



광범위한 림프관 침범을 보이는 갑상선 유두암의 병리학 및 분자유전학적 특성 연구*

신혜리**, 전해연**, 원재경**, 박성희****

Pathologic and Molecular Characteristics of Papillary Thyroid Carcinoma showing Extensive Endolymphatic Invasion*

Hye-ri Shin**, Hye-Yeon Jeon**, Jae-Kyung Won**, Seong Hoe Park****

ABSTRACT

Papillary thyroid carcinoma is the most common thyroid cancer, and lymphatic invasion and lymph node metastasis occur much more frequently than those of other types of thyroid carcinomas. Lymph node metastasis is a major factor in defining the poor prognosis of papillary thyroid carcinoma, but the pathological factors and molecular mechanisms underlying this issue are not yet clearly identified. In this study, we compared and analyzed the clinical-pathological and molecular-genetic factors of a group with and without extensive lymphatic invasion to identify particular factors underlying this issue. Statistical analysis was conducted on the clinical factors, pathological characteristics, stage, and molecular changes of the resected tissues in 147 papillary thyroid carcinoma patients.

* 본 논문은 2022년도 대한민국학술원 전문학술활동 지원으로 이루어짐

** 서울대학교 의과대학 병리학교실

**** 대한민국학술원 자연과학부 제4분과 회원, 서울대학교 의과대학 병리학교실

As a result, the group with extensive lymphatic invasion was statistically and significantly associated with younger age, and absence of encapsulation of main tumor. With a molecular characterization, non-BRAF mutants with gene fusions are more likely to have extensive lymphatic invasion ($P = 0.0038$). In particular, we, for the first time, observed the distribution of occult microtumor foci around the main mass, and the density of these foci was found to be significantly associated with lymphatic invasion ($P = 0.01455$). As the presence of high-density occult microtumor foci suggests multifocal de novo cancerization of thyroid cancer, follow-up study on the single-cell level would be able to contribute to establish a new concept of thyroid oncogenesis and metastasis.

Key Words: Papillary thyroid carcinoma, lymphatic invasion, pathology, molecular factor, genetics

초 록

갑상선 유두암은 갑상선암 중 가장 흔한 암으로 다른 갑상선암종에 비해 암세포의 림프관 침윤 및 림프절 전이가 흔히 일어난다. 림프절 전이는 갑상선 유두암의 예후를 안 좋게 하는 주요 요인이거나 이를 일어나게 하는 병리학적 요인 및 분자기전에 대해서는 아직 명확히 밝혀져 있지 않다. 이 연구에서는 성인에서 광범위한 림프관 침윤을 일으키는 군과 그렇지 아니한 군의 병리학적 요소와 분자유전학적 요소를 비교 분석하여 림프관 침윤과 관련된 인자를 밝혀내고 림프절 전이의 기전을 밝혀내고자 하였다. 147명의 갑상선 절제 수술 환자를 대상으로 임상 정보, 절제 조직의 병리학적 특징, 병기, 분자변화들을 조사하여 통계 분석을 시행하였다. 그 결과 광범위한 림프관 침윤을 보이는 군은 더 젊은 연령, 종괴 피막의 부재와 통계적으로 의미 있게 관련되는 것으로 나타났다. 그리고 분자유전학적으로는 BRAF 변이가 아닌 다른 암유전자의 융합 (RET)으로 인한 암종에서 더 광범위한 림프관 침윤이 나타날 가능성이 큰 것으로 나타났다 ($P = 0.0038$). 특히 주종괴의 주변으로 잠재 미세종양 병소 (occult microtumor foci)가 분포함을 최초로 관찰하였고 이들 병소의 밀도가 림프관 침윤과 의미있게 연관됨을 발견하였다 ($P = 0.01455$). 고밀도의 잠재 미세종양 병소의 존재는 갑상선암 최초의 multifocal de novo cancerization 보고를 시사하는 만큼 후속으로 정밀한 단일세포 차원의 연구를 통해 갑상선암의 발병 및 전이에 대한 새로운 개념 정립에 기여할 수 있을 것이다.

주제어: 갑상선 유두암, 림프관 침윤, 병리, 분자 요소, 유전학

목 차

I. 서론	IV. 고찰
II. 재료 및 방법	참고문헌
III. 결과	

I. 서론

갑상선암의 가장 흔한 유형은 갑상선 유두암으로 전체 갑상선암 증례의 85%를 차지한다 [Aschebrook-Kilfoy et al. 2011]. 갑상선 유두암은 일반적으로 90% 이상의 10년 생존율로 예후가 우수하지만 약 30%의 환자에서 재발한다 [Mazzaferrri and Jhiang 1994]. 갑상선 유두암의 조직학적 아형 중 원주세포 아형 (columnar cell variant), 큰 세포 아형 (tall cell variant) 및 미만성 경화 아형 (diffuse sclerosing variant)은 상대적으로 예후가 좋지 않다 [Dralle and Machens 2008, Cooper et al. 2009]. 림프관 침윤은 주종괴에서 림프관 공간으로 침윤하는 암세포로 정의되며, 암세포가 림프관 채널의 내피에 부착되거나 혈관벽과 내피를 통해 침윤하는 것을 일컫는다 [Metz and Asa 2011]. 기존 연구에서는 갑상선 유두암 중 미만성 경화 아형에서 광범위한 림프관 침윤이 특징적으로 관찰된다 [Kennichi Kakudo 2018]. 림프관 침윤은 많은 암에서 확립된 나쁜 예후 인자이지만, 갑상선 유두암에서의 림프관 침윤에 대한 연구는 주로 소규모의 후향적 코호트 연구로 제한적이다 [Kim et al. 2006, Girardi et al. 2013, Pontius et al. 2016]. 선행연구들에 따르면 림프관 침윤은 갑상선암 환자의 질병 재발 및 생존율 저하와 관련이 있다 [Cheng et al. 2020]. 또한 미만성 경화 아형이 아니라도 17-25세 연령군의 갑상선 유두암 증례들에서 림프관 침윤이 다른 연령군에 비해 통계적으로 유의하게 많이 관찰되는 결과를 보인다 [Sezer et al. 2017].

