국내에서 발생하고 있다. 실제 국내 통계에 따르면 2001년부터 2018년까지 여성 유방암 발생률은 연간 6.6% 증가하는 추세이다. 유방암은 발생 원인에 따라 산발성 유방암, 가족성 유방암, 유전성 유방암으로 나뉘는데 그 중 유전성 유방암은 전체 유방암의 5-10%를 차지하고 있다.



유전성 유방암과 가장 연관성이 높다고 알려진 것이 BRCA(BReast CAncer) 유전자이다. 유전성 유방암의 약 15-40%는 BRCA1/2의 병원성 변이(PV)로 인해 발생한다. BRCA 유전자는 17번 염색체(17q21)에 위치하고 24개의 엑손을 가지며 1863개의 아미노산을 가진 단백질을 암호화하는 비교적 큰 유전자이다. BRCA2는 13번 염색체(13q12-13)에 위치하며 27개의 엑손으로 구성되어 있으며 3,418개의 아미노산으로 구성된 단백질을 암호화하는 더 큰 유전자로 DNA의 손상을 복구하는 단백질을 생성하는 유전자이다.

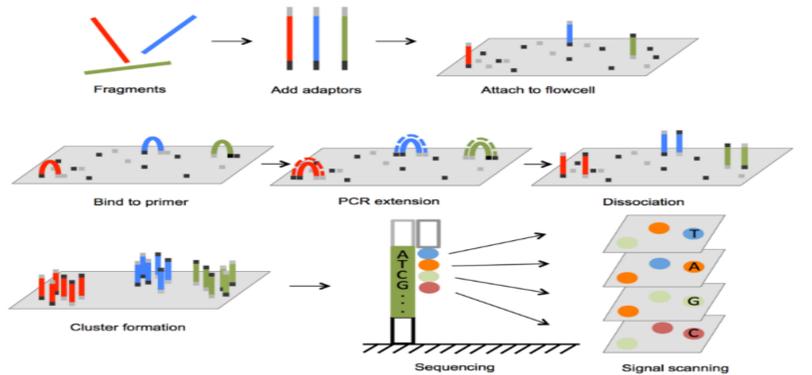
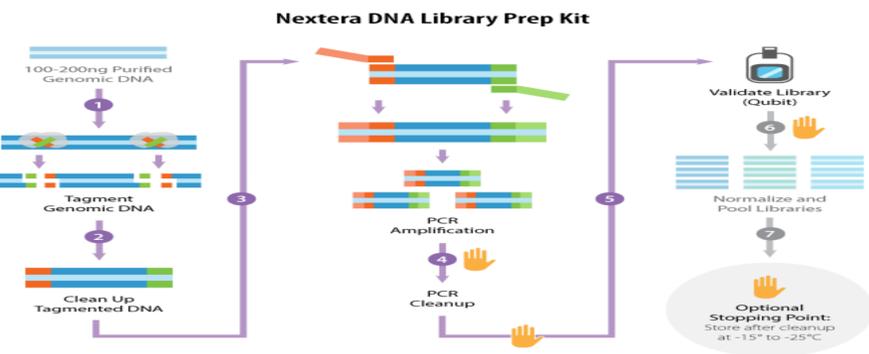
BRCA유전자 돌연변이가 발생되면 비정상 단백질 생산과 더불어 DNA 손상에 대한 복구가 이루어지지 않아 유전체의 불안정성이 조장되어 암이 발생된다. 현재까지 유방암의 원인이 되는 BRCA 유전자의 돌연변이는 BRCA1에서 1706개, BRCA2에서 1446개의 돌연변이가 보고되어 있다.



최근 혈액암, 고형암, 유전질환을 대상으로 차세대염기서열분석법(NGS)을 이용한 유전자 패널 검사에 대해 보험 급여(본인 부담50%)가 적용되게 되었다. NGS 패널검사는 여러 개의 유전자를 하나의 검사패널로 만들어서 한 번에 검사하는 것을 의미한다. 진단검사의학검사실에서 NGS 검사방법을 도입하게 되면서, 유방암 환자 혹은 유방암이 의심되어 암 검사를 하는 환자들에게서 질병과 연관되어 있는 유전자 돌연변이에 대한 정보를 얻을 수 있게 되었다. 기존에 시행해오던 전통적인 염기서열분석법은 한 번에 한 개의 유전자에 대한 염기서열정보만을 얻을 수 있었으나, NGS 검사를 시행하게 되면서 한 번에 여러 개의 유전자 (유전자 패널)들을 동시에 검사할 수 있게 되었다. 본 연구는 최근 다양한 암 질환의 진단에 널리 사용되는 NGS 패널검사를 이용하여 대전보건대학교 임상병리과 학생 10명을 대상으로 BRCA 유전자 돌연변이를 분석하고 기존의 전통적인 돌연변이 분석법과의 차이점을 비교 분석하고자 하였다.

