

Colorectal Adenocarcinomas Harboring ALK Fusion Genes

**A Clinicopathologic and Molecular Genetic Study
of 12 Cases and Review of the Literature**

汇报人：郭媛媛

指导老师：闫庆国教授

2020. 10. 12

主要内容

- 研究背景
- 资料与方法
- 结果
- 讨论

研究背景一：结直肠癌与基因融合

- 1、结直肠癌是美国乃至全世界癌症相关死亡的主要原因，它是一种高度异质性的疾病，多基因表观遗传学在肿瘤的发生发展中起至关重要的作用。
- 2、大部分结直肠癌由癌基因或抑癌基因的突变引起，然而，一小部分以受体酪氨酸激酶（RTKs）基因的融合为特征。
- 3、RTK基因的3' 区域与5' 区域融合形成一个嵌合基因或癌基因，其具有酪氨酸激酶活性，能够诱导下游信号通路，从而促进肿瘤的发生。

研究背景二：结直肠癌与ALK基因

- 1、间变性淋巴瘤激酶(ALK) 编码的基因与酪氨酸激酶亚家族高度同源，其分子改变主要包括基因扩增、突变和多重融合。
- 2、目前有几种不同的ALK抑制剂已获批，并在ALK基因融合的癌症患者中显示出了疗效。
- 3、与此相关研究报道较少，本研究在大量的结直肠癌患者中筛选出12例ALK基因融合相关的结直肠腺癌，提供了一个全面的临床病理、免疫组织化学和分子遗传学等方面的评估。

资料与方法

一、研究资料

- 1、本研究来自欧洲（捷克共和国，芬兰，德国，意大利和芬兰）、日本和美国的8150个确诊的结直肠癌患者。样本来自多肿瘤组织芯片。
- 2、肿瘤分期和组织学分类依据美国癌症联合委员会TNM分期建议和世界卫生组织（WHO）消化系统肿瘤的分类并对肿瘤浸润淋巴细胞的密度进行评分。
- 3、所有病例均有治疗和随访数据，均接受手术治疗或辅助化疗，而未均经过络氨酸激酶抑制剂治疗。

二、研究方法

1. 免疫组织化学

MLH1、PMS2、MSH2和MSH6、CDX2、CK7、CK20、MUC2、p53、PD-L1、CD274

2. 荧光原位杂交

3. 核酸提取、MLH1启动子甲基化状态的评估

4. 高通量测序技术（NGS）

结 果

一、ALK免疫反应

- *分为弥漫型、局灶型、管腔型
- *12例ALK基因融合病例均为细胞质染色或膜染色，无细胞核染色。
- *无ALK融合、ALK重排和或ALK突变为局灶或管腔阳性表达。

TABLE 1. ALK Immunoreactivity in 12 CRCs Harboring ALK Fusion Genes

ALK Fusion Gene Transcript	No. Cases	ALK Immunoreactivity	
		Cytoplasmic	Membrane
CAD(e35)-ALK(e20)	1	Moderate to strong	Absent
DIAPH2(e17)-ALK(e20)	1	Weak	<u>Strong</u>
DIAPH2(e26)-ALK(e20)	1	Strong	Absent
EML4(e21)-ALK(e20)	1	Moderate to strong	Absent
EML4(e6)-ALK(e20)	1	Weak to moderate	<u>Variable</u>
LOC101929227(e2)-ALK(e10)	1	Weak	Absent
SLMAP(e14)-ALK(e20)	1	Moderate to strong*	Absent
SPTBN1(e7)-ALK(e20)	4	Weak	<u>Strong</u>
STRN(e3)-ALK(e20)	1	Moderate	Variable†

*Some cells with a dot-like perinuclear staining.

†Stronger on luminal side.