전반적으로 림프관 침윤이 존재하는 군에서 종양의 크기가 크고, 종양의 림프절 전이, 종양의 갑상선 피막 침윤 및 갑상선외 확장이 유의하게 많이 관찰된다 [Sezer et al. 2017, Cheng et al. 2020]. 이러한 선행연구결과들은 갑상선 유

두암 환자에서 종양의 림프절 침윤이 악성의 병리학적 특징의 지표로 간주되어야 함을 시사하며 종양의 림프절 침윤이 동반된 갑상선 유두암 환자는 재발 및 전이에 대해 주의 깊게 추적 관찰해야 함을 권장하고 있다 [Pontius et al. 2016, Sezer et al. 2017, Wagner et al. 2020].

미만성 경화 아형이 아니면서 림프관 침윤을 보이는 성인 갑상선 유두암의 분자유전학적 특성에 대하여 연구가 많이 되어있지 않으나, 선행연구들에 따르면 BRAF V600E 돌연변이와 TERT 프로모터 돌연변이의 빈도가 림프절 침윤이 동반된 갑상선 유두암 증례들에서 높게 관찰된다 [Franklin et al. 1997, Pu et al. 2021]. 그러나 우리나라를 비롯한 아시아 국가에서처럼 BRAF V600E 돌연변이의 빈도가 90% 이상 관찰되는 지역에서는 이러한 분석이 적용되지 않고 TERT 프로모터 돌연변이가 어떻게 림프절 침윤에 연관되는지에 대한 연구는 되어 있지 않다. 이들에 대한 분자병리학적 특징 조사와 분자유전학적 특징에 대한 연구를 통해 갑상선 유두암에서의 림프관 침윤의 기전을 밝혀 내고 림프절 전이를 억제할 수 있는 타겟 유전자를 찾을 수 있을 것으로 기대된다.

II. 재료 및 방법

연구대상

연구대상에는 서울대병원에서 모집된 만 10세 이상, 만 84세 이하의 (Papillary thyroid cancer, PTC) 환자군을 포함하고, 병리학적으로 림프관 침윤이 발생한 환자군 78명과 대조군 69명을 포함하였다. 본 연구는, 연구참여에 대한 서울대학교병원 IRB (승인 ID: H-1903-073-1017)에서 요구하는 바에 따라 환자 또는 보호자로부터 서면 동의서를 얻거나 조건에 부합하는 경우 IRB로부터 동의서 면제를 받고 진행하였다.

임상데이터 수집

모든 환자는 갑상선 전절제술, 갑상선 아전절제술, 엽절제술을 받았다. 갑상선 유두암 환자에서 수집된 종양의 조직학적 하위그룹을 Conventional, infiltrative follicular, Tall cell, Diffuse sclerosing, Warthin, Hobnail 및 Encapsulated follicular 로 나누었고, 종양 크기 및 피막유무, 위치 정보를 수집하였다 [Lee et al. 2015].

직접 염기 서열 분석, 면역조직화학 염색, RNA-sequencing에 의한 분자검사

Tissue array 제작 및 면역조직화학 염색

BRAF V600E 돌연변이는 특이적 항체(Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA), NRAS Q61R 항체(Bio SB, Santa Barbara, CA, USA), 단일클론 마우스 항-인간 ALK 항체(Novocastra, 3 Newcastle Upon Tyne, UK), 단일클론 토끼 항-인간 pan-Trk 항체(Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)를 사용하여 실험을 수행하였다 (그림 1A, B) [Park et al. 2015, Kim et al. 2018].

중합 효소 연쇄 반응 (PCR) 분석 및 Sanger 염기서열 분석법, RNA-sequencing

BRAF 엑손 15, TERT 프로모터(C228T 및 C250T) 영역, H/K/NRAS 코돈 12, 13 및 61 및 BRAF의 직접 시퀀싱을 위한 적절한 프라이머를 사용하여 PCR 로 증폭되었다 (그림 1C) [Xing et al. 2015].

신선한 냉동 및 FFPE 조직의 RNA-Seq 라이브러리는 각각 TruSeq RNA 라이브러리 준비 키트 버전 2 및 TruSeq RNA 액세스 라이브러리 준비 키트(모두 Illumina 제품)를 사용하여 구성되었다. TruSeq Nano DNA 준비 키트(Illumina)를 사용하여 라이브러리를 구성하였다. STAR-fusion 소프트웨어를 사용하여 Fusion 유전자를 스크리닝한 후 Integrative Genomics Viewer [Robinson et al. 2011] 를 사용하여 Chimeric 판독값을 수동으로 검토하고 Fusion된 유전자들의 발현을 검토하였다 (그림 1D).

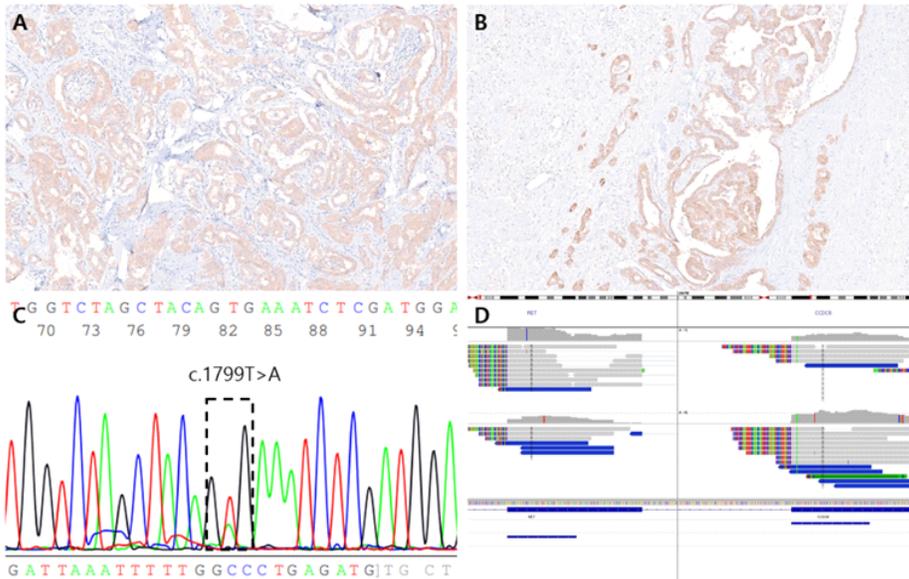


그림 1. 면역화학염색, 시퀀싱 및 RNA-seq을 이용한 분자유전학적 변화 탐색 (A) BRAF V600E 특이 항체를 사용한 갑상선 유두암에서의 BRAF 변이 검출 (B) Pan-TRK 항체를 이용한 TRK 전위 확인 (C) 직접 염기서열법을 이용한 BRAF c.1799T>A 변이 검출 (D) RNA-sequencing을 이용한 CCDC6-RET fusion 검출

