Clinical Study of Non-Invasive Prenatal Testing Using Next-Generation Sequencing

Dong Hee Seo^{1,2}, Dae-Yeon Cho¹, Jihun Kim¹, So Young Kim², Sung Eun Cho², and Mijin Oh¹

¹LabGenomics Clinical Research Institute and

²LabGenomics Clinical Laboratories, Seongnam, Korea

Corresponding author:

Dong Hee Seo

LabGenomics Clinical Research Institute, 700 Daewangpangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam 13488, Korea

Tel: +82-31-628-0730

Fax: +82-31-628-0701

E-mail: seo2023@nate.com

pISSN: 2384-2458

eISSN: 2288-7261

Background: Serological prenatal screening tests are widely used to detect fetal chromosomal abnormalities such as Down and Edward syndromes. After determining the presence of fetal cell-free DNA in maternal blood, the non-invasive prenatal test (NIPT) coupled with next-generation sequencing has been performed in other countries, therefore, we developed a domestic NIPT technology.

Methods: The results of genomics-based NIPT performed between April and May, 2015 were analyzed. Maternal blood samples were collected in a specific Cell-Free DNA BCT tube. The samples were then massively sequenced using MiSeq and NextSeq 500 (Illumina Inc., USA) using LabGenomics laboratory-developed libraries. Chromosomal abnormalities were analyzed using a bioinformatics algorithm.

Results: A total of 464 cases were analyzed. The samples of 12 subjects had to be collected again because of a low fetal DNA fraction in the initially obtained samples. Among the 456 cases for which fetal genome results were obtained, 436 had a low risk of trisomy, 12 had a high risk for Down syndrome, two had a high risk for Edward syndrome, and four had sex chromosomal aneuploidy, showing that the positive percentage of chromosomal abnormalities was 4.4%. All 12 cases with high risk for Down syndrome were confirmed as having trisomy 21 by amniocentesis.

Conclusions: Our laboratory-developed genomics-based NIPT showed high positive predictive value, therefore, NIPT may be replaced by our own developed method.

(J Lab Med Qual Assur 2015;37:214-218)

Key Words: Non-invasive prenatal test, Trisomy, Cell-free DNA, Fetal DNA fraction

서론

산모의 혈청 생화학적 표지자와 태아의 목덜미투명대(nuchal translucency) 초음파검사를 이용해 다운증후군, 에드워드 증후군 등 태아의 염색체 이상 유무를 알기 위한 산전선별검사가 국내에서 널리 이용되고 있다[1]. 혈청검사로는 임신 초기 pregnancy associated plasma protein A와 β -human chorionic gonadotropin (hCG)를 보는 이중표지자검사, 임신 중기 알파태아단백(alpha-fetoprotein [AFP]), hCG, unconjugated estriol을 보는 삼중검사, 삼중검사에 inhibin A

를 추가한 사중검사(quad test), 그리고 최근에는 통합선별검사(integrated screening test)가 비침습적 산전선별검사(non-invasive prenatal test, NIPT)로 사용되고 있다[2,3]. 이들 산전선별검사서 양성을 보이는 경우 양수천자 또는 융모막 천자를 통해 염색체검사로 태아의 염색체 이상 여부를 확인하고 있다. 하지만 혈청선별검사는 위양성률이 높다는 단점이 있고, 양수천자는 침습적 시술로 인한 산모의 높은 심리적 부담, 태아 소실 등의 문제점이 있다. 이에 최근에 산모의 혈액에 존재하는 태아의 유리 핵산(cell free DNA)으로 산전진단을 하는 소위 유전체 기반 비침습적 산전검사(genomics-based

noninvasive prenatal testing)가 소개되었다[4]. 유전체 기반 NIPT는 기존 혈청 산전 선별검사들에 비해 위양성률이 낮고 산모의 말초혈액을 이용하는 검사이기 때문에 안전하다는 장점이 있다.

산모혈액 내의 태아 유리 핵산을 이용한 유전학적 검사는 1997년 Lo 등[5]에 의해 처음으로 성공하였다. 이후 유전자 분석기법의 발달로 차세대 염기서열분석법을 이용한 NIPT가 가능하게 되어 현재 Sequenom, Verinata Health, Ariosa Diagnostics, Natera 등의 유전체 분석 회사들에 의해 상업화된 서비스가 제공되고 있다[6,7]. 유전체 기반 NIPT는 대용량염기서열분석(massively parallel sequencing)법으로 산모 및 태아 유래의 DNA 분절을 증폭하여 전산화된 생물정보학(bioinformatics)을 이용하여 해당 염색체의 상대적인 발현량을 통계적으로 분석한다[8]. 유전체 기반 NIPT가 신의료기술 행위이기 때문에 국내에서는 아직까지 임상검사로써 시행되지 못하고 있으며, 국외 유전체 분석회사에 의뢰하고 있다[9]. 이에 랩지노믹스 의학연구소에서는 자체 기술로 유전체 기반 NIPT를 개발하여 임상시험을 진행하였으며[10], 의료기관을 방문한 산모의 동의를 구하여 연구용으로 검사를 시행하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

