

An Analytical Validation of the GenesWell™ BCT Multigene Prognostic Test in Patients with Early Breast Cancer

Jee-Eun Kim¹, Byeong-il Kang¹, Seung-Min Bae¹, Saebom Han¹, Areum Jun¹, Jinil Han¹, Min-ah Cho¹, Yoon-La Choi², Jong-Heun Lee¹, Young-Ho Moon¹

¹R&D Center, Gencurix Inc., Seoul, Korea

²Department of Pathology and Translational Genomics, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

조기 유방암 환자를 위한 다지표 예후 예측 검사 GenesWell™ BCT의 분석적 성능 시험

김지은¹, 강병일¹, 배승민¹, 한새봄¹, 전아름¹, 한진일¹, 조민아¹, 최윤라², 이종훈¹, 문영호¹

¹㈜ 젠큐릭스, 기업부설연구소, ²성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 병리학교실

GenesWell™ BCT is a 12-gene test suggesting the prognostic risk score (BCT Score) for distant metastasis within the first 10 years in early breast cancer patients with hormone receptor-positive, HER2-negative, and pN0~1 tumors. In this study, we validated the analytical performance of GenesWell™ BCT. Gene expression values were measured by a one-step, real-time qPCR, using RNA extracted from FFPE specimens of early breast cancer patients. Limit of Blank, Limit of Detection, and dynamic range for each of the 12 genes were assessed by serially diluted RNA pools. The analytical precision and specificity were evaluated by three different RNA samples representing low risk group, high risk group, and near-cutoff group in accordance with their BCT Scores. GenesWell™ BCT could detect gene expression of each of the 12 genes from less than 1 ng/μL of RNA. Repeatability and reproducibility across multiple testing sites resulted in 100% and 98.3% consistencies of risk classification, respectively. Moreover, it was confirmed that the potential interference substances does not affect the risk classification of the test. The findings demonstrate that GenesWell™ BCT have high analytical performance with over 95% consistency for risk classification.

Key words: GenesWell™ BCT, Analytical validation, BCT score, Early breast cancer, Gene expression

Corresponding author: Young-Ho Moon
R&D Center, Gencurix Inc., 9F, 242 Digital-ro,
Guro-gu, Seoul 08394, Korea
Tel: 82-70-7443-9522
Fax: 82-2-2621-7028
E-mail: yhmoon@gencurix.com

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2017 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

Received: February 10, 2017
Revised 1st: March 14, 2017
Revised 2nd: March 27, 2017
Revised 3rd: March 28, 2017
Revised 4th: March 28, 2017
Accepted: March 28, 2017

서론

현재 전 세계적으로 매년 약 157만 명의 유방암 환자가 발생되고 있으며, 발생률은 빠르게 증가하고 있다[1]. 특히 한국의

경우, 연간 유방암 환자 발생률은 1996년 기준으로 3,801명에서 2011년에 16,967명으로 늘어나, 15년 사이에 약 4.5배 증가하였다. 특히 에스트로겐 수용체(estrogen receptor, ER) 양성, 인간 표피 증식 인자 수용체(human epidermal growth factor

receptor 2, HER2) 음성, 림프절 전이 음성인 조기 유방암 환자는 2002년의 경우 전체 유방암 환자의 58.2%에서 2012년에는 73%로 나타나 지속적으로 증가 추세를 보이고 있다[2,3]. 조기 유방암 환자의 대부분은 타 장기 전이 위험이 낮아 항암화학요법이 필요하지 않음에도 불구하고, 기존 유방암 처치 가이드라인으로는 항암요법이 필요한 환자의 정확한 판별이 어려워 대다수의 환자가 수술 후에 항암화학요법과 방사선 치료를 처방받고 있다[4]. 그러나 최근 분자진단 기술과 빅데이터 분석 기술의 발전이 빠르게 진행됨에 따라 환자의 치료 선택에 있어 개인별 맞춤 의학으로의 접근이 가능하게 되었다. 이에 따라 유방암 치료에 있어서도 유방암 환자의 예후에 대한 정보를 통하여 환자의 화학항암요법 치료 결정에 이용할 수 있는 여러 유전자 검사법들이 개발되어 시행되고 있으며, 그에 대한 임상적 유효성 또한 지속적으로 입증되고 있다[4-6]. 이와 더불어 미국 국립 종합 암 네트워크(National Comprehensive Cancer Network, NCCN)의 유방암 치료 가이드라인에서는 항암치료가 필요한 ER 양성, HER2 음성, 림프절 전이 음성 또는 림프절 전이 3개 이하(pN0 또는 pN1)인 조기 유방암 환자의 10년 내 타 장기 전이 위험에 대한 예후를 예측하는 유전자 검사법이다. GenesWell™ Breast Cancer Test (Gencurix, Seoul, Korea; GenesWell™ BCT)는 호르몬 수용체(hormone receptor, HR) 양성, HER2 음성 및 림프절 전이 음성 또는 림프절 전이 3개 이하(pN0 또는 pN1)인 조기 유방암 환자의 10년 내 타 장기 전이 위험에 대한 예후를 예측하는 유전자 검사법이다. GenesWell™ BCT는 조기 유방암 환자의 파라핀 포매(formalin-fixed paraffin embedded, FFPE) 검체로부터 추출한 total RNA에서 유방암 예후와 연관이 있는 6개 유전자(*UBE2C*, *TOP2A*, *RRM2*, *FOXM1*, *MKI67*, *BTN3A2*), 3개의 유방암 호르몬 관련 유전자(*ESR1*, *PGR*, *ERBB2*) 및 3개의 표준 유전자(*CTBP1*, *CUL1*, *UBQLN1*)를 포함한 총 12개 유전자의 발현량을 실시간 역전사 중합 효소 연쇄 반응(quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, RT-qPCR) 기반으로 측정한다. 그 후 이들 발현량을 고유의 유방암 예후 예측 알고리즘에 대입해 Breast Cancer Test Score (BCT Score)를 산출하고, 산출된 Score에 따라 환자의 예후를 저위험군(low risk) 또는 고위험군(high risk)으로 제시하는 검사법이다.