통계분석

모든 통계 분석은 R 소프트웨어(버전 4.2, © The R Foundation, NZ)를 사용하여 수행되었다. 환자군과 대조군 간에 인구, 성별의 인구학적 변인에 차이가 있는지 알아보기 위해 카이검정 (Chi t-test)을 하여 p값을 통하여 유의성을 판단하였다. 피셔정확도 검정을 통해 조정된 승산비 (OR) 및 95% 신뢰구간을 구하여 설명력을 평가하였다. 인구학적 변인의 나이 및 종양크기에 차이가 있는지 알아보기 위해서 Welch's t 검정을 사용하였다. 조직학적 진단을 하위그룹으로 나누고 림프관 침윤 발생여부와 잠재 미세종양 병소 발생 여부와의 관계를 로지스틱 회귀분석 (logistic regression analysis)을 통하여 분석하였다. 또한, 림프관 침윤의 발생여부와 잠재 미세종양 병소 발생 여부에 따른 임상학적 관점과 병리학적 관점의차이가 있는지 확인하기 위해 로지스틱 회귀분석 (logistic regression analysis)으로 연관성을 평가하였다. 침윤 여부를 종속변인, 종양의 둘연변이 유

전자를 독립변인으로 포함하여 같은 통계방법으로 유의성을 평가하였다. 최종적으로 로지스틱 회귀분석은 Nagelkerke의 R^2 을 통해 설명력을 평가하였다.

III. 결과

1. 갑상선 유두암의 림프관 침윤과 관련된 병리학적 요소

갑상선 유두암에서 광범위한 림프관 침윤을 보이는 환자 (이하 LV침윤)와 그리고 이와는 상반되게 림프관 침윤이 없는 환자 (이하 LV비침윤)의 임상 및 병리학적 요소들을 비교하였을 때 성별로는 차이를 보이지 않는 반면 LV침윤 환자의 평균연령은 38세이며 LV비침윤 환자의 평균연령은 48세로 연령의 분포는 두 군간의 유의미한 차이를 보였다 ($P = 0.0001$) (표 1).

병리학적 특징들을 비교해 보았을 때 LV침윤 종양의 크기는 LV비침윤 종양의 크기보다 유의하게 큰 것으로 확인되었고 ($P = 0.0313$), 조직학적 세부 아형의 분포에 유의미한 차이는 관찰되지 않았다. 종양을 둘러싸는 피막의 유무 (Encapsulation)가 유의하게 차이를 나타내었으며 ($P < 0.001$), LV침윤에서는 피막 형성이 없는 경우가 93.1%로 제일 높았으며, LV비침윤에서는 피막 형성 부재가 43.5%, 부분적 피막 형성이 30.4% 및 완전한 피막 형성이 23.9%로 고르게 확인되었다. 종양위치 ($p=0.248$)는 유의미한 차이가 보이지 않았고, 림프절 전이 ($P < 0.0000$)는 두군간의 유의미한 차이를 보였으며, LV침윤 종양은 림프절 전이 단계가 pN1a 34.8% 및 pN1b 65.2%로 100% 림프절 전이가 일어난 것으로 확인되었다(표 1).

표 1. 갑상선 유두암의 광범위한 림프관 침윤을 보이는 군과 그렇지 아니한 군에서 임상 및 병리학적 특성 비교

	Overall n=147 (100%)	Lymphovascular invasion (+) n=78 (53.1%)	Lymphovascular invasion (-) n=69 (46.9%)	P-value	X ²	OR	95CI	†† p
Sex [†]								
Male/Female	57/90 (38.8%/61.2%)	32/46 (41.0%/59.0%)	25/44 (36.2%/63.8%)	0.5516	0.35	1.2	0.6-2.5	0.6124
Age (years) at diagnos ^{†††}				0.0001*** F = 0.96 (Age welch's t-test분산동질)				
Mean	43.4	38.7	48.7					
Median	43.0	36.5	48.2					
m-M	10-83.8	10-76	15.6-83.8					
Tumor Size ^{†††}				0.0313* F = 0.59 (Age welch's t-test분산비동질)				
Mean	1.7	1.9	1.4					
Median	1.1	1.5	1.0					
m-M	0.3-10.9	0.5-10.9	0.3-7.5					
Histology*	144	75	69	0.238 R ² = 0.009				
Conventional	98 (68.1%)	41 (54.7%)	57 (82.6%)					
Infiltrative follicular PTC	28 (19.4%)	21 (28.0%)	7 (10.1%)					
Tall cell	5 (3.5%)	4 (5.3%)	1 (1.4%)					
Diffuse sclerosing	7 (4.9%)	7 (9.3%)	0 (0.0%)					
Warthin	1 (0.7%)	0 (0.0%)	1 (1.4%)					
Hobnail	4 (2.8%)	2 (2.7%)	2 (2.9%)					
Encapsulated follicular	1 (0.7%)	0 (0.0%)	1 (1.4%)					
Tumor Location*	109	71	38	0.2477 R ² = 0.012				
Left	23 (21.1%)	12 (16.9%)	11 (28.9%)					
Right	37 (33.9%)	24 (33.8%)	13 (34.2%)					
Multiple	42 (38.5%)	31 (43.7%)	11 (28.9%)					
Multiple+ Isthmus	7 (6.4%)	4 (5.6%)	3 (7.9%)					
Encapsulation*	118	72	46	0.000*** R ² = 0.2836				
Absent	87 (73.7%)	67 (93.1%)	20 (43.5%)					
Partial & Incomp	18 (15.3%)	4 (5.6%)	14 (30.4%)					
Comp & Well	12 (10.2%)	1 (1.4%)	11 (23.9%)					
Infiltrative	1 (0.8%)	0 (0.0%)	1 (2.2%)					
pN*	108	69	39	0.0000*** R ² = 0.283				
No Meta	14 (13.0%)	0 (0.0%)	14 (35.9%)					
pN1a	38 (35.2%)	24 (34.8%)	14 (35.9%)					
pN1b	56 (51.9%)	45 (65.2%)	11 (28.2%)					
pT*	111	72	39	0.272 R ² = 0.01				
1+2	74 (66.7%)	49 (68.1%)	25 (64.1%)					
3+4	19 (17.1%)	12 (16.7%)	7 (17.9%)					
5<	18 (16.2%)	11 (15.3%)	7 (17.9%)					
Angiogenicinvasion*	145	76	69	0.008** R ² = 0.0467				
Absent	139 (95.9%)	70 (92.1%)	69 (100.0%)					
Focal	1 (0.7%)	1 (1.3%)	0 (0.0%)					
Massive	5 (3.4%)	5 (6.6%)	0 (0.0%)					

