Laboratory Medicine and Quality Assurance

pISSN 2950-9114 • eISSN 2950-9122

ORIGINAL ARTICLE

https://doi.org/10.15263/jlmqa.2023.45.2.70

Diagnostic Effectiveness of Copy Number Variation Detection Using Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification in Patients with Lynch Syndrome-Related Cancer

Do-Hoon Kim

Department of Diagnostic Laboratory Medicine, Keimyung University Dongsan Hospital, Keimyung University School of Medicine, Daegu, Korea

Corresponding author:
Do-Hoon Kim
Department of Diagnostic Laboratory Medicine, Keimyung University Dongsan Hospital, Keimyung University School of Medicine, 1035 Dalgubeol-daero, Dalseo-gu, Daegu 42601, Korea
Tel +82-53-258-7941
E-mail kdh@dsmc.or.kr

Received: February 28, 2023
Revised: March 10, 2023
Accepted: March 13, 2023

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.

Background: Lynch syndrome (LS) is an autosomal dominant inherited disease caused by germline mutations in one of the DNA mismatch repair (MMR) genes such as mutL homologue 1 (MLH1), mutS homologue 2 (MSH2), MSH6, and postmeiotic segregation increased 2. Most pathogenic variants of LS are single nucleotide polymorphisms, but copy number variations (CNV) account for a significant proportion. Therefore, we investigated the efficacy of multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) using a hereditary cancer next-generation sequencing (NGS) panel and MLPA of MMR genes in patients with LS-related cancer.
Methods: We performed hereditary cancer NGS of 48 genes, including MMR genes, and MLPA, including MLH1, MSH2, and MSH6, in 120 patients with LS-related cancer. The pathogenic variants detected by NGS were confirmed using Sanger sequencing.
Results: Of the 120 patients, 18 had pathogenic variants, of which the six most common were MSH2 gene variants. Of the six MSH2 mutations, three were CNVs detected by MLPA. Nonsense and frameshift mutations were found in MSH6 and MLH1, respectively, in two other patients.
Conclusions: In this study, CNVs were found at a higher rate in the pathogenic variants of MSH2 in patients with LS than in previous studies. Therefore, MLPA must be performed to detect CNVs in the diagnosis of LS.
(Lab Med Qual Assur 2023;45:70-5)

Key Words Lynch syndrome I, Lynch syndrome II, Hereditary nonpolyposis colorectal neoplasms, DNA copy number variations, Multiplex polymerase chain reaction, MutS homolog 2 protein

서론

린치 증후군(Lynch syndrome) 또는 유전성 비폴립증 대장암은 전체 대장암의 약 5%에 해당하는 상염색체 우성 유전질환이다[1]. 해당 환자들은 70세까지 대장암의 이환율이 80%에 이르며 발병 평균 나이가 45세 정도로 산발성 대장암 환자들에 비해 조기에 암이 발생한다[2]. 린치 증후군은 발생하는 암의 종류에 따라 I과 II로 구분하기도 하는데, 린치 증후군 I은 대장암만 특이적으로 발생하고 II는 대장암과 다른 장기암이 함께 발견된다[3]. 특히 발생률이 높은 다른 장기암은 자궁내막암이 가장 흔하며 그 외에도 위암, 난소암, 췌담도암, 요관암, 소장암 등이 동반되기도 한다[4,5]. 린치 증후군은 상기의 관련 암이 발생한 가족력이 있는 경

Copyright © 2023 Korean Association of External Quality Assessment Service

우가 많고 발생된 암에 따라 나타나는 임상 양상이 다양할 수 있기 때문에 의심되는 환자에 대해 적절한 진단적 접근이 필요하다.