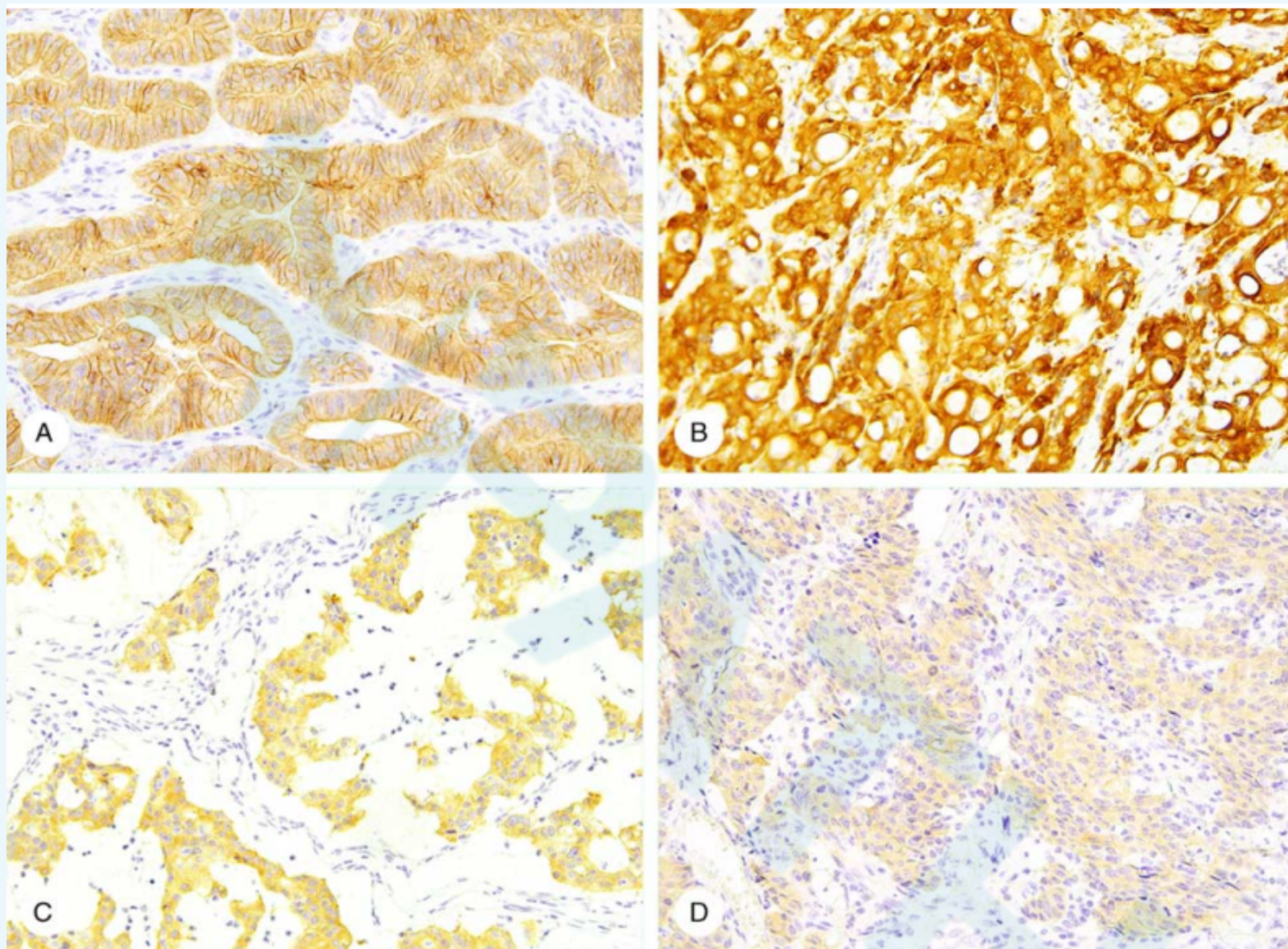


FIGURE 1. Example of diffuse ALK immunoreactivity in CRCs. Strong membrane staining for ALK in case 1 with a SPTBN1-ALK fusion (A); strong cytoplasmic ALK staining in case 6 with a DIAPH2-ALK fusion (B); moderate cytoplasmic ALK staining in case 8 with an EML4-ALK fusion (C); weak cytoplasmic ALK staining in case 9 with a LOC101929227-ALK fusion (D).

