

國立臺灣大學醫學院醫學檢驗暨生物技術學系

碩士論文

Department of Clinical Laboratory Sciences and Medical Biotechnology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

台灣地區神經母細胞瘤 *ALK* 基因多型性及

基因突變分析

Analysis of Genetic Polymorphisms and Mutations on
ALK Gene in Neuroblastoma in Taiwanese Population

陳蔓潔

Man-Chieh Chen

指導教授：胡忠怡 博士

Advisor: Chung-Yi Hu, Ph.D.

中華民國 105 年 7 月

July, 2016





國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

台灣地區神經母細胞瘤 *ALK* 基因多型性及基因突變分析

Analysis of Genetic Polymorphisms and Mutations on *ALK* Gene
in Neuroblastoma in Taiwanese Population

本論文係陳蔓潔君 (R03424020) 在國立臺灣大學醫學檢驗暨生物技術學系、所完成之碩士學位論文，於民國 105 年 07 月 18 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

胡忠怡

(簽名) (指導教授)

林長音

盧正祐


劉彥麟

郭遠輝

系主任、所長

林長音

致謝




兩年的時間一下就過去了，能完成這篇論文首先要感謝我的指導教授胡忠怡老師在實驗過程所給予的指導及建議，並且在老師身上學習到許多學術知識。感謝台大醫院神經母細胞瘤照護團隊—許文明醫師、盧孟佑醫師、劉彥麟醫師、周獻堂醫師以及張修豪醫師，提供我珍貴的神經母細胞瘤樣本以及病人臨床資料做為研究材料並且讓我有機會參與神經母細胞瘤的國際研討會，使我受益良多。其中特別感謝盧孟佑醫師、劉彥麟醫師在 committee 上的建議以及為我解決一些與神經母細胞瘤相關的問題，還有助理楊彩姍學姊在檢體與臨床資料上的協助，對於論文的完成有很大的幫助。感謝標靶課與 committee 時，林亮音老師、郭遠燁老師、歐大諒老師以及顧雅真老師在研究過程中所給予的建議及論文完成的指導。另外，感謝 R304 的成員們—佩蓉學姊、馨瑩學姊與佳瑋兩年來的照顧與實驗上的幫助；文博帶給實驗室許多的歡樂及笑聲，還有新來的學弟妹—映辰、克巍，很高興認識你們。最後，我要感謝我的家人—爸爸、媽媽、哥哥以及世彥，有你們的支持和陪伴我才能順利完成學位，謝謝你們！

摘要




神經母細胞瘤(Neurolblastoma, NB)是源自於交感神經系統前驅細胞的胚胎性惡性腫瘤。罹患第四期 NB 的病童即使遵循常規治療預後仍差，其五年存活率低於 40%，亟待找出更有效的治療標的物。多年來在 NB 的研究都指出造成治療失敗的特徵是腫瘤具有 *MYCN* 增幅。近年來許多研究認為 *ALK* (Anaplastic lymphoma kinase)可能是另一個與 NB 致病相關的重要基因：臨床上發現 high-risk NB 若高度表現 *ALK*，其病患存活率低於不表現 *ALK* 者。造成 *ALK* 基因異常表現的原因除了 *ALK* 基因 gain/amplification (12.2% / 1.5% in NB)，尚與 *ALK* 基因突變(8% in NB)或其他未知原因有關。*ALK* 是一酪胺酸激酶接受器 (receptor tyrosine kinase)，當 *ALK* 的 tyrosine kinase domain 發生突變(如:F1174、F1245 及 R1275)會造成 *ALK* 過度活化，誘導細胞趨於癌化。*ALK* 基因的調控經常與 *MYCN* 做連結，研究指出 *ALK* 的活化能促進 *MYCN* 表現；而 *MYCN* 亦能促進 *ALK* 轉錄表現。以 *ALK* 作為標的物的小分子抑制劑 Crizotinib，臨床上已使用於有 *ALK* 轉位突變的非小細胞肺癌(NSCLC)之治療。在細胞實驗及小鼠 xenograft 模型中 Crizotinib 皆能有效抑制 NB 細胞及腫瘤生長，使 *ALK* 抑制劑具潛力為 high-risk NB 提供有效的輔助治療。然而，具有 *ALK* F1174 突變的轉殖小鼠 NB 動物模型中，Crizotinib 無法抑制腫瘤發展，顯示 *ALK* 抑制劑對某些 *ALK* 突變的 NB 抑制效果不好；若改採用 *ALK* 小分子抑制物 TAE-684 則具有抑制 *ALK* F1174 突變的 NB 腫瘤。本研究目的為檢查台灣地區神經母細胞瘤中 *ALK* 基因表現及突變情形。將目前收集到 34 位健康成人 PBMC 以及 61 例 NB 病患檢體，針對 *ALK* 基因 Exon20~25 區域(kinase domain) 及與其相鄰之 Intron 部分分段進行 PCR，並進行核酸定序(Sanger's sequencing)。在 61 例 NB 樣本中發現 7 例(11.3%)有 *ALK* 突變：3 例為 F1174L 突變、3 例為 F1245 突變，1 例 A1274T 突變，未見到 R1275 突變；在 Exon20~25 中發現 6 個單一核苷酸多型性(SNPs)(3 個 SNPs 位於外顯子之同義 SNPs；3 個 SNPs 位在 Intron20 及 Intron25)，此 6 個 SNPs 變異型基因分布頻率在 NB 腫瘤與正常 PBMC 無差異。



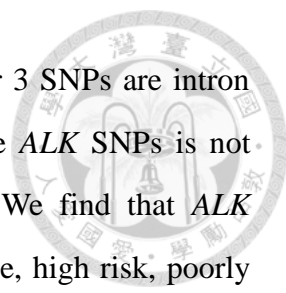
將 *ALK* 基因突變與病人臨床資料進行分析，發現 *ALK* 基因突變與惡性 NB(advanced stage、high risk、poorly differentiation、*MYCN* amplification)有關聯性。腫瘤帶有 *ALK* 突變病患存活率較差(EFS：HR 4.2， $p=0.0021$ ；OS：HR 5.6， $p=0.0015$)。並且在 advanced stage、high-risk NB 的次群分析中，帶有 *ALK* 突變的腫瘤病患顯著有存活期較短。以 *ALK* 基因表現量與病人臨床資料進行分析，*ALK* 高度表現在腫瘤細胞分化程度低的 NB(UNB、PDNB)較顯著($p=0.0012$)，其餘預後因子皆與 *ALK* 表現量高或低較無關聯。而 *ALK* 基因表現量與 *MYCN* 基因表現具有高度正相關($r=0.5831$ ， $p<0.0001$)，但與 *ALK* 基因突變或基因多型性無顯著關聯。分析 *ALK* 基因表現量與 NB 病人存活率，結果則顯示腫瘤中 *ALK* 表現量高與病人存活率較差(EFS：HR 2.3， $p=0.0600$ ；OS：HR 4.8， $p=0.0240$)。透過本研究一系列實驗數據與臨床資料的統計分析，我們得知：(1) *ALK* 基因突變常出現在惡性神經母細胞瘤，病患的預後較差；在惡性(advanced stages, high risk)神經母細胞瘤中，*ALK* 突變為造成疾病較快進展的重要因子。透過檢測病患腫瘤是否具 *ALK* 基因突變及為何種突變，能在診斷早期預測病人的預後及選擇何種 *ALK* 抑制劑作為病患的輔助治療。(2) 不論 *ALK* 基因是否突變，神經母細胞瘤腫瘤皆可能有 *ALK* 高度表現；而 *ALK* 的高表現量在 *ALK*^{WT} 及 *ALK*^{Mut+} 病患中皆可發現。(3) 在 NB 腫瘤中 *ALK* 表現與 *MYCN* 表現呈顯著正相關。(4) 腫瘤中 *ALK* 表現量高為不良預後因子。(5) 國人的 NB 病例帶有對 Crizotinib 具抗藥性的 *ALK* F1174L 突變比例較國外為高，未來若要使用 *ALK* 抑制劑治療國人神經母細胞瘤，*ALK* 基因 kinase domain 突變之篩檢將十分重要。

