

出國報告 (出國類別：進修)

# 分子標記與基因突變分析於神經系統 腫瘤分類之應用

服務機關：國立臺灣大學醫學院附設醫院/病理部

姓名職稱：黃馨儀/主治醫師

派赴國家：美國/加州大學舊金山分校

出國期間：101 年 12 月 27 日 至 103 年 03 月 25 日

報告日期：103 年 05 月 20 日

## 摘要：

「神經科學及神經醫學」目前為臺灣大學及臺大醫院重點發展項目之一，而神經病理學在疾病診斷上乃是神經醫學研究之基礎。目前，各類腫瘤的病理分類不只需要病理形態學的診斷，更將腫瘤的基因變異或分子標記當成再次細分的標準 (criteria)，進而作為癌症「治療個人化」的基礎，中樞神經系統腫瘤之分類亦然。最近數年這方面的研究進展相當快速，寡樹突神經膠瘤、星形神經膠瘤、混合性寡樹突及星形神經膠瘤、膠質母細胞瘤及髓母細胞瘤等中樞神經系統惡性腫瘤的分子變異的情形已一一被分析出來，而不同分子變異亞型與腫瘤行為，預後、對治療之反應，及復發機率的關聯性也不盡相同。可以說，病理上腫瘤分類的方法，已由早期的型態學分類，進展到分子病理分類的時代。

目前本部已設有分子診斷實驗室，但服務項目以肺癌、乳癌、大腸直腸癌為主。實驗分析技術主要應用 DNA 定序突變分析及螢光原位雜交。藉由本次至 UCSF 進修，配合本部原有之分子診斷分析為基礎，引進並逐步建置中樞神經系統腫瘤分子標記檢測，一方面提供更完善的病理診斷服務，另一方面也為新的分子標記或可能之治療標靶分子的發現奠定基礎。

# 目次

目的.....	1
過程	
UCSF 神經病理及分子病理部門.....	2
神經病理學的學習.....	3
分子病理學的學習.....	4
中樞神經系統腫瘤常用之分子病理檢查.....	5
心得.....	10
建議事項.....	11
參考資料.....	11

## 本文

### 目的：

近十多年來病理學的發展，對於各類腫瘤的病理分類不只需要病理形態學的診斷，更將腫瘤的基因變異或分子標記當成再次細分的標準 (criteria)。形態學上類似的腫瘤，其預後、對治療之反應，及復發機率等不一定類似，因為腫瘤細胞內的特定的基因變異，會影響腫瘤的進程或行爲。隨著分子生物技術的發展，腫瘤的基因變異除了提供治療方向和預後評估等資訊，日新月異的標靶治療更需要設立各種針對不同腫瘤的分子病理診斷項目。中樞神經系統腫瘤之分類亦然，當前研究趨勢仍是希望藉由腫瘤中分子變異的情形分析

「神經科學及神經醫學」目前為臺灣大學及臺大醫院重點發展項目之一，而神經病理學在疾病診斷上乃是神經醫學研究之基礎。臺大醫院病理部已設有分子診斷實驗室，但服務項目以肺癌、乳癌、大腸直腸癌、軟組織腫瘤為主。實驗分析技術主要應用 DNA 定序突變分析，螢光原位雜交分析等。本次出國進修，擬見習 UCSF 病理部對中樞神經系統腫瘤的形態學及分子病理診斷，未來將以本部門原有之分子診斷分析為基礎，逐步建置文獻報告所提及之中樞神經系統腫瘤分子標記，提供臨床醫師處理病患的依據。

## 過程：

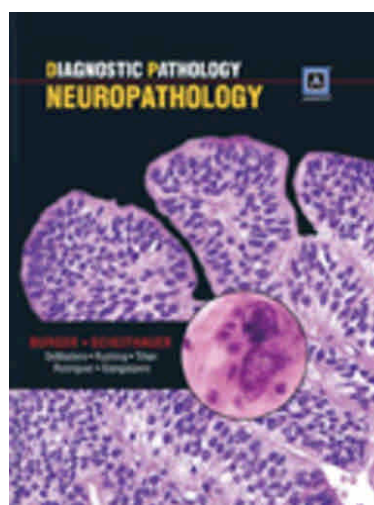
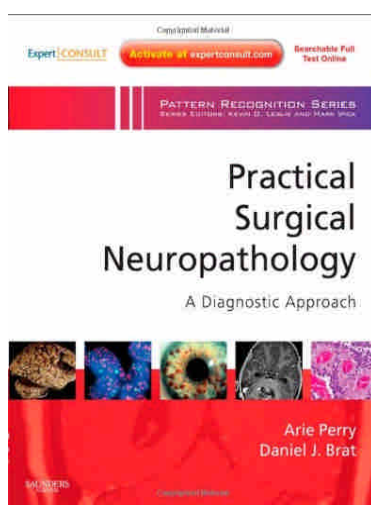
### 一、UCSF 神經病理及分子病理部門