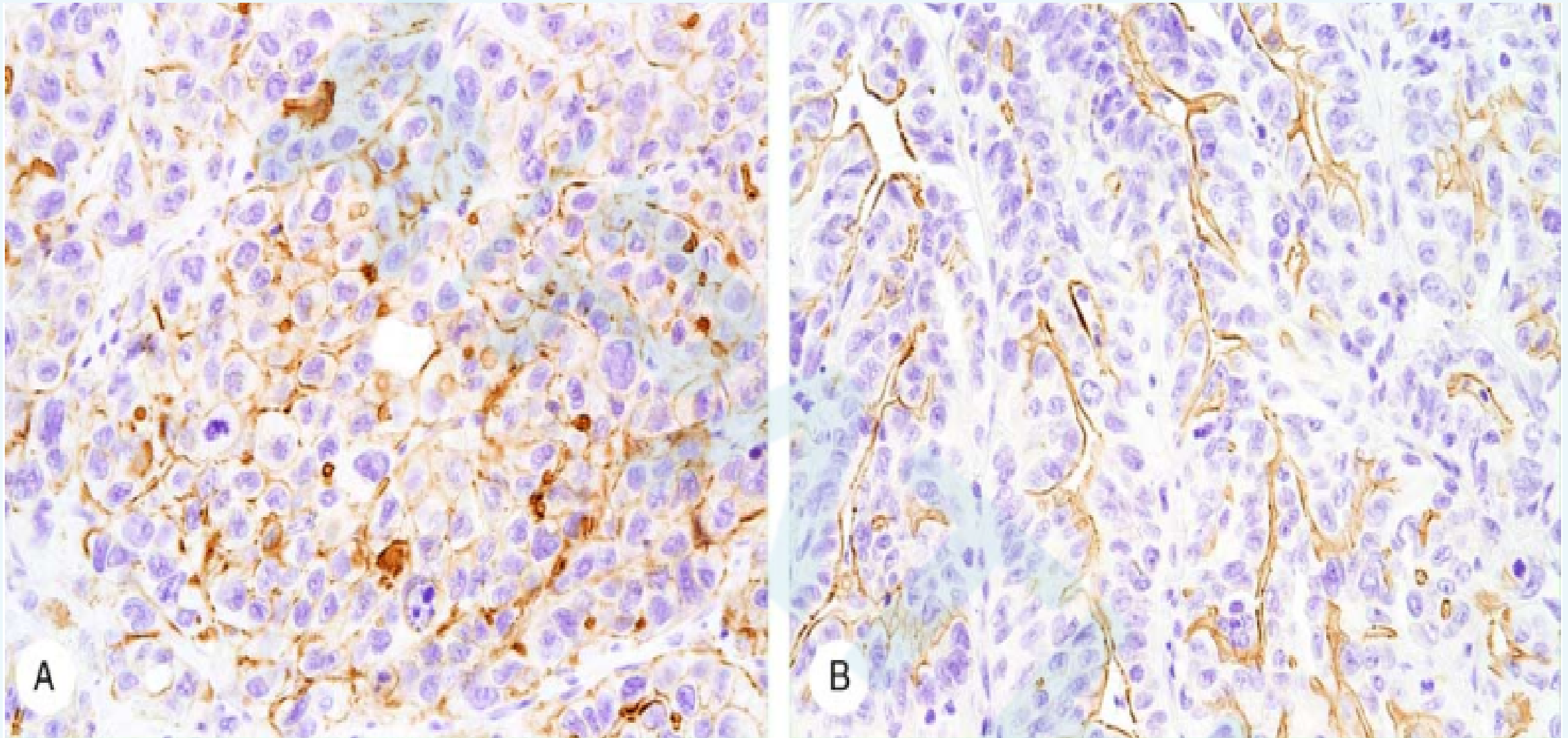


FIGURE 2. Example of focal (A) and luminal (B) ALK immunoreactivity in ALK fusion–negative colon carcinomas

