

Next-generation Sequencing Reveals Recurrent Somatic Mutations in Small Cell Neuroendocrine Carcinoma of the Uterine Cervix

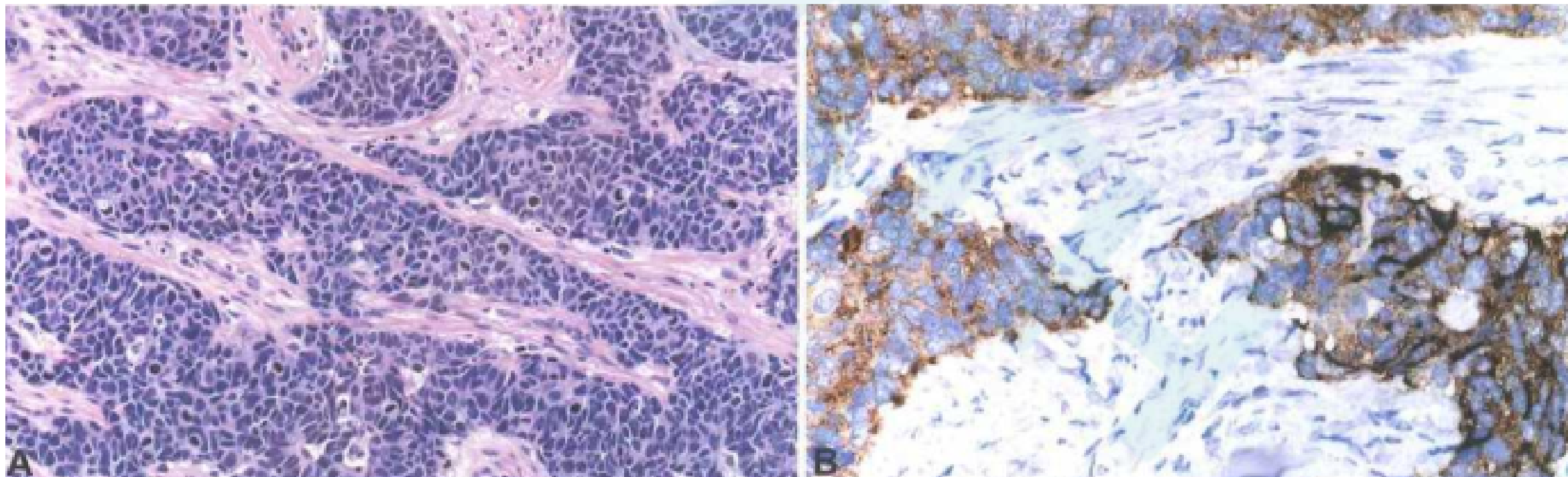
汇报人：付欣

指导老师：王哲主任

BACKGROUND: 宫颈小细胞神经内分泌癌（SCNEC）

ICD0编码： 8041/3

- 形态特征： 为单一的小细胞群，核卵圆形、深染，通常呈镶嵌样，胞质缺乏。常有大量核分裂和凋亡，广泛坏死。浸润淋巴血管和神经。SCNEC 可能伴有原位或浸润性鳞癌或腺癌。



BACKGROUND: 宫颈小细胞神经内分泌癌（SCNEC）

- 免疫组化：表达神经内分泌标记物 Syn、CgA、CD56 有助于诊断SCNEC，另外TTF-1通常阳性。
- 病因：宫颈SCNEC与高危型HPV相关。HPV18比在宫颈鳞癌中更常见。
- 预后：高度侵袭性，即使疾病早期也是如此。发现时通常已是晚期。所有分期的SCNEC的5年生存率为 14-39%，分期更高则预后更差。

BACKGROUND: 宫颈小细胞神经内分泌癌（SCNEC）

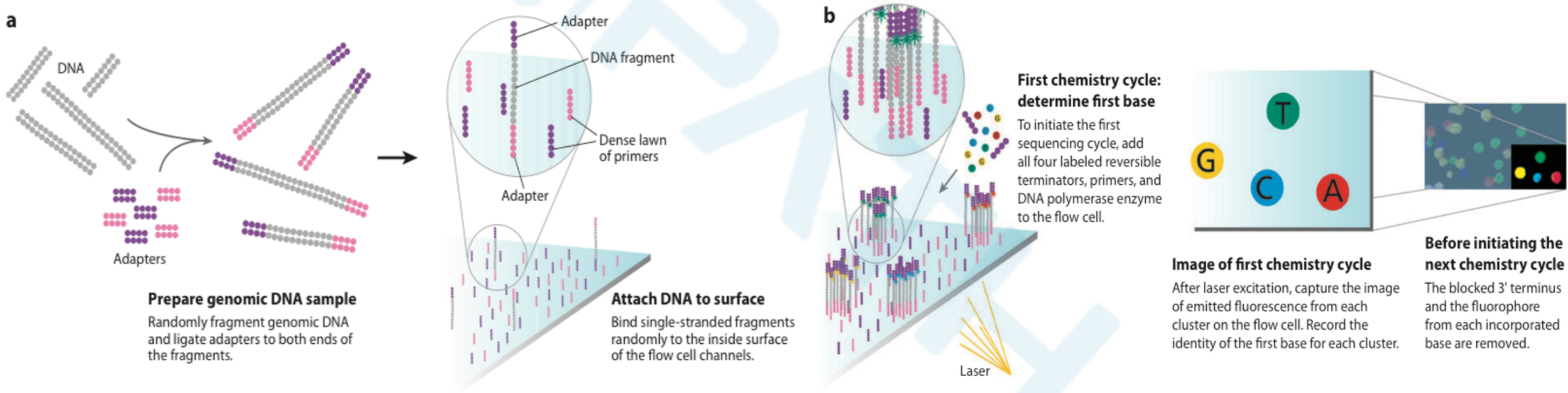
治疗：

- 目前尚无指南可以遵循，主要是借鉴小细胞肺癌的治疗经验进行治疗；
- 早期的宫颈SCNEC 患者通常采用根治性子宫切除术同时辅助化疗和放疗。晚期不能手术的患者则给予放疗和/或化疗；
- 近年来，肺的小细胞癌开始应用细胞信号通路抑制剂、血管生成抑制剂、凋亡促进剂和免疫疗法等，而这些靶向治疗是否适用于宫颈SCNECs，就依赖于对其进行遗传变异的鉴定。
- 目的：用二代测序的方法检测宫颈小细胞神经内分泌癌的基因学改变。