GenesWell™ BCT는 분석적 성능 및 임상적 성능 검증이 완료되었으며, 이를 기반으로 한국 식품의약품안전처(식약처)로부터 3등급 체외진단용 의료기기로서 허가(제허16-800호)를 받았다. GenesWell™ BCT의 임상적 성능은 알고리즘 산출군(discovery set)을 대상으로 생존분석을 통한 원격전이 확률을

추정한 결과, 저위험군의 10년 내 무원격전이 생존률은 97.15% (95% CI, 94.43~99.94%)이었으며, 고위험군의 10년 내 무원격전이 생존률은 60.30% (95% CI, 42.90~84.70%)로 위험군 간에 약 36.85%의 차이가 있음을 확인하였다(p -value=1.74E-10, log-rank test). 또한 알고리즘 검증군(validation set)에서도 저위험군의 10년 내 무원격전이 생존률은 96.19% (95% CI, 92.79~99.70%)이었으며, 고위험군의 10년 내 무원격전이 생존률은 73.66% (95% CI, 59.26~91.57%)로 위험군 간 22.53% 차이가 있었다(p -value=6.23E-06, log-rank test). 이러한 결과는 GenesWell™ BCT 검사를 통해 고위험군으로 분류된 환자는 저위험군으로 분류된 환자보다 높은 확률로 원격전이가 발생할 수 있음을 의미하며, 높은 원격전이 발생 확률을 보이는 고위험군 환자의 경우 추가적인 치료요법(화학요법 등)을 고려해야 함을 제시한다고 할 수 있다[9].

본 연구는 Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiment (MIQE) [10] 및 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 가이드라인을 기반으로 수행된 GenesWell™ BCT의 분석적 성능 시험에 관한 연구결과로, 이를 통하여 GenesWell™ BCT 검사법의 정밀성 및 정확성을 확인하였다.

재료 및 방법

1. 예후 예측 알고리즘을 통한 BCT Score 산출

BCT Score는 GenesWell™ BCT에서 측정된 6개 예후 유전자의 Cp 값을 3개의 표준 유전자의 평균 Cp 값으로 표준화(normalization)한 6개의 Δ Cp 값과 각 환자 고유의 임상 정보(종양 크기 및 pN 상태)를 예후 예측 알고리즘에 대입하여 산출하였다. BCT Score 범위는 0.00에서 10.00까지이며, 임계치(cutoff) 4.00을 기준으로 4.00미만은 저위험군으로, 4.00이상은 고위험군으로 분류한다.

BCT Score는 환자를 저위험군 또는 고위험군으로 분류하지만, 보다 정밀한 분석적 성능시험을 위해 본 시험에서는 임계치 4.00을 기준으로, 고위험군 범위의 10%, 저위험군 범위의 10%를 가감하여 3.60이상 4.60이하의 임계치 주변군(near cutoff)을 추가로 설정하여 시험하였다. 이에 본 시험은 총 3개의 군(고위험군, 저위험군, 임계치 주변군)에 대하여 시행되었으며, 각 군에 대한 판정 일치도를 확인하였다.

또한, BCT Score 산출에 포함되지 않지만 조기 유방암 분류에 사용되는 유방암 호르몬 관련 유전자인 *ESR1*, *PGR* 그리고 *ERBB2*의 측정에 대한 성능은 표준화된 Δ Cp 값에 대한 변동계

수(coefficient of variation, CV%)로 확인하였다.

2. 검체

조기 유방암 환자의 FFPE 검체는 삼성서울병원에서 기관연 구윤리심의위원회(Institutional Review Board, IRB) 승인을 거쳐 수집하였다(SMC 2011-07-116-001). 각 FFPE 검체는 10 μm 두께의 절편으로 절제하여 시험에 사용하였다. 수집된 각각의 FFPE 검체는 GenesWell™ BCT로 시험하여 BCT Score가 산출되었고, 시험 목적에 따라 1개 이상의 검체를 사용하여 FFPE 또는 추출된 RNA를 혼합(pooling)하여 시험하였다 (Table 1).

3. 장비 및 시약

1) Total RNA 추출

FFPE 검체 절편의 탈 파라핀부터 total RNA 추출 및 Dnase I 처리까지의 과정은 전 자동화 추출법으로, 제조사의 매뉴얼에 따라 Tissue Preparation System (Siemens Healthcare Diagnostics, Munich, Germany)와 VERSANT Tissue Preparation Reagents Kit (Siemens Healthcare Diagnostics, Munich, Germany)를 사용하여 이루어졌다. 각 FFPE 검체 절편 별로 추출된 100 μL의 total RNA는 사용하기 전까지 영하 80°C에서 보관하였다.