UCSF 是加州大學系統中唯一一所純粹由醫療相關系所組成的學校，包含醫學院、牙醫學院、護理學院、藥理學院等等，分布於三個舊金山市內的校區：Parnassus Height、Mission Bay 和 Mission District。UCSF 病理部主要位於 Parnassus 校區的醫學中心，提供 Moffitt-Long Hospital、Mt. Zion Hospital、San Francisco General Hospital (SFGH) 和 the San Francisco Veterans Affairs Medical Center (SFVAMC) 等四所 UCSF 相關醫院病理診斷服務。由 Dr. Arie Perry 領導的神經病理部門擁有八位神經病理次專科醫師，共同處理每年由 UCSF 相關醫院收到的手術神經病理標本約 1200 例，約 100-200 例來自全美各地及其他國家的諮詢玻片，還有將近 200 例解剖的腦部標本。以上神經病理標本涵蓋的範疇包括中樞及周邊神經系統的腫瘤、感染、神經退化性疾病和肌肉切片。UCSF 神經病理部門亦和 UCSF Brain Tumor Research Center、California Childhood Brain Tumor Consortium、California Encephalitis Project 等

機構密切合作，參與腦腫瘤的組織收集、基礎研究及臨床治療計畫研究。

面對龐大且複雜的神經病理診斷工作，UCSF 神經病理部門的

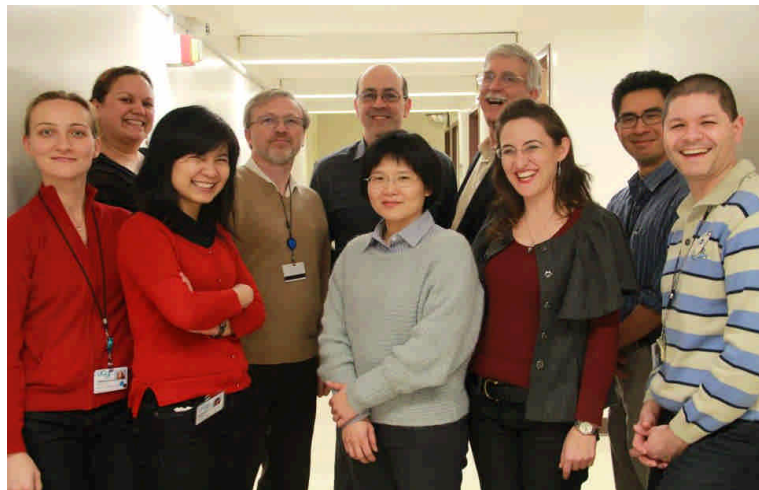
醫師包括國際知名的神經病理專家 Dr. Arie Perry，也是神經病理教科書 “Practical Surgical Neuopathology” 的作者(上圖左)；而 Dr. Tarik Tihan 及 Dr. Han S. Lee 也參與教科書 “Diagnostic Pathology: Neuopathology” 的寫作及編纂(上圖右)。在日常的神經病理診斷及冷凍切片診斷之時，若遇有神經腫瘤的案例，會開立與診斷相關的染色或分子病理檢查，以幫助正確診斷的確立；而與預後相關的分子病理檢查，一般在外科病理報告之外，另由補發報告通知檢查結果。UCSF 的分子病理部門位於靠近 Mission Bay 校區的 China



Basin Laboratory Facility，和神經病理有關的檢驗項目包括特定中樞神經系統腫瘤的染色體基因變異，尚有 Fragile X syndrome、Huntingtons disease、frontotemporal lobar degeneration 等遺傳疾病的檢驗。需要接受分子病理檢驗的中樞神經系統腫瘤標本，由神經病理部門送出數片未染色的切片作為檢查用。在每週一次的神經系統腫瘤聯合討論會中，臨床醫師決定治療策略時，都希望獲知結合神經病理形態學和分子病理的報告結果。

## 二、神經病理學的學習

在 UCSF 神經病理部門接受訓練的，除了 UCSF 自己的解剖病理住院醫師及正接受神經病理次專科的訓練病理醫師之外，一向都有來自其他國家的訪問病理醫師或其他如法醫師、神經內科、神經外科、分子病理部門的醫師接受為期不等的解剖神經病理訓練。多元的跨專科背景，使每位在 UCSF 神經病理部門研習的醫師能互相交流病例的臨床表現、影像學表現、病理型態學特徵及治療之相關性，從而對疾病本身有更全面的了解，而不是只限於每個醫師自己的專科領域。下圖為部分 UCSF 神經病理次專科醫師及訪問醫師們的合影。



切片的診斷及報告於每日下午約兩點半左右開始，由輪值的解剖病理住院醫師一一報告簡單的病史和影像學檢查等結果，負責的神經病理次專科醫師口述需要的染色檢查、分子病理檢查、及初步診斷，等一切檢查結果完成，住院醫師會將最後病理報告完成並交由負責的神經病理次專科醫師確認。同時，訪問或短期受訓的醫師也都全程參與這些例行的閱片過程，且被鼓勵隨時提出對診斷和檢查的想法和大家討論。此外，不定時的開刀中神經病理冷凍切片診斷標本，其診斷過程也如同例行的閱片過程，是大家可以學習及熱烈討論的時機。