關鍵字：神經母細胞瘤、*ALK* 基因、突變，臨床預後。

Abstract



Neuroblastoma (NB) is an embryonal malignancy derived from precursor cells of the sympathetic nervous system. Children suffer from the stage 4 disease display a poor 5-years survival (less than 40%) even following multi-modality treatments. For years, studies of neuroblastoma show that *MYCN* gene amplification consistently associated with treatment failure. Recently, anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) has been evolved as an important factor in carcinogenesis of neuroblastoma. Previous studies showed that NB with high *ALK* immune reactivity was associated with clinical outcome. Aberration in *ALK*, including *ALK* gene gain/ amplification (12.2%/ 1.5% in NB), *ALK* gene mutations (8% in NB) and others, makes *ALK* the second most commonly mutated gene in neuroblastoma. *ALK* is a receptor tyrosine kinase, mutations on the tyrosine kinase domain of *ALK* (eg. F1174, F1245, and R1275), would cause *ALK* overactivation and predispose to carcinogenesis. *ALK* and *MYCN* showed regulatory loop: *ALK* was able to stimulate *MYCN* promoter via activation of ERK signaling, and *MYCN* was found to bind onto *ALK* promoter region to regulate *ALK* transcription. Targeting to *ALK*, by small molecular inhibitor, Crizotinib has been applied in the treatment of NSCLC harboring *ALK* translocation. In cell experiments and mice xenograft model, crizotinib can also inhibit the growth of NB cell lines and NB tumors and make *ALK* inhibitors a potential effective adjuvant therapy for high-risk NB. However, in the *MYCN*-transgenic mice harboring *ALK* F1174 mutation, Crizotinib couldn't inhibit the development of NB tumor, point out that Crizotinib is ineffective in inhibit *ALK* with certain mutation within kinase domain. *ALK* inhibitors have limitation in treatment. The goal of this research is to inspect the situation on *ALK* gene expression and mutations in neuroblastoma in Taiwan. 61 NB tumor samples and PBMCs from 34 healthy adults were analyzed, PCR amplification of *ALK* gene fragments spanning exon20 to exon25 and their neighboring intronic regions, followed by Sanger's sequencing. In 61 tumor DNA samples, 7 (11.3%) were found to have heterozygotic *ALK* mutation: 3 F1174L mutation, 3 with F1245 mutation, 1 with A1274T mutation, but there is no R1275 mutation found. Moreover, we find 6 SNPs in exon20 to 25 of *ALK* gene, 3 SNPs are



synonymous variants which located in exon20, 21 and23; the other 3 SNPs are intron variants, located in intron20 and 25. The allelic distribution of the *ALK* SNPs is not significantly different between NB tumors and normal PBMCs. We find that *ALK* mutation is associated with adverse clinical features (advanced stage, high risk, poorly differentiation, and *MYCN* amplification), and inferior survival (EFS: HR 4.2, $p=0.0021$; OS:HR 5.6, $p=0.0015$). Subset analysis of advanced stage, high-risk NB showed that patient harboring *ALK* mutation displayed a shorter 5-year survival. Relative mRNA expression of *ALK* and *MYCN* were determinate by q-RT-PCR. *ALK* expression was found positively correlated with *MYCN* gene expression ($r=0.5831$, $p<0.0001$). High *ALK* expression was associated with undifferentiated/ poorly differentiated NB ($p=0.0012$), but not with *ALK* mutation, *ALK* genetic polymorphism, nor other clinical features. We found *ALK* high expression correlated with worse patients' survival (EFS: HR 2.3, $p=0.0600$; OS: HR 4.8, $p=0.0240$).

In Summary, we obtain information in our research: (1) *ALK* gene mutation occurs in NB with adverse clinical features. Further, *ALK* mutation is an important factor that cause faster disease progression in advanced stage and/or high-risk NB. Detection of *ALK* mutational spectrum in early diagnosis, could predict patients' prognosis and choice suitable *ALK* inhibitor as adjuvant therapy in neuroblastoma. (2) *ALK* high expression could exist in *ALK* WT or mutant⁺ tumors. *ALK* high expression was not necessary found in *ALK*^{Mut+} tumor. (3) *ALK* expression is highly correlated with *MYCN* expression in NB tumor, (4) High *ALK* expression in NB tumor predicts poor clinical outcomes. (5) *ALK* F1174L (known Crizotinib-resistant) is a prevalent type of mutation in NB in Taiwan. Screening *ALK* mutation to evaluate the use of *ALK* inhibitor as therapeutics is very important for NB patients in Taiwan.

Keyword: Neuroblastoma, *ALK* gene, mutation, clinical outcome.

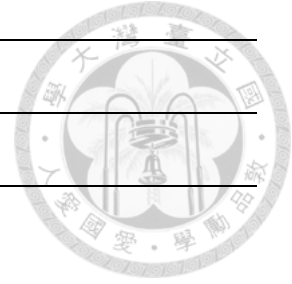
縮寫表



縮寫	全名
Ala (A)	Alanine
ALCL	Anaplastic large cell lymphomas
ALK	Anaplastic lymphoma kinase
A-loop	Activation loop
AUC	Area under the ROS curve
cDNA	Complementary DNA
CRC	Colorectal cancer
CT	Computed tomography
DNB	Ddifferentiating nerroblastoma
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EFS	Event-free survival
ESCC	Esophageal squamous cell carcinoma
EtBr	Ethidium bromide
EtBr	Ethidium bromide
FH	Favorable histology
Gly (G)	Glycine
GN	Ganglioneuroma
GNB	Ganglioneuroblastoma
HMGA1	High mobility group AT-hook 1
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
HVA	Homovanillic acid
ID2	Inhibitor of DNA binding 2
IDRF	Image defined risk factors

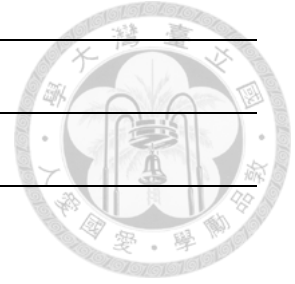


縮寫	全名
IHC	Immunohistochemistry
Ile (I)	Isoleucine
IMT	Inflammatory myofibroblastic tumor
INPC	International Neuroblastoma Pathology Classification
INRGSS	International Neuroblastoma Risk Group Staging System
INSS	International Neuroblastoma Staging System
IRB	The Institutional Review Board
LB	Ligand-binding domain
LDH	Lactate dehydrogenase
Leu (L)	Leucine
LIF	Leukemia inhibitory factor
LTK	Leukocyte receptor tyrosine kinase
MAM	Meprin, A5 protein, and protein phosphatase μ
MgCl ₂	Magnesium chloride
miBG	Metaiodobenzylguanidine
MK	Midkine
MKI	Mitosis-karyorrhexis index
MRI	Magnetic resonance imaging
MYCN	v-myc avian myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived
NaCl	Sodium chloride
NB	Neuroblastoma
NPM1	Nucleophosmin
NSCLC	Non-small cell lung cancer
NSE	Neuron-specific enolase

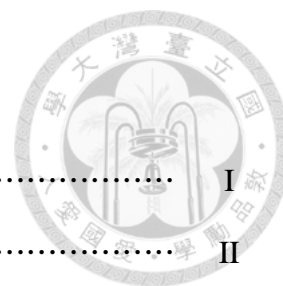


縮寫	全名
ODC	Ornithine decarboxylase
OS	Overall survival
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PDNB	poorly differentiated neuroblastoma
Phe (F)	Phenylalanine
PK	Proteinase K
pNTs	Peripheral neuroblastic tumors
Pro (P)	Proline
PT	Pleiotrophin
PTK	Protein tyrosine kinase
qPCR	Real-time PCR
RBCL	Red blood cell lysis buffer
RCC	Renal cell carcinoma
RMC	Renal medullary carcinoma
ROC	Receiver operating characteristic
RT-PCR	Reverse Transcription-PCR
SDHA	Succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SNP	Single-nucleotide polymorphism
TBE Buffer	Tris-borate-EDTA buffer
TH-MYCN	Tyrosine hydroxylase promoter-MYCN
Thr (T)	Threonine
TKD	Tyrosine kinase domain

TM	Transmembrane domain
縮寫	全名
Tris-Cl	Tris base. HCl
UD	Undefined
UH	Unfavorable histology
UNB	Undifferentiated neuroblastoma
Val (V)	Valine
VMA	Vanillylmandelic acid
WT	Wild type



目錄



致謝	I
摘要	II
Abstract	IV
縮寫表	VI
目錄	X
表目錄	XIV
圖目錄	XV
附錄目錄	XVI
第一章 緒論	1
1.1 神經母細胞瘤	1
1.1.1 神經母細胞瘤簡介	1
1.1.2 神經母細胞瘤的致病機轉	1
1.1.3 神經母細胞瘤的臨床表現	2
1.1.4 神經母細胞瘤的診斷與分期	2
1.1.5 神經母細胞瘤的病理特徵	3
1.1.6 神經母細胞瘤的治療	4
1.1.7 神經母細胞瘤的分子標記及預後指標	5
1.2 Anaplastic lymphoma kinase (ALK)基因	7
1.2.1 ALK 基因的簡介	7
1.2.2 ALK 基因的腫瘤學歷史	8
1.2.3 ALK 基因與神經母細胞瘤	9
1.2.4 ALK 基因的調控	10
1.2.5 ALK 抑制劑在神經母細胞瘤中的潛力	10
1.3 研究假說	11



第二章 研究目的與實驗設計.....	12
2.1 研究目的.....	12
2.2 實驗設計.....	12
第三章 材料與方法.....	13
[實驗材料].....	13
3.1 臨床檢體.....	13
3.2 試劑、試藥、試劑套組與工作清單.....	13
3.2.1 試劑試藥清單.....	13
3.2.2 試劑套組.....	14
3.2.3 試劑配方.....	14
(a) DNA 製備.....	14
(b) Polymerase Chain Reaction (PCR).....	15
3.2.4 聚合酶連鎖反應之引子序列.....	15
(a) <i>ALK</i> 基因.....	15
(b) Control gene.....	16
3.2.5 反轉錄聚合酶連鎖反應/即時定量反轉錄聚合酶連鎖反應之引子.....	16
(a) <i>ALK</i> 基因.....	16
(b) <i>MYCN</i> 基因.....	16
(c) Control gene.....	16
3.2.6 實驗儀器.....	17
3.2.7 軟體與網路工具.....	17
[實驗方法].....	18
3.3 檢體 DNA、RNA 製備.....	18
3.3.1 傳統常規 DNA 萃取.....	18
3.3.2 傳統常規 RNA 萃取.....	18