린치 증후군은 복제실수교정 유전자(mismatch repair gene, MMR)의 생식세포 돌연변이(germline mutation)에 의해 발생하며, MMR 유전자에 결함이 생기면 DNA 복제 실수를 인지하고 교정하지 못하기 때문에 현미부수체 불안정(microsatellite instability, MSI)을 일으켜 암이 발생한다[6,7]. MMR에 관여하는 대표적인 유전자는 mutL homologue 1 (*MLH1*), mutS homologue 2 (*MSH2*), *MSH6*, postmeiotic segregation increased 2 (*PMS2*)가 있으며, 최근에는 epithelial cell adhesion molecule (*EPCAM*) 유전자의 생식세포 돌연변이도 관련이 있는 것으로 보고되었다[8]. 린치 증후군의 확진을 위해서는 해당되는 MMR 유전자의 생식세포 돌연변이의 여부를 유전자검사를 통해 확인해야 한다. MMR 유전자 중 *MHL1*, *MSH2*의 변이가 병적 변이의 약 90%을 차지하고 무의미 변이(nonsense variant), 틀이동 변이(frameshift variant), 또는 과오 변이(missense variant)가 대부분의 주요한 변이로 알려져 있으나 *MLH1*의 10%–20%, *MSH2*의 20%–40%, *MSH6*의 10%, *PMS2*의 20%–55%에서 엑손 단위의 결실 또한 보고되고 있으므로 린치 증후군의 확진검사 시에는 단일염기변이(single nucleotide variant, SNV)뿐 아니라 유전자 복제 수 변이(copy number variation, CNV) 검출을 포함한 포괄적인 검사가 필요하다[9].

이에 본 연구에서는 린치 증후군 관련 암을 가진 환자들을 대상으로, MMR 유전자가 포함된 차세대 염기서열분석법(next-generation sequencing, NGS) 기반 유전성 암 유전자 패널검사를 실시하였다. 더불어 *MHL1*, *MSH2*, *MSH6*에 해당하는 multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)를 추가적으로 시행하여 린치 증후군 환자에서의 CNV 분포를 살펴보고 린치 증후군 확진검사에서의 MLPA의 효용성에 대하여 고찰해 보았다.

재료 및 방법

1. 대상

2020년 1월부터 2022년 6월까지 계명대학교 동산병원 내에서 유전성 암 유전자 패널검사가 의뢰된 환자들 중 린치 증후군 관련 암인 대장암, 직장암, 자궁내막암, 난소암을 가진 환자들을 대상으로 120명을 선정하였다. 검체는 익명화하여 개인정보가 노출되지 않도록 개인식별코드로 대체하여 사용하였다. 본 연구는 원내 임상시험심사위원회(institutional review board, IRB)의 심의를 받았다(IRB file no., 2023-02-020).

2. DNA 추출

유전체 DNA는 말초혈액에서 QIAGEN QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 추출하였다. 추출된 DNA의 농도 및 순도는 Nanodrop ND-100 spectrophotometry (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA)를 이용하여 확인하였다. DNA 순도는 A260/280에서의 비율이 1.8–2.0 사이임을 확인하였다.

3. 차세대 염기서열분석 및 직접 염기서열분석

추출한 DNA는 Ion Chef System (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)으로 library preparation을 시행하였고 유전성 암 관련 유전자를 포함하여 주문 제작한 유전자 패널을 Ion S5 sequencer (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 염기서열분석을 시행하였다. 포함된 암 유전자는 모두 48개로 *ABRAXAS1*, *APC*, *ATM*, *ATR*, *AXIN2*, *BARD1*, *BLM*, *BMPR1A*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CDH1*, *CDKN2A*, *CFTR*, *CHEK2*, *EPCAM*, *FANCC*, *FANCG*, *FH*, *GALNT12*, *GEN1*, *GREM1*, *MEN1*, *MLH1*, *MRE11*, *MSH2*, *MSH3*, *MSH6*, *MUTYH*, *NBN*, *NF1*, *NTHL1*, *PALB2*, *PALLD*, *PMS2*, *POLD1*, *POLE*, *PRSS1*, *PTEN*, *RAD51C*, *RAD51D*, *RET*, *RPS20*, *SMAD4*, *SPINK1*, *STK11*, *TP53*, *VHL*이며 염기서열분석 방식은 amplicon-based library preparation으로 모든 과정은 제조사의 지침에 따라 검사하였다. 유전성 암 유전자 패널에서 병적 변이가 발견된 검체는 3500xL DNA analyzer with a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA)를 이용하여 직접 염기서열분석법으로 확진검사를 시행하였다.

4. Multiplex ligation-dependent probe amplification

120명 대상 환자는 모두 *MHL1*, *MSH2*, *MSH6* 유전자의 CNV를 검출하기 위해 SALSA MLPA P003-D1 MLH1/MSH2와 P072-D1 MSH6-MUTYH (MRC-Holland, Amsterdam, the Netherlands)를 이용하였고 P003-D1에서 양성 소견이 있을 때 P248-B2 MLH1-MSH2 (MRC-Holland)를 사용하여 반복 및 결실이 있는 엑손 부위를 확인한 후 확진하였다. 각 kit는 해당 유전자의 전 엑손에 대한 probe가 포함되어 있으며, 각 probe로 증폭이 된 형광 peak의 높이를 Coffalyser.Net (MRC-Holland) 프로그램으로 분석하여 probe peak ratio 값을 구하여 반복 또는 결실 여부를 확인하였다.