2) 유전자 Cp 값 측정

FFPE 검체의 12개 유전자의 Cp 값은 QuantiFast Multiplex

RT-PCR +R Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 RT-qPCR 기법으로 측정하였다. Microlab STAR^{LT} (Hamilton Robotics, Grisons, Switzerland)을 사용하여 12개 유전자의 primer 및 probe가 각 well에 분주되어 있는 384 well plate에 FFPE 검체에서 추출한 total RNA와 상기 시약을 주입하였다. 그 후, LightCycler480 II (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)의 매뉴얼에 따라 각 유전자의 Cp 값을 측정하였다. 역전사 반응은 50°C에서 20분간 반응 시켰으며, PCR은 95°C에서 5분 반응 후 95°C에서 15초, 60°C에서 30초의 주기를 45회 반복 수행하였다.

GenesWell™ BCT의 양성대조군(positive control, PC)으로는 12개의 유전자가 포함된 plasmid로부터 합성한 in vitro transcribed RNA를 사용하였고, 음성 대조군(no template control, NTC)으로는 RNase free water를 사용하였다.

4. 평가 방법

1) 공란 한계(limit of blank, LoB), 검출 한계(limit of detection, LoD), 및 측정 범위(dynamic range) 설정

각 유전자의 공란 한계는, 음성 대조군으로 수행한 30회 반복 시험에서 측정된 평균 Cp 값 및 표준 편차를 사용하여, 아래의 공식에 따라 설정하였다[11].

$$\text{각 유전자의 공란 한계} = \text{각 유전자의 평균 Cp 값} - (1.645 \times \text{각 유전자의 표준편차})$$

각 유전자의 검출 한계 및 측정 범위는 각 군(고위험군, 저위험군, 임계치 주변군)에 해당하는 FFPE 검체를 3개씩 선별하여, 총 9개의 검체를 사용하여 RNA pool을 제작하여 시험하였다. 먼저, 고농도와 저농도 사이의 5개 이상의 농도의 RNA pool을 사용하여, 3회 반복 시험을 수행하여 R²값이 0.9이상인 직선성 구간을 확인하였다[12]. 그 후, 검출 한계로 예상되는 농도를 포함한 주변 5개 농도의 RNA pool을 사용하여 24회 반복 시험을 수행하여, 공란 한계 미만의 Cp 값으로 95% 이상 측정되는 최소 농도를 각 유전자의 검출 한계로 설정하였다[13]. 또한, 측정 범위는 각 유전자의 검출 한계 이상, 직선성 구간의 최대 농도 이하로 설정하였다.

2) 분석적 정밀도(precision) 평가

분석적 정밀도는 3개의 각 군(고위험군, 저위험군, 임계치 주변군)에 해당하는 FFPE 검체를 5씩 선별하여, 각 군의 검체에서 추출한 RNA를 pooling한 3개의 RNA pool로 시험하였다.

Table 1. Characteristics of patients

Category	Variable	No. of patients	%
Tumor size (cm)	≤2	9	47.4
	2~5	8	42.1
	>5	2	10.5
pN	0	14	73.7
	1	3	15.8
	>1	2	10.5
ER	Positive	19	100.0
	Negative	0	0.0
PR	Positive	16	84.2
	Negative	3	15.8
HER2	Positive	0	0.0
	Negative	19	100.0
Histological grade	1	2	10.5
	2	13	68.4
	3	4	21.1
Nuclear grade	1	1	5.3
	2	15	78.9
	3	3	15.8

Table 2. LoB, LoD and dynamic range of the 12 genes included in GenesWell™ BCT

Gene	LoB [Cp value]	LoD [Cp value]	LoD [ng/ μ L]	Dynamic range [Cp value]
UBE2C	38.50	34.79 (34.07~35.51)	0.08	28.57~34.79
TOP2A	38.42	35.79 (35.19~36.40)	0.31	29.61~35.79
RRM2	41.00	31.88 (30.79~32.98)	0.08	27.37~31.88
FOXM1	38.61	32.46 (32.06~32.85)	0.16	27.7~34.46
MKI67	41.00	34.07 (33.50~34.63)	0.08	27.35~34.07
BTN3A2	41.00	32.48 (32.08~32.88)	0.08	26.24~32.48
ESR1	39.85	36.10 (34.80~37.39)	0.08	30.44~36.10
PGR	41.00	30.46 (29.80~31.12)	0.31	26.18~30.46
ERBB2	38.83	34.23 (33.52~34.93)	0.04	26.92~34.23
CTBP1	34.76	32.07 (31.70~32.43)	0.63	28.28~32.07
CUL1	38.60	33.95 (33.43~34.46)	0.31	29.59~33.95
UBQLN1	41.00	36.71 (35.19~38.24)	0.04	28.73~36.71

95% confidence intervals of Cp values at LoD are indicated in brackets.