2015년 4월부터 5월까지 본 의학연구소에 의뢰된 464건의 유전체 기반 NIPT 결과를 분석하였다. 본 유전자검사에 동의한 산모의 혈액은 전용용기인 Streck (Omaha, NE, USA)사의 Cell-Free DNA BCT 튜브에 채혈되어 본 의학연구소에 운송된 후, 혈장 2 mL을 사용하여 핵산이 추출되었다. 자체 개발한 검사 프로토콜을 이용하여 MiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA, USA)과 NextSeq 500 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) 기기로 전체 유전체에 대용량염기서열검사를 시행한 후, 생물정보학 알고리즘을 이용하여 태아의 염색체 이상을 분석하였다. 21번, 18번, 13번 염색체의 상대적인 비율을 계산하여 Z-점수를 이용하여 위험도를 평가하였다[10]. 염색체 이상의 확인검사로써 해당 산모로부터 양수를 채취하여 염색체 분석검사를 시행하였다. 본 연구는 기관생명윤리위원회로부터 2013년 7월에 연구승인을 받았으며(R-2013-03), 검사기술을 개발한 후에 2015년 4월에 산모의 동의를 얻어 검사를 진행하였다. 유전체 기반 NIPT를 위한 혈액채혈 시 산모의 임신주수는 10주부터 24주까지 분포하였고, 10주가 18명, 11주 31명, 12주 95명, 13주 33명, 14주 8명, 15주 24명, 16주 77명, 17주 105명, 18주 33명, 19주 10명, 20주 이상이 13명, 임

신주수를 알 수 없는 경우가 18명이었다.

결과

총 464건의 유전체 기반 NIPT 의뢰건 중에서 12건은 산모 혈액 내 태아 분획(fetal fraction)이 낮아서 재검을 위해 재채혈이 요구되었다. 재검이 시행된 12건 중 11건은 삼배수체(trisomy) 저위험군으로 결과가 나왔고, 한 건은 검사결과를 얻지 못했다. 464건의 검사 의뢰건 중 7건은 용혈 등으로 재검이 요구되었으나, 의뢰측에서 검사 진행을 원하지 않아 검사가 취소되었다.

검사결과를 얻지 못한 8건을 제외하고, 태아 유전체의 NIPT 분석결과가 나온 456건의 검사 중 436건(95.6%)은 염색체 삼배수체 저위험군으로, 12건(2.7%)은 다운증후군 고위험군, 2건(0.4%)은 다운증후군 중위험군, 2건(0.4%)은 에드워드스증후군 고위험군, 4건(0.9%)은 성염색체 이상으로 양성을 보여 검사의 양성률은 4.4%였다. 성염색체 이상은 XO 터너증후군이 2건, 그리고 XXY, XXX 증후군이 각 한 건이었다.

유전체 기반 NIPT에서 다운증후군 고위험군을 보인 12건 모두, 양수검사를 통해 21번 염색체의 삼배수체가 확인되었다. 따라서 본 의학연구소에서 개발한 유전체 기반 NIPT의 양성예측률(positive predictive value)은 다운증후군 고위험군을 기준으로 했을 때 100%를 보였다. 다운증후군 중위험군을 보인 2건에서는 양수 염색체 검사상 1건은 다운증후군을, 1건을 정상 소견을 보였다. 유전체검사에서 성염색체 이상으로 터너증후군을 보인 1건에서는 양수검사를 통해 터너증후군 염색체 이상이 확인되었으며, 나머지 3건에서는 양수결과를 확인할 수 없었다. 유전체 기반 NIPT에서 저위험군을 보인 산모의 분만 시 이상은 확인할 수 없었다(Table 1).