除了不定時的學術演講之外，神經病理次專科另有幾項每週固定的會議，分述如下：

1. 神經病理次專科教學會議：每週一早上九點至十點，由 UCSF 神經病理次專科醫師以專題方式，輪流講述特定疾病的診斷或研究進展。
2. 諮詢案例及困難案例討論：每週二早上九點至十點半，由 Dr. Arie Perry 或 Dr. Tarik Tihan 主持，幾乎所有在神經病理的成員都會參加，將一週來的困難案例逐一討論，並取得診斷上的共識。
3. 解剖案例腦部檢查：每週三早上八點半至十點半，當月輪值病理解剖的住院醫師報告生前病史及其他器官的解剖發現，並在神經病理次專科醫師的指導下，將已用福馬林固定的腦連切成左右對稱的一公分厚片狀，檢查肉眼所見異狀病採取適當切片作顯微鏡下診斷。
4. 神經影像學會議：每週四早上九點至十點，由神經外科醫師及影像醫學科醫師分別報告，是了解病理切片案例臨床表現的重要會議。
5. 神經系統腫瘤聯合討論會：每週四中午十二點半至兩點，每一例惡性神經系統腫瘤，均會在會議中討論其診斷及治療方針，因此，除了病理型態學上的分類診斷，腫瘤的基因或染色體變異情形也是必要的資訊，提供治療、預後的參考，有時也討論病例是否該進入臨床試驗計畫。
6. 肌肉及神經切片討論：每週五早上九點至十點半，與神經科醫師共同檢閱肌肉及神經切片。

### 三、分子病理學的學習

需要進一步做分子診斷、基因檢測或染色體變異檢測的神經系統腫瘤，在神經病理次專科醫師閱片之後，開立檢查委託單，並依各檢查項目所需另準備足夠的空白切片，送至分子病理部門。分子病理部門的檢驗人員，一般會累積數個病例一起進行 FISH，每次的實驗流程皆附上陽性及陰性控制組。當 FISH 步驟完成之後，螢光玻片的結果由兩位檢驗人員分別判讀，最後由負責的分子病理次專科醫師再次確認，才發出結果報告。

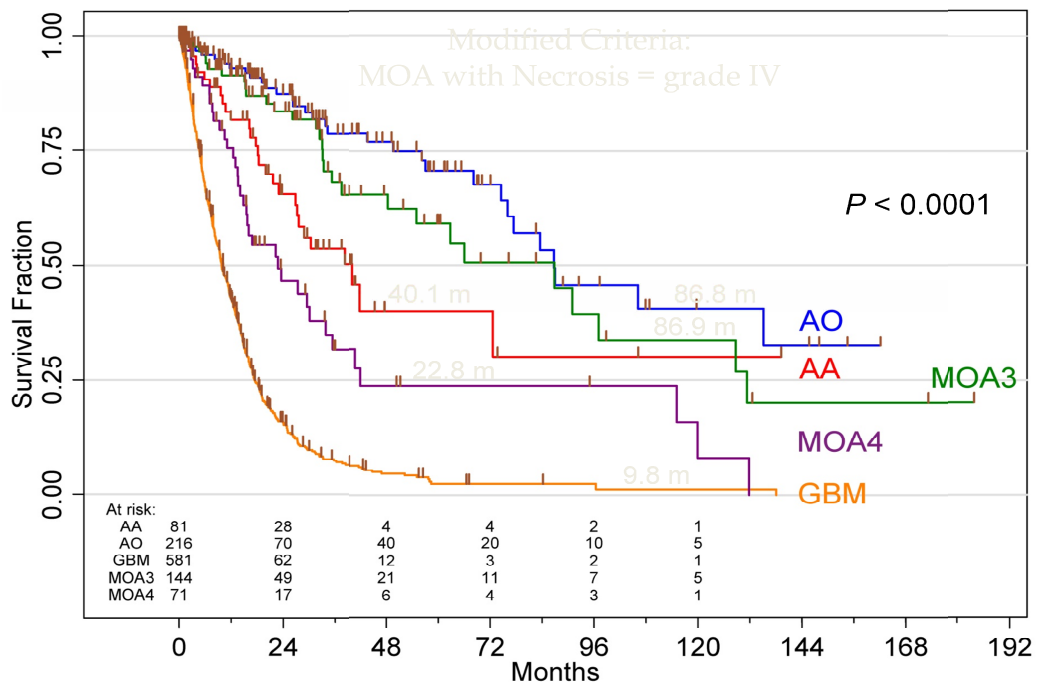
在進修期間，每一至兩個星期總有需作 FISH 的神經系統腫瘤病例。因此，在參與例行的神經病理會議及討論之餘，進修者也可自行利用時間到