3.3.3 以 DNA、RNA 及蛋白質萃取套組萃取神經母細胞腫瘤樣本·····	18
3.3.4 cDNA 製備·····	19
(a) SuperScript® III First-Strand Synthesis System·····	19
(b) Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit with dsDNase·····	19
3.4 聚合酶連鎖反應引子設計·····	19
3.5 聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)·····	19
3.6 反轉錄聚合酶連鎖反應 (Reverse Transcription-PCR, RT-PCR)·····	20
3.7 聚合酶連鎖反應產物純化與定序·····	20
3.8 即時定量聚合酶連鎖反應·····	20
3.9 數據統計分析·····	20
第四章 結果·····	22
[臨床資料及檢體收案情形]·····	22
4.1 神經母細胞瘤預後因子與病患存活率之分析·····	22
4.2 <i>ALK</i> 基因突變及基因多型性分析·····	23
4.2.1 神經母細胞瘤病人腫瘤中 <i>ALK</i> 基因突變分析·····	23
4.2.2 <i>ALK</i> 突變基因型的表現·····	23
4.2.3 神經母細胞瘤病人 <i>ALK</i> 基因突變與預後分子相關性之分析·····	24
4.2.4 <i>ALK</i> 基因多型性分析·····	25
4.3 <i>ALK</i> 基因表現量分析·····	26
4.3.1 神經母細胞瘤中 <i>ALK</i> 基因表現量之分析·····	26
4.3.2 <i>ALK</i> 基因表現量與神經母細胞瘤預後因子之關聯性·····	27
4.3.3 <i>ALK</i> 基因表現量與 <i>ALK</i> 基因突變之關聯性·····	28
4.3.4 <i>ALK</i> 基因表現量與 <i>ALK</i> 基因多型性之關聯性·····	29
4.3.5 <i>ALK</i> 基因表現量與 <i>ALK</i> 組織化學染色之關聯性·····	29
4.3.6 <i>ALK</i> 基因表現量與 <i>MYCN</i> 基因增幅及其 <i>MYCN</i> 表現量之相關性分	

析.....	29
4.4 <i>ALK</i> 基因變異及基因表現量與神經母細胞瘤病患存活率之分析.....	30
4.4.1 <i>ALK</i> 基因突變與神經母細胞瘤病患不良存活率具顯著相關性.....	30
4.4.2 <i>ALK</i> 基因多型性與神經母細胞瘤病患存活率之相關性.....	32
4.4.3 <i>ALK</i> 基因表現與神經母細胞瘤病患存活率之相關性.....	32
第五章 討論	33
第六章 參考文獻	38
圖與表	52
附錄	80



表目錄



表一、	臺大醫院神經母細胞瘤病人臨床資料.....	53
表二、	61例神經母細胞瘤病人腫瘤中 ALK 基因突變情形.....	54
表三、	神經母細胞瘤病人 ALK 基因突變與預後分子之分析.....	55
表四、	國人神經母細胞瘤腫瘤與健康成人 PBMCs 中 ALK 基因多型性分布.....	56
表五、	ALK 基因表現量與神經母細胞瘤預後因子之統計結果.....	57
表六、	ALK 基因表現量與 ALK 基因多型性之統計結果.....	58
表七、	ALK 基因多型性與神經母細胞瘤病患無事件存活率(EFS)之統計結果.....	59
表八、	ALK 基因多型性與神經母細胞瘤病患整體存活率(OS)之統計結果.....	60

圖目錄



圖一、	神經母細胞瘤預後因子與事件發生存活率(EFS)及整體存活率(OS)之關係.....	61
圖二、	<i>ALK</i> 基因突變熱點之分佈情形.....	62
圖三、	帶有神經母細胞瘤病人腫瘤及細胞株 DNA 與 cDNA 樣本之 <i>ALK</i> 突變點核酸定序.....	63
圖四、	神經母細胞瘤病人腫瘤中 <i>ALK</i> 基因多型性之核酸定序結果.....	64
圖五、	<i>ALK</i> 免疫化學染色與 <i>ALK</i> 表現量之 ROS 曲線.....	66
圖六、	神經母細胞瘤病人腫瘤中 <i>ALK</i> 基因表現量分佈圖.....	67
圖七、	<i>ALK</i> 基因表現量與神經母細胞瘤預後因子之關係.....	68
圖八、	<i>ALK</i> 基因表現量與 <i>ALK</i> 基因突變之分析.....	69
圖九、	<i>ALK</i> 基因表現量與 <i>ALK</i> 基因多型性之分析.....	70
圖十、	<i>ALK</i> 基因表現量與 <i>ALK</i> 組織化學染色之關聯性.....	71
圖十一、	<i>ALK</i> 基因表現量與 <i>MYCN</i> 基因表現量之關係.....	72
圖十二、	<i>ALK</i> 基因突變與神經母細胞瘤病患不良存活率相關.....	73
圖十三、	<i>ALK</i> 基因突變與惡性神經母細胞瘤及病患不良存活率相關.....	74
圖十四、	<i>ALK</i> 基因多型性與神經母細胞瘤病患存活率之相關性.....	77
圖十五、	<i>ALK</i> 基因表現與與神經母細胞瘤病患存活率之相關性.....	79

附錄



附錄一、	神經母細胞瘤的臨床表現.....	81
附錄二、	國際神經母細胞瘤分期系統 (International Neuroblastoma Staging System, INSS).....	82
附錄三、	國際神經母細胞瘤病理學分類 (International Neuroblastoma Pathology Classification, INPC).....	83
附錄四、	神經母細胞瘤影像限定之風險因子(Image defined risk factors, IDRFs).....	84
附錄五、	國際神經母細胞瘤風險群分期系統(International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Staging System).....	85
附錄六、	INRG Consensus Pretreatment Classification schema.....	86
附錄七、	<i>ALK</i> 基因結構、 <i>ALK</i> 融合基因及 <i>ALK</i> 基因的腫瘤學歷史.....	87
附錄八、	以 NB 病患存亡與 <i>ALK</i> 表現量進行 ROC 作圖之靈敏度及特異性結果.....	88
附錄九、	<i>ALK</i> A1274T 突變(rs45502292)位於 <i>ALK</i> 基因 TKD 活化位.....	89
附錄十、	<i>ALK</i> A1274 位點(rs45502292)在各物種間具高度相似性.....	90
附錄十一、	<i>ALK</i> 免疫組織化學染色與神經母細胞病患存活率之關聯性.....	91
附錄十二	以 <i>ALK</i> IHC 與 <i>ALK</i> 表現量進行 ROC 作圖及其之靈敏度和特異性之結果.....	92
附錄十三	實驗步驟.....	93



第一章 緒論


1.1 神經母細胞瘤

1.1.1 神經母細胞瘤簡介

神經母細胞瘤是源自於交感神經系統的前驅細胞在發育過程中產生突變所導致的惡性腫瘤，大約有一半的神經母細胞瘤源自後腹腔，好發於腎上腺髓質或交感神經節以腹部腫瘤形式出現，其餘則發生於胸部、頭部或骨盆之椎旁交感神經節¹⁻³。神經母細胞瘤是兒童第四種常見的癌症，佔所有兒童癌症發生率的 6-8%，僅次於白血病(30-34%)、腦瘤或中樞神經系統方面腫瘤(19-25%)以及惡性淋巴瘤(10-12%)⁴⁻⁶。對於因惡性腫瘤死亡的案例中，神經母細胞瘤便佔了兒童致死率的 15%^{1,7}。世界各地報導的 NB 發生率皆類似，根據美國 National Cancer Institute 統計，每年會出現 700 個新案例；新生兒患病率(prevalence)是 1/7000，年發生率則為每百萬人中大約出現 10 個案例⁸⁻¹²。而根據台灣兒童癌症基金會統計，神經母細胞瘤的年發生率約 1/10,000，每年會出現 30 個新案例^{13,14}。神經母細胞瘤平均發病年紀為 18 個月，大約有 40% 患者於 1 歲以前發病、75% 患者於 4 歲以前發病，98% 患者皆是 10 歲以前發病^{2,8}。目前對於神經母細胞瘤的病因仍不明朗，但似乎與後天環境因子無關。大部分病童腫瘤多為自發性產生，視為偶發性案例；只有少數患者屬於家族遺傳，通常在相當小年紀便具有多灶性原發性腫瘤，視為家族性案例^{1,15}。

1.1.2 神經母細胞瘤的致病機轉

從病理學角度而言，神經母細胞瘤屬於周邊神經母細胞腫瘤(peripheral neuroblastic tumors, pNTs)之一，其腫瘤中的細胞形態為小而藍的圓形細胞¹⁶。這些細胞源自交感神經系統前驅細胞，為交感腎上腺譜系中未分化的胚胎細胞(symphogonia)。這些多能的胚胎細胞(pluripotent symphogonia)遷移出神經嵴後便形成交感神經節、腎上腺髓質嗜鉻細胞以及副神經節，這也就是 pNTs 一般發生




的部位。然而，造成胚胎細胞(embryonal cells)持續存在進而於後來導致 pNTs 的機制目前尚不明瞭。神經母細胞瘤的成因可能是具有缺陷的胚胎基因控制著神經嵴的發育，進而造成胚胎細胞經歷不平衡增殖以及分化受擾¹⁷⁻¹⁹。這些缺陷造成正常的遺傳分化程序受到干擾，導致早期或晚期分化受到阻礙。以病理組織學角度，pNT 亞型便是依據腫瘤中細胞成熟度做區分，細胞形態可能以未分化的神經母細胞為主或是具有大量完全分化的神經元細胞，其外圍受許旺細胞緻密間質包覆。