Table 1. Results of non-invasive prenatal test tested by next-generation sequencing and amniocentesis

Category	No. of cases	Confirmation by amniocentesis		
		Positive	Negative	Not available
Low-risk	436			436
Middle-risk	2 of trisomy 21	1	1	
	12 of trisomy 21	12	0	
High-risk	2 of trisomy 18			2
	4 of sex chromosome aneuploidy	1		3

고찰

산모 혈액 속의 태아 유리 DNA는 약 150 bp 길이의 짧은 핵산 분절로 태반에서 유래한다. 태아 유리 DNA는 산모 혈액 내의 전체 유리 DNA의 약 10%를 차지하며, 임신 4주째부터 산모의 혈액에 나타나기 시작하여, 임신 10주에는 약 4%를 차지한다[11]. 태아 유리 DNA는 분만 후 2시간 이후에는 검출되지 않는다[12]. 산모 혈액 내의 약 10%의 태아 유리 DNA에서 1.5배 증가한 삼배수체를 확인하는 데에 통상적인 유전자증폭검사로서는 어려움이 있었고, 차세대염기서열분석법이 가능해지면서 이를 이용한 유전체 기반 NIPT 산전검사가 현실화되었다. 국내에서는 2011년에 Yang 등[13]이 처음으로 산모혈액 내의 태아 유리핵산에 대해 SRY 유전자, Rh D 유전자검사를 시행한 연구가 보고되어 있다.

다운증후군 등 태아의 염색체 이상의 위험도를 파악하기 위한 노력이 1980년 중반까지는 산모의 나이나 가족력을 고려하여 양수천자를 통한 침습적 염색체 검사로 주로 시행되었다. 1984년 Merkatz 등[14]이 다운증후군 산모에서 AFP이 감소되어 있다는 것을 보고한 이후로 모든 연령의 산모에서 혈청학적 표지자를 이용한 비침습적 산전선별검사가 시행되고 있다. 유전체 기반 NIPT가 검사 민감도가 높고 위양성률이 낮지만 미국산부인과학회에서는 35세 이상 산모, 혈청학적 선별검사 양성, 삼배수체 이상의 과거력을 가진 산모 등 고위험군 산모에서 산전선별검사로 사용할 것을 권장하고 있다[15]. 미국에서는 양수천자의 비용이 유전체 기반 NIPT 산전검사 비용보다 많이 높아서 고위험군 산모에서 유전체 기반 NIPT 산전검사법 적용이 확산되고 있지만 국내에서는 그 반대의 상황이라서 아직 활성화되고 있지 않다. 유전체 기반 NIPT 검사가 의뢰되는 경향을 보면 해외에 의뢰하는 경우에는 검사 비용의 부담으로 인해 의뢰건수가 월 30건 미만으로 일정 수준을 유지하였지만[9], 국내에서 시행했을 때는 의뢰 건이 약 두 달 만에 400건 이상이 본 의학연구소에 의뢰되었다. 유전체기반 NIPT 산전검사의 검사 정확도가 높기 때문에 저위험군 산모에서의 연구결과가 축적되면 태아의 삼배수체 이상이 의심되는 경우 양수검사를 대체할 수 있다는 전망도 있다.

본 의학연구소에 의뢰된 456건의 유전체 기반 NIPT 검사 중 20건이 검사 양성을 보여 4.4%의 검사 양성률을 보였다. Han 등[16]에 의하면 국내 임신 중기 양수천자의 염색체 이상이 3.1%로 보고되어 있으며, 본 연구의 NIPT 검사 양성률도 이와 비슷한 수준을 보였다. 본 연구에서는 NIPT 검사 양성인 경우 양수천자 결과를 확인하였는데, 다운증후군 고위험군의 경우 양수 염색체 검사에서 모두 21번 삼배수체가 확인되었

다. 에드워드증후군 양성 2건의 경우는 양수 천자는 시행되지 않았지만, 초음파검사상 에드워드증후군이 의심되어 NIPT를 시행한 경우여서 검사양성의 결과를 어느 정도 신뢰할 수 있었다. 외국에서도 NIPT의 양성 예측률이 높은 것으로 보고되어 있는데, Bianchi 등[17]은 1,914명의 산모를 대상으로 한 연구에서 다운증후군에 대한 혈청학적 선별검사의 양성 예측률이 4.2%인데 반해 유전체 기반 NIPT의 경우 45.5%였다고 보고하고 있다. 본 연구에서는 중위험군 이상의 다운증후군 양성을 기준으로 하면 검사의 양성 예측률은 92.9% (13/14건)를 보였다.

본 의학연구소에 의뢰된 8 건(1.7%)에 대해서는 유전체 기반 NIPT 결과를 얻지 못했다. 이는 검체 혈액 내 fetal fraction이 낮아서 검사에 실패한 것으로 추정되며, 유전체 기반 NIPT 산전검사의 검사 실패율은 1-5%로 보고되어 있다[11]. 저위험군을 보인 산모의 분만 시 결과는 추적할 수 없었지만, 검사를 시행한 대상자로부터 본 의학연구소에 태아 이상 소견이 아직 접수되지 않고 있어서 검사의 위음성률은 낮을 것으로 기대된다.