BACKGROUND: DNA测序

- 从1977年第一代DNA测序技术（Sanger法），发展至今三十多年时间，测序技术从第一代发展到现在的第三代乃至第四代，测序读长从长到短，再从短到长。
- **第一代测序技术**：主要为Sanger法。其核心原理是：由于ddNTP的2' 和3' 都不含羟基，其在DNA的合成过程中不能形成磷酸二酯键，因此可以用来中断DNA合成反应，在4个DNA合成反应体系中分别加入一定比例带有放射性同位素标记的ddNTP（分为：ddATP, ddCTP, ddGTP和ddTTP），通过凝胶电泳和放射自显影后可以根据电泳带的位置确定待测分子的DNA序列。

- **第二代测序技术：**核心思想是边合成边测序，即通过捕捉新合成的末端的标记来确定DNA的序列，现有的技术平台主要包括Roche公司的454技术、illumina公司的Solexa，Hi seq技术和ABI公司的Solid技术。



- **第三代测序技术：**以PacBio公司的SMRT和Oxford Nanopore Technologies纳米孔单分子测序技术，被称之为第三代测序技术。与前两代相比，他们最大的特点就是单分子测序，测序过程无需进行PCR扩增。

	优点	相对局限性
第一代	高读长，准确度一次性达标率高，能很好处理重复序列和多聚序列	通量低；单个样品的制备成本相对较高
第二代	很高测序通量，节约时间；成本较一代低；	样品制备较难；所引入PCR过程会在一定程度上增加测序的错误率，且具有系统偏向性；读长也比较短
第三代	单分子测序，不需要任何PCR的过程，有效避免因PCR偏向性而导致的系统错误，同时提高读长	

MATERIALS AND METHODS:

- **Case Selection:** 10 cases
- **Immunohistochemistry** :P16,Syn,CgA,p53
- **In Situ Hybridization:**
 high-risk HPV RNA probe solution (RNAscope, 16, 18,26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82;) ISHs for **HPV DNA** (wide spectrum probe:cocktail of HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45)
- **Targeted Next-generation Sequencing**

TABLE 1. Clinicopathologic Features and Mutational Profile

Case	Age	Procedure	Size (cm)	LVI	LN	SYN	CHR	P16	HR-HPV	P53	Mutations	Follow-up
1	45	Hysterectomy	6.0	Yes	No	Diffuse+	Focally+	Diffuse+	HPV 18	Normal	ErbB2, ARID1B, BCL6	13 mo, alive with metastatic disease
2	60	Hysterectomy	9.0	Yes	Yes	Diffuse+	Negative	Diffuse+	Not detected*	Aberrant (diffuse)	TP53, c-Myc, NCOA3	2 mo, alive with metastatic disease
3	29	Hysterectomy	1.3	Yes	No	Diffuse+	Focally+	Diffuse+	HPV 18	Normal	TP53, BRCA2, NOTCH1	Not available
4	68	Biopsy	NA	NA	NA	Diffuse+	Focally+	Diffuse+	HPV 35	Aberrant (null)	TP53, PIK3CA, PTEN, RB1	Not available
5	31	Hysterectomy	7.5	No	Yes	Diffuse+	Diffuse+	Diffuse+	HPV 18	Normal	BRCA1	4 mo, dead of disease
6	64	Hysterectomy	4.5	Yes	No	Diffuse+	Positive†	Diffuse+	HPV 18	Normal	PIK3CA	Not available
7	28	Hysterectomy	10.0	Yes	Yes	Diffuse+	Negative	Diffuse+	HPV 18	Normal	KRAS	126 mo, alive with postradiation tumor
8	34	Hysterectomy	2.5	Yes	Yes	Diffuse+	Focally+	Diffuse+	Not detected*	Normal	none detected	11 mo, dead of disease
9	61	Hysterectomy	4.4	Yes	No	Diffuse+	Positive†	Diffuse+	Not detected‡	Aberrant (diffuse)	TP53, PIK3CA	11 mo, dead of disease
10	36	Hysterectomy	3.6	Yes	Yes	Diffuse+	Focally+	Diffuse+	HPV 18	Normal	none detected	27 mo, dead of disease