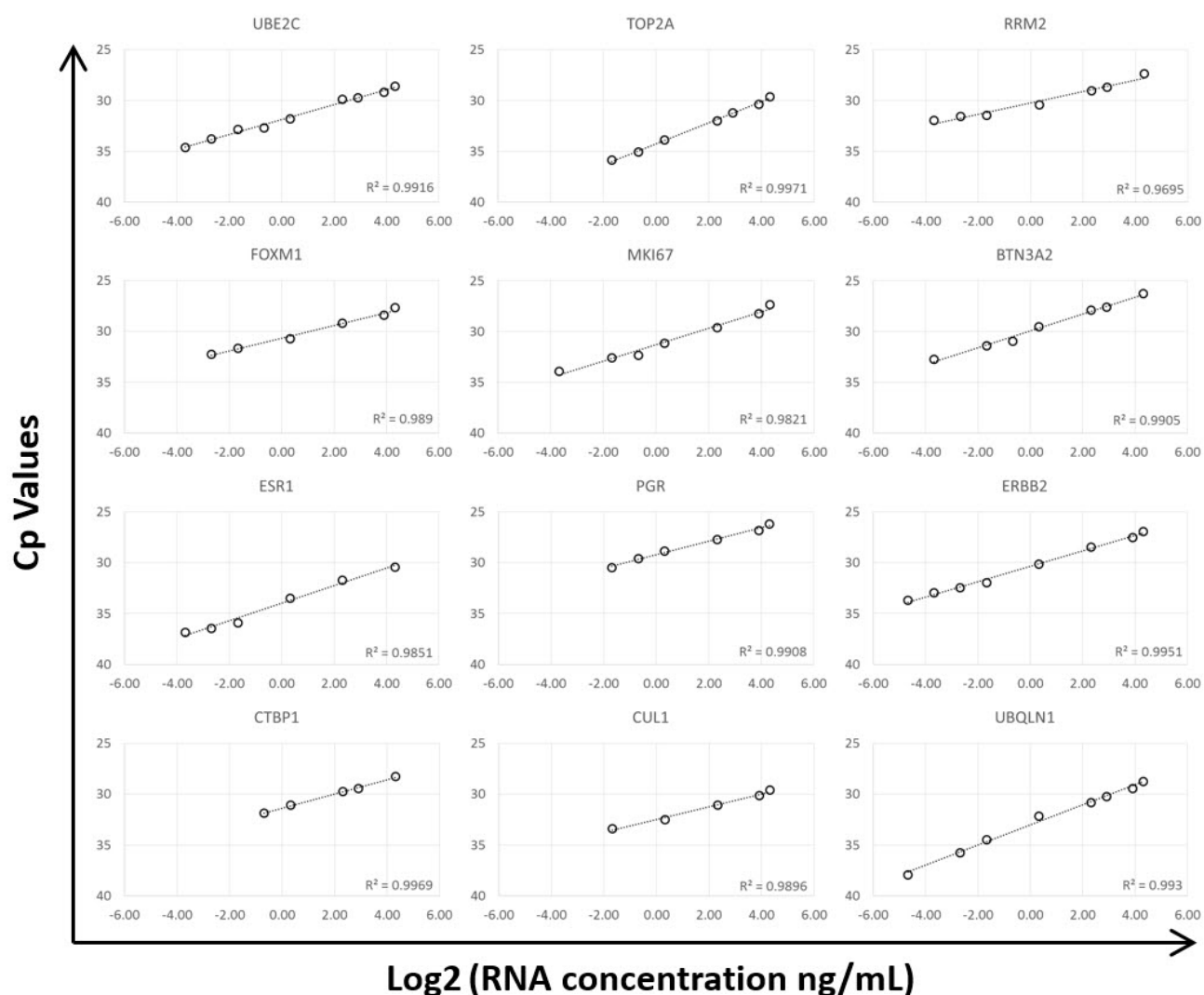


Figure 1. Cp values of each of 12 genes in GenesWell™ BCT were linear up against to log₂ (total RNA conc.,ng/mL).

반복성 시험은 한 시험실 내 반복성을 검증하기 위해, 3개의 RNA pool을 이용하여 1명의 시험자가 시험 내 2반복으로 매일 2번씩 5일동안 시험하였으며, 재현성 시험은 RNA pool을 2곳의 시험실에 분배하여 각 시험실 별로 1명의 시험자가 각각 2개의 제조 lot을 이용하여 시험 내 2반복으로 5일 동안 수행하였다 [14]. 12개 각 유전자의 ΔC_p 값은 시험 내 2반복에 대한 평균 C_p 값을 3개의 표준 유전자의 평균 C_p 값으로 표준화하였으며, CV%는 반복된 시험에서의 평균 ΔC_p 값 및 표준 편차를 이용하여 아래와 같은 산식을 통해 산출하였다.

$$CV\% = (\Delta C_p \text{의 표준편차} / \text{평균 } \Delta C_p) \times 100$$

또한, 각 군에 대한 판정 일치도는 일치률(%)로 판정하였으며, 재현성 시험에서 제시한 BCT Score에 대한 표준 편차는 단변량 one-way ANOVA 분석을 통해 산출하였다.

3) 분석적 특이도(analytical specificity) 평가

분석적 특이도 시험은, 시험 중 간섭 가능성이 있는 물질이 FFPE 검체의 위험군 판정에 영향을 미치는지의 여부를 확인하였다. 3개의 각 군(고위험군, 저위험군, 임계치 주변군)에 해당되는 FFPE 검체에 CLSI EP07-A2 [15]에서 권장하는 혈색소(hemoglobin: 2 mg/mL, 4 mg/mL), 중성지방(triglycerides: 37 mM, 74 mM), 그리고 파라핀 절편(paraffin section: 1 cm², 2.25 cm²)을 첨가한 후, total RNA를 추출한 후, 각 조건에서 추출한 total RNA를 시험 내 3반복으로 수행하여, 간섭 물질을 첨가하지 않은 대조군과 시험군에서 각 군에 대한 위험군 판정을

비교하였다.

결 과

1. 공란 한계, 검출 한계, 및 측정 범위

RT-qPCR 기반으로 만들어진 GenesWell™ BCT의 12개 유전자에 대한 분석적 민감도를 확인하였다. 12개 유전자의 공란 한계 C_p 값은 최대 41.00, 최소 34.76으로 CTBP1에서 제일 낮은 수치를 나타냈으며, 공란 한계 미만의 C_p 24회 반복 시험 중 95% 이상 검출되는 LoD를 각 유전자 별로 확인한 결과, 최소 0.04 ng/μL에서 최대 0.63 ng/μL으로 측정되었다(Table 2). 또한, 각 유전자의 C_p 값에 대한 측정범위는 LoD 이상이면서 직선성에 대한 R²값이 0.9 이상인 구간을 설정하였다(Table 2, Figure 1).