본 의학연구소에서 개발한 유전체 기반 NIPT 산전검사를 우리는 Momguard 검사로 명명하였다. Momguard 검사는 자체 개발한 유전체 정보 분석 자동화/최적화 플랫폼인 GeneBro 플랫폼을 이용하여 검사가 진행된다. 결과 정확도에 결정적인 영향을 미치는 유리 DNA 분획 결정에서 산모의 임신주수, 상염색체, 성염색체의 상대비율 및 성 특이 유전자(sex specific gene) 등의 정보와 다양한 시뮬레이션을 통해 산출된 실험적 보정계수를 반영하는 고유의 앙상블 알고리즘(ensemble algorithm)을 적용하여 정확한 검사결과를 제공한다. 또한 임상시험을 거쳐 확보한 통계치와 분포를 이용하여 표준점수를 계산하고, 임계치 이상의 결과를 판정한다. 미국 아리오사의 Harmony 검사는 표적 유전체 염기서열분석법과 fetal-fraction optimized risk of trisomy evaluation (FORTE) 생물정보학 알고리즘을 사용한다. FORTE 알고리즘은 태아 염색체를 이배수체로 가정하는 모델과 태아 염색체를 삼배수체로 가정하는 모델의 교차비(odds ratio)를 이용하여 삼배수체 위험도를 산출하는 통계 알고리즘으로 검사의 분석 정확도를 향상시키는 것으로 보고되어 있다[18].

유전체 기반 NIPT 산전검사는 태아의 개방성 신경관 결손 등의 위험도를 알 수 없기 때문에 현재 널리 사용되고 있는 사중검사 등 혈청학적 산전선별검사로 지속적으로 필요하다고 본다. 또한 태아 염색체의 수적인 이상 이외의 구조적인 이상 등은 검출할 수 없는 한계를 가지고 있어서 양수천자를 통한 염색체 검사의 필요성은 여전히 존재한다[10]. 다만 태아의 삼배수체 이상이 예상되는 상황에서 산모가 양수천자를 두

려워하는 경우 등에서 양수천자를 시행하기 전에 비침습적으로 한 번 더 선별할 수 있는 검사로 유전체 기반 NIPT를 이용할 수 있을 것이다. 유전체 기반 NIPT가 저위험군 결과를 보이면 염색체 이수성 확인을 위해 양수검사를 추가적으로 시행할 필요는 없다고 본다. 양수검사를 이렇게 유전체 기반 NIPT 산전검사로 추가적으로 염색체 이수성을 선별을 하게 되면 위 양성률이 높은 혈청학적 선별검사 양성으로 인해 양수천자를 시행하는 경우를 줄일 수 있을 것이다. 벨기에와 네덜란드에서는 2013년 4월에 유전체 기반 NIPT 산전검사가 도입된 후 2013년 12월까지 3,000예의 미국 아리조나의 NIPT검사인 Harmony 검사가 시행되었다고 한다[19]. 유전체 기반 NIPT 산전검사가 신의료기술로 인정받아 국내에서 일상적인 검사로 시행된다면 검사 건수가 증가할 것으로 예상되며 이로 인해 침습적인 양수천자 시술 경우가 줄어들 것으로 기대된다. 결론적으로 본 의학연구소에서 개발한 유전체 기반 NIPT는 높은 검사 양성예측률을 보여 해외로 의뢰되고 있는 NIPT를 대체할 수 있을 것으로 여겨진다.