1.1.3 神經母細胞瘤的臨床表現

神經母細胞瘤在臨床上的表現差異很大，神經母細胞瘤腫瘤能夠沿著交感神經系統而出現在任何部位(附錄一)²⁰，但主要發生在腎上腺髓質。原發腫瘤(primary tumor)若發生在脖子或上胸部會造成霍納氏綜合症(Horner's syndrom)，其臨床表現為上眼瞼下垂、瞳孔縮小以及無汗症；椎間神經母細胞瘤(Paraspinal neuroblastomas)其腫瘤沿著脊柱延伸至椎間孔(intervertebral foramina)，使得脊髓受到壓迫造成癱瘓；腹膜後大神經母細胞瘤(Large retroperitoneal neuroblastomas)腫瘤往往壓縮腎臟，而引起高血壓；其他若腫瘤在眼窩會造成眼球突出形成瘀斑(俗稱浣熊眼)，在長骨則會造成跛腳²¹。神經母細胞瘤一般是透過造血系統而轉移至周邊淋巴結以及骨髓，而轉移至骨髓的腫瘤細胞將浸潤骨皮質。此外，神經母細胞瘤也會轉移至肝臟，特別是罹患第 4S 期的神經母細胞瘤病患，腫瘤轉移致肝臟所涉及的影響便相當廣泛，但是這樣的腫瘤一般很短暫，多半在未經治療下即自發性消退(spontaneous regression)。

1.1.4 神經母細胞瘤的診斷與分期

目前對於神經母細胞瘤的診斷與分期的歸類是以 International Neuroblastoma Staging System (INSS)分類為基礎。神經母細胞瘤一開始診斷的測試包含了以斷層掃描(CT)或核磁共振攝影(MRI)評估原發腫瘤的大小和區域範圍以及是否侵犯至



其他器官。另外，miBG (metaiodobenzylguanidine，一種正腎上腺素的類似物)，可被交感神經元選擇性地吸收，因此使用放射性碘元素(I^{131} 和 I^{123})進行標定，便能特異性地偵測到神經母細胞瘤位置^{17,22}。後續的診斷會藉由腫瘤組織的病理切片做確認或是透過檢測病人尿液或血清中的兒茶酚胺(catecholamine)或兒茶酚胺代謝物，如多巴胺(dopamine)、高香草酸(homovanillic acid, HVA)及香草扁桃酸(vanillylmandelic acid, VMA)的濃度進行確認。大約 90%神經母細胞瘤腫瘤都會大量分泌兒茶酚胺代謝物，因為未分化型腫瘤(undifferentiated tumor)缺乏將兒茶酚胺轉換成 HVA 及 VMA 的酵素，因此尿液中 HVA 與 VMA 濃度會上升；而在分化不良腫瘤(poorly differentiated tumor)中 VMA-HVA 比值經常偏低(ratio<1)，並表示預後較差^{18,19,22,23}。

目前臨床上神經母細胞瘤的分期常使用 International Neuroblastoma Staging System (INSS)¹⁸ 做為臨床醫師開刀時的依據，在不切除重要器官及不讓病患毀容情況下將腫瘤切除，該分期如下所示：(另可見附錄二^{24,25})

Stage 1：屬於局部性腫瘤，可透過手術被完全切除且未出現淋巴結轉移現象。

Stage 2A：屬於局部性腫瘤，無法透過手術完全切除，未出現淋巴結轉移現象。

Stage 2B：屬於局部性腫瘤，不一定能透過手術完全去除，同側淋巴結具有轉移現象，異側淋巴結則不會轉移。

Stage 3：腫瘤擴散範圍已跨過身體中線，但不一定有淋巴結轉移；或腫瘤只出現在單側，但有淋巴結的遠端轉移；或腫瘤位在中線，並帶有兩側的淋巴結轉移。

Stage 4：腫瘤已轉移到遠端，如淋巴結、骨髓、肝臟、皮膚或其他器官。

Stage 4S：發病年紀小於一歲之病童，帶有 Stage 1 或 2 的局部性腫瘤，並且會特異地轉移致肝臟、皮膚以及骨髓中。

1.1.5 神經母細胞瘤的病理特徵

神經母細胞瘤透過病理組織的觀察，藉由判定腫瘤中細胞分化程度進而與疾



病預後做連結，一般細胞分化程度越高，病患的預後也越好。

在 International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC) 中，以年齡為基礎搭配組織形態學特徵，如神經膠間質(Schwannian stroma)發育程度、神經母細胞(neuroblast)分化程度以及有絲分裂-核碎裂指數(mitosis-karyorrhexis index, MKI)，將 pNTs 從預後好到預後差大致分成三大類^{22,26-28} (附錄三)：

- (1) **神經節細胞瘤(ganglioneuroma)**：細胞分化程度最高，其組織中神經膠間質佔的比例最高(Schwannian-stroma-dominant)；最良性，預後最好。
- (2) **神經節神經母細胞瘤(ganglioneuroblastoma)**：細胞分化程度次之；依照結節(nodule)與否可再細分成混合型(intermixed)，組織中富含神經膠間質(Schwannian-stroma-rich)以及結節型(nodular)，組織中神經膠間質比例不一，顯著、富含或鮮少都可能。
- (3) **神經母細胞瘤(neuroblastoma)**：細胞分化程度最低，組織中神經膠間質佔的比例也最少(Schwannian-stroma-poor)；最惡性，預後普遍較差。神經母細胞瘤可在向下細分成：未分化(undifferentiated)、分化不良(poorly differentiated)及分化中(differentiating)，一般細胞分化程度越差，表示腫瘤越惡性。

1.1.6 神經母細胞瘤的治療

一般神經母細胞瘤的治療是依據腫瘤風險性而有所不同，主要遵循國際神經母細胞瘤風險群分期系統(International Neuroblastoma Risk Group Staging System, INRGSS)²⁹，此分類法只應用於手術前拍攝之影像結果做分類依據，不以術後結果或是否擴散至淋巴結來歸類疾病分期。以此系統做疾病分期，需要具備判別影像界定風險因子(image defined risk factors, IDRF) (附錄四)是否存在的相關知識。INRG 分期系統初步將神經母細胞瘤分成 4 類(附錄五)：

Stage L1：屬於 low-risk neuroblastoma。腫瘤只出現在原發部位；在影像掃描，如斷層掃描(CT)或核磁共振(MRI)中未發現 IDRFs。治療方法為觀察後以手術切除腫



瘤。此類病患的五年整體存活率高達 97%³⁰。

Stage L2：屬於 intermediate-risk neuroblastoma。腫瘤尚未擴散至原發部位及其鄰近部位以外之區域；影像掃描可發現 IDRFs。通常在腫瘤切除前進行化學治療，而化療的劑量及頻率依據臨床及腫瘤的生物學風險因子與病患對化療的反應進行微調。近年來研究顯示對於一直沒有接受化療及腫瘤切除前觀察期的病患其三年整體存活率約 96%³¹，因此針對 stage L2 病患的治療原則是降低化療劑量及頻率來減少副作用。

Stage M：屬於 high-risk neuroblastoma。腫瘤以遠端轉移至身體其他器官。治療強度不斷加強，涵蓋了手術、化學治療、放射性治療、分化療法以及免疫療法，但此類病患的五年存活率仍約 40% 左右。


Stage MS：病患年紀低於 18 個月，而腫瘤轉移之部位只侷限於皮膚、肝臟、骨髓。

若將 INRG 分類系統結合臨床指標(INSS、發病年紀)、病理組織學指標(腫瘤細胞分化程度)、遺傳學指標(MYCN 增幅、腫瘤細胞 DNA 套數)，用於預測腫瘤生長及治療成效。這些指標被用於定義疾病的風險性，而將神經母細胞瘤進一步歸類成 very low-risk、low-risk、intermediated-risk 以及 high-risk 四類。(附錄六)

1.1.7 神經母細胞瘤的分子標記及預後指標


除了前面所提到以病童發病年紀、INSS 分期以及病理組織分類做為神經母細胞瘤的預後指標(prognostic markers)外，近年來漸漸也重視腫瘤中的基因變化，探討其分子層面的改變，藉此輔助預測神經母細胞瘤病患的治癒前景。目前被認為與神經母細胞瘤相關性高，能作為預後指標的分子標記(biomarkers)有：

1. **MYCN 增幅 (MYCN amplification)**：MYCN 增幅的定義是每個二倍體基因組(diploid genome)中含大於 10 個套數(copy numbers)。據研究顯示神經母細胞瘤之中大約 25% 比例有 MYCN 增幅現象^{9,32-35}。第 2、3、4、4S 期的病患若具有 MYCN 基因增幅，在疾病進展時間以及整體存活率的多元回歸分析中都強烈



預示有較差的預後。與神經母細胞瘤相關的兩種染色體變化：染色體 17q 增加(gain)及染色體 1p 缺失(deletion)常伴隨 *MYCN* 基因增幅，並與疾病預後不良有關³⁶⁻³⁸。由於 *MYCN* 為一轉錄因子，因此可透過調控基因表現進而影響細胞功能。*MYCN* 基因能夠增加 *MYCN* 細胞途徑相關基因的表現，如 *HMGAI*(與癌症轉移有關)³⁹、*ID2*(抑制細胞分化及增加細胞增生)^{40,41}、*ODC*(參與 polyamine 合成，基因位在 *MYCN* 附近，因此 *MYCN* 增幅常伴隨 *ODC* 增幅)^{42,43}、*p53*(抑癌基因)⁴⁴ 等；或是降低交感神經元晚期分化發育相關基因表現(如 *LIF*)⁴⁵，因此透過偵測這些基因的表現能用於預測神經母細胞瘤不良預後⁴⁶。透過 *MYCN* 基因剔除的小鼠在胚胎時期便死亡，且觀察到小鼠神經元數量減少，證實了 *MYCN* 對神經元發育成熟的重要性^{47,48}。而 1997 年由 W.Weiss 發展出的 TH-*MYCN* 轉殖基因小鼠⁴⁹，能自發性產生與人類神經母細胞瘤相似度高的腫瘤，證實 *MYCN* 基因參與神經母細胞瘤的發生及發展，因此常被用於 *MYCN*-amplified NB 相關之研究。