2. 정밀도 평가

GenesWell™ BCT의 정밀도는 단일 기관에서 실시하는 반복성과 다수의 기관에서 실시하는 재현성으로 구분하여 검증하였다[14]. 정밀도 시험을 위해 사용된 각 군별 BCT Score는 각각 3.24 (저위험군), 4.19 (임계치 주변군), 5.65 (고위험군)이었다.

반복성 시험은 한 시험실 내에서 시험 내 2 반복으로 하루 2번, 5일 동안 수행하였다. 반복 시험을 통해 측정된 12개 각 유전자의 ΔC_p 값의 CV%는 각 군 모두 5% 미만이었고(Table 3), 각 군별 판정 일치율은 100%임을 확인할 수 있었다(Figure 2).

재현성 시험은 2 곳의 시험실(한 시험실 당 1명의 시험자)에

Table 3. Analytical precision for detecting expression of 12 genes

Gene	Coefficient of variation (%)					
	Low risk		Near cutoff		High risk	
	Repeatability	Reproducibility	Repeatability	Reproducibility	Repeatability	Reproducibility
UBE2C	0.80	0.73	1.31	0.78	1.34	0.92
TOP2A	2.40	1.58	1.39	1.43	1.25	0.95
RRM2	1.73	1.11	1.63	1.09	1.48	1.10
FOXM1	1.39	1.18	1.71	1.03	1.33	1.26
MKI67	0.95	1.03	0.99	0.98	0.86	1.27
BTN3A2	0.90	0.80	0.96	0.85	1.15	0.93
ESR1	1.67	0.93	1.95	1.00	1.40	1.83
PGR	0.75	0.68	1.44	0.84	1.14	0.80
ERBB2	1.26	1.00	0.88	0.54	1.09	0.81
CTBP1	0.96	0.45	1.15	0.71	0.99	0.72
CUL1	1.58	0.90	1.64	0.92	1.70	1.50
UBQLN1	1.33	0.87	2.21	0.97	2.63	1.34

Total CV% for ΔC_p values of 12 genes were calculated from mean C_p values with standard deviations obtained by ANOVA test [CV%=(Standard deviation of ΔC_p values/Mean ΔC_p values)x100].

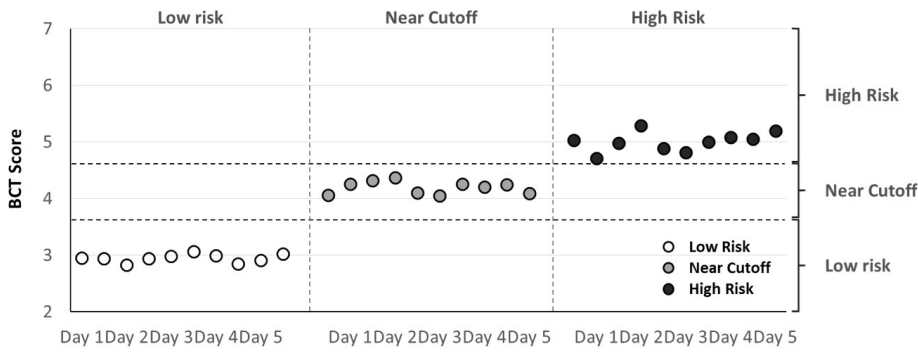


Figure 2. Repeatability of BCT Scores was confirmed using three different group RNA samples (Low Risk, Near Cutoff, High Risk) for 5 different working days. Each dot indicates individual BCT Score.

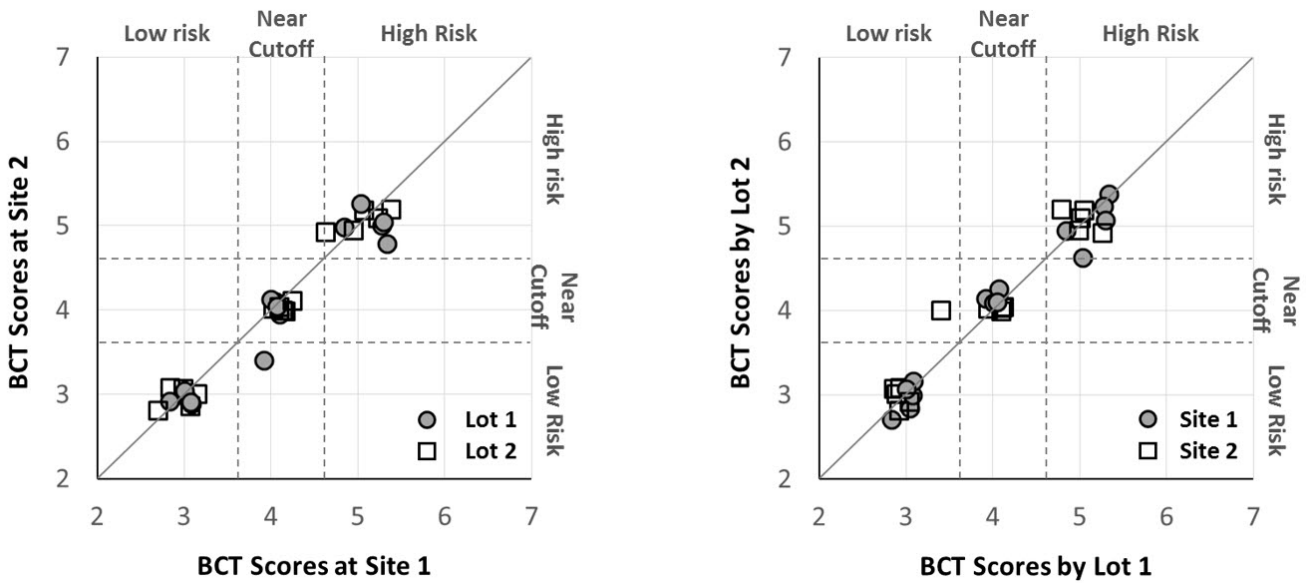


Figure 3. Reproducibility of BCT Scores was validated using three different group RNA samples (Low Risk, Near Cutoff, High Risk) with 2 manufacturing lots at 2 independent testing sites for 5 different working days.