二、**ALK**基因重排与融合

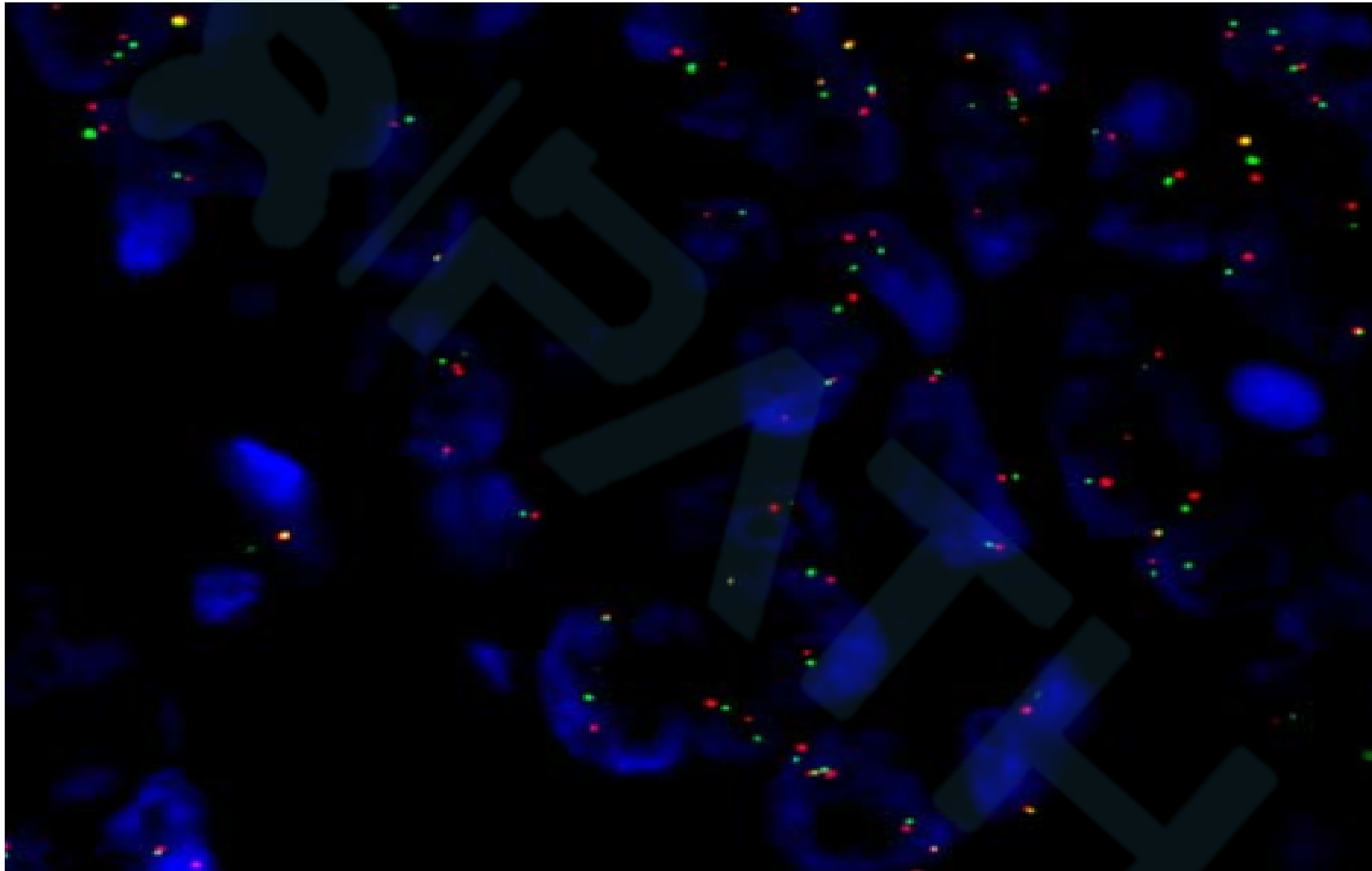


FIGURE 3. A dual-color FISH analysis performed on interphase nuclei using a break-apart ALK gene probe in CRC (case 9) harboring a LOC101929227-ALK fusion. A split of orange and green signals indicates an ALK rearrangement.

三、临床病理特征

TABLE 2. Clinical Characteristics of 12 CRCs Harboring *ALK* Fusion Genes

Case No.	Type of <i>ALK</i> Fusion	Age	Sex	Tumor Site	pTNM	Follow-up (mo)
1	SPTBN1(e7)- <i>ALK</i> (e20)	53	Male	Cecum	pT3N1aM0	ANED (30)*
2	SPTBN1(e7)- <i>ALK</i> (e20)	66	Female	Cecum	pT3N0M0	ANED (20)*
3	CAD(e35)- <i>ALK</i> (e20)	87	Female	Cecum	pT4bN1bM1a	DOD (1)*
4	SPTBN1(e7)- <i>ALK</i> (e20)	64	Female	Ascending colon	pT3N2M0	ANED (98)†
5	SLMAP(e14)- <i>ALK</i> (e20)	69	Male	Ascending colon	pT3aN1cM1c	DOD (8)†
6	DIAPH2(e26)- <i>ALK</i> (e20)	72	Female	Ascending colon	pT3N1bM0	DOD (34)*
7	SPTBN1(e7)- <i>ALK</i> (e20)	75	Female	Ascending colon	pT4aN2bM0	ANED (78)*
8	EML4(e21)- <i>ALK</i> (e20)	76	Male	Ascending colon	pT3N1M0	AWD (54)*
9	LOC101929227(e2)- <i>ALK</i> (e10)	77	Female	Ascending colon	pT3pN1aM0	DOD (12)*
10	DIAPH2(e17)- <i>ALK</i> (e20)	72	Female	Hepatic flexure	pT4aN2aM0	ANED (13)‡
11	STRN(e3)- <i>ALK</i> (e20)	65	Female	Splenic flexure	pT2N0M0	ANED (15)†
12	EML4(e6)- <i>ALK</i> (e20)	76	Female	Rectum	pT2N0M0	ANED (35)‡