China Basin Laboratory Facility 的分子病理部門，觀摩並學習判讀 FISH 結果。分子病理部門擁有多餘的螢光顯微鏡工進修者使用，而在判讀過程中若遇到問題，分子病理部門的醫師及檢驗人員都十分熱心地協助或加以解說。

#### 四、中樞神經系統腫瘤常用之分子病理檢查

##### 1. 寡樹突神經膠瘤 (oligodendroglioma) 的 1p/19q 染色體缺失

WHO grade II or grade III 寡樹突神經膠瘤的腫瘤細胞常見 1 號染色體短臂(1p)和 19 號染色體長臂(19q)的缺失，根據目前文獻報告，具有 1p/19q 染色體缺失的寡樹突神經膠瘤對放射性治療及化學治療的反應較為良好，且具有 1p/19q 染色體缺失的病人存活率較高。此外，1p/19q 染色體缺失亦有助於診斷 WHO grade II or grade III 混合性寡樹突及星形神經膠瘤 (mixed oligoastrocytoma, MOA)、WHO grade IV 具有寡樹突神經膠細胞分化的多形性膠質母細胞瘤 (glioblastoma/GBM with oligodendroglioma component) 等，以上兩種具有寡樹突神經膠細胞分化的神經膠瘤，其預後相較於同期之 WHO grade II or grade III 星形神經膠瘤 (astrocytoma) 或 WHO grade IV 多形性膠質母細胞瘤更為良好(見下圖)。因此，1p/19q 染色體缺失的檢測能提供診斷之輔助資料及預後評估的依據。



目前多數美國的分生病理實驗室，檢驗 1p/19q 染色體缺失的方法，都是使



用 DNA 探針，在福馬林固定石蜡包埋的手術檢體進行螢光原位雜交 (FISH)，分別檢測染色體 1p 和 19q 的缺失。市面上的 DNA 探針，皆是針對 1p36 和 19q13 這兩個染色體區域，UCSF 也是採用這兩個探針加上另外 1q 和 19p 的 DNA 探針作為對照組，作 1 號染色體短臂(1p)和 19 號染色體長臂(19q)數目的計數，量化結果以百分比表示具有染色體缺失的腫瘤細胞比例。下表摘錄自 Dr. Arie Perry 發表的研究成果：

		Patients with Deletion of the Indicated Region of Common Loss							
		1p36		19q13.3		1p36 and 19q13.3			
Status	No. of patients	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
<b>Primary and recurrent</b>									
Oligodendrogliomas	52	25	48	33	63	23	44		
Mixed oligoastrocytomas	31	9	29	15	40	0	26		
Astrocytomas	79	14	18	21	27	6	8		
<i>P</i> *		.0002		<.0001		<.0001			
<b>Primary†</b>									
Oligodendrogliomas	36	15	42	21	50	14	39		
Mixed oligoastrocytomas	19	4	21	10	53	4	21		
Astrocytomas	61	11	18	14	23	5	8		
<i>P</i> *		.011		.0009		.0004			
<b>Recurrent‡</b>									
Oligodendrogliomas	16	10	63	12	75	9	56		
Mixed oligoastrocytomas	12	5	42	5	42	4	33		
Astrocytomas	18	3	17	7	39	1	6		
<i>P</i> *		.012		.015		.002			

\* $\chi^2$  test, astrocytomas v oligodendrogliomas, excluding mixed oligoastrocytomas.

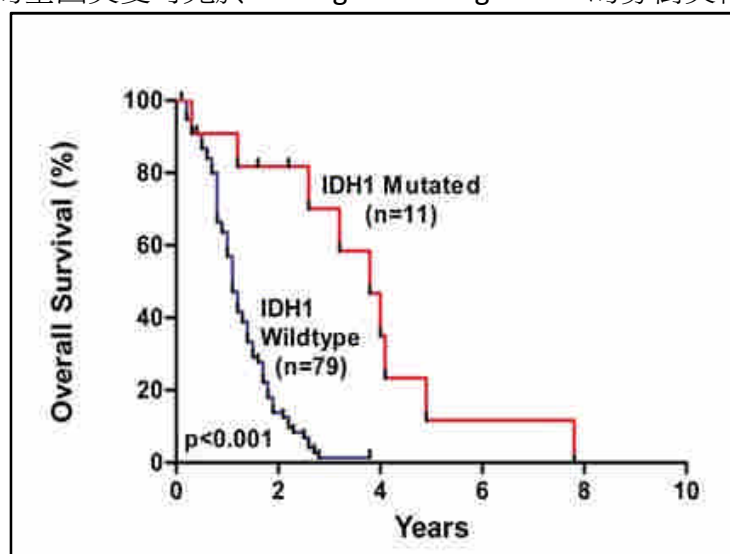
†Specimens derived from initial surgical resection.

‡Specimens derived from non-initial surgical resection.