서 2개 lot을 사용하여 시험 내 2반복으로 5일 동안 수행하였다. 그 결과, 각 군의 판정 일치율은 저위험군 100%, 임계선 주변군 95%, 고위험군 100%로 확인되었다(Figure 3). 임계선 주변군의 경우, 20회 반복 중 1회의 시험에서 BCT Score가 3.40인 저위험군으로 판정되어 95% 일치율을 보였다. 재현성 시험을 통해 산출된 BCT Score의 평균값에 대한 분산 정도(degree of variation)를 확인하기 위하여 표준 편차를 산출한 결과, 저위험군 0.12, 임계치 주변군 0.17, 고위험군 0.20으로 전체 BCT Score의 범위(0.00~10.00)에서 2% 내 변동(noise)을 보임을 확인하였다(Table 4). 또한 재현성 시험을 통해 측정된 각 유전자 의 ΔCp 값의 CV%는, 반복성 시험에서와 마찬가지로 모두 5% 미만이었다(Table 3).

3. 분석적 특이도 평가

GenesWell™ BCT의 분석적 특이도를 확인하기 위해 각 간

섭 물질을 3개의 군에 해당되는 각 1개의 FFPE 검체에 혼합한 후 total RNA를 추출하여 3회 반복 시험 하였다. 각 시험의 BCT Score를 산출하여 대조군의 BCT Score (저위험군, 3.28; 임계치 주변군, 3.73; 고위험군, 6.15)와 비교하였다. 그 결과, 간섭 물질의 존재 여부와 관계없이 각 군에 대한 판정은 동일하였다(Figure 4). 이를 통해 본 시험에서 사용된 간섭 물질인 hemoglobin, triglycerides 그리고 paraffin section이 GenesWell™ BCT의 시험 결과에 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었다.

고 찰

유방암은 다른 고형암에 비해 항암치료의 효과가 뚜렷하며 수술 후에 보조적으로 항암치료를 추가하여 생존율을 높일 수 있는 암이지만, 항암치료에 의해 모든 유방암 환자의 재발을 감소시키는 효과가 있지 않다는 사실은 잘 알려져 있다[16,17]. 전

Table 4. Variance of BCT Scores for three group samples in reproducibility study

Sample	Mean BCT Score	Standard deviation			
		Variance components			Total variance
		Day	Site	Lot	
Low risk	2.97	0.118	0.004	<0.001	0.117
Near cutoff	4.03	0.150	0.056	0.052	0.165
High risk	5.07	0.216	0.019	0.005	0.197

Analysis: R 3.3.1, Package: ANOVA Test.

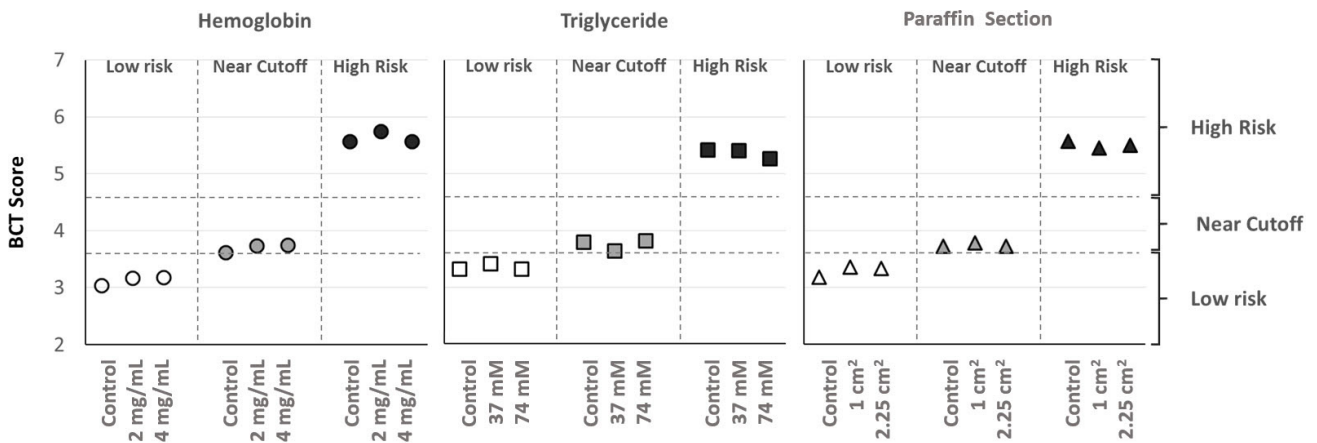


Figure 4. Analytical specificity of BCT Scores was validated using three individual FFPE specimens which represent each of three risk classification group in the conditions of with or without interference substances (hemoglobin, triglycerides, and paraffin section). Each dot indicates individual BCT Score.