*Adjuvant chemotherapy status unknown.

†Adjuvant chemotherapy.

‡No adjuvant chemotherapy.

ANED indicates alive, no evidence of disease; DOD, died of disease; NA, not available.

TABLE 3. Histopathologic Characteristics of 12 CRCs Harboring *ALK* Fusion Genes

Case No.	Type of <i>ALK</i> Fusion	Degree of Glandular Differentiation	Mucinous Component	Lymphovascular Invasion	TILs
1	SPTBN1(e7)- <i>ALK</i> (e20)	Moderate	No	Yes	Low
2	SPTBN1(e7)- <i>ALK</i> (e20)	Poor	No	Yes	High
3	CAD(e35)- <i>ALK</i> (e20)	Moderate	No	Yes	High
4	SPTBN1(e7)- <i>ALK</i> (e20)	Moderate	Yes	No	High
5	SLMAP(e14)- <i>ALK</i> (e20)	Moderate	No	Yes	High
6	DIAPH2(e26)- <i>ALK</i> (e20)	Poor	No	Yes	High
7	SPTBN1(e7)- <i>ALK</i> (e20)	Poor	Yes	Yes	High
8	EML4(e21)- <i>ALK</i> (e20)	Mucinous	Yes	No	Low
9	LOC101929227(e2)- <i>ALK</i> (e10)	Solid (medullary)	No	Yes	High
10	DIAPH2(e17)- <i>ALK</i> (e20)	Moderate	No	Yes	Low
11	STRN(e3)- <i>ALK</i> (e20)	Moderate	No	No	High
12	EML4(e6)- <i>ALK</i> (e20)	Solid (medullary)	No	No	High