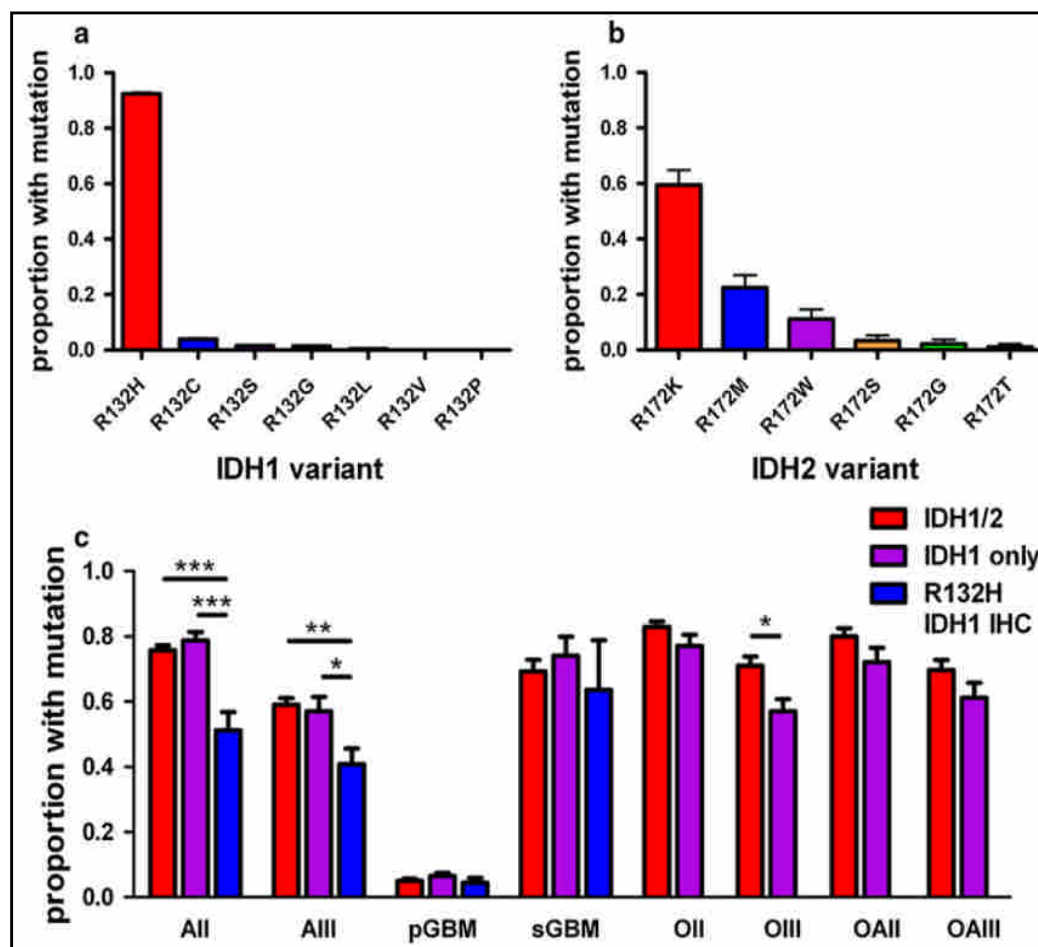
## 2. 神經膠瘤 (glioma) 的 IDH1/2 (isocitrate dehydrogenase 1 and isocitrate dehydrogenase 2) 基因變異

IDH1 或 IDH 2 的基因突變可見於 WHO grade II or grade III 的寡樹突神經

膠瘤、星形神經膠瘤、混合性寡樹突及星形神經膠瘤、和 WHO grade IV 的次發性 (secondary) 膠質母細胞瘤，而原發性 (primary) 膠質母細胞瘤 和毛狀星形神經膠瘤



(pilocytic astrocytoma)則極少見到這兩個基因的突變。因此，IDH1/2 基因變異已普遍作為以上腫瘤的鑑別診斷工具之一；再者，具有 IDH1 或 IDH 2 的基因突變的腫瘤，比起同型態卻沒有突變的腫瘤，其病人的整體存活率較佳(見上圖)，所以 IDH1/2 基因變異也有預後參考的價值。如下圖所示，IDH1 的好發基因突變位置造成 IDH1 蛋白的第 132 個胺基酸 – 精胺酸 (arginine, R) 的轉變，有約 90% 的突變例是這個精胺酸突變成為組胺酸 (histidine, H)。目前已有針對 IDH1 R132H 突變蛋白