통적으로 암의 크기, 림프절 전이 여부, 암세포의 모양 등을 통해 항암제 치료 결정이 주로 이루어졌으나, 임상적 유효성의 한 계로 많은 환자들에게 정확한 치료법 제시에 대한 근거가 부족하다고 알려져 있다[18]. 이에 환자의 예후를 예측할 수 있는 다중 유전자를 이용한 다수의 검사법들이 개발되어 해외에서 시행되고 있다[5,6]. 대표적인 예로 미국 FDA 510(k)를 받은 Mammaprint[®] (Agendia, Irvine, CA, USA)와 Prosigna[™] Breast Cancer Gene Signature Assay (NanoString Technologies, Seattle, USA)가 있으며, 또한 Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) 인증 받은 시험실에서 서비스를 통해 진단하는 Oncotype DX[®] Breast Cancer Assay (Genomic Health)와 Endopredict[®] (Sividon Diagnostics, Cologne, Germany)가 있다.

GenesWell[™] BCT가 예후 예측을 위해 발현량을 측정하는 유전자는 총 12개로 6개의 예후 예측 유전자와 3개의 표준 유전자, 그리고 3개의 유방암 호르몬 관련 유전자로 구성되어 있다. 6개의 예후 예측 유전자는 유럽 및 미주 8개국 환자 정보를 보유한 National Center for Biotechnology Information (NCBI)

의 GEO (Gene Expression Omnibus)에서 1,300명 유방암 환자의 유전 정보를 이용하여 선별하였다. 선별된 유전자는 유방암 예후가 좋은 집단과 나쁜 집단 간 발현 차이가 큰 증식 (proliferation)과 면역반응 (immune response)에 관여하는 유전자군으로 이루어져 있으며, 유방암의 예후 예측과 관련이 높고 동결 검체 및 FFPE 검체 조직에서 발현이 안정적인 유전자로 세포 증식 관련 유전자(*UBE2C*, *TOP2A*, *RRM2*, *FOXM1*, *MKI67*) 5개와 면역 반응 관련 유전자(*BTN3A2*)로 구성되어 있다. 추가적으로, 3개의 유방암 호르몬 관련 유전자(*ESR1*, *PGR*, *ERBB2*)는 조기 유방암 환자 분류에 중요한 호르몬 수용체의 발현 정도를 확인하는데 이용된다.

GenesWell[™] BCT는 알고리즘을 통해 산출된 BCT Score 임계치 4.00을 기준으로 4.00 미만은 저위험군, 4.00 이상은 고위험군 환자로 분류한다. 저위험군과 고위험군을 분류하는 임계치의 중요성에 따라, 본 연구에서는 임계치 주변군을 설정하여 총 3개의 군으로 시험하였다. GenesWell[™] BCT는 여러 유전자 발현값의 조합을 이용하여 검사하는 체외진단다지표검사 (In Vitro Diagnostic Multivariate Index Assay, IVDMA)로, 국

제적 표준 물질이 존재하지 않으며, 미국 FDA 유방암 진단기기 가이드라인에서도 제품의 대상 검체를 이용하여 분석적 성능시험을 하도록 권장하고 있다[19]. 따라서, 본 연구에서는 GenesWell™ BCT의 검사 대상인 HR 양성인면서 HER2 음성인 조기 유방암 환자의 FFPE 검체를 이용하여 분석적 성능을 검증하였다.

분석적 정밀도에서 12개 유전자의 ΔCt 에 대한 CV%가 모두 5% 미만으로 측정되어 안정적으로 각 유전자의 발현값이 반복, 재현됨을 확인할 수 있었다(Figure 3, Table 4). 또한, BCT Score에 따른 3개의 군에 대한 판정 일치도가 반복성 시험에서 전체 100%, 재현성 시험에서 전체 98.3%로 확인됨으로써 BCT Score에 대한 높은 재현, 반복률을 확인하였다. 재현성 및 반복성 시험을 통해 산출된 BCT Score에 대한 각 시험에 대한 표준편차는 재현성 시험에서 0.16, 반복성 시험에서 0.12로, BCT Score 범위(0.00~10.00)의 1.6% 및 1.2%였다. 재현성 시험에서 표준편차가 큰 이유는 시험 날짜 간 표준편차가 다른 조건에 비해 크게 나타났기 때문이며(Table 4), 이는 시험 날짜 내 2명의 시험자, 2개의 lot, 2곳의 시험실 및 2대의 PCR 분석 기기에 대한 모든 변동 계수를 포함하였기 때문이라 생각된다. 그러나 다른 RT-qPCR을 기반으로 한 제품인 Endopredict® (Sividon Diagnostics)의 복수의 시험실에서 수행된 정밀도 시험에서의 EP Score (0-15)에 대한 표준 편차는 1.7%, Oncotype DX® Breast Cancer Assay (Genomic Health)의 한 곳의 시험실에서 수행된 정밀도 시험에서 Recurrence Score (RS) (0~100)에 대한 표준편차는 1.53%임을 감안했을 때[20,21], GenesWell™ BCT의 반복·재현에 대한 성능이 상기 제품에 비해 떨어지지 않음을 확인할 수 있었다.

GenesWell™ BCT 검사법은 HR 양성 및 HER2 음성이며, pN0 또는 pN1인 조기 유방암 환자의 10년 내 원격전이의 위험성을 유의하게 예측할 뿐만 아니라, 임상병리학적 변수를 기반으로 한 예후 예측법 보다 뛰어난 분류 정확도를 보여주었다[9]. 또한, 본 검사로 산출된 BCT Score가 조기 유방암 환자에 있어 유의한 예후 정보를 제공해 줄 수 있는 독립적인 예후 지표로 제시될 수 있음을 확인하였으며, 다른 예후 예측 검사법 보다 임상적 성능이 뛰어남을 보여 주었다[9]. 그리고 본 연구 결과에서는 GenesWell™ BCT 검사법이 높은 재현성과 반복성을 지닌 검사법임을 확인할 수 있었다. 따라서 GenesWell™ BCT 검사는 유방암 환자의 과잉치료(overtreatment) 또는 반대로 불충분한 치료(undertreatment)의 가능성을 줄여 환자 개개인의 맞춤형 치료를 위한 유용한 임상적 정보를 제공하는 검사법으로 사용될 수 있음을 제시한다고 할 수 있다.