Numbers in bold are significant at p < 0.05
 † Chi t-test †† Fisher exact test ††† Welch's Test

2. 림프관 침윤과 잠재 미세종양 병소 (occult microtumor foci) 분포에 대한 분자유전학적 비교

갑상선 유두암의 전체 조직에서 림프관 침윤을 세밀하게 검사하면서 주종괴 외부 갑상선 실질에서 림프관 침윤 병소는 아니나 갑상선 여포 하나 또는 여러 개가 유두암의 세포적 특징을 일부 또는 뚜렷히 갖게 되는 병소들을 관찰되었다 (그림 2). 각 환자 조직별로 이러한 병소들은 주종괴와 떨어져 있으면서 다발성으로 모여 있거나 (그림2A), 주종괴 옆에 인접하여 있는 경우 (그림2B), 주종괴와 떨어져 단독으로 존재하는 경우 (그림2C,D) 등 빈도 및 분포는 다양하였다. 이들이 차후 명확한 유두암으로 발전할 것을 고려하여 잠재 미세종양 병소 (occult microtumor foci, OMF)라 명명하였으며 이들의 각 환자의 조직별 빈도 및 분포를 기반으로 분류하여 림프관 침윤과 함께 분자유전학적 특성을 비교하였다.

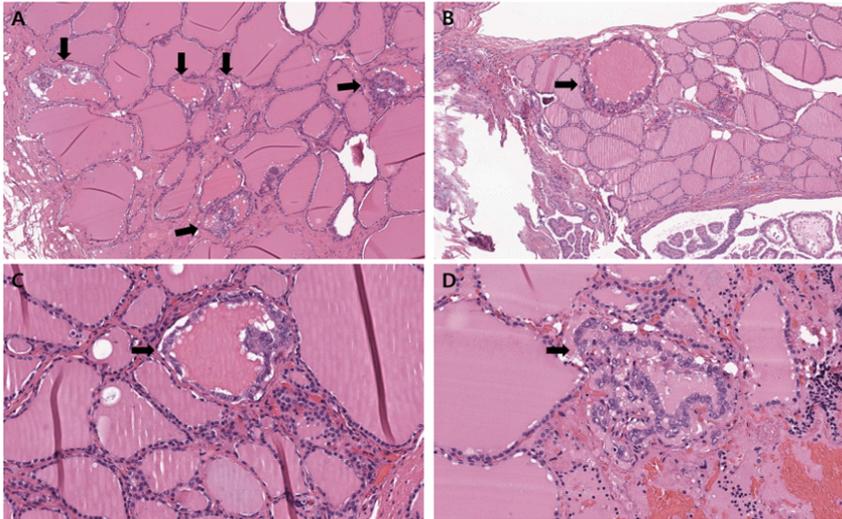


그림 2. 잠재 미세종양 병소 (OMF) 형태학적 모습
(A) OMF가 다발성으로 관찰되는 증례의 H&E 사진 (x100) (B) 주종괴 옆에 인접하여 있는 OMF의 모습 (C,D) 주종양과 떨어진 실질에서 단독으로 존재하는 OMF들.

LV침윤군에서 비침윤군과 비교하여 잠재 미세종양 병소의 분포가 의미있게 높게 나타났으며 ($P = 0.01455$), LV침윤의 경우 OMF가 중등도 이상이 52.8% (Moderate 27.8%, Many 25.0%)인데 LV비침윤의 경우 존재하지 않는 경우가 53.8%로 제일 많은 비중을 차지하고 중등도 이상은 15.4%에 불과하였다 (표 2).

분자적 관점에서 LV침윤과 비침윤군에서 BRAF 유전자의 변이가 유의미한 차이가 나타났다. LV침윤이 BRAF 유전자 변이가 없는 것이 31.0% 및 BRAF V600E 변이가 있는 것이 64.8%로 나타났고 LV비침윤이 BRAF 변이가 있는 경우가 88.2%로 오히려 더 높은 BRAF V600E 돌연변이 비중을 보였다 (표 2).