四、组织学特征

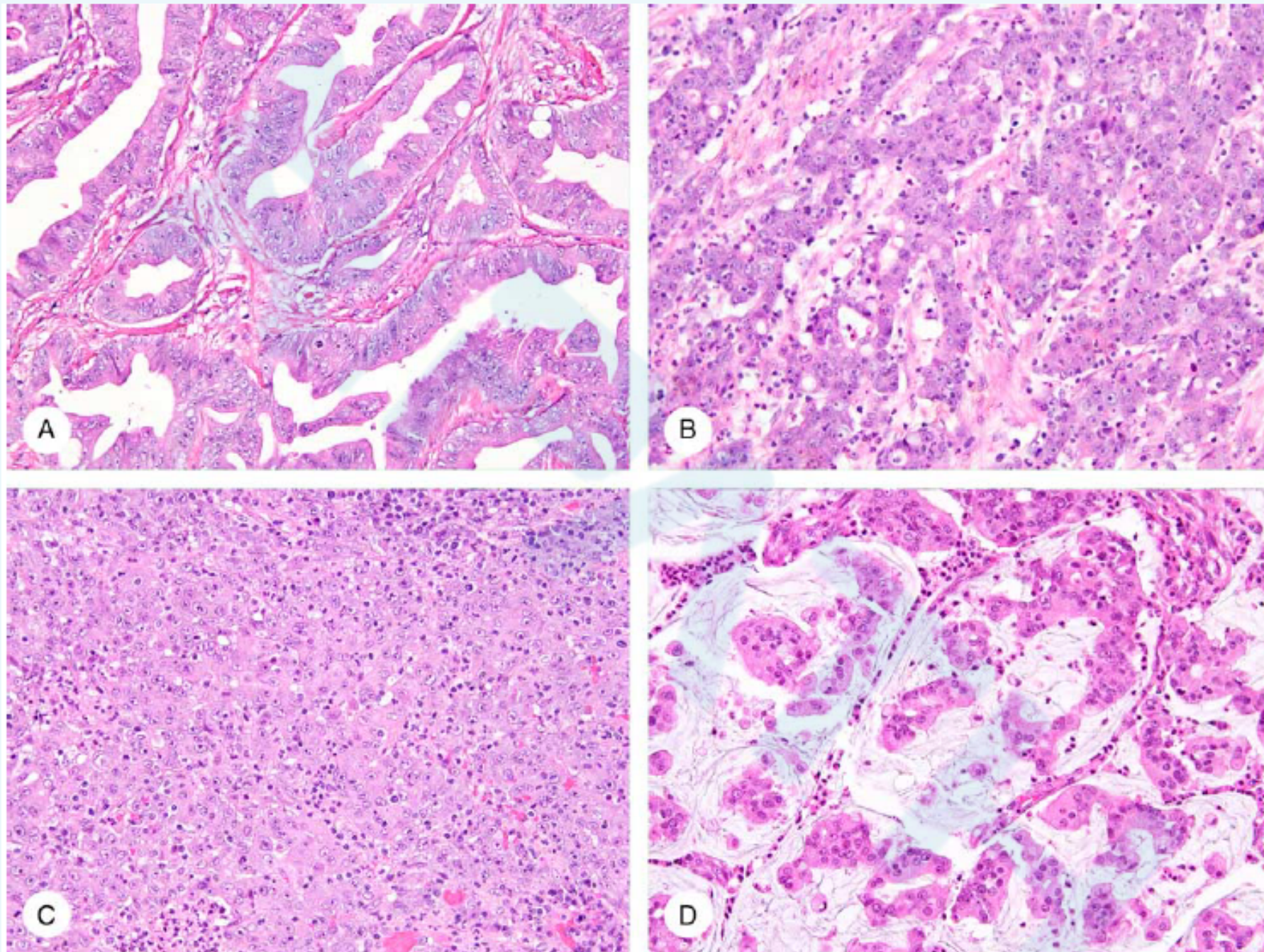


FIGURE 4. Histologic features of CRCs with diffuse ALK immunoreactivity. Case 1, moderately differentiated CRC harboring SPTBN1-ALK fusion (A); case 2, poorly differentiated CRC harboring SPTBN1-ALK fusion (B); case 12, medullary CRC harboring EML4-ALK fusion (C); case 8, mucinous tumor harboring EML4-ALK fusion (D).

五、MMR状态、 P53突变、 CDX2、 CK7、 CK20和 MUC2的表达以及 PD-L1表达

TABLE 4. MMR Status, p53 Alterations, CDX2, CK7, CK20, and MU

Case No.	ALK Fusion Partner Gene	MMR Status			
		MLH1	PMS2	MSH2	MSH6
1	SPTBN1	Retained	Retained	Loss	Retained
2	SPTBN1	Loss	Loss	Retained	Retained
3	CAD	Retained	Retained	Retained	Retained
4	SPTBN1	Loss	Loss	Retained	Retained
5	SLMAP	HLoss	Retained	Retained	Retained
6	DIAPH2	Loss	Loss	Retained	Retained
7	SPTBN1	Loss	Loss	Retained	Retained
8	EML4	Retained	Retained	Retained	Retained
9	LOC101929227	Loss	Loss	Retained	Retained
10	DIAPH2	HLoss	Retained	Retained	Retained
11	STRN	Loss	Loss	Retained	Retained
12	EML4	Loss	Loss	Retained	Retained

*Methylated promoter.

†Weak staining.

HLoss indicates heterogenous loss; IPC, isolated positive cell; WT, wild-type.