5. 생물정보학적 분석

Ion S5 sequencer에서 생성된 FASTQ 파일은 Torrent Suite

software ver. 5.16.1 (Thermo Fisher Scientific) 및 Torrent Variant caller (Thermo Fisher Scientific) 프로그램을 통해 base calling과 alignment를 시행하였다. Annotation은 Ion Reporter Software (Thermo Fisher Scientific) 내의 KRGDB Hereditary ver. 5.16 pipeline을 이용하였다. Reference genome sequence는 human genome build 19를 바탕으로 하였다. 유전성 암 유전자 패널에서 annotation 과정을 거친 변이들 및 MLPA 결과는 American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and Association of Molecular Pathology의 2015년 가이드라인에 따라 "pathogenic" (PV), "likely pathogenic" (LPV), "uncertain significance" (VUS), "likely benign", "benign"의 다섯 가지 카테고리로 분류되었고 [10], PV, LPV, VUS가 있는 경우에만 결과를 보고하였다. ACMG 가이드라인에 따른 분류를 위해 Clinvar (ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/) 사이트의 변이 분류결과와 QIAGEN Clinical Insight (QIAGEN) 프로그램의 변이 분류결과를 사용하였다.

결과

총 120명의 검사 대상자 중 난소암 환자는 109명, 자궁내막암은 4명, 대장암은 1명, 직장암은 1명이었다. 나머지 5명은 두 가지 암을 진단받은 환자들로, 자궁내막암과 대장암이 2명, 자궁내막암과 직장암이 1명, 난소암과 위암, 그리고 난소암과 폐암이 각각 1명씩이었다. 대상 환자들의 성별은 여성이 118명으로 대부분이었으며 남성이 2명이었다. 전체 나이 평균은 58세(범위, 32–91세)였고 여성 환자의 평균 나이는 58세(범위, 32–91세), 남성 환자의 평균 나이는 44세(범위, 32–55세)였다.

120명의 환자들을 대상으로 유전성 암 유전자 패널 및 MLPA를 시행한 결과, PV를 가진 환자는 3명, LPV는 1명, VUS는 83명이었으며, PV와 VUS를 동시에 가진 환자는 13명, LPV와 VUS를 가진 환자는 1명, PV, LPV, VUS가 모두 발견되지 않은 환자는 19명이었다.

PV 또는 LPV를 가진 환자는 총 18명으로 변이가 발견된 유전자는 *MSH2*가 6명으로 가장 많았으며 *RAD51D*가 4명, *BRCA1*이 3명, *BRCA2*가 2명, *MSH6*, *MLH1*, *CFTR*이 각 1명씩이었다. PV 또는 LPV를 가진 환자 중 난소암이 13명, 대장암이 1명, 자궁내막암이 1명, 자궁내막암과 대장암이 동시에 있는 환자가 2명, 자궁내막암과 직장암이 동시에 있는 환자가 1명이었다.

MMR 관련 유전자에서 PV가 나온 환자들을 살펴봤을 때, *MSH2* 유전자에서 PV가 발견된 6명 중 4명이 자궁내막암을 진단받은 환자였으며 나머지 2명은 각각 난소암, 대장암 환자였다. 6종류의 *MSH2*의 PV 중 3가지 변이는 MLPA 검사를 통해 엑손 단위의 결실이 발견된 경우였다(Fig. 1). *MLH1*과 *MSH6* 유전자에서 PV를 가진 환자는 각각 1명으로 모두 난소암이었으며 *MLH1*에