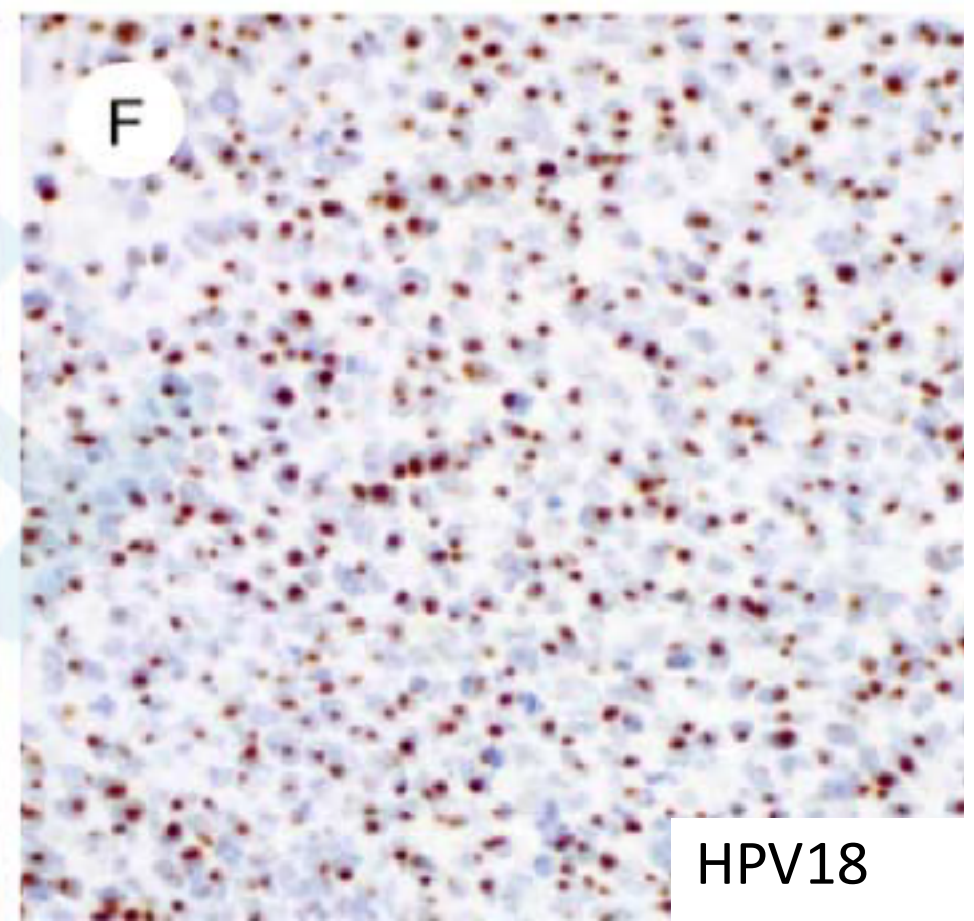
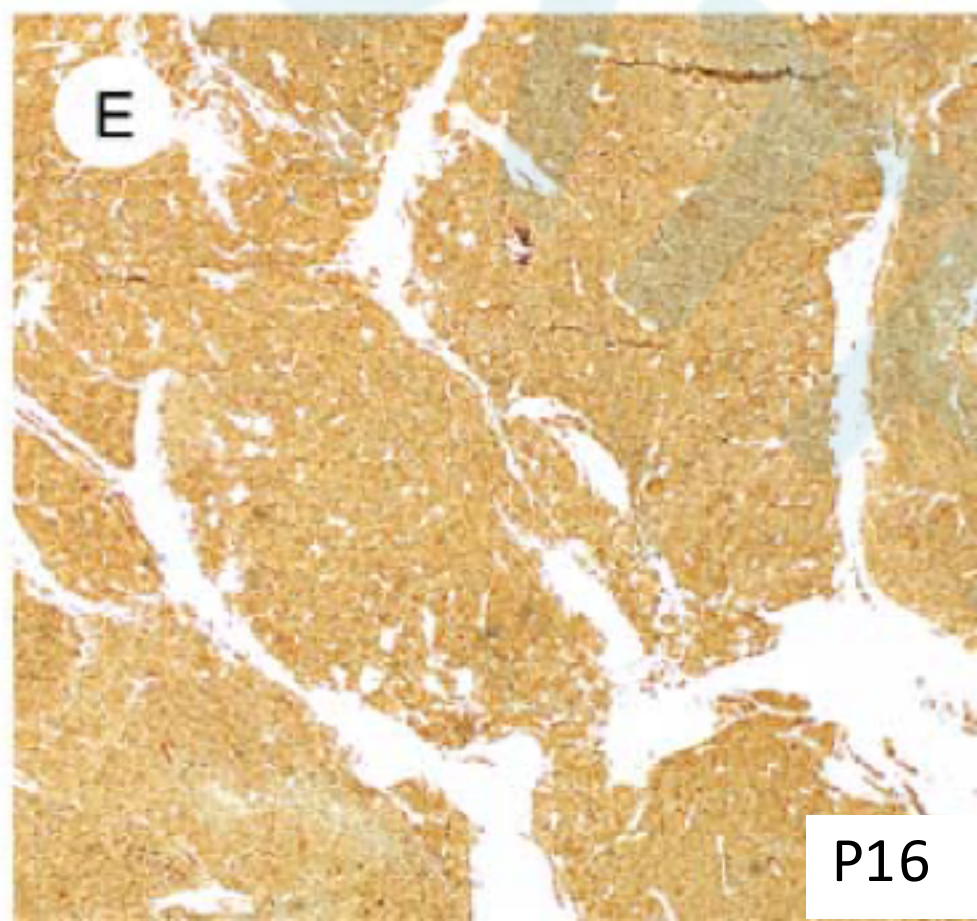
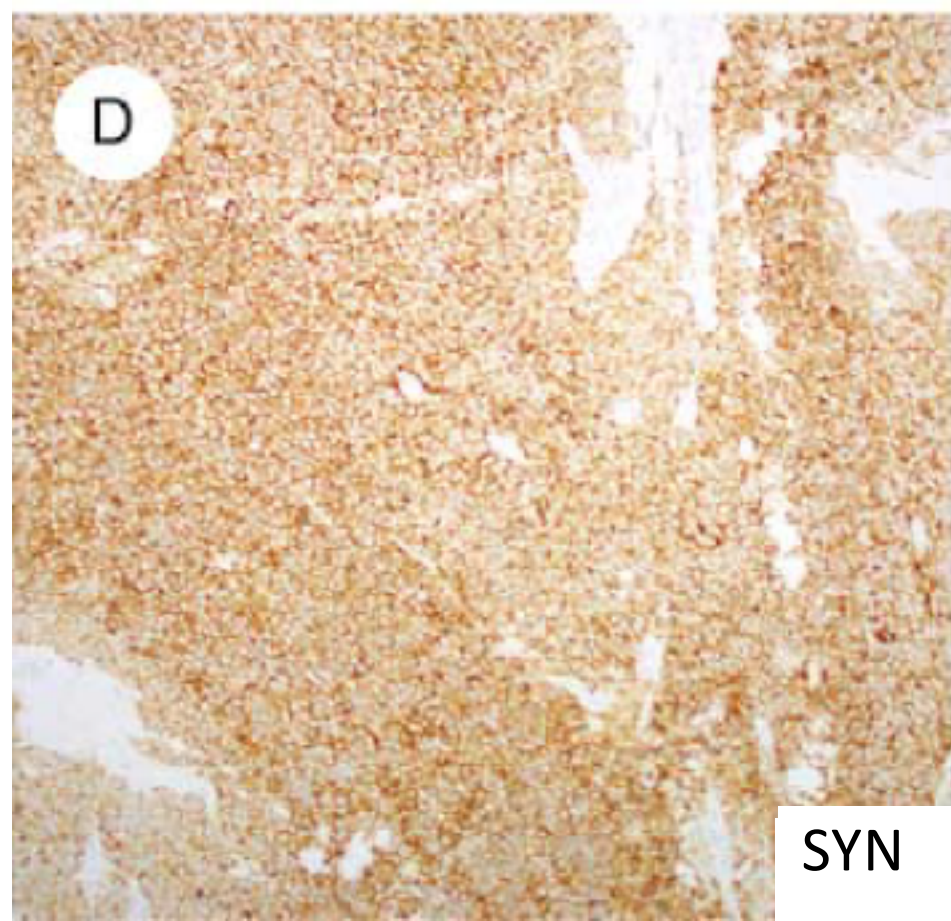
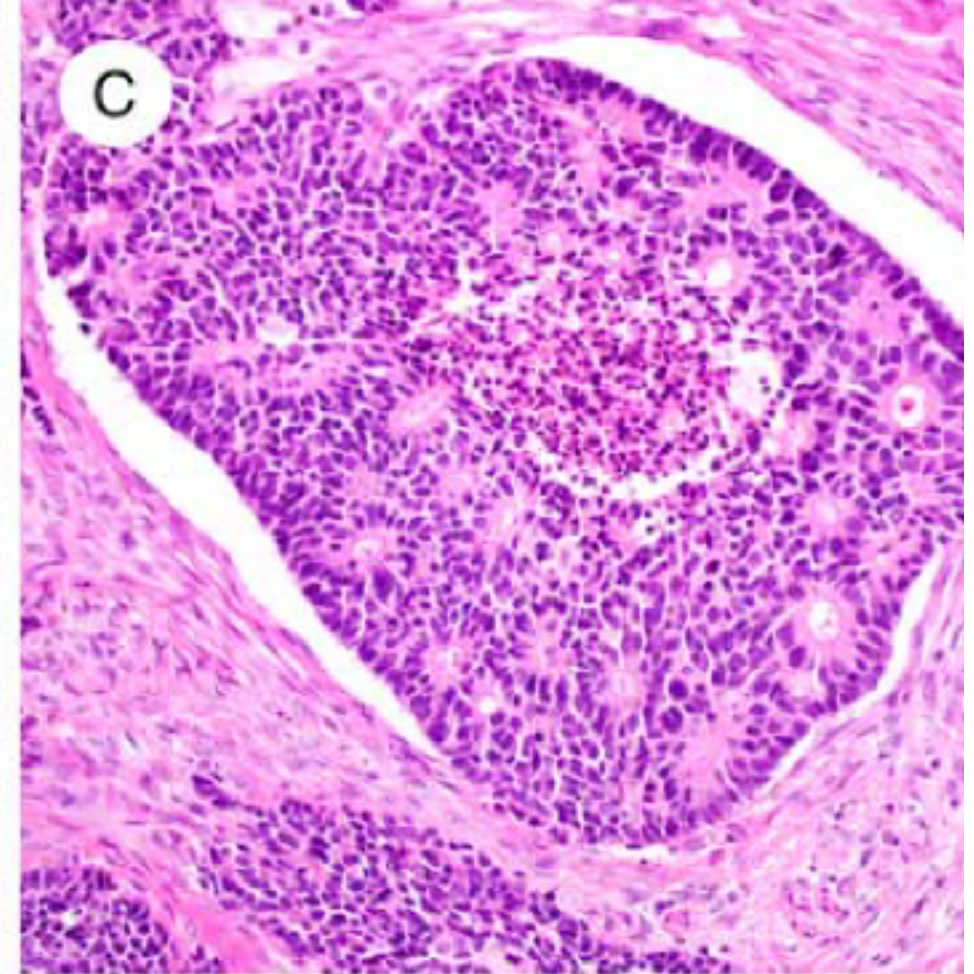
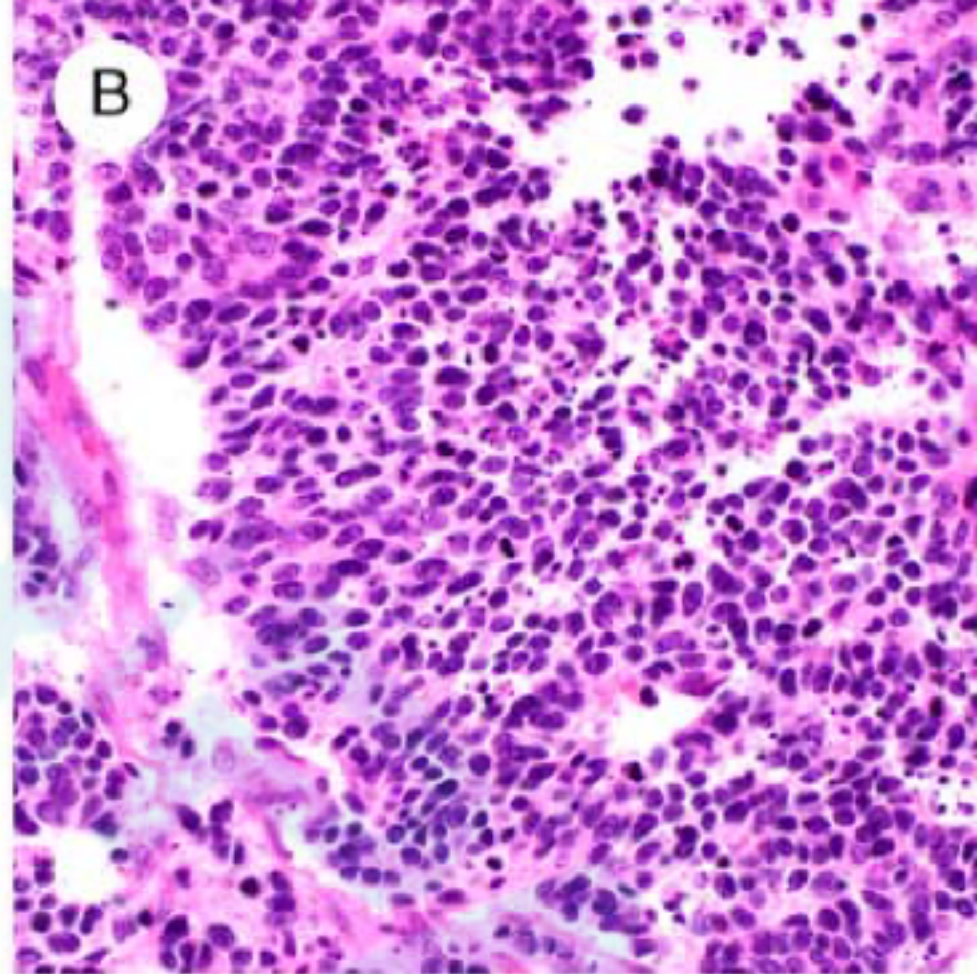
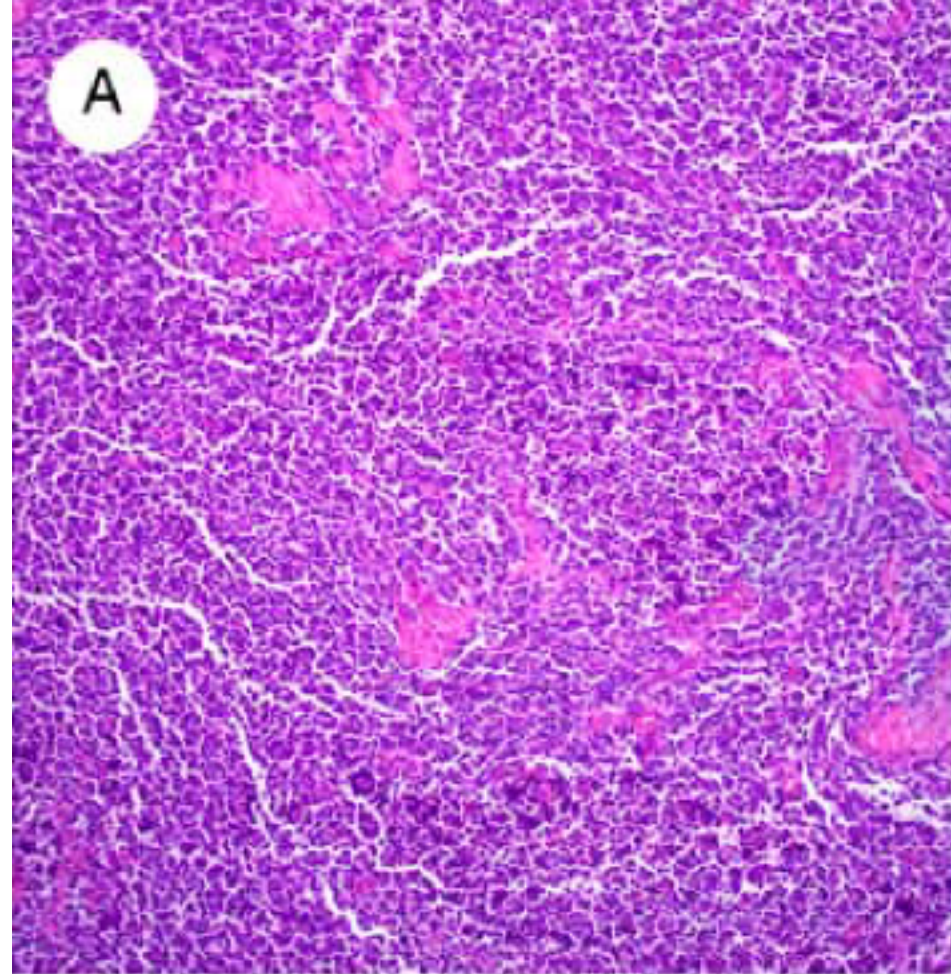
*HPV 18 RNA probe and HR-HPV RNA mixed probe solution (covering 18 HR-HPV subtypes) failed to detect HPV (wide spectrum HPV DNA probe also failed to detect HPV in case 2); PCR amplification for HR-HPV was not successful.