JC2 Immunophenotypes, and PD-L1 Expression in 12 CRCs With *ALK* Fusions

p53 Pathway Alterations p53 Nuclear Accumulation (<i>TP53</i> mutation)	Immunopositivity				PD-L1 Expression	
	CDX2	CK7	CK20	MUC2	Tumor Cells	Tumor-infiltrating Immune Cells
Focal (p.Arg273Cys)	Diffuse	Diffuse	Negative	Focal	Negative	Focal
Focal (p.Gly199*)	Diffuse	Negative	Negative	Negative	Focal	Diffuse
Diffuse (p.Met237Ile)	Diffuse	Diffuse	Focal	Negative	Negative	Focal
Focal (WT)	Diffuse	Diffuse	Diffuse	Focal	Negative	Focal
Diffuse (p.Arg248Trp)	Diffuse	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
Focal (p.Tyr126His)	Diffuse	Negative	Focal	Focal	Focal	Focal
IPC (WT)	Diffuse	Negative	Focal	Focal	Negative	Focal
Focal (WT)	Diffuse	Diffuse	Negative	Diffuse	Negative	Focal
Negative (WT)	Focal	Diffuse	Focal	IPC	Focal	Focal
Diffuse (p.Arg282Trp)	Diffuse	Negative	Diffuse	Focal	Negative	Negative
IPC (WT)	Diffuse*	Negative	Focal	Focal	Negative	Diffuse
Focal (WT)	Focal†	Negative	Negative	Negative	Diffuse	Diffuse

- 1、10例（83%）出现MMR错配修复缺陷，其中9例MLH1（-），同时7例PMS2（-），1例MSH2（-），12例MSH6（+）。
- 2、11例P53核阳性表达，其中2例（散在+），9例突变中6例为（局灶+），3例为（弥漫+）；2例TP53（野生型）中出现散在的p53核阳性表达，1例p53和TP53均为阴性。
- 3、10例CDX-2（弥漫+），2例CDX-2（局灶+）；
2例CK20（弥漫+），5例CK20（局灶+）；
5例CK7（弥漫+）；8例MUC2弥漫或局灶阳性表达。
- 4、4例肿瘤细胞PD-L阳性表达，3例PD-L1（局灶+），1例PD-L1（弥漫+）；10例肿瘤浸润免疫细胞（7例局灶+，3例弥漫+）。
- 5、未出现BRAF、RAS和PI3K-ALK/MTOR信号通路的突变。

TABLE 5. Types of ALK Fusions Described in 38 CRCs Reported in This (n = 12) and Previously Published Studies^{3,11–23}

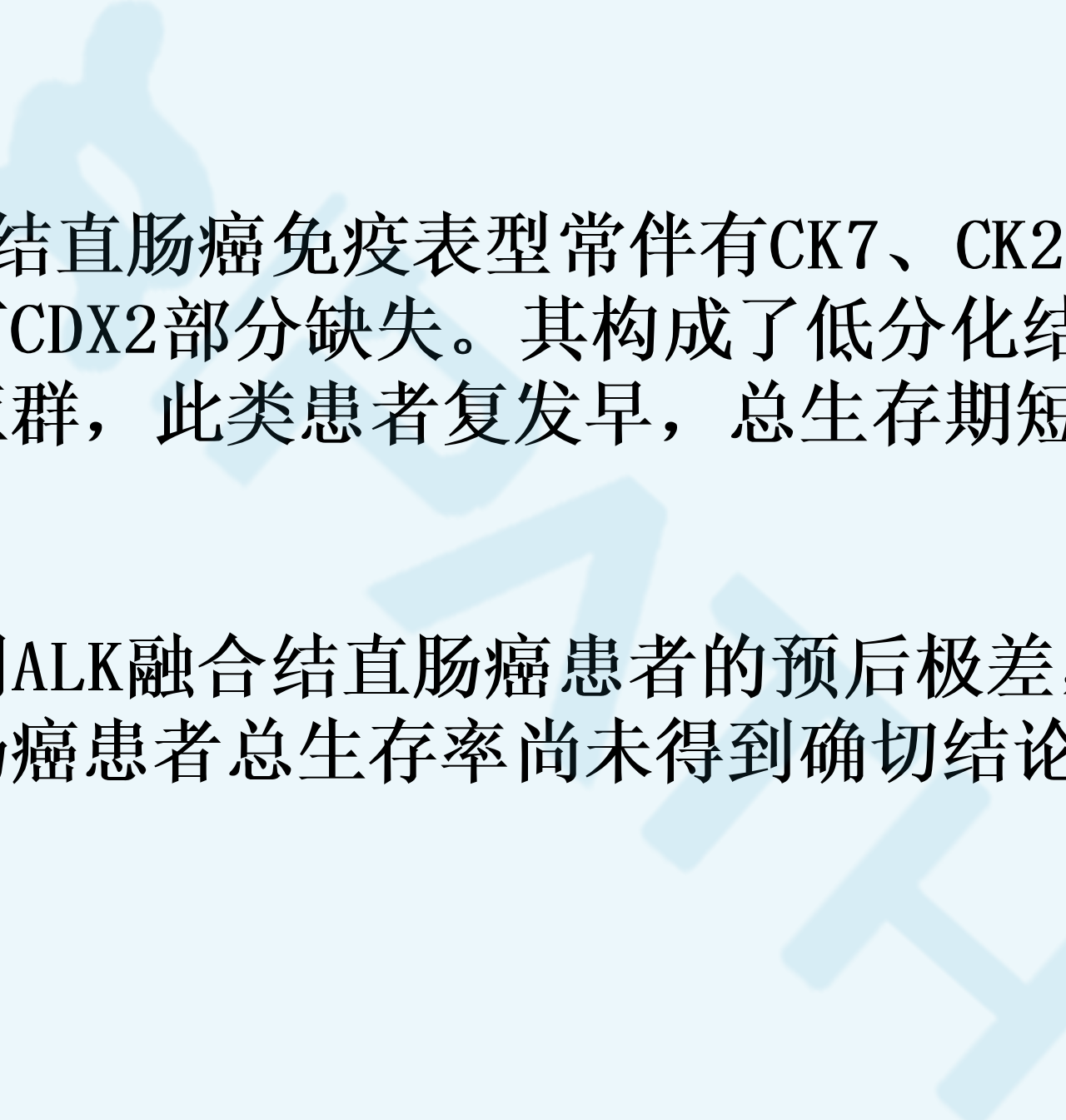
Fusion Gene Partner	Exon	ALK				
		2	10	19	20	NA
C2orf44	4	—	—	—	1	—
CAD	35	—	—	—	3	—
	NA	—	—	—	—	1
CENPF	11	—	—	—	1	—
DIAPH2	17	—	—	—	1	—
	26	—	—	—	1	—
EML4	2	—	—	1	1	—
	6	—	—	—	2	—
	13	—	—	—	1	—
	20	—	—	—	2	—
	21	—	—	—	3	—
	NA	—	—	—	—	4
LOC101929227	2	—	1	—	—	—
MAPRE3	7	—	—	—	1	—
PPP4R3B	11	1	—	—	—	—
PPP1R21	17	—	—	—	1	—
PRKAR1A	2	—	—	—	1	—
PRKAR1B	4	—	—	—	1	—
SLMAP	14	—	—	—	1	—
SPTBN1	7	—	—	—	5	—
STRN	3	—	—	—	4	—
Subtotal		1	1	1	30	5
Total	38	—	—	—	—	—