요약

GenesWell™ BCT는 호르몬 수용체 양성, HER2 음성, 및 pN0 또는 1인 조기 유방암 환자의 10년내 타 장기 전이 재발 위험도를 제시하는 다지표 예후 예측 검사로, 예후에 대한 위험을 BCT Score로 제시한다. 본 연구에서는 GenesWell™ BCT의 분석적 성능을 검사하였다. 조기 유방암 환자의 FFPE 검체로부터 추출한 RNA를 대상으로 GenesWell™ BCT 수행하여, 12개 유전자의 발현값을 측정하였다. GenesWell™ BCT의 최소검출한계, 공란 한계 및 측정 범위는 단계 희석한 RNA 검체를 사용하여 평가하였으며, 분석적 정밀도 및 특이도 시험은 BCT Score에 따라 저위험군, 고위험군 그리고 경계선 주변으로 나누어진 3개의 RNA 검체를 이용하여 시험하였다. GenesWell™ BCT는 1 ng/μL 미만의 RNA 검체에서 RNA를 측정할 수 있었으며, 다기관에서 수행된 분석적 정밀도 시험에서 반복성 100% 및 재현성 98.3%의 결과를 확인할 수 있었다. 또한, 분석적 특이도 시험을 통해, 간섭 물질이 검체의 재발 위험성 판정에 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었다. 이들 결과는 GenesWell™ BCT가 95% 이상의 항상성을 나타내는 높은 분석적 성능을 가지고 있음을 제시한다.

REFERENCES

1. International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012 [Internet]. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2012 [cited 2017 February 01] Available from http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer/.
2. International Agency for Research on Cancer. World Cancer Report 2014. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2014.
3. Kim Z, Min SY, Yoon CS, Lee HJ, Lee JS, Youn HJ, et al. The basic facts of Korean breast cancer in 2011: Results of a nationwide survey and breast cancer registry database. *J Breast Cancer*. 2014;17(2):99-106.
4. Sinn P, Aulmann S, Wirtz R, Schoff S, Marme F, Varga Z, et al. Multigene assays for classification, prognosis, and prediction in breast cancer: A critical review on the background and clinical utility. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 2013;73(9):932-940.
5. Rouzier R, Pronzato P, Chereau E, Carlson J, Hunt B, Valentine WJ. Multigene assays and molecular markers in breast cancer: systematic review of health economic analyses. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;139:621-637.
6. Györfy B, Hatzis C, Sanft T, Hofstätter E, Aktas B, Pusztai L. Multigene prognostic tests in breast cancer: past, present, future. *Breast Cancer Res*. 2015;17:11.
7. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical practice guidelines in oncology: Breast cancer [Internet]. Wa-

- shington: National Comprehensive Cancer Network; 2017 [cited 2017 February 01]. Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp
8. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25:5287-5312.
 9. Gong GY, Kwon MJ, Han JI, Lee HJ, Lee SK, Lee JE, et al. A new molecular prognostic score for predicting the risk of distant metastasis in patients with HR+/HER2- early breast cancer. *Sci. Rep.* 2017. Forthcoming.
 10. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE Guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009;55(4):611-622
 11. David AA, Armbruster DA, Pry T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin Biochem Rev.* 2008; 29(Suppl 1):49-52.
 12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline. CLSI document EP06-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2003.
 13. Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures; approved guideline - second edition. CLSI document EP17-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
 14. Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of precision of quantitative measurement procedures; approved guideline - third edition. CLSI document EP05-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
 15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Interference testing in clinical chemistry; approved guideline - second edition. CLSI document EP07-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
 16. Fisher B, Jeong JH, Bryant J, Anderson S, Dignam J, Fisher ER, et al. Treatment of lymph-node-negative, oestrogen-receptor-positive breast cancer: Long-term findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project randomised clinical trials. *Lancet.* 2004;364(9437):858-868.
 17. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group: Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: An overview of the randomised trials. *Lancet.* 2005;365(9472):1687-1717.
 18. Huober J, Thürlimann B. Adjuvant! When the new world meets the old world. *Lancet Oncology.* 2009;10(11):1028-1029.
 19. Food and Drug Administration. Center for Devices and Radiological Health: Guidance for industry and FDA staff - class II special controls guidance document: Gene expression profiling test system for breast cancer prognosis [Internet]. Silver Spring: Food and Drug Administration; 2007 [cited 2017 February 01]. Available from: <http://www.fda.gov/Regulatory-Information/Guidances/ucm079163.htm>
 20. Kronenwett R, Bohmann K, Prinzler J, Sinn BV, Haufe F, Roth C, et al. Decentral gene expression analysis: analytical validation of the Endopredict genomic multianalyte breast cancer prognosis test. *BMC Cancer.* 2012;12:456.
 21. Cronin M, Sangli C, Liu ML, Pho M, Dutta D, Nguyen A, et al. Analytical validation of the Oncotype DX genomic diagnostic test for recurrence prognosis and therapeutic response prediction in node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Chem.* 2007;53(6):1084-1091.