REFERENCES

1. Hwang D. The recent trend of prenatal screening. *J Genet Med* 2008;5:7-14.
2. Kim S, Kim YH, Min WK. Prenatal serum marker screening in Korea: survey results. *Korean J Lab Med* 2007;27:28-33.
3. Yi DY, Jung B, Kang MS, Huh JY, Paek JY, Cha DH, et al. The evaluation of integrated test as an antenatal screening test for Down's syndrome in Korea. *Lab Med Online* 2011;1:10-8.
4. Morain S, Greene MF, Mello MM. A new era in non-invasive prenatal testing. *N Engl J Med* 2013;369:499-501.
5. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997;350:485-7.
6. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 2005;437:376-80.
7. Yang JI. Clinical application of non-invasive prenatal testing using cell free fetal DNA. *J Korean Med Assoc* 2014;57:771-9.
8. Lim JH, Park SY, Ryu HM. Non-invasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 21 using cell-free fetal DNA in maternal blood. *Obstet Gynecol Sci* 2013;56:58-66.
9. Seo DH, Cho SE, Kwak JR. An experience of using the Harmony test for genomics-based non-invasive prenatal testing. *J Lab Med Qual Assur* 2015;37:44-6.
10. Lee MY, Cho DY, Won HS, Hwang AR, Jeong B, Kim J, et al. Performance of Momguard, a new non-invasive prenatal testing protocol developed in Korea. *Obstet Gynecol Sci* 2015;58:340-5.
11. Gekas J, Langlois S, Ravitsky V, Audibert F, van den Berg DG, Haidar H, et al. Identification of trisomy 18, trisomy 13, and Down syndrome from maternal plasma. *Appl Clin Genet* 2014;7:127-31.
12. Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999;64:218-24.
13. Yang YH, Han SH, Lee KR. Noninvasive prenatal diagnosis using cell-free fetal DNA in maternal plasma: clinical applications. *J Genet Med* 2011;8:1-16.
14. Merkatz IR, Nitowsky HM, Macri JN, Johnson WE. An association between low maternal serum alpha-fetoprotein and fetal chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* 1984;148:886-94.
15. American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics. Committee Opinion No. 545: Noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy. *Obstet Gynecol* 2012;120:1532-4.
16. Han SH, An JW, Jeong GY, Yoon HR, Lee A, Yang YH, et al. Clinical and cytogenetic findings on 31,615 mid-trimester amniocenteses. *Korean J Lab Med* 2008;28:378-85.
17. Bianchi DW, Parker RL, Wentworth J, Madankumar R, Saffer C, Das AF, et al. DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. *N Engl J Med* 2014;370:799-808.
18. Sparks AB, Struble CA, Wang ET, Song K, Oliphant A. Noninvasive prenatal detection and selective analysis of cell-free DNA obtained from maternal blood: evaluation for trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol* 2012;206:319.e1-9.
19. Willems PJ, Dierickx H, Vandenakker E, Bekedam D, Segers N, Deboulle K, et al. The first 3,000 Non-Invasive Prenatal Tests (NIPT) with the Harmony test in Belgium and the Netherlands. *Facts Views Vis Obgyn* 2014;6:7-12.

차세대 염기서열분석법을 이용한 비침습적 산전검사 임상연구

서동희^{1,2} • 조대연¹ • 김지훈¹ • 김소영² • 조성은² • 오미진¹

¹랩지노믹스 의학연구소, ²랩지노믹스 임상검사센터

배경: 산전에 다운증후군, 에드워드스증후군 등 태아의 염색체 이상을 알기 위해 혈청학적 산전선별검사가 널리 사용되고 있다. 산모혈액 내 태아의 유리 유전체의 존재가 밝혀진 후 차세대 염기서열분석법을 이용한 비침습적 산전검사(non-invasive prenatal test, NIPT)가 국외에서 시행되고 있어서 국내 기술을 개발하였다.

방법: 2015년 4월부터 5월까지 랩지노믹스 의학연구소에 의뢰된 464건의 유전체 기반 NIPT 결과를 분석하였다. 산모의 혈액은 전용용기인 Streck (Omaha, USA)사의 Cell-Free DNA BCT 튜브에 채혈되었고, 자체 개발한 라이브러리를 이용하여 MiSeq과 NextSeq 500 (Illumina Inc., USA) 기기로 대용량염기서열검사를 시행한 후 생물정보학 알고리즘을 이용하여 태아의 염색체 이상을 분석하였다.

결과: 총 464건의 의뢰건 중에서 12건은 산모 혈액 내 태아 분획이 낮아서 재채혈이 요구되어 재검이 시행되었다. 태아 유전체 검사결과가 나온 456건의 검사 중 436건은 삼배수체 저위험군으로, 12건은 다운증후군 고위험군으로, 2건은 에드워드스증후군 고위험군, 4건은 성염색체 이상으로 양성을 보여 검사 양성률은 4.4%였다. 양수천자 확인검사에서 다운증후군 고위험군 12건 모두 21번 염색체의 삼배수체가 확인되었다.

결론: 본 의학연구소에서 개발된 유전체 기반 NIPT는 높은 검사 양성예측률을 보여 해외로 의뢰되고 있는 NIPT 검사를 대체할 수 있을 것으로 여겨진다.

(J Lab Med Qual Assur 2015;37:214-218)

교신저자: 서동희

우)13488 경기도 성남시 분당구 대왕판교로 700, 랩지노믹스 의학연구소

Tel: 031)628-0730, Fax: 031)628-0701, E-mail: seo2023@nate.com