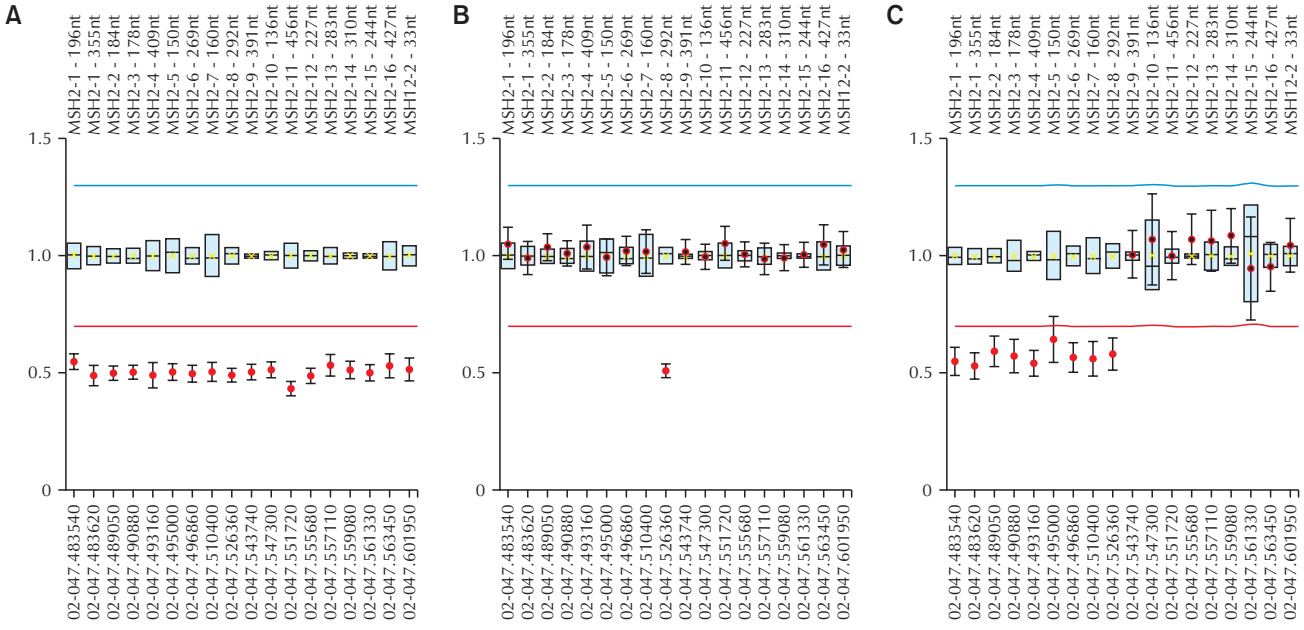

Fig. 1. Multiplex ligation-dependent probe amplification results of samples with mutS homologue 2 (*MSH2*) copy number variations in bar chart generated via Coffalyser.Net. Exons with reduced peak ratio are presented by dots. (A) Sample of patient no. 74 with deletion of whole exons of *MSH2*. (B) Sample of patient no. 89 with deletion of exon 8. (C) Sample of patient no. 91 with deletion of exon 1–8.

Table 1. Pathogenic variants found in *MLH1*, *MSH2*, and *MSH6* genes in patients with Lynch syndrome-related cancer

Patient no.	Gene	Nucleotide change	AA change	Variant type
6	*MLH1*	c.1684del	p.Gln562Argfs*	Frameshift
20	*MSH6*	c.2731C>T	p.Arg911*	Nonsense
44	*MSH2*	c.187del	p.Val63*	Nonsense
72	*MSH2*	c.1867_1870del	p.Ala623fs*	Frameshift
73	*MSH2*	c.187del	p.Val63*	Nonsense
74	*MSH2*	Whole gene deletion	-	Deletion
89	*MSH2*	Exon 8 deletion	-	Deletion
91	*MSH2*	Exon 1–8 deletion	-	Deletion

Abbreviations: *MLH1*, mutL homologue 1; *MSH2*, mutS homologue 2; *MSH6*, mutS homologue 6; AA, amino acid.

서 발견된 PV는 틀이동변이였고 *MH6*에서 발견된 PV는 무의미변이였다(Table 1). MLPA를 통한 *MHL1*, *MSH6* 유전자의 결실 및 중복은 발견되지 않았다.

고찰

린치 증후군의 진단이 중요한 이유는 변이가 있는 환자 및 환자의 가족에 대해 대장암뿐만 아니라 타장기암에 대한 고위험군을 찾아내어 정기검진과 같은 암의 조기 발견을 위한 적극적인 의료적 접근을 하기 위함이다. 여성의 경우에는 자궁내막암으로 가장 흔하게 발병하고[4], 그 외 다른 장기에도 암이 발생할 수 있으므로 이른 나이의 암 발병 또는 린치 증후군 관련 암 발생의 가족력이 있을 경우에는 정확한 진단을 통해 유전성 암의 여부를 확인해야 한다.