2. **節段性染色體變化(Segmental chromosome changes)**：節段性染色體數目的變化可用於預測不能切除且不具 *MYCN* 增幅的幼兒型神經母細胞瘤之復發。所有神經母細胞瘤病患若發病年紀較晚、疾病分期較晚期、復發風險性較高以及疾病結果較差者，有較多數量的染色體斷點⁵⁰⁻⁵⁴。
3. **全染色體變化(Whole chromosome changes)**：細胞中的 DNA index，也就是套數(ploidy)，能透過流式細胞儀(flow cytometry)進行偵測。神經母細胞瘤細胞的 DNA index 若與正常細胞相同(DNA index=1)，稱做二倍體(diploid)；若細胞中 DNA index 增加(DNA index>1)則稱作超二倍體(hyperdiploid)。對嬰幼兒而言，超二倍體細胞與神經母細胞瘤早期分期較有關係，對化療的反應較好，通常比二倍體細胞有更良好的預後。但染色體套數並不適用於預測年紀大的孩童之預後。⁵⁵
4. ***ALK* 突變(*ALK* mutation)**：未分化淋巴瘤激酶(Anaplastic lymphoma kinase ,




ALK)是位在細胞表面的酪胺酸激酶受器(receptor tyrosine kinase)，只會在發育中的胚胎以及新生兒大腦中大量表現。ALK 的胚系突變(germline mutations)是造成遺傳性神經母細胞瘤的主因，而後天 ALK 的體細胞活化性突變(somatic activating mutations)也被發現是神經母細胞瘤的癌化原因。而 ALK 突變比例佔神經母細胞瘤病患的 8%，並且與高風險性神經母細胞瘤的較低存活率有高度相關性⁵⁶。

5. **神經滋養因子受器(Neurotrophin receptors)**:通常表現在正常神經細胞及一些神經母細胞瘤細胞表面。透過此受器讓細胞辨識神經滋養因子(Neurotrophin)—nerve growth factor，為類激素化學物質(hormone-like chemicals)，能輔助神經細胞成熟。若神經母細胞瘤腫瘤擁有某些神經滋養因子受器，特別是 TrkA，則具有較好的預後。
6. **血清指標(Serum markers)**:神經母細胞瘤細胞能釋放鐵蛋白(ferritin)至血液中，病患血中鐵蛋白濃度高者預後較差。神經母細胞瘤細胞亦能製造神經元特異性烯醇酶(Neuron-specific enolase, NSE)及乳酸脫氫酶(lactate dehydrogenase, LDH)，因此血中 NSE、LDH 濃度上升與病患不良預後有關。

1.2 Anaplastic lymphoma kinase (ALK)基因

1.2.1 ALK 基因的簡介

未分化淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, ALK)基因是一種蛋白質酪胺酸激酶(protein tyrosine kinase, PTK)基因，擁有一個單一穿膜結構區域(single transmembrane domain, TM)，人類的 ALK 由 1620 個胺基酸構成⁵⁷⁻⁵⁹。ALK 蛋白胞外部分包含 2 個 MAM (meprin, A5 protein, and protein phosphatase μ) domain 及 1 個假想的配體結合區域(ligand-binding domain, LB)^{59,60}(附錄七)。ALK 在 PTK superfamily 系統進化樹裡相對孤立，與 ALK 激酶區域(kinase domain)具最高度序列相似的是白血球酪胺酸激酶(leukocyte receptor tyrosine kinase, LTK；79%相似度)。



在成人體內只有中樞神經系統能低量表現 ALK，而其他組織器官則未偵測到 ALK 表現⁶¹。有鑑於這樣的基因表現分佈，ALK 因此被認為在神經系統發育過程中扮演重要角色。由於 ALK 的結構及其表現的分佈，暗示著它的功能應是位在細胞表面上提供特異性配體結合的受器，並且調控著神經細胞的增殖與分化。ALK 的天然配體仍不明確，目前被認定最可能為哺乳類動物 ALK 受體的 2 個配體是生長因子 pleiotrophin 及 midkine^{62,63}，但此說法仍具有爭議⁶⁴，對 pleiotrophin 及 midkine 的生物意義也尚不清楚。事實上，ALK 基因可透過基因重組，如轉位(translocation)、翻轉(inversion)與其他基因產生融合蛋白或透過基因突變使得 ALK 構形改變，導致 ALK 能夠不透過配體刺激便能持續活化(ligand-independent activation)⁶⁵。

1.2.2 ALK 基因的腫瘤學歷史

ALK 基因在腫瘤學領域首次出現是 Morris 等人於 1994 年⁶⁶在未分化大細胞淋巴瘤(anaplastic large cell lymphomas, ALCL)中發現染色體 5q35(nucleophosmin, *NPM1*)與染色體 2p23(含未知的 PTK 基因)發生轉位(translocation)，該 PTK 基因便被命名為 anaplastic lymphoma kinase (ALK)基因。*NPM1* 基因胺基酸末端與 ALK 基因的催化區域(catalytic domain)發生聯結形成融合蛋白(fusion protein)。透過 *NPM1* 的二聚化(dimerization)，使得 *NPM1*-ALK 融合蛋白得以活化⁶⁵。下一個與 ALK 聯結的疾病是炎症肌纖維母細胞瘤(inflammatory myofibroblastic tumor, IMT)，除了腫瘤中 ALK 表現增加，亦發現 *TPM3*-ALK、*TPM4*-ALK 融合蛋白⁶⁷。而 *TPM3/4*-ALK 融合蛋白也在食道鱗狀細胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)⁶⁸與腎癌(renal cancer)⁶⁹中發現。而 2007 年 Soda 等人在非小細胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)則發現 2 號染色體短臂(2p)因為發生翻轉(inversion)，使得 *EML4* 基因與 ALK 基因形成 *EML4*-ALK 融合基因⁷⁰，約佔 NSCLC 病患 6%。其他腫瘤也有發現 ALK 融合基因，例如在大腸直腸癌(Colorectal cancer, CRC)中有 *EML4*-ALK 與 *C2orf44*-ALK 融合基因，腎細胞癌(Renal cell carcinoma, RCC)⁷¹、腎髓質癌(Renal

medullary carcinoma, RMC)⁷² 中則發現 *VCL-ALK* 融合基因。(附錄七)



1.2.3 *ALK* 基因與神經母細胞瘤

2008 年 Mosse 研究團隊¹⁵ 對家族性神經母細胞瘤 (familial/germline neuroblastoma) 進行單一核苷酸多型性投影 (single nucleotide polymorphism mapping) 搭配核酸定序發現 3 個位在 *ALK* tyrosine kinase domain 的突變 (R1192P, R1275Q, G1128A)。而透過 high-risk NB 的染色體套數分析 (chromosome copy number analysis)，發現 high-risk NB 常發生 *ALK* 基因 gain 或 amplification，並且藉由核酸定序發現 *ALK* gain/amplified high-risk NB 中，*ALK* tyrosine kinase domain 也有 *ALK* 活化性突變發生 (M1166R, I1171N, F1174I/L, F1245V/C, I1250T, R1275Q 等 8 個)，這類在 *ALK* tyrosine kinase domain 隨機發生突變的神經母細胞瘤，稱作偶發性神經母細胞瘤 (sporadic neuroblastoma)^{15,73-75}。2014 年 Bresler 等人分析 1596 例確診為神經母細胞瘤的樣本中發現 126 例 (8%) 有 *ALK* 基因突變，這些突變分布於 tyrosine kinase domain 的 16 個位置，其中 3 個突變熱點 (hotspots) 的突變人數為 F1174：38 人 (30%)、F1245：15 人 (12%) 及 R1275：54 人 (43%)，共佔 NB *ALK* 突變案例總數的 85%。神經母細胞瘤中 *ALK* 基因變異 (genetic aberration) 除了 *ALK* 基因活化性突變外，尚有 *ALK* 基因的 gain (12.2%，copy number 為 3-10 copies) 或 amplification (1.5%，copy number 為 >10 copies)。

研究顯示 *ALK* 基因發生變異 (基因突變或基因增幅) 的神經母細胞瘤病患，無事件存活率 (EFS) 與整體存活率 (OS) 皆比未發生基因變異者低；進一步分析 high-risk NB 病患，則 *ALK* 基因變異的病患存活率亦低於未發生 *ALK* 基因變異者⁵⁶。由 R2 資料庫 (Tumor Neuroblastoma-Kocak-649 custom-ag44kewolf) 則可見 *ALK* 基因過度表現會造成神經母細胞瘤病患存活率下降⁷⁶。而有些第 4 期神經母細胞瘤案例是未發生 *ALK* 基因突變或增幅，但具有 *ALK* 高度表現⁷⁷，因此 NB 腫瘤中 *ALK* 基因表現量高對於評估神經母細胞瘤的預後也相當重要。