†By report (slide not available for review to assess staining distribution).

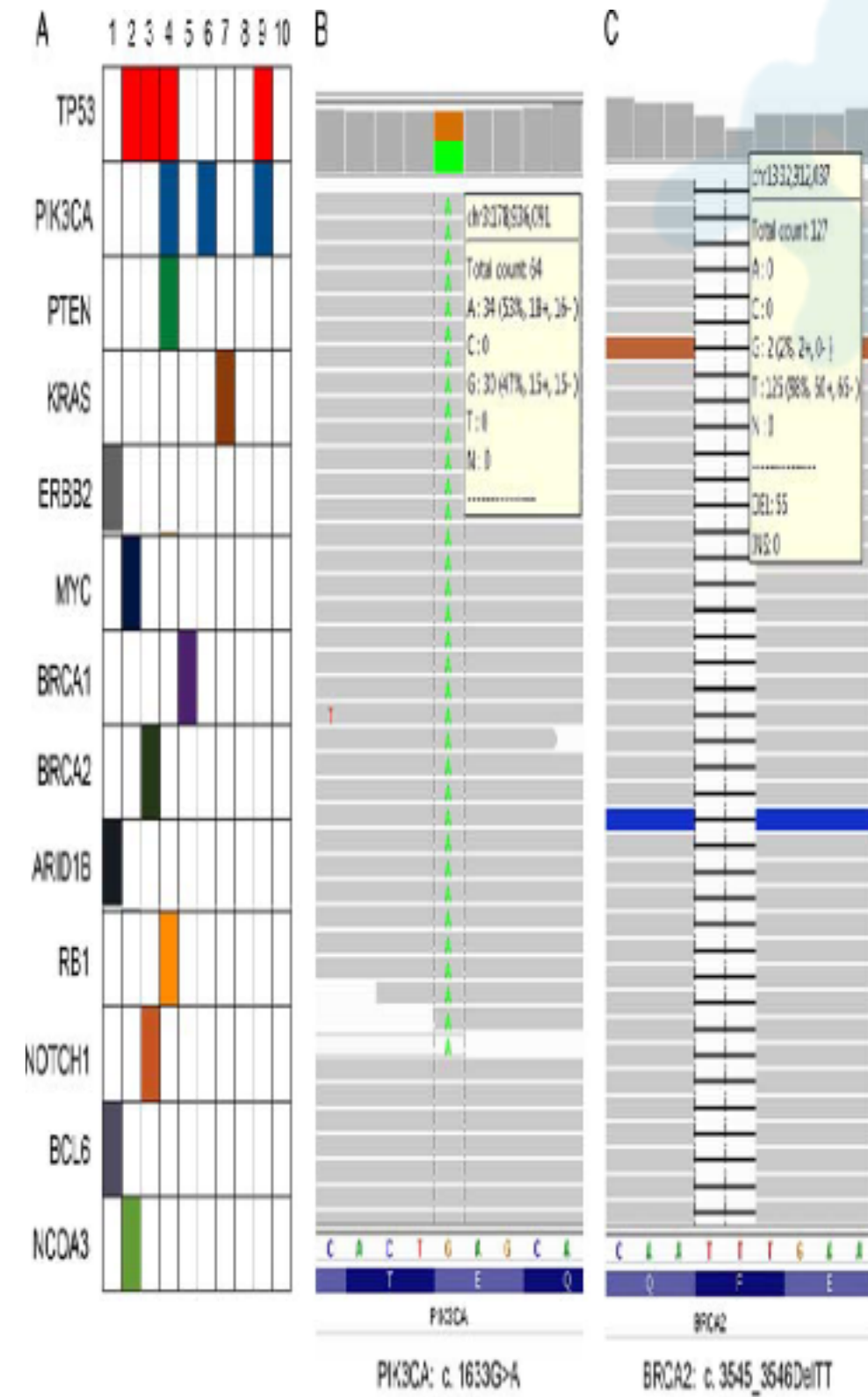
‡HPV 18 RNA probe, HR-HPV RNA mixed probe solution (covering 18 HR-HPV subtypes), and PCR all failed to detect HPV.

CHR indicates chromogranin; HR, high-risk; LN, lymph node metastasis; LVI, lymphovascular invasion; NA, not applicable; SYN, synaptophysin.