린치 증후군의 평가는 임상적 표현형 및 종양의 병리학적 소견과 유전적 검사로 이루어진다. 암스테르담 진단기준 I, II와 수정된 베데스다 진단기준이 린치 증후군의 임상지침으로 사용되고 있으나[2], 린치 증후군이 있는 50% 이상의 환자를 놓칠 수 있다는 보고가 있다[11]. 이에 대장암 환자에게서 수행하는 MSI 검사와 MMR 단백질의 발현 여부를 평가하는 면역조직화학검사가 비용과 효율 측면에서 비교적 효과적인 린치 증후군의 선별검사로 사용되고 있으며 MSI 검사에서 검사 패널에 포함된 5개의 현미부수체 중 두 개 이상의 현미부수체의 불안정성을 보이는 MSI-H (high)일 때 또는 면역조직화학검사에서 특정 단백질이 염색이 되지 않을 경우, 린치 증후군을 진단할 수 있는 유전학적 검사를 선택할 때 중요한 고려 대상이 될 수 있다[6]. 그러나 이러한 결과들은 특정 유전자의 병적 변이를 유추할 수 있는 정도의 정보이며 정확한 원인 파악을 위해서는 유전자 검사로 생식세포 돌연변이 여부를 확인해야 한다.

NGS의 기술적 발전으로 린치 증후군 관련 유전자뿐만 아니라 많은 유전성 암 관련 유전자의 돌연변이를 한 번의 검사로 검출이 가능해졌다. 린치 증후군에서 발견되는 주요한 돌연변이들은 SNV로 현재의 NGS platform에서는 대부분 검출이 가능할 것으로 보이나 본 연구에서와 같이 *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* 및 *PMS2* 유전자에서 CNV도 병적 변이로 보고가 되고 있기 때문에 SNV와 CNV를 모두 검출할 수 있는 검사방법이 필요하다. Read depth, paired-end mapping, split read, *de novo* assembly of a genome, 상기 방법을 조합하는 등 여러 방식으로 NGS를 이용한 CNV의 검출방법이 있으나[12], NGS 검사 자체의 내부적, 외부적 요인으로 인해 CNV 검출 여부의 확진검사로 사용하기에 제한점이 있다. 이에 MLPA는 CNV 확진검사로서 가장 우선적으로 고려해야 할 검사방법이다.

본 연구의 결과에서 병적 변이가 있는 18명의 환자 중 6명이 *MSH2*에서 변이가 발견되었고, 그 중 50%가 CNV로 인한 생식세포 돌연변이였다. 이 비율은 *MSH2*에서 보고된 병적 돌연변이 중 CNV가 차지하는 비율보다 더 높은 비율로 나타났으므로 린치 증후군을 확진하기 위해서 MLPA 검사가 반드시 필요하다는 것을 시사한다. 실제로 한 보고에서는 임상적으로 린치 증후군의 증상을 보이면서 MSI-H 소견을 보이는 환자들 중 약 50% 정도에서 주요 MMR 관련 유전자 변이 검출이 되지 않았다는 내용을 발표하면서 린치 증후군에서 CNV 검출의 중요성에 대해 강조하였다[13]. 린치 증후군이 강하게 의심되는 환자군에서 SNV 검출 위주의 NGS 검사 후에도 병적 변이가 없을 경우, MMR 관련 유전자의 CNV를 검출하는 검사법을 사용하지 않으면 많은 수의 린치 증후군 환자를 놓칠 수 있다. 특히 CNV 변이의 비율이 높은 *MSH2* 유전자는 반드시 MLPA 검사에 포함시켜 결실 및 중복 여부를 확인해야 한다. Table 1에서 제시된 91번 환자의 경우, MLPA kit 중 *MSH2* 유전자 선별용 검사인 P003-D1의 결과에서 *MSH2* 유전자뿐 아

니라 *MSH2* 유전자의 앞 부분(upstream)에 위치한 *EPCAM* 유전자의 결실도 같이 관찰되었다. 해당 환자에서는 *EPCAM* 유전자가 *MSH2* 유전자와 함께 결실되었으나 MMR 관련 유전자에 변이가 없더라도 *EPCAM* 유전자에 결실이 있다면 *MSH2* 프로모터 부위의 과메틸화(hypermethylation)으로 인한 *MSH2* 발현 억제가 나타나 린치 증후군이 나타날 수 있다[8]. 그러므로 *MSH2* 유전자에 대한 MLPA를 분석할 때는 위치가 근접한 *EPCAM* 유전자의 결실 여부도 확인할 필요성이 있다. 또한 본 연구에서 *MLH1*과 *MSH6* 유전자의 CNV는 발견되지 않았지만 다른 관련 유전자의 병적 변이가 검출되지 않았을 때는 해당 유전자의 CNV 여부도 중요한 고려 대상이다. MLPA는 기존의 염기서열분석 방법과는 별도로 시행해야 된다는 번거로운 점이 있지만 NGS의 CNV 검출 성능이 더 개선될 때까지 NGS와 함께 시행하는 것을 적극적으로 고려해야 한다.