MATERIALS & METHODS

본 연구에서는 유전자검사 동의를 받은 대전보건대학교 임상병리과 학생 10명의 말초혈액에 genomic DNA를 추출하고 DNA의 정도관리를 시행한 뒤, BRCAAccuTest® PLUS panel (NGeneBio Co.)을 이용한 NGS를 수행하였다. 즉, 10명의 대상자의 말초혈액 3ml를 채혈하여 DNeasy® Blood & Tissue kit(Quaigen Co.)를 이용해 genomic DNA를 추출한 다음 NanoDrop(Qubit®, Invitrogen co.)을 이용하여 DNA의 순도와 농도를 분석하고 TapeStation®(Agilent Co.)을 이용하여 사이즈를 분석한 후 NGS 패널 검사를 진행하고 장비에서 도출된 FASTQ 형식의 데이터를 NGeneAnalysis® 프로그램을 이용하여 결과 값의 정도관리, annotation, 변이를 확인하였다.



RESULTS & DISCUSSION

본 연구에서 NGS를 이용하여 10명의 학생의 BRCA 1/2 유전자 돌연변이를 분석한 결과, 27개 유형의 돌연변이가 나타났다(그림1). 분석된 돌연변이는 ACMG(American College of Medical Genetics)의 유전자 변이형 5단계 분류 체계상 Benign(양성변이체)으로 분류되어 임상적으로 의의가 없는 정상 변이형으로 분류되었다.

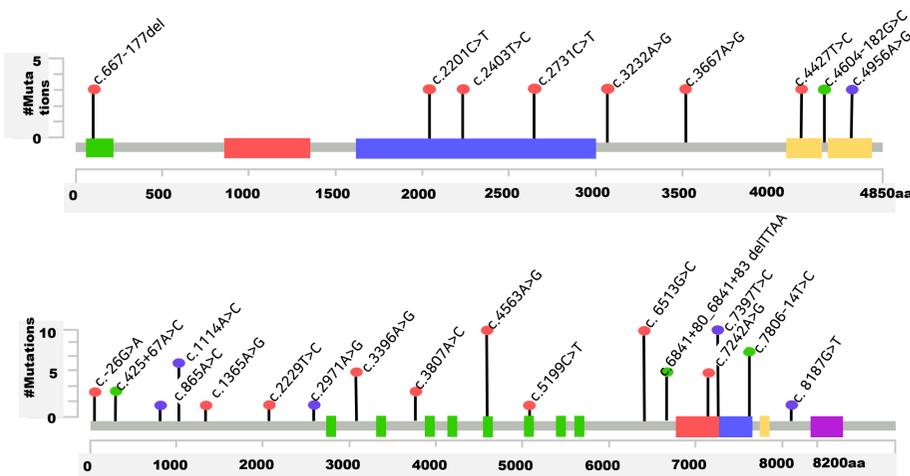


그림 1. 10명 학생의 BRCA1/2 유전자 돌연변이 부위

표 1. BRCA1 유전자 주요 돌연변이 유형결과

NT change (BIC Format)	AA change (Amino Acid)	Zygoty	Type	Classification
c.4956A>G	p.Ser1613Gly	heterozygote	SNV	Benign
c.4604-182C>G		heterozygote	SNV	Benign
c.4427T>C	p.Ser1436=	heterozygote	SNV	Benign
c.3667A>G	p.Lys1183Arg	heterozygote	SNV	Benign
c.3232A>G	p.Glu1038Gly	heterozygote	SNV	Benign
c.2731C>T	p.Pro871Leu	heterozygote	SNV	Benign
c.2430T>C	p.Leu771=	heterozygote	SNV	Benign
c.2201C>T	p.Ser694=	heterozygote	SNV	Benign
c.667-177del		heterozygote	Del	Benign

표 2. BRCA2 유전자 주요 돌연변이 유형결과

NT change (BIC Format)	AA change (Amino Acid)	Zygoty	Type	Classification
c.1342A>C	p.Asn372His	heterozygote	SNV	Benign
c.4791A>G	p.Leu1521=	homozygote	SNV	Benign
c.5427C>T	p.Ser1733=	heterozygote	SNV	Benign
c.6741G>C	p.Val2171=	homozygote	SNV	Benign
c.7625C=	p.Ala2466=	homozygote	SNV	Benign
c.8034-242T>C		heterozygote	SNV	Benign

그 중 BRCA 유전자 돌연변이가 가장 많이 나온 한 명의 돌연변이 유형을 분석결과 BRCA1에서 9개(표1), BRCA2에서 6개로 14개의 염기치환형태, 1개의 결손형 돌연변이가 확인되었다(표2) 일부 돌연변이에서는 아미노산의 치환도 보였으나 결과적으로는 정상 변이에 속하였다. 현재 진단검사의학검사실에서 시행 가능한 NGS 검사는 많게는 100개 이상의 종양유전자를 한 번에 검사할 수 있으며, 각 유전자 전체 또는 돌연변이가 집중적으로 몰려 있는 부위를 선별하여 검사를 시행할 수 있다. NGS 검사의 통상적인 분석 민감도는 전체 골수 세포의 1~10% 범위에 존재하는 변이까지 검출 가능한 것으로 보고되고 있어, 이는 기존의 염기서열분석법에 비해 더 예민한 민감도를 나타낸다고 알려져 있다. 따라서, NGS 검사는 유방암 및 다양한 암종의 진단과 치료 결정, 경과 관찰에 유용한 정보를 제공할 것으로 기대 된다.