年龄：28–68y（中位：40.5y）；肿瘤大小：1.3–10cm,（平均5.4cm）；
在手术切除标本中大部分病例有淋巴管的侵犯，一半病例有淋巴结的转移；
所有肿瘤SYN和P16弥漫阳性表达，8例CgA局灶或弥漫阳性；
高危型HPV检测，有6例检测到HPV18型，1例检测到HPV35型，另有3例用几种HPV的检测方法都没发现有高危型HPV；

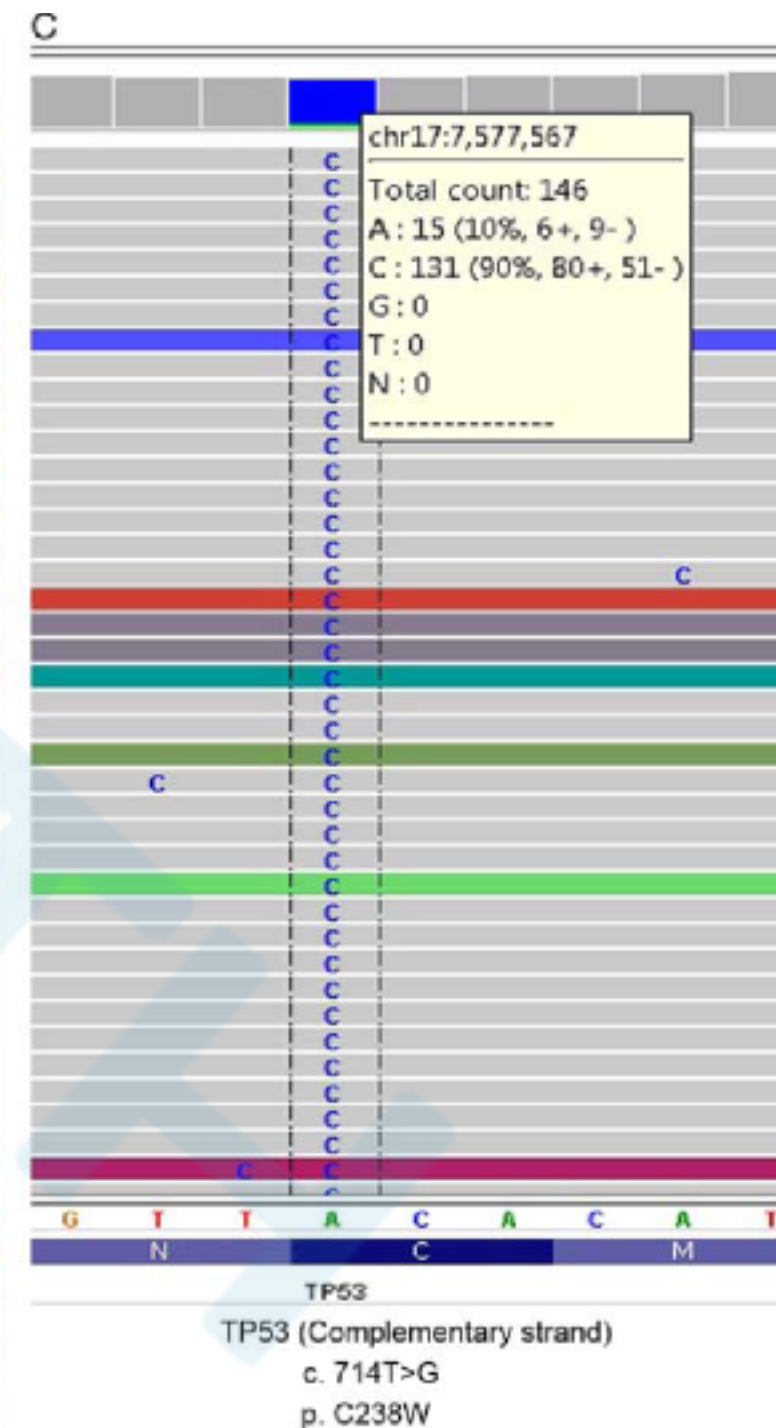
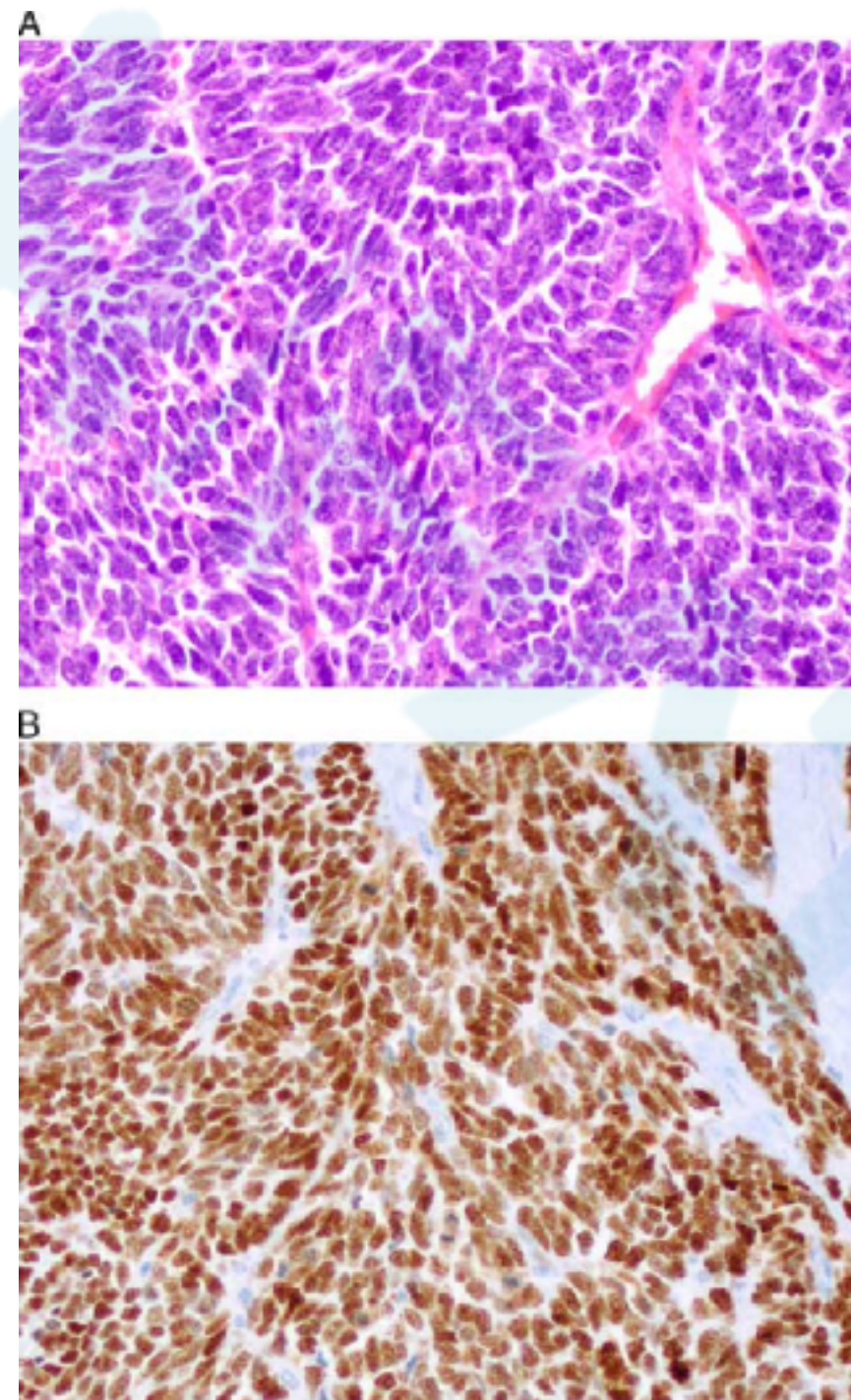
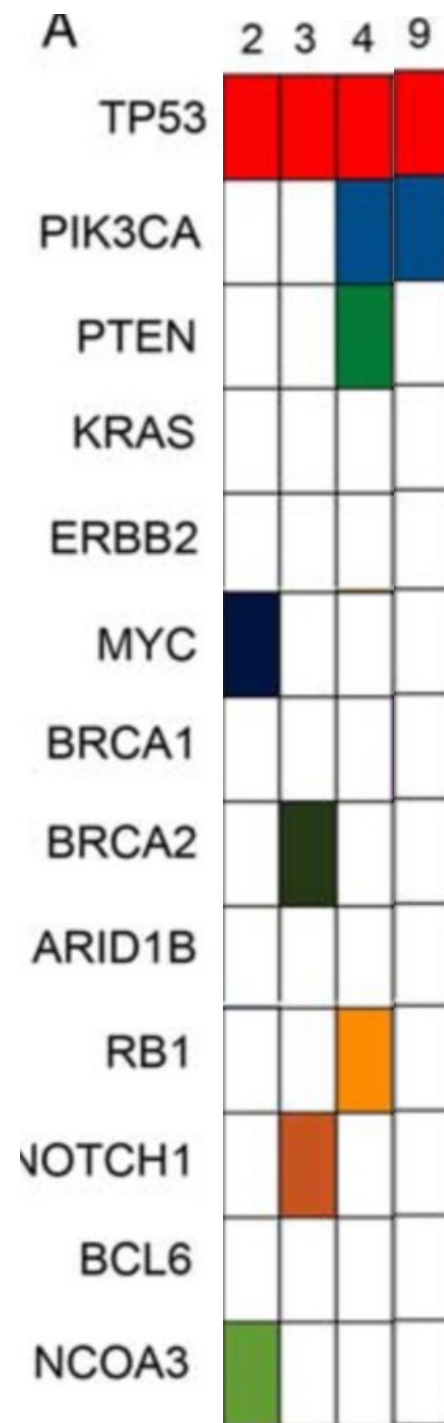