린치 증후군 의심 환자들은 앞서 기술한 임상 표현형 및 병리학적 선별검사를 통해 고위험군을 선정하여 유전자검사를 시행하는 과정을 거쳐야 한다. 본 연구에서는 난소암 환자의 수가 많아 암 스테르담 진단기준 I, II와 수정된 베데스다 진단기준 및 MSI 검사와 면역조직화학검사를 적용하지 못하였다는 한계점이 있다. 또한 *PMS2* 유전자에서 발생하는 CNV는 long range PCR이 불가하였으므로 분석에서 제외하였다.

결론적으로, 린치 증후군 의심 환자군에서 진단을 위한 유전학 검사를 할 때, SNV 검출 검사뿐 아니라 반드시 CNV 검출을 포함하는 MLPA 검사를 시행하여 린치 증후군의 병적 변이의 상당 부분을 차지하는 CNV를 배제할 수 있어야 한다. 특히 보고된 병적 변이 중 CNV의 비율이 높은 *MSH2* 유전자는 MLPA 검사 시에 반드시 포함하고 NGS에서 음성이 나온 환자들은 우선적으로 MLPA를 고려하여 진단을 통한 조기 검진과 치료를 놓치는 사례가 없도록 해야 할 것이다.

감사의 글

도움을 주신 대구동산병원 이재희 선생님께 감사의 뜻을 표한다.

ORCID

Do-Hoon Kim https://orcid.org/0000-0002-9854-7850

REFERENCES

1. Sehgal R, Sheahan K, O'Connell PR, Hanly AM, Martin ST, Winter DC. Lynch syndrome: an updated review. Genes (Basel) 2014;5:497-507.
2. Sobocinska J, Kolenda T, Teresiak A, Badziąg-Lesniak N, Kopczynska M, Guglas K, et al. Diagnostics of mutations in MMR/EPCAM genes and their role in the treatment and care of patients with Lynch syndrome. Diagnostics (Basel) 2020;10:786.
3. Silva FC, Valentin MD, Ferreira Fde O, Carraro DM, Rossi BM. Mismatch repair genes in Lynch syndrome: a review. Sao Paulo Med J 2009;127:46-51.
4. Steinke V, Engel C, Buttner R, Schackert HK, Schmiegel WH, Propping P. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)/Lynch syndrome. Dtsch Arztebl Int 2013;110:32-8.
5. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. Gastroenterology 2010;138:2044-58.
6. Lynch HT, Snyder CL, Shaw TG, Heinen CD, Hitchins MP. Milestones of Lynch syndrome: 1895-2015. Nat Rev Cancer 2015;15:181-94.
7. Fu L, Sheng JQ, Li XO, Jin P, Mu H, Han M, et al. Mismatch repair gene mutation analysis and colonoscopy surveillance in Chinese Lynch syndrome families. Cell Oncol (Dordr) 2013;36:225-31.
8. Niessen RC, Hofstra RM, Westers H, Ligtenberg MJ, Kooi K, Jager PO, et al. Germline hypermethylation of MLH1 and EPCAM deletions are a frequent cause of Lynch syndrome. Genes Chromosomes Cancer 2009;48:737-44.
9. Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA. GeneReviews: Lynch syndrome. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1211/ (Assessed February 4, 2021).
10. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of

sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med 2015;17:405-24.

11. Adar T, Rodgers LH, Shannon KM, Yoshida M, Ma T, Mattia A, et al. Universal screening of both endometrial and colon cancers increases the detection of Lynch syndrome. Cancer 2018;124:3145-53.
12. Zhao M, Wang Q, Wang Q, Jia P, Zhao Z. Computational tools for copy number variation (CNV) detection using next-generation sequencing data: features and perspectives. BMC Bioinformatics 2013;14(Suppl 11):S1.
13. Masson AL, Talseth-Palmer BA, Evans TJ, Grice DM, Duesing K, Hannan GN, et al. Copy number variation in hereditary non-polyposis colorectal cancer. Genes (Basel) 2013;4:536-55.