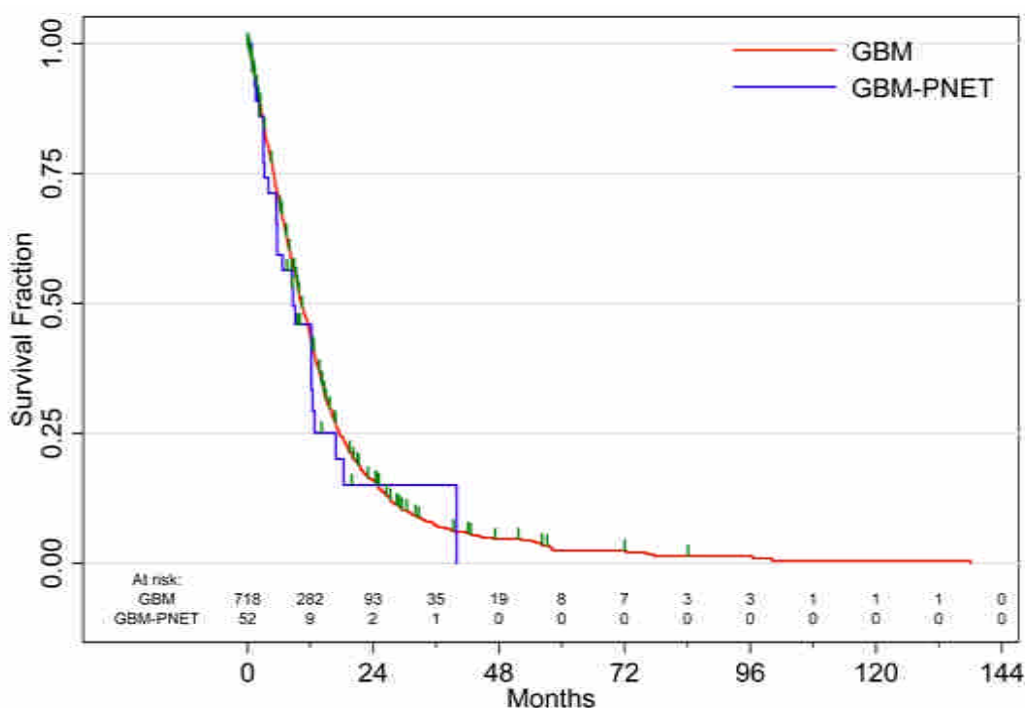
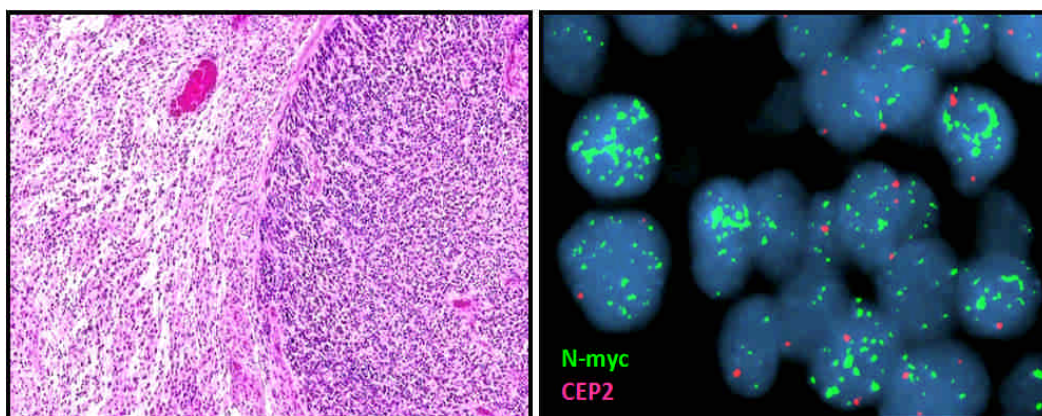


的抗體面市，UCSF 神經病理部門目前的做法，常規性地對所有 WHO grade II or grade III 的寡樹突神經膠瘤、星形神經膠瘤、混合性寡樹突及星形神經膠瘤、膠質母細胞瘤皆實施 IDH1 R132H 突變蛋白免疫染色，而染色陰性的病例，若臨床醫師認為需要，再進一步用聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 和基因序列分析 (gene sequencing) 檢驗 IDH1 或 IDH 2 的基因突變狀態。