RESULTS: Somatic Mutational Profile of SCNEC



- 除Case8和Case10外，其余8例至少有一种基因的改变。
- 出现频率最高的为TP53（4例）和PIK3CA（3例），其中2例同时有TP53和PIK3CA的突变。
- 尽管检测了637个基因，Case8和Case10还是没检测到基因学的改变，但是却具有典型的小细胞癌的形态学表现。

RESULTS: TP53 Mutations in SCNEC



- Case2: TP53同时伴有MYC and NCOA3的突变,
- Case9: TP53同时伴有PIK3CA的突变, 这两例P53为过表达模式;

RESULTS: TP53 Mutations in SCNEC



RESULTS: Clinical Outcome of Patients With SCNEC

TABLE 1. Clinicopathologic Features and Mutational Profile

Case	Age	Procedure	Size (cm)	LVI	LN	SYN	CHR	P16	HR-HPV	P53	Mutations	Follow-up
1	45	Hysterectomy	6.0	Yes	No	Diffuse+	Focally+	Diffuse+	HPV 18	Normal	ErbB2, ARID1B, BCL6	13 mo, alive with metastatic disease
2	60	Hysterectomy	9.0	Yes	Yes	Diffuse+	Negative	Diffuse+	Not detected*	Aberrant (diffuse)	TP53, c-Myc, NCOA3	2 mo, alive with metastatic disease
3	29	Hysterectomy	1.3	Yes	No	Diffuse+	Focally+	Diffuse+	HPV 18	Normal	TP53, BRCA2, NOTCH1	Not available
4	68	Biopsy	NA	NA	NA	Diffuse+	Focally+	Diffuse+	HPV 35	Aberrant (null)	TP53, PIK3CA, PTEN, RB1	Not available
5	31	Hysterectomy	7.5	No	Yes	Diffuse+	Diffuse+	Diffuse+	HPV 18	Normal	BRCA1	4 mo, dead of disease
6	64	Hysterectomy	4.5	Yes	No	Diffuse+	Positive†	Diffuse+	HPV 18	Normal	PIK3CA	Not available
7	28	Hysterectomy	10.0	Yes	Yes	Diffuse+	Negative	Diffuse+	HPV 18	Normal	KRAS	126 mo, alive with postradiation tumor
8	34	Hysterectomy	2.5	Yes	Yes	Diffuse+	Focally+	Diffuse+	Not detected*	Normal	none detected	11 mo, dead of disease
9	61	Hysterectomy	4.4	Yes	No	Diffuse+	Positive†	Diffuse+	Not detected‡	Aberrant (diffuse)	TP53, PIK3CA	11 mo, dead of disease
10	36	Hysterectomy	3.6	Yes	Yes	Diffuse+	Focally+	Diffuse+	HPV 18	Normal	none detected	27 mo, dead of disease

4例患者于死亡； 1例患者术后13个月发现远处转移； 1例术后2个月发现远处转移； 1例发现骨盆成软骨细胞型骨肉瘤；

DISCUSSION

- 宫颈的 SCNEC 是一种极其罕见但侵袭性很高的肿瘤，具有很高的死亡率，即使诊断时处于疾病早期；
- 由于其非常罕见，缺乏大宗的病例研究，因此目前尚无指南可以遵循，主要是借鉴小细胞肺癌的治疗经验进行治疗；
- 早期的宫颈SCNEC 患者通常采用根治性子宫切除术同时辅助化疗和放疗。晚期不能手术的患者则给予放疗和/或化疗；
- 然而复发率高，预后差值得开发新的治疗宫颈SCNEC的方法，包括认识其可用于靶向治疗的分子改变。