1.2.4 ALK 基因的調控

神經母細胞瘤中，*ALK* 基因的調控常與 *MYCN* 基因做聯結，因為兩者位在人類染色體 2p 鄰近區域(*ALK*: 2p23、*MYCN*: 2p24)，故 *ALK* 基因增幅經常伴隨 *MYCN* 基因增幅^{59,78,79}。由 Schönher 等人的研究發現 *ALK* 能透過透過活化下游 ERK 訊息傳遞途徑刺激 *MYCN* promoter 進行轉錄進而促進 *MYCN* 表現⁸⁰。而 Hasan 等人提出 *ALK* promoter region 上有 non-canonical E-Box 的結構座落於轉錄起始位的上游，並且證明 *MYCN* 基因能藉由與 *ALK* promoter 上的 non-canonical E-Box 結合來促進 *ALK* 基因的轉錄表現⁷。

1.2.5 ALK 抑制劑在神經母細胞瘤中的潛力

以 *ALK* 作為標的物的小分子抑制劑 Crizotinib (PF-02341066) 於 2011 年經美國 FDA 核准，臨床上已使用於有 *ALK* 轉位突變的非小細胞肺癌(NSCLC)之治療，Crizotinib 的作用機制是結合至 *ALK* 的 ATP 結合位，藉由與 ATP 競爭來阻斷 *ALK* 的 autophosphorylation，進而抑制 *ALK* 持續活化。由於神經母細胞瘤中出現的 *ALK* 基因突變，會造成 *ALK* 結構改變，促使 *ALK* 由 inactive form 轉變成 active form，增加 ATP 與 *ALK* 的 ATP 結合位親和力，導致 *ALK* 得以產生 ligand-independent activation。這使得許多研究團隊也寄望於將 *ALK* 抑制劑應用於治療神經母細胞瘤。根據 Heukamp 等人於 2012 年的研究⁸¹，Crizotinib 在細胞實驗及小鼠 xenograft 模型中皆能有效抑制 NB 細胞及腫瘤生長，使 *ALK* 抑制劑具潛力為 high-risk NB 提供有效的輔助治療。

然而，某些 *ALK* 基因突變對於 Crizotinib 的感受性較低，表示 *ALK* 抑制劑對於某些 *ALK* 突變的神經母細胞瘤而言抑制效果不好。眾所皆知的 Crizotinib-resistant *ALK* 突變是 F1174L^{56,59}，其它對 Crizotinib 感受性差的 *ALK* 突變如 G1128A、I1171N、Y1278S 等⁵⁶。Heukamp 等人的研究⁸¹顯示具有 *ALK* F1174L/*MYCN* double-transgenic mice 的 NB 小鼠模型中，Crizotinib 無法抑制腫瘤發展；採用實驗用的 *ALK* 小分



子抑制物(如：TAE-684)則具有抑制 *ALK* F1174L 突變的 NB 腫瘤。以相同劑量的 TAE-684 及 Crizotinib 處理 *ALK* F1174L-mutated NB cell，發現 TAE-684 更能減少細胞的 viability。將 *ALK* F1174L-mutated NB cell 皮下注射於裸鼠所長出的腫瘤，同樣以 TAE-684 及 Crizotinib 治療，發現 Crizotinib 無法抑制 *ALK* F1174L-mutated tumor 生長，但 TAE-684 則能有效抑制腫瘤生長。這意味著那些對於 Crizotinib 感受性較低的 NB 病患，其他 *ALK* 抑制劑對於 NB 治療將有幫助。

1.3 研究假說

ALK 表現與惡性神經母細胞瘤有關，使用 *ALK* 抑制劑可能為病患提供有效的輔助治療。由於某些 *ALK* 突變對 Crizotinib 感受性較低，加上 Crizotinib 是昂貴的標靶藥物，因此以 NB 腫瘤中 *ALK* 基因的表現狀況及 *ALK* 基因突變作為預測病患對 Crizotinib 感受性的指標，可望能協助醫師判斷採取 *ALK* 抑制劑為神經母細胞瘤病患治療的參考。



第二章 研究目的與實驗設計

2.1 研究目的

本研究的目的是檢查台灣地區神經母細胞瘤中 *ALK* 基因表現及突變情形。(1) 透過 qRT-PCR 偵測 *ALK* 基因的表現;(2) 以 sanger's sequencing 檢測 *ALK* 基因突變。

2.2 實驗設計

本研究主要分成三部分:(1) NB 腫瘤中 *ALK* 基因突變及基因多型性分析、(2) NB 腫瘤中 *ALK* 基因表現量分析、(3) 驗證 *ALK* 基因表現以及 *ALK* 基因突變與在神經母細胞瘤的臨床意義。

- (1) 從 NB 病患腫瘤萃取 DNA 用於分析 *ALK* 基因突變與基因多型性；而從健康人 PBMC 萃取 DNA 則做為與 NB 病人 *ALK* 基因序列做比對的控制組。將針對 *ALK* 基因 tyrosine kinase domain 中 Exon20 到 25 部分分段進行 PCR 後，做 Sanger's sequencing，來偵測 *ALK* 基因突變。
- (2) 從 NB 病患腫瘤萃取 RNA 逆轉錄成 cDNA 後利用 real-time PCR 檢測腫瘤組織中 *ALK* 基因表現量。
- (3) 統計國人神經母細胞瘤中 *ALK* 突變發生頻譜與 *ALK* kinase domain 區域基因多型性分布。
- (4) 分別探討 *ALK* 基因突變與 *ALK* 基因表現量與 NB 預後指標，如 INSS 疾病分期、INPC 病理學分類、INRG 風險評估、*MYCN* 增幅與否，以及 *ALK* 免疫化學染色結果進行統計分析，並以圖或表方式呈現。



第三章 材料與方法

[實驗材料]

3.1 臨床檢體

本研究中使用的神經母細胞瘤臨床檢體來自 2007 年至 2014 年在臺灣大學附設醫院診斷、治療並於手術時取下之腫瘤樣本，所有樣本取得經由病患/家長知情簽名同意用於 NB 相關研究，並且經人體試驗暨研究倫理委員會(The Institutional Review Board, IRB)審核通過。本研究共使用了 15 個神經母細胞瘤病患腫瘤 cDNA 以及 64 個病人腫瘤組織(其中有 3 例腫瘤組織無法提取足夠 DNA、RNA 樣本以及 2 例 cDNA 樣本品質無法符合分析要求)；而實驗中所使用之控制組檢體則為 34 個健康成人血液檢體。病人腫瘤組織及健康對照組周邊血液單核白血球將萃取出 DNA 及 RNA，並以 RNA 製備出 cDNA。

3.2 試劑、試藥、試劑套組與工作清單

3.2.1 試劑試藥清單

品名	廠牌	Cat. No
Agarose	AMRESCO	0710-500G
Chloroform*	MERK	1.02445.1000
EDTA	MERK	1.08418.0250
EtBr [#]	Flow Laboratories	16-891-49
Ethanol	MERK	1.00983.2500
Isopropanol	MERK	1.09634.2500
MgCl ₂	SIGMA	M-2670
NaCl	Mallinckrodt AR	7581-05
Proteinase K	MERK	1.07393.0010
SDS	AMRESCO	0227-500G
Sucrose	SIGMA	S-7903
TBE Buffer	AMRESCO	0478-2PK
Triton X-100	SIGMA	T-9284
Tris-Cl	AMRESCO	0826-1KG

*毒化物；[#]致癌物



3.2.2 試劑套組

品名	廠牌	Cat. No.
NucleoSpin TriPrep Kit	MACHEREY-NAGEL	740966.50
GeneAmp® 10X PCR Buffer I	ABI Life Technology	N808-0129
TRIZOL LS Reagent	ambion Life Technology	10296-010
SuperScript III First-Strand Synthesis System RT-PCR	Invitrogen Life Technology	18080-051
Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit with dsDNase	Thermo Scientific	#K1671
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	Thermo Scientific	#K0221
DreamTaq DNA Polymerase	Fermentas Thermo Scientific	#EP0702
10mM dNTP Mix	Fermentas Thermo Scientific	#R0192
REPLI-g Mini Kit	Qiagen	150023
QuantiTect Whole Transcriptome Kit	Qiagen	207043
PCR/Gel Clean UP Kit	Favorgen	FAGCK001-1
Bio-100 Mass DNA Ladder	Protech Technology Enterprise	M1-100T
Nuclease/EtBr Terminator	Protech Technology Enterprise	PT-R475-500ml

3.2.3 試劑配方

(a) DNA 製備

5X RBC Lysis Buffer

材料	終濃度
Sucrose (MW=342.3)	1.6 M
Triton X-100	5% (v/v)
MgCl ₂ -6H ₂ O (1M Stock)	25 mM
Tris-Cl (1M Stock, pH7.5)	60 mM

滅菌後，至於 4°C 保存

5X Proteinease K Buffer

材料	終濃度
NaCl	0.375 M
EDTA (pH8.0)	0.12 M

以 0.45μM 濾膜過濾後，室溫保存

Proteinease K Stock



材料	用量
Proteinase K	100 mg
10mM Tris-HCl, pH7.5	10 ml

分裝後-20°C 保存

Proteinase K Mixture (700µl for each reaction)

材料	體積 (µl)
5X Proteinase K Buffer	160
Proteinase K (10 mg/ml)	40
10% SDS	80
ddH ₂ O	420

使用前配製

(b) Polymerase Chain Reaction (PCR)

10X PCR Buffer

材料	終濃度
10X DreamTaq Buffer	
MgCl ₂	20mM
KCl	
(NH ₄) ₂ SO ₄	
GeneAmp® 10X PCR Buffer I	
MgCl ₂	15mM
KCl	500mM
TrisHCl, pH8.3	100mM
Gelatin	0.01%