표 2. 갑상선 유두암의 광범위한 림프관 침윤을 보이는 군과 그렇지 아니한 군에서 분자유전학적 특성 비교

	Overall n=147 (100%)	Lymphovascular invasion (+) n=78 (53.1%)	Lymphovascular invasion (-) n=69 (46.9%)					
Occult microtumor foci [†]	111	72	39	0.01455*	R ² =0.0535			
Absent	32 (28.8%)	11 (15.3%)	21 (53.8%)					
Mild	35 (31.5%)	23 (31.9%)	12 (30.8%)					
Moderate	24 (21.6%)	20 (27.8%)	4 (10.3%)					
Many	20 (18.0%)	18 (25.0%)	2 (5.1%)					
		P-value		X ²	OR	95CI	†† P	
BRAF [†]	139	71	68	0.0038**	8.38	0.28	0.09-0.73	0.0065**
WT	30 (21.6%)	22 (31.0%)	8 (11.8%)					
V600E	106 (76.3%)	46 (64.8%)	60 (88.2%)					
WT + V600E	3 (2.2%)	3 (4.2%)	0 (0.0%)					
TERT	27	17	10					
0	27 (100.0%)	17 (100.0%)	10 (100.0%)					
1	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)					
RAS	119	58	61					
0	119 (100.0%)	58 (100.0%)	61 (100.0%)					
1	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)					
Fusion	121	59	62					
WT	114 (94.2%)	53 (89.8%)	61 (98.4%)					
RET	6 (5.0%)	6 (10.2%)	0 (0.0%)					
NTRK1	1 (0.8%)	0 (0.0%)	1 (1.6%)					

광범위한 림프관 침범을 보이는 갑상선 유두암의 병리학 및 분자유전학적 특성 연구

표 3. 잠재 미세종양 병소 (OMF)가 흔한 군과 그렇지 아닌 군에서 임상 및 병리학적 특성 비교

	Overall n=113 (100%)	Occult microtumor foci (+) n=45 (39.8%)	Occult microtumor foci (-) n=68 (60.2%)	P-value	X ²	OR	95CI	††P
Sex [†]								
· Male/Female	41/72 (6.3%/63.7%)	32/46 (51.1%/48.9%)	25/44 (26.5%/73.5%)	0.0076**	7.111	2.8	1.2-6.9	0.009**
Age (years) at diagnos ^{†††}				0.1056				
· Mean	43.9	40.9	45.9					
· Median	43.0	40.0	44.0					
· m-M	16.0-83.8	17-75	16-83.8					
Tumor Size ^{†††}				0.3632				
· Mean	1.7	1.9	1.6					
· Median	1.1	1.5	1.2					
· m-M	0.3-10.9	0.5-10.9	0.3-7.5					
Histology [*]	112	68	44	0.779		R ² =0.0007		
· Conventional	68 (60.7%)	47 (69.1%)	21 (47.7%)					
· Infiltrative follicularPTC	28 (25.0%)	11 (16.2%)	17 (38.6%)					
· Tall cell	5 (4.5%)	2 (2.9%)	3 (6.8%)					
· Diffuse sclerosing	5 (4.5%)	3 (4.4%)	2 (4.5%)					
· Warthin	1 (0.9%)	1 (1.5%)	0 (0.0%)					
· Hobnail	3 (2.7%)	3 (4.4%)	0 (0.0%)					
· Encapsulated follicular	2 (1.8%)	1 (1.5%)	1 (2.3%)					
Tumor Location [*]	111	45	66	0.259		R ² =0.0116		
· Left	25 (22.5%)	7 (15.6%)	18 (27.3%)					
· Right	37 (33.3%)	10 (22.2%)	27 (40.9%)					
· Multiple	42 (37.8%)	24 (53.3%)	18 (27.3%)					
· Multiple+Isthmus	7 (6.3%)	4 (8.9%)	3 (4.5%)					
Encapsulation [*]	113	45	68	0.00215**		R ² =0.0816		
· Absent	83 (73.5%)	41 (91.1%)	42 (61.8%)					
· Partial & Incomp	17 (15.0%)	4 (8.9%)	13 (19.1%)					
· Comp & Well	12 (10.6%)	0 (0.0%)	12 (17.6%)					
· Infiltrative	1 (0.9%)	0 (0.0%)	1 (1.5%)					
pN [*]	108	43	65	0.0000***		R ² =0.138		
· No Meta	12 (11.1%)	0 (0.0%)	12 (18.5%)					
· pN1a	40 (37.0%)	10 (23.3%)	30 (46.2%)					
· pN1b	56 (51.9%)	33 (76.7%)	23 (35.4%)					
pT [*]	113	45	68	0.014*		R ² =0.0528		
· 1+2	75 (66.4%)	26 (57.8%)	49 (72.1%)					
· 3+4	20 (17.7%)	7 (15.6%)	13 (19.1%)					
· 5<	18 (15.9%)	12 (26.7%)	6 (8.8%)					
Angiogenic invasion [*]	111	44	67	0.0857		R ² =0.0268		
· Absent	109 (98.2%)	42 (95.5%)	67 (100.0%)					
· Focal	1 (0.9%)	1 (2.3%)	0 (0.0%)					
· Massive	1 (0.9%)	1 (2.3%)	0 (0.0%)					

3. 잠재 미세종양 병소 (OMF) 분포를 중심으로 한 병리학 및 분자유전학적 비교

관점을 바꾸어 갑상선 유두암에서 높은 OMF 밀도를 보이는 환자와 그렇지 않은 환자의 임상 및 병리학적 요소들을 비교하였을 때 성별 (P = 0.0076)에서 유의미한 차이를 나타냈다 (표 3). 반면 두 군의 평균연령은 각 41세와 46세로 연령은 두 군간 유의미한 차이가 없었다. 그 외 임상적인 지표와 분자유전학적 지표는 LV침윤군과 비침윤군의 차이를 그대로 따르는 추세로 나타났다 (표 3, 4)

표 4. 잠재 미세종양 병소(OMF)가 흔한 군과 그렇지 아니한 군에서 분자유전학적 특성 비교

	Overall n=113 (100%)	Occult microtumor foci (+) n=45 (39.8%)	Occult microtumor foci (-) n=68 (60.2%)					
Lymphatic invasion*	111	44	67	0.744	R ² =0.0009			
Absent	12 (10.8%)	0 (0.0%)	12 (17.9%)					
Minimal	27 (24.3%)	6 (13.6%)	21 (31.3%)					
Multiple	45 (40.5%)	21 (47.7%)	24 (35.8%)					
Massive	27 (24.3%)	17 (38.6%)	10 (14.9%)					
				P-value	X ²	OR	95CI	†† P
BRAF †	104	41	63	0.009**	6.7915	3.52	1.2-11.0	0.0133*
WT	22 (21.2%)	14 (34.1%)	8 (12.7%)					
V600E	79 (76.0%)	26 (63.4%)	53 (84.1%)					
WT+V600E	3 (2.9%)	1 (2.4%)	2 (3.2%)					
TERT	20	7	13					
0	20 (100.0%)	7 (100.0%)	13 (100.0%)					
1	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)					
RAS	89	32	57					
0	89 (100.0%)	32 (100.0%)	57 (100.0%)					
1	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)					
Fusion	90	32	58					
WT	87 (96.7%)	30 (93.8%)	57 (98.3%)					
RET	2 (2.2%)	2 (6.3%)	0 (0.0%)					
NTRK1	1 (1.1%)	0 (0.0%)	1 (1.7%)					