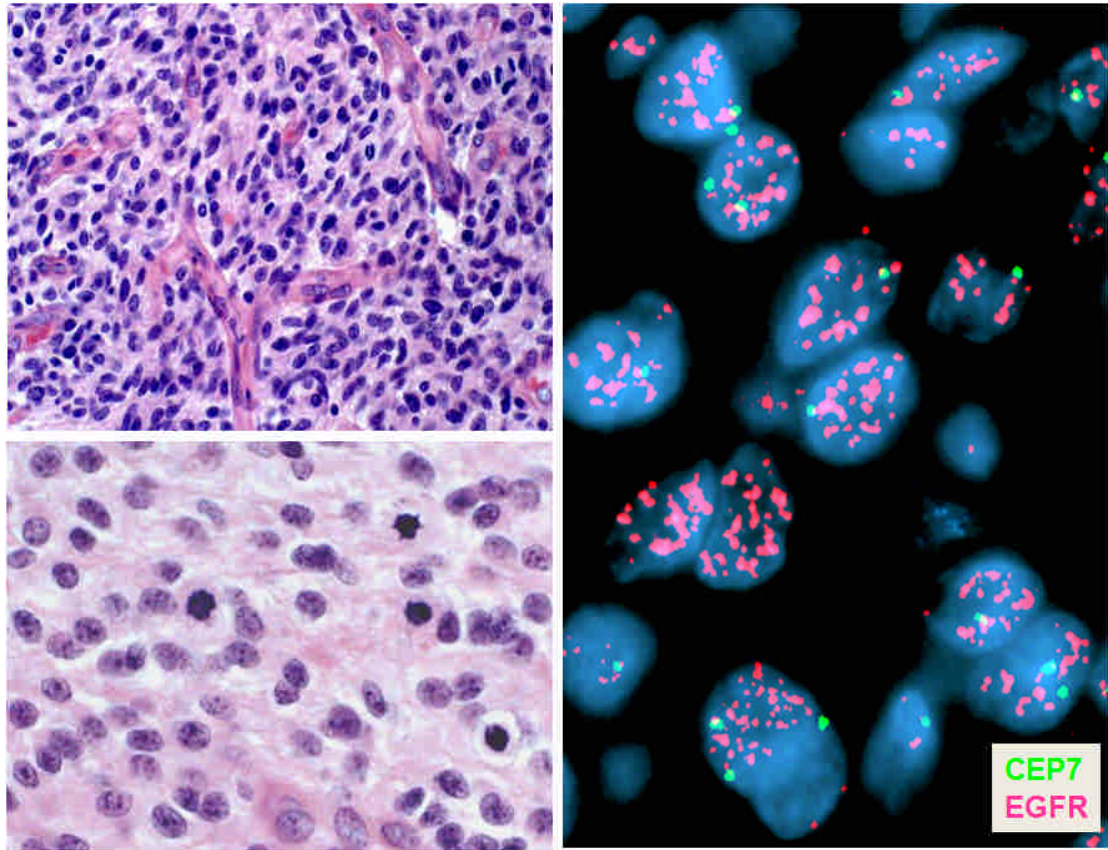
### 3. 膠質母細胞瘤 (glioblastoma)

膠質母細胞瘤(舊稱多形性膠質母細胞瘤, glioblastoma multiforme )是好

發於年長成人的高度惡性腦部腫瘤，有幾種特殊的形態學亞型會伴有特定的基因變異，也影響病人的預後和對治療方針的選擇。除了前述提到的 WHO grade IV glioblastoma with oligodendroglioma component 相較於同期之 WHO grade IV 膠質母細胞瘤更為良好，因而必須做 1p/19q FISH 確定此亞型之診斷之外，glioblastoma with PNET-like foci 這個膠質母細胞瘤亞型(見下圖)病程進展比一般膠質母細胞瘤快，常具有 10q deletion、N-myc gene amplification

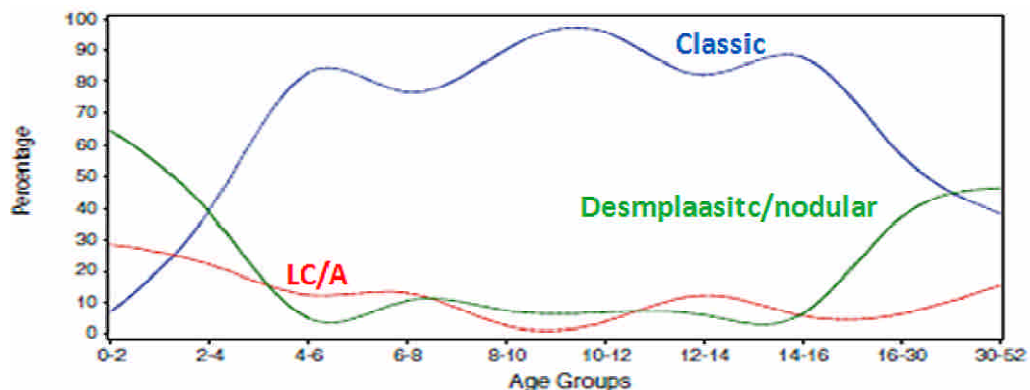


或 c-myc gene amplification 等變異，可利用 FISH 技術配合腫瘤型態作確診，提供臨床醫師積極治療的依據。另外，Small cell variant glioblastoma 這個預後較差的亞型，常伴有 EGFR gene amplification、10q deletion，也必須利用 FISH 技術偵測染色體或基因變異(見下頁圖)。



#### 4. 髓母細胞瘤 (medulloblastoma)

髓母細胞瘤為好發於兒童的高度惡性腦部腫瘤，約有 75% 的病例發生在 10 歲之前。髓母細胞瘤在病理型態學上有四種亞型：classic medulloblastoma、desmoplastic/nodular medulloblastoma、medulloblastoma with extensive nodularity、large cell/anaplastic medulloblastoma，這四類好發的年齡層略有



不同(見上圖)。以疾病的惡性度和預後而言，desmoplastic/nodular medulloblastoma 是預後較佳的亞型，而 large cell/anaplastic medulloblastoma 是進展最快、需要立即而積極化學放射治療的亞型。根據基因及訊息傳導路徑的變異，2010 年的 medulloblastoma 共識會議把髓母細胞瘤分成四類：