於-20°C 保存

3.2.4 聚合酶連鎖反應之引子序列

(a) ALK 基因

Name	Primer sequence	Amplicon size	SNPs in the amplicon
Exon20	<i>ALK</i> I19.1	301 bp	rs146074150,
	<i>ALK</i> I20.2		rs4622670, rs2276550

Exon21+22	<i>ALK</i> I20.1 <i>ALK</i> I22.2	CCAGCTGCCTCATTATTGTG CTTGGAGATATCGATCTGTT AG	413 bp	rs3795850
Exon23	<i>ALK</i> I22.1 <i>ALK</i> I23.2	TTTGCCAGACTCAGCTCAG TGGCACAACA ACTGCAGCAA AG	221 bp	COSM28055, rs56247462
Exon24	<i>ALK</i> I23.1 <i>ALK</i> I24.2	CTGACAAGCTCCTCGTCAGT CAGATCAGCGACAGGATGAC	188 bp	rs281864720, COSM28493
Exon25	<i>ALK</i> I24.1 <i>ALK</i> I25.2	GCCGTTGTACTCATCTTCC CTGAGGTGGAAGAGACAGGC	201 bp	rs45502292, rs3738868

(b) Control gene

Name	Primer sequence	Amplicon size
hu- β 2M-F	GCCGATATTCCTCAGGTACT	331 bp
hu- β 2M-R	TCCAACCTTCAGCAGCTTAC	

3.2.5 反轉錄聚合酶連鎖反應/即時定量反轉錄聚合酶連鎖反應之引子

(a) *ALK* 基因

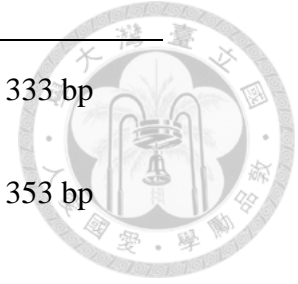
Name	Primer sequence	Amplicon size	
<i>ALK</i> E19.1	TTTCTGCGGCATCATGATTG	1049 bp	搭配 <i>ALK</i> E29.2
<i>ALK</i> E27.1	AGTTTGTCACCAAGTGGAGGC	183 bp	搭配 <i>ALK</i> E29.2
<i>ALK</i> E29.2	ATACTATCGGCAAAGCGGTG		
<i>ALK</i> E22.1	GTGCTCTGAACAGGACGAAC		
<i>ALK</i> E26.2	CTTAACTGGCAGCATGGCA	418 bp	搭配 <i>ALK</i> E22.1
<i>ALK</i> E27.2	GATTTCCCATAGCAGCACTCC	502 bp	搭配 <i>ALK</i> E22.1

(b) *MYCN* 基因

Name	Primer sequence	Amplicon size
<i>MYCN</i> -F	GACCACAAGGCCCTCAGTAC	240 bp
<i>MYCN</i> -R	GTGGATGGGAAGGCATCGTT	

(c) Control gene

Name	Primer sequence	Amplicon size
------	-----------------	---------------



hu-c- β 2M-F	TGGAGGCTATCCAGCGTACTCC	333 bp
hu-c- β 2M-R	CATCTTCAAACCTCCATGATGCTG	
hu-c- β -actin-F	GCTCGTCGTCGACAACGGCTC	353 bp
hu-c- β -actin-R	CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC	
hu-GAPDH-f	GCCAAAAGGGTCATCATCTC	227 bp
hu-GAPDH-r	GGCCATCCACAGTCTTCT	
hu-c-HPRT1-f	TGACACTGGCAAAAACAATGCA	94 bp
hu-c-HPRT1-r	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT	
hu-c-SDHA-f	TGGGAACAAGAGGGCATCTG	86 bp
hu-c-SDHA-r	CCACCACTGCATCAAATTCATG	

3.2.6 實驗儀器

儀器	廠牌型號
落地型離心機	KUBOTA 8800
微量離心管離心機	HERMLE Z233MJK-2
水平震盪器	KS Orbital shaker OS701
自動恆溫機	DENG YNG DB 45 incubator
分光光度計(Nanodrop)	J&H ND1000
PCR 熱循環儀	peqLab peqSTAR、Thermal PX2
電泳槽	Mupid-21
照膠系統(UV Box)	Quantum-1000-26M

3.2.7 軟體與網路工具

名稱(版本)	開發單位(網址)	用途
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	網路基因資料庫
Ensembl Genome browser	http://asia.ensembl.org/index.html	網路基因資料庫
R2 database	http://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi?&species=hs	網路資料庫
DNA MAN (7.0.2.176)	Lynnon Corporation	定序圖形檔顯示
Chromas (2.5.1.0)	Technelysium Pty Ltd	序列分析比對
GraphPad Prism 4	GraphPad Software, Inc.	統計軟體、繪圖軟體



[實驗方法]

3.3 檢體 DNA、RNA 製備

3.3.1 傳統常規 DNA 萃取

以 EDTA 採血管(紫頭)收集 3 ml 全血後，先經離心去除上層血漿，再加入紅血球裂解液(Red blood cell lysis buffer, RBCL)離心後，留下採血管底部的白色血球團塊，加入蛋白酶 K 混合液(Proteinase K mixture)後將待萃檢體移置 1.5 ml 微量離心管，於 37°C 震盪培養隔夜，藉此使白血球細胞中的蛋白質降解。次日，於室溫下冷卻待萃檢體後，加入 6N NaCl 鹽析出蛋白質。以微量離心管離心機離心後將上清液取出移至 1.5 ml 離心管中，加入異丙醇(Isopropanol)輕微搖晃至核酸沉澱物出現。離心去除上清液，以 75% 酒精清洗核酸沉澱物。待酒精風乾後，加入適當體積的滅菌水使最終 DNA 濃度約為 40 μ g/ml，萃取出 DNA 檢體儲存於-20°C 冰箱備用。附錄十一【實驗步驟 1】

3.3.2 傳統常規 RNA 萃取

利用 Guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform 原理來分離 RNA、DNA 及蛋白質，再用 isopropanol 萃取 RNA。附錄十一【實驗步驟 2】

3.3.3 以 DNA、RNA 及蛋白質萃取套組萃取神經母細胞腫瘤樣本

利用含有大量 chaotropic ions 的細胞裂解液(lysis buffer)在裂解細胞的同時將所有細胞內的酵素(包括 DNase、RNase、proteases 以及 phosphatases 等等)皆去活性，並將難溶的蛋白質分解，藉以使得 DNA 及 RNA 更好被矽膠濾膜(silica membrane)吸收。經過兩次清洗步驟後，以低鹽緩衝液將 DNA 洗脫，收集 RNA 留在濾膜上。殘留於濾膜上的 DNA 則透過 rDNase 溶液去除之。隨後利用兩種緩衝液清洗濾膜以去除鹽類、代謝物以及大分子細胞成分，此時便只留下 RNA 於濾膜上。最後再以 RNase-free water 將 RNA 洗脫下來。將 DNA、RNA 萃取過程中所留

下含有蛋白質之溶液則可透過蛋白質沉澱試劑有效地將蛋白質從溶液中沉澱下來，經過清洗步驟後，最後以蛋白質溶解緩衝液回溶。附錄十一【實驗步驟 3】



3.3.4 cDNA 製備

(a) SuperScript® III First-Strand Synthesis System

透過 SuperScript® III 的 M-MLV 反轉錄酶以 RNA 為模板合成出 first-strand cDNA。SuperScript® III 的反轉錄酶是一種經過修飾而減少 RNase H 活性並增加熱穩定度，而且不會受到 ribosome RNA 及 transfer RNA 的大量抑制的 M-MLV 反轉錄酶，因此得以從 total RNA 中合成出 first-strand cDNA。附錄十一【實驗步驟 4 (a)】

(b) Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit with dsDNase

套組中的雙股特異性 DNA 酶(dsDNase)可將 RNA 溶液中殘存的雙股 DNA 去除，同時確保 RNA 和單股 DNA(包括 cDNA 以及引子)不被切割。而套組中的反轉錄酶源自 M-MuLV 反轉錄酶，經改良後具有高度熱穩定性、更穩定，並且增加 cDNA 的合成率。附錄十一【實驗步驟 4 (b)】

3.4 聚合酶連鎖反應引子設計

自 Ensembl Genome browser 網站下載目標基因的序列，再搜尋相關文獻 NCBI (National Center for Biotechnology Information)網站上基因多型性資料庫，決定所要調查之基因多型性/突變位點，依照下載序列設計適合之引子。

3.5 聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

將檢體 DNA 取 0.2µg/µl (至多 3µl)至 0.2ml 微量離心管中，並加入 30µl 聚合酶連鎖反應混合液，與檢體 DNA 充分混勻後，於預先設定好的適當 PCR 條件下進行反應。反應完成後再以 1.5~2.0% 洋菜膠片(含 1%EtBr)進行電泳分離，並確認聚合酶連鎖反應是否有產物足以進行後續實驗。本實驗中所有聚合酶連鎖反應之條



件與混合液配置如附錄十一【實驗步驟5】。

3.6 反轉錄聚合酶連鎖反應 (Reverse Transcription-PCR, RT-PCR)