IV. 고찰

갑상선암종 중에서 갑상선 유두암은 림프관 침윤을 통한 림프절 전이를 하고, 갑상선 여포암은 혈관을 통한 혈행성 전이를 하는 것으로 알려져 있다. 그러나 암종에 따라 이런 차이가 발생하는 이유, 그리고 같은 암종내에서도 그 정도의 차이를 결정하는 요인은 어떤 것인지에 대해서는 아직까지 알려진 바가 없다. 이 연구에서는 갑상선 유두암 중 광범위한 림프관 침윤을 보이는 군 (LV침윤군)과 그렇지 않은 군 (LV비침윤군)을 비교하여 표현형의 차이를 결정하는 요인들을 분석하였다. LV침윤군의 연령이 유의하게 젊었는데 이는 선행 연구에서 시사된 바와 일치한다 [Steiling et al. 2008, Galandiuk et al. 2012]. 종양의 크기가 큰 경우, 종양의 피막 침윤과의 연관성도 기존 연구와 일치한다 [Franklin et al. 1997, Steiling et al. 2008]. 그러나 LV침윤군에서 BRAF 변이가 유의하게 적은 것은 기존 연구의 결과와 상반되는 것처럼 보인다 [Franklin et al. 1997, Pu et al. 2021]. 그러나 미만성 경화형에서 림프관 침윤을 광범위하게 보인다는 점, 그리고 미만성 경화암이 BRAF 변이보다 RET/PTC 재배열이 더 흔하다는 점에서 본 연구에서 LV침윤군은 미만성 경화형 암에 더 가까운 분자유전학적 특징을 가진다고 할 수 있다 [Pillai et al. 2015].

본 연구에서 특징적으로 알게 된 것은 잠재 미세종양 병소의 존재이다. 이들은 특히 LV침윤군에서 빈번히 관찰되며 주종괴 부근 또는 주종괴에서 멀리 떨어진 실질에서 하나 또는 몇개의 여포들에서 세포학적 형태 이상으로 나타난다. 콜로이드 (colloid)의 공포성 변화 (vacuolar change)를 동반하며 세포학적 형태로 보면 유두암과 거의 비슷하거나 중간형을 띄기도 한다. 이들은 갑상선암에서도 multifocal de novo cancerization 현상이 있음을 시사하는 증거가 될 수 있다.

최근 한 연구팀에 의하면 형태학적(morphologically)으로는 정상이지만 전암상태 (pre-malignant)이며, 변이된 전사체 특성 (정상과 암사이의 중간 특징)을 가지는 갑상선 세포 군집이 발견되기도 하였다 [Pu et al. 2021]. 전암상태에 있는 갑상선 세포의 존재는 multifocal de novo cancerization 이론으로 설명할 수 있는데, 종양의 유전 변화는 점진적인 방식으로 진화되고 축적되어 형태적 변화가 있거나 혹은 없는 전암 세포의 형태로 나타날 수 있다는 것이다 [Curtius et al. 2018]. 이들 영역은 현미경적으로 비암성 (noncancerous)으로 분류되며

즉 정상, 과형성 (hyperplasia), 화생 (metaplasia) 또는 이형성 (dysplasia) 등의 형태를 가진다 [Garcia et al. 1999]. 형태학적으로 구별 가능한 전암상태의 질병 (식도선암의 Barrett 식도 [Kaz et al. 2015], 유방암의 상피내 암종 (DCIS) [Virnig et al. 2010]와 전립선암의 prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) [Bostwick and Cheng 2012]) 등은 암발생 위험을 증가시키는 multifocal de novo cancerization의 예들이다. 이 밖에도 대장암 [Leedham et al. 2009, Galandiuk et al. 2012] 및 장상피화생을 특징으로 하는 위암 [Prasad et al. 2007, Gutierrez-Gonzalez et al. 2011], 이형성과 상피내 암종 (carcinoma in situ)를 특징으로 하는 비소세포성 편평상피암 [Franklin et al. 1997, Steiling et al. 2008] 등이 있다. 이러한 현상은 나이가 들며 생기는 DNA 복제 과정의 실수 [Alexandrov et al. 2015], 후생유전적 (epigenetic) 변이 [Nosho et al. 2009, Ushijima and Hattori 2012] 혹은 돌연변이 자극 (감염 [Gutierrez-Gonzalez et al. 2011, Ushijima and Hattori 2012, Lochhead et al. 2015], 흡연 [Steiling et al. 2008, de Bruin et al. 2014], 식이, 자외선노출 [Klein et al. 2010] 등) 이 원인이 된다.

갑상선암에서의 이러한 현상은 비교적 젊은 나이에 호발하고 유전자의 전위를 더 자주 동반한다는 점에서 유전적 감수성과 밀접한 관계가 있으며 후생유전학적 원인도 고려해야한다. 정확한 기전을 밝히기 위해서는 단일세포 수준의 분석과 공간 전사체 (spatial transcriptomics) 실험을 통한 조사가 필요하며 이는 기존에 알려진 BRAF 변이에 의한 침윤과는 다른 종양 형성 및 침윤의 개념을 제시할 수 있다.