Subtype	WNT	SHH	Group C	Group D
% of medulloblastoma	10%	25%	30%	35%
Histology	Classic	Classic or desmoplastic	Classic or LC/A	Classic or LC/A
Cytogenetics	Monosomy 6	9q loss	Isochromosome 17q	Isochromosome 17q
Molecular markers	Beta-catenin	SFRP1 GAB1	MYC amplification	MYCN amplification
Metastasis	Rare	Rare	Frequent	Frequent
Clinical strategy	Reduction in therapy	SHH pathway inhibitors	Intensified therapy	Research still needed

雖然傳統針對髓母細胞瘤的化學治療及放射線治療已延長了髓母細胞瘤病人的存活率，但化學治療及放射線治療也為部分年幼病人帶來長期的神經系統後遺症，使得他們的心智能力低於一般。因此，針對腫瘤分子變異的標靶藥物被視為新的較低毒性治療選擇之一。舉 SHH medulloblastoma 為例，這幾年陸續有數件大型跨國臨床試驗，使用有別於傳統化學治療的藥物去治療這個亞型的髓母細胞瘤，例如針對 SHH 受體 Smoothened 的拮抗劑之一 GDC-0449。以上這個例子，說明了分子變異檢測的建置乃是當務之急。

## 心得：

在 UCSF 的進修期間，印象深刻的除了醫療人員間專業團隊合作提供了高水準的臨床病人照護之外，這所醫院對於醫學生、住院醫師、次專科訓練的扎實，著實能吸引絡繹不絕的醫師及學者去參觀進修。這項對教學研究的注重，更是大學醫院在提供臨床醫療服務之外的貢獻所在。

UCSF 的人力配置對比於臨床服務量，比起臺灣絕大多數的醫院都充裕許多，一方面是美國醫療保險的收費足以支持這樣的醫療人力，切實的分級轉診制度也使得 UCSF 這樣的大學醫院免於被過量的病人飽和、癱瘓，才能維持一貫高品質的教學研究功能。這樣的情景，希望有朝一日也能在臺灣的大學醫院見到。

## 建議事項：

目前健保給付的制度，許多檢查項目均不給付。然而，許多疾病的病理學正確診斷及分子檢查，絕非區區四、五項健保支付的免疫染色檢查費用即可達成的。以臺灣各醫學中心的水準，這些分子病理檢查的技術並不難達成，可惜的是礙於分子病理檢查的成本，並非每位病人皆能負擔昂貴的自費分子變異檢查，進而限縮了分子病理檢查的建置與發展。從病人和臨床醫師的角度而言，接受一項手術之後取得的病理標本，理應能夠提供最佳的治療及預後參考。

然而現今健保制度的設計，顯然對於支付其他常見癌症的標靶治療藥物多所限制，遑論更少見的神經系統腫瘤。在政策投入所謂發展國際醫療之時，希望能有更多的資源進行如分子診斷這些長遠的、一時無法看出成果的扎根工作，才不會因發展不均使整體醫療發展遭遇瓶頸。

## 參考資料：

Archer TC, Pomeroy SL. Medulloblastoma biology in the post-genomic era. *Future Oncol.* 2012 Dec;8(12):1597-604.

Buckner JC, Gesme D Jr, O'Fallon JR, et al. Phase II trial of procarbazine, lomustine, and vincristine as initial therapy for patients with low-grade oligodendroglioma or oligoastrocytoma: Efficacy and associations with chromosomal abnormalities. *J Clin Oncol.* 2003;21(2):251-255.

Horbinski C. What do we know about IDH1/2 mutations so far, and how do we use it? *Acta Neuropathol.* 2013;125:621-636

Jones DT, Jäger N, Kool M, Zichner T, Hutter B, Sultan M, et al. Dissecting the genomic complexity underlying medulloblastoma. *Nature* 2012;488 (7409): 100-105.

Kramar F, Zemanova Z, Michalova K, et al. Cytogenetic analyses in 81 patients with brain gliomas: correlation with clinical outcome and morphological data. *J Neurooncol.* 2007;84(2):201-211.

Olson JM. Therapeutic opportunities for medulloblastoma come of age. *Cancer Cell.* 2014 Mar 17;25(3):267-9.

Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 2008;321(5897):1807-12.

Perry A, Fuller CE, Banerjee R, et al. Ancillary FISH analysis for 1p and 19q status: Preliminary observations in 287 gliomas and oligodendroglioma mimics. *Front Biosci.* 2003;8:1-9

Smith JS, Perry A, Borell TJ, et al: Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixedoligoastrocytomas. *J Clin Oncol* 2000;18(3):636-645

Wharton SB, Maltby E, Jellinek DA, et al. Subtypes of oligodendroglioma defined by 1p,19q deletions, differ in the proportion of apoptotic cells but not in replication-licensed non-proliferating cells. *Acta Neuropathol.* 2007;113(2):119-127.