NA indicates not available.

讨 论

- 1、在结直肠癌中，弥漫性细胞质或膜表达预示着肿瘤存在ALK基因融合；本研究ALK融合方式分为染色体内基因重排（9）和染色体间基因重排（3）。
- 2、由于ALK阴性的结直肠癌未行基因检测，因此本研究不能评估ALK免疫组化检测ALK融合的敏感性。
- 3、本研究将11例ALK融合肿瘤以脾曲为界分为右侧，可以更好地反映不同部位的肿瘤生物学特征。

- 4、EML4-ALK为最常见的融合方式，首次发现于非小细胞肺癌。而本研究SPTBN1（e7）-ALK（e20）基因融合最常见（4/12）；SPTBN1可与膜磷脂结合，因此，在SPTBN1-ALK融合肿瘤中出现ALK膜阳性的现象。
- 5、在本研究中分析的ALK融合肿瘤中没有检测到常见的BRAF、K-RAS和N-RAS突变，但有报道STRN-ALK融合盲肠癌检测到K-RAS G13D突变。因此，作者认为该病例中RAS的累积可能是继发于癌性ALK融合之后。

- 
- 
- 6、ALK融合结直肠癌免疫表型常伴有CK7、CK20和MUC2缺失，偶尔伴有CDX2部分缺失。其构成了低分化结直肠癌的高侵袭性亚群，此类患者复发早，总生存期短。
 - 7、研究表明ALK融合结直肠癌患者的预后极差，关于ALK融合结直肠癌患者总生存率尚未得到确切结论。

综上所述，本研究描述了罕见的伴有ALK融合的结合直肠癌患者的临床病理和分子遗传学特征。虽然这些肿瘤具有MMR缺失结直肠癌的特征，但由于对ALK抑制剂治疗有效，因此，可以将ALK融合性肿瘤定义为一种新的分子亚型。



谢

谢

!

谢

谢