참 고 문 헌

- Alexandrov, L. B., Jones, P. H., Wedge, D. C., Sale, J. E., Campbell, P. J., Nik-Zainal, S. and Stratton, M. R. 2015. Clock-like mutational processes in human somatic cells. *Nature Genetics* 47(12), 1402-1407.
- Aschebrook-Kilfoy, B., Ward, M. H., Sabra, M. M. and Devesa, S. S. 2011. Thyroid cancer incidence patterns in the United States by histologic type, 1992-2006. *Thyroid* 21(2), 125-134.
- Bostwick, D. G. and Cheng, L. 2012. Precursors of prostate cancer. *Histopathology* 60(1), 4-27.
- Cheng, S. P., Lee, J. J., Chien, M. N., Kuo, C. Y., Jhuang, J. Y. and Liu, C. L. 2020. Lymphovascular invasion of papillary thyroid carcinoma revisited in the era of active surveillance. *Eur J Surg Oncol* 46(10 Pt A), 1814-1819.
- Cooper, D. S., Doherty, G. M., Haugen, B. R., Kloos, R. T., Lee, S. L., Mandel, S. J., Mazzaferri, E. L., McIver, B., Pacini, F., Schlumberger, M., Sherman, S. I., Steward, D. L., Tuttle, R. M., American Thyroid Association Guidelines Taskforce on Thyroid, N. and Differentiated Thyroid, C. 2009. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 19(11), 1167-1214.
- Curtius, K., Wright, N. A. and Graham, T. A. 2018. An evolutionary perspective on field cancerization. *Nature Reviews Cancer* 18(1), 19-32.
- De Bruin, E. C., McGranahan, N., Mitter, R., Salm, M., Wedge, D. C., Yates, L., Jamal-Hanjani, M., Shafi, S., Murugaesu, N., Rowan, A. J., Grönroos, E., Muhammad, M. A., Horswell, S., Gerlinger, M., Varela, I., Jones, D., Marshall, J., Voet, T., Van Loo, P., Rastl, D. M., Rintoul, R. C., Janes, S. M., Lee, S. M., Forster, M., Ahmad, T., Lawrence, D., Falzon, M., Capitanio, A., Harkins, T. T., Lee, C. C., Tom, W., Teefe, E., Chen, S. C., Begum, S., Rabinowitz, A., Phillimore, B., Spencer-Dene, B., Stamp, G., Szallasi, Z., Matthews, N., Stewart, A., Campbell, P. and Swanton, C. 2014. Spatial and temporal diversity in genomic instability processes

- defines lung cancer evolution. *Science* 346(6206), 251-256.
- Dralle, H. and Machens, A. 2008. Surgical approaches in thyroid cancer and lymph-node metastases. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 22(6), 971-987.
- Franklin, W. A.,Gazdar, A. F.,Haney, J.,Wistuba, II,La Rosa, F. G.,Kennedy, T.,Ritchey, D. M. and Miller, Y. E. 1997. Widely dispersed p53 mutation in respiratory epithelium. A novel mechanism for field carcinogenesis. *J Clin Invest* 100(8), 2133-2137.
- Galandiuk, S.,Rodriguez-Justo, M.,Jeffery, R.,Nicholson, A. M.,Cheng, Y.,Oukrif, D.,Elia, G.,Leedham, S. J.,McDonald, S. A. C.,Wright, N. A. and Graham, T. A. 2012. Field Cancerization in the Intestinal Epithelium of Patients With Crohn's Ileocolitis. *Gastroenterology* 142(4), 855-864.e858.
- Garcia, S. B.,Park, H. S.,Novelli, M. and Wright, N. A. 1999. Field cancerization, clonality, and epithelial stem cells: the spread of mutated clones in epithelial sheets. *J Pathol* 187(1), 61-81.
- Girardi, F. M.,Barra, M. B. and Zettler, C. G. 2013. Variants of papillary thyroid carcinoma: association with histopathological prognostic factors. *Braz J Otorhinolaryngol* 79(6), 738-744.
- Gutierrez-Gonzalez, L.,Graham, T. A.,Rodriguez-Justo, M.,Leedham, S. J.,Novelli, M. R.,Gay, L. J.,Ventayol-Garcia, T.,Green, A.,Mitchell, I.,Stoker, D. L.,Preston, S. L.,Bamba, S.,Yamada, E.,Kishi, Y.,Harrison, R.,Jankowski, J. A.,Wright, N. A. and McDonald, S. A. 2011. The clonal origins of dysplasia from intestinal metaplasia in the human stomach. *Gastroenterology* 140(4), 1251-1260.e1251-1256.
- Kaz, A. M.,Grady, W. M.,Stachler, M. D. and Bass, A. J. 2015. Genetic and Epigenetic Alterations in Barrett's Esophagus and Esophageal Adenocarcinoma. *Gastroenterol Clin North Am* 44(2), 473-489.
- Kennichi Kakudo, S. S., Keiko Inomata, Tomoko Kagiya, Hiroyuki Yamashita, Chiung-Ru Lai 2018. Papillary Thyroid Neoplasms in the 4th Edition WHO Classification of Tumors of Endocrine Organs: Neoplasms with Papillary Thyroid Carcinoma-type Nuclear Features. *Journal of Basic & Clinical Medicine* 7(1), 21-35.