高危型HPV：

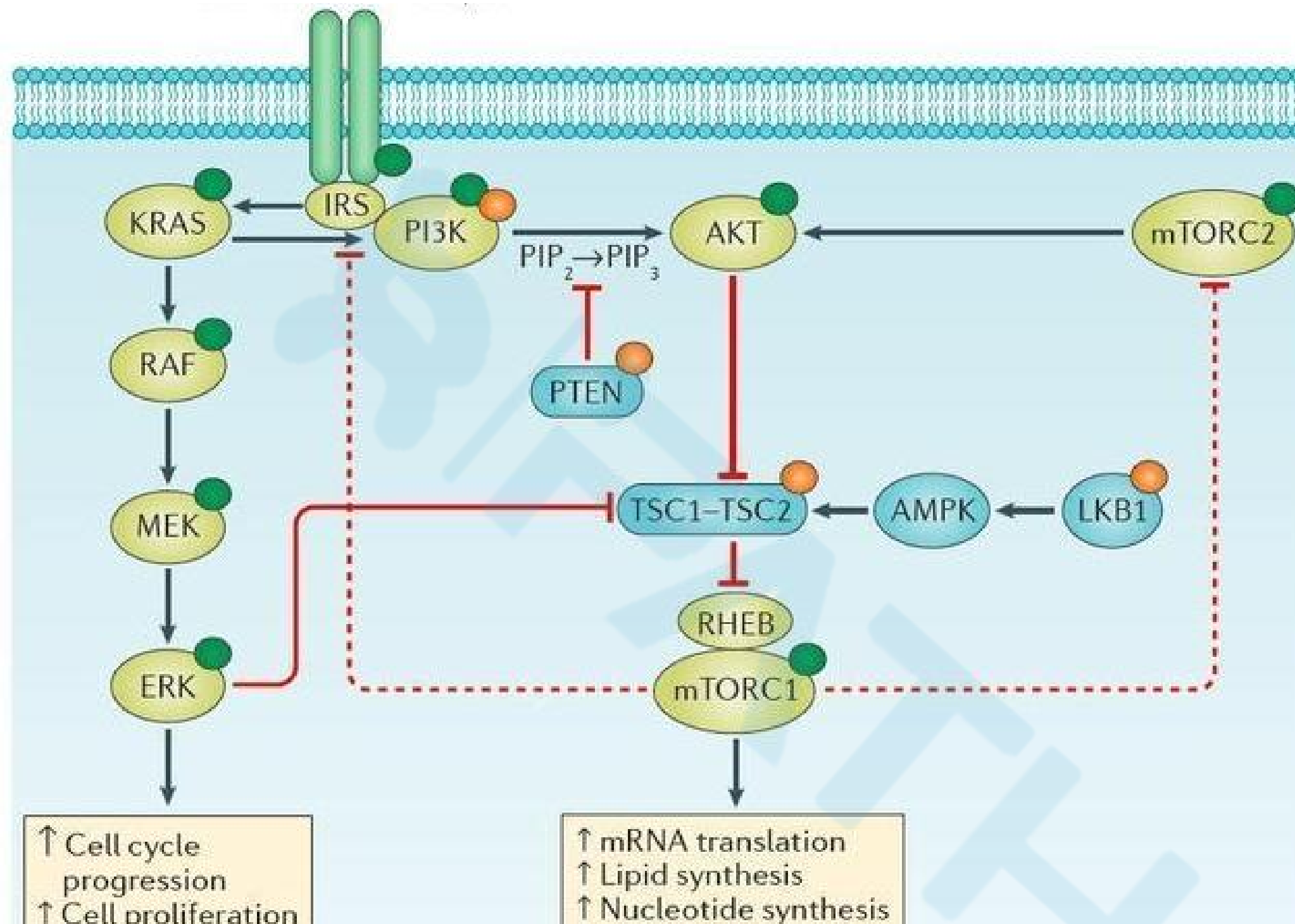
- 本文研究的10个病例P16都弥漫强阳性表达，但高危型HPV检测7/10阳性（6例为HPV18，1例为HPV35），且有2例检测失败，所以实际上，宫颈 SCNEC 高危型HPV的感染率可能更高。

TP53：

- 因为高危型HPV的E6蛋白可以抑制P53的功能，所以之前人们推测包括小细胞癌在内的与高危型HPV感染相关的宫颈癌P53应该是野生型的；
- 但是，本文所研究的病例中4/10例出现TP53的突变（其中3例为异常表达模式，1例为野生型）；并且有1例TP53突变且P16弥漫阳性，但高危型HPV检测却阴性，这提示宫颈的SCNEC可能存在2种不同的发生机制：一是高危型HPV的驱动（最常见）；一是无高危型HPV的TP53驱动机制（少见）。

PIK3CA:

- 本文的研究中，有3例肿瘤发现有4个PIK3CA的突变位点：G106A、N345T、E545D、E545K（是PIK3CA最常见的突变位点）；
- PIK3CA是 hpv相关的癌症基因突变最频繁的基因之一，包括宫颈鳞状细胞癌、宫颈腺癌、HPV阳性的头颈部肿瘤；
- PIK3CA定位于3q26，长34kb，编码I类磷脂酰肌醇3-激酶（PI3Ks）的p110催化亚基，PIK3CA突变可以导致PIK3CA蛋白的过度表达，从而引起PI3K的催化活性增强，激活PI3K - AKT - mTOR信号通路，从而引起细胞癌变。



- 存在这些突变的SCNECs可能对 mTOR或AKT抑制剂比较敏感，这可能是治疗SCNECs的一个潜在靶点。

KRAS:

- 本研究中有1例出现了KRAS的突变，突变位点为(G12V)；之前有研究发现宫颈腺癌也有KRAS的突变，其突变位点为(G12D)；
- 因此，与KRAS通路相关的MEK抑制剂可用于SCNECs的治疗；

BRCA1和BRCA2:

- 本文各有1个病例检测出BRCA1和BRCA2的突变，而这提示我们，针对BRCA突变患者的PARP抑制剂，也可能用于治疗有BRCA突变的宫颈SCNEC。

DISCUSSION

- 除了以上基因改变之外，本研究中还发现有ERBB2、c-Myc、ARID1B、RB1、BCL6和 NCOA3的突变，这些都可能为SCNECs的治疗提供帮助；
- 虽然检测了637个基因，但仍有2例未检测到任何基因的突变，作者推测这两例肿瘤可能是由于其他致癌机制引起的，比如基因的过表达和/或失活，拷贝数变异，DNA和/或组蛋白相关的表观遗传调控等；

SUMMARY

- 宫颈的SCNEC极其罕见，但侵袭性很高，目前尚无相关的治疗指南可以遵循；
- 而国内外关于宫颈的SCNEC的文章大多是病例报道，或者基于传统治疗方案的随访资料，而与之相关的基因改变的文章相对较少；
- 本文用二代测序的方法检测了10例宫颈的SCNEC，发现了一些基因的改变，从而给宫颈SCNEC的治疗提供了一些新的思路；

PIK3CA → mTOR或AKT抑制剂

KRAS → MEK抑制剂

BRCA突变 → PARP抑制剂



Thank You!