- Kim, J. M., Kim, T. Y., Kim, W. B., Gong, G., Kim, S. C., Hong, S. J. and Shong, Y. K. 2006. Lymphovascular invasion is associated with lateral cervical lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *Laryngoscope* 116(11), 2081-2085.
- Kim, M. J., Won, J. K., Jung, K. C., Kim, J. H., Cho, S. W., Park, D. J. and Park, Y. J. 2018. Clinical Characteristics of Subtypes of Follicular Variant Papillary Thyroid Carcinoma. *Thyroid* 28(3), 311-318.
- Klein, A. M., Brash, D. E., Jones, P. H. and Simons, B. D. 2010. Stochastic fate of p53-mutant epidermal progenitor cells is tilted toward proliferation by UV B during preneoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(1), 270-275.
- Leedham, S. J., Graham, T. A., Oukrif, D., McDonald, S. A., Rodriguez-Justo, M., Harrison, R. F., Shepherd, N. A., Novelli, M. R., Jankowski, J. A. and Wright, N. A. 2009. Clonality, founder mutations, and field cancerization in human ulcerative colitis-associated neoplasia. *Gastroenterology* 136(2), 542-550.e546.
- Lee, Y. A., Jung, H. W., Kim, H. Y., Choi, H., Kim, H. Y., Hah, J. H., Park, D. J., Chung, J. K., Yang, S. W., Shin, C. H. and Park, Y. J. 2015. Pediatric patients with multifocal papillary thyroid cancer have higher recurrence rates than adult patients: a retrospective analysis of a large pediatric thyroid cancer cohort over 33 years. *J Clin Endocrinol Metab* 100(4), 1619-1629.
- Lochhead, P., Chan, A. T., Nishihara, R., Fuchs, C. S., Beck, A. H., Giovannucci, E. and Ogino, S. 2015. Etiologic field effect: reappraisal of the field effect concept in cancer predisposition and progression. *Mod Pathol* 28(1), 14-29.
- Mazzaferrri, E. L. and Jhiang, S. M. 1994. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *Am J Med* 97(5), 418-428.
- Mete, O. and Asa, S. L. 2011. Pathological definition and clinical significance of vascular invasion in thyroid carcinomas of follicular epithelial derivation. *Mod Pathol* 24(12), 1545-1552.
- Nosho, K., Kure, S., Irahara, N., Shima, K., Baba, Y., Spiegelman, D., Meyerhardt,

- J. A.,Giovannucci, E. L.,Fuchs, C. S. and Ogino, S. 2009. A prospective cohort study shows unique epigenetic, genetic, and prognostic features of synchronous colorectal cancers. *Gastroenterology* 137(5), 1609-1620.e1601-1603.
- Park, G.,Kim, T. H.,Lee, H. O.,Lim, J. A.,Won, J. K.,Min, H. S.,Lee, K. E.,Park, D. J.,Park, Y. J. and Park, W. Y. 2015. Standard immunohistochemistry efficiently screens for anaplastic lymphoma kinase rearrangements in differentiated thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 22(1), 55-63.
- Pillai, S.,Gopalan, V.,Smith, R. A. and Lam, A. K. 2015. Diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma--an update of its clinicopathological features and molecular biology. *Crit Rev Oncol Hematol* 94(1), 64-73.
- Pontius, L. N.,Youngwirth, L. M.,Thomas, S. M.,Scheri, R. P.,Roman, S. A. and Sosa, J. A. 2016. Lymphovascular invasion is associated with survival for papillary thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 23(7), 555-562.
- Prasad, G. A.,Wang, K. K.,Buttar, N. S.,Wongkeesong, L. M.,Krishnadath, K. K.,Nichols, F. C., 3rd,Lutzke, L. S. and Borkenhagen, L. S. 2007. Long-term survival following endoscopic and surgical treatment of high-grade dysplasia in Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 132(4), 1226-1233.
- Pu, W. S., X. Yu, P. Zhang, M. Liu, Z. Tan, L.,Han, P.,Wang, Y.,Ji, D.,Gan, H.,Wei, W.,Lu, Z.,Qu, N.,Hu, J.,Hu, X.,Luo, Z.,Li, H.,Ji, Q.,Wang, J.,Zhang, X. and Wang, Y. L. 2021. Single-cell transcriptomic analysis of the tumor ecosystems underlying initiation and progression of papillary thyroid carcinoma. *Nat Commun* 12(1), 6058.
- Pu, W.,Shi, X.,Yu, P.,Zhang, M.,Liu, Z.,Tan, L.,Han, P.,Wang, Y.,Ji, D.,Gan, H.,Wei, W.,Lu, Z.,Qu, N.,Hu, J.,Hu, X.,Luo, Z.,Li, H.,Ji, Q.,Wang, J.,Zhang, X. and Wang, Y. L. 2021. Single-cell transcriptomic analysis of the tumor ecosystems underlying initiation and progression of papillary thyroid carcinoma. *Nat Commun* 12(1), 6058.
- Robinson, J. T.,Thorvaldsdóttir, H.,Winckler, W.,Guttman, M.,Lander, E. S.,Getz, G. and Mesirov, J. P. 2011. Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology* 29(1), 24-26.

- Sezer, A., Celik, M., Yilmaz Bulbul, B., Can, N., Tastekin, E., Ayturk, S., Ustun, F., Guldiken, S. and Sut, N. 2017. Relationship between lymphovascular invasion and clinicopathological features of papillary thyroid carcinoma. *Bosn J Basic Med Sci* 17(2), 144-151.
- Steiling, K., Ryan, J., Brody, J. S. and Spira, A. 2008. The field of tissue injury in the lung and airway. *Cancer Prev Res (Phila)* 1(6), 396-403.
- Ushijima, T. and Hattori, N. 2012. Molecular pathways: involvement of Helicobacter pylori-triggered inflammation in the formation of an epigenetic field defect, and its usefulness as cancer risk and exposure markers. *Clin Cancer Res* 18(4), 923-929.
- Virnig, B. A., Tuttle, T. M., Shamliyan, T. and Kane, R. L. 2010. Ductal carcinoma in situ of the breast: a systematic review of incidence, treatment, and outcomes. *J Natl Cancer Inst* 102(3), 170-178.
- Wagner, K., Abraham, E., Tran, B., Roshan, D., Wykes, J., Campbell, P. and Ebrahimi, A. 2020. Lymphovascular invasion and risk of recurrence in papillary thyroid carcinoma. *ANZ J Surg* 90(9), 1727-1732.
- Xing, M., Alzahrani, A. S., Carson, K. A., Shong, Y. K., Kim, T. Y., Viola, D., Elisei, R., Bendlová, B., Yip, L., Mian, C., Vianello, F., Tuttle, R. M., Robenshtok, E., Fagin, J. A., Puxeddu, E., Fugazzola, L., Czarniecka, A., Jarzab, B., O'Neill, C. J., Sywak, M. S., Lam, A. K., Riesco-Eizaguirre, G., Santisteban, P., Nakayama, H., Clifton-Bligh, R., Tallini, G., Holt, E. H. and Sýkorová, V. 2015. Association between BRAF V600E mutation and recurrence of papillary thyroid cancer. *J Clin Oncol* 33(1), 42-50.