將 cDNA 樣本取 1 μ l 至 0.2ml 微量離心管中，並加入 30 μ l 聚合酶連鎖反應混合液，與 cDNA 充分混勻後，於預先設定好的適當 PCR 條件下進行反應。反應完成後再以 1.5~2.0% 洋菜膠片(含 1%EtBr)進行電泳分離，並確認聚合酶連鎖反應是否有產物足以進行後續實驗。本實驗中所有聚合酶連鎖反應之條件與混合液配置如附錄十一【實驗步驟5】。

3.7 聚合酶連鎖反應產物純化與定序


聚合酶連鎖反應後之產物利用 PCR/Gel clean up 套組(Favorgen)純化後，以 2% 洋菜膠片進行電泳，並以 UV 光照射，依照膠片上色帶強度推估純化後產物的 DNA 濃度與純度。將純化後的產物依照建議量準備樣品後，委託台大醫學院第二共同研究中心進行桑格定序(Sanger's sequencing)反應(APPLIED BIOSYSTEMS, 3730xl DNA Analyzer)。詳見附錄十一【實驗步驟6】。

3.8 即時定量聚合酶連鎖反應

將檢體 cDNA 稀釋 10 倍後，取 1 μ l 至 0.2ml 微量離心管中，並加入 19 μ l 即時定量聚合酶連鎖反應混合液(2X SYBR Green Master Mix)，與檢體 cDNA 充分混勻後，於預先設定好的適當 real-time PCR 條件下進行反應(ABI 7500 Fast)。反應完成後將實驗數據輸出至 excel 檔，以便做後續基因相對表現量分析。詳見附錄十一【實驗步驟7】。

3.9 數據統計分析

臨床資料與病人基因型分析或病人 *ALK* 基因表現量高/低間之比對，以卡方檢



定進行統計分析(雙尾)，當 p 值小於 0.05 認定為有統計上的顯著差異。若細格數 n 值小於 5 以下，則使用費雪精確檢定(Fisher's exact test)。臨床資料與實驗數據間比較以及 Kaplan-Meier curve (survival curve) 皆是透過 GraphPad Prism 軟體進行分析、作圖以及統計，組間分布比較統計的檢定方法為 Mann-Whitney U Test，不同病人組間存活比較檢定用 Log-rank test。



第四章 結果

[臨床資料及檢體收案情形]

本研究共收集 79 例 2007-2014 年間在台大醫院就診並接受手術治療之神經母細胞瘤病人檢體，其中 15 例為 cDNA 樣本，64 例病人檢體則是取得冷凍腫瘤組織，抽取 DNA 及 RNA 樣本，並將 RNA 反轉錄出 cDNA (其中有 3 例無法提取足夠 DNA、RNA 樣本以及 2 例 RNA 樣本品質無法符合分析要求)。因此最終用於本研究中進行資料分析的細節如表一所示：74 個病人 cDNA 樣本進行即時定量 PCR 偵測腫瘤中 *ALK*、*MYCN* 基因表現量；61 例病人 DNA 檢體進行核酸定序 (Sanger's sequencing) 分析腫瘤中 *ALK* 基因突變及基因多型性。病人臨床資料部分，有 74 例組織病理資料、74 例疾病分期資料、73 例疾病風險分群資料、70 例 *MYCN* 基因增幅與否資料、74 例復發時間資料、74 例死亡時間資料及 31 例 *ALK* 免疫組織化學染色資料。

4.1 神經母細胞瘤預後因子與病患存活率之分析

針對具有完整臨床資料的 74 個病例，將病人發病年紀和疾病分期 (INSS stage) 與確診後之疾病復發時間 (time to relapse) 或死亡時間 (time to death) 分別進行比對，便可得到與病人發病年紀及疾病分期相關的事件發生存活率 (event-free survival, EFS) 及整體存活率 (overall survival, OS)。

從實驗結果可發現：若 NB 病人發病年紀大於 18 個月，無事件存活率 (Event-free survival, EFS) 及整體存活率 (Overall survival, OS) 皆明顯低於發病年小於 18 個月的病人 (圖一 a, EFS: $p=0.0013$; OS: $p=0.0015$)。神經母細胞瘤 INSS 分期，若 NB 病人疾病分期為第 4 期者，EFS 之五年存活率為 14.2% (存活時間中位數為 20.6 個月) 以及 OS 之五年存活率為 27.0% (存活時間中位數為 39.0 個月)，皆顯著低於第 1、2 期病例 (圖一 b)。




4.2 ALK 基因突變及基因多型性分析

4.2.1 神經母細胞瘤病人腫瘤中 ALK 基因突變分析

將所有 DNA 檢體針對 ALK 基因 Exon20 到 Exon25 及其鄰近 Intron 部分分段進行 PCR 後，進行核酸定序(Sanger's sequencing)，並從定序結果檢視 ALK 基因突變，已報導 ALK 3 個突變熱點 F1174、F1245 及 R1275 分別是位在 ALK 基因 Exon23、24 及 25(圖二)。本研究中所有發現的突變皆經過獨立重覆 PCR/Sanger's sequencing 予以確認，並於對應樣本 cDNA 中確認突變點及突變形式。分析 61 例神經母細胞瘤腫瘤中發現共有 7 例具有 ALK 基因突變(表二)，其中有 3 例為 F1174 突變，在+3522 位置出現單一核苷酸置換，由 C 置換成 A，並造成第 1174 號胺基酸由苯丙胺酸(phenylalanine, Phe (F))改變成白胺酸(leucine, Leu (L))—F1174L。此外，有 3 例為 F1245 突變，其中的 2 例在+3733 位置分別出現單一核苷酸置換，1 例是由 T 置換成 G，使得第 1245 號胺基酸由苯丙胺酸改變成纈胺酸(valine, Val (V))—F1245V；1 例是由 T 置換成 A，使得第 1245 號胺基酸由苯丙胺酸改變成異白胺酸(isoleucine, Ile (I))—F1245I；另 1 例是在+3735 位置出現單一核苷酸置換，由 C 置換成 A，造成第 1245 號胺基酸由苯丙胺酸(phenylalanine, Phe (F))改變成白胺酸(leucine, Leu (L))—F1245L。本研究於 NB 樣本中並未發現 ALK R1275 突變，不過卻發現了 1 個可能的新突變點—A1274，在+3820 位置出現單一核苷酸置換，由 G 置換成 A，並造成第 1274 號胺基酸由丙胺酸(alanine, Ala (A))改變成蘇胺酸(threonine, Thr (T))—A1274T。此突變點在 Ensembl Genome browser 基因資料庫(CANCER-GENOME, EVA-EXAC, PERLEGEN database)中有記錄，其發生頻率 G allele: A allele=12,1411:1 (EVA-EXAC database)，但至今尚無人報導在神經母細胞瘤中發現此突變點。

4.2.2 ALK 突變基因型的表現

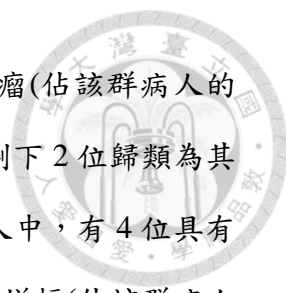
本研究發現 ALK 基因突變的樣本皆為 $ALK^{WT/Mut+}$ 雜合子(圖三)，與先前報導



相似⁸²。NB 檢體編號 168、203 及 277-L 與 NB 細胞株 SH-SY5Y 皆帶有 *ALK* F1174L 突變，從定序圖可見正常野生對偶基因(WT allele)和突變對偶基因(mutant allele)在腫瘤中的訊號強度並非一致(圖三 a)。針對同病例/細胞株之 cDNA 樣本進行核酸定序，結果發現在病人腫瘤編號 168 及 277-L 與 SH-SY5Y 細胞株，其 WT allele 與 mutant allele 表現之訊號強度與 DNA 樣本中訊號強度比例相當，但是病人腫瘤編號 203 的 cDNA 樣本經重覆測試卻無法偵測到 *ALK* F1174 突變(圖三 a)。檢體編號 256、270 及 274 都是 *ALK* F1245 突變，從 DNA/cDNA 核酸定序圖可見 WT allele 與 mutant allele 訊號強度大致相當(圖三 b)。檢體編號 254 為 *ALK* A1274T 突變，其 DNA/cDNA 核酸定序顯示 WT allele: mutant allele 訊號強度皆約 1:1 (圖三 c)。分析具有 *ALK* 突變的樣本可發現在絕大多數的樣本 *ALK* mutant allele 皆有表現，WT allele 則全部都有表現，因此在神經母細胞瘤腫瘤中 *ALK* 基因即使未出現突變亦能有表現。

4.2.3 神經母細胞瘤病人 *ALK* 基因突變與預後分子相關性之分析


由於 *ALK* 基因與惡性神經母細胞瘤有關，因此我們進行 *ALK* 基因突變與神經母細胞瘤預後分子(年齡、疾病分期、疾病風險分群、組織病理學以及 *MYCN* 基因增幅與否)之分析(表三)。年齡是以神經母細胞瘤平均發病年紀—18 個月做區分，在 7 位具有 *ALK* 基因突變的病人中，有 3 位的發病年紀小於 18 個月(佔該群病人的 10.3%)；4 位的發病年紀大於 18 個月(佔該群病人的 12.5%)。將 INSS 分期區分成早期 NB(第 1、2 期)、晚期 NB(第 3、4 期)以及第 4S 期，7 位具有 *ALK* 基因突變的的病人皆屬於後期階段(1 位為第 3 期，其他 6 位皆是第 4 期)，佔該群病人的 18.9%。疾病風險分群：7 位具有 *ALK* 基因突變的的病人皆為高風險分群之神經母細胞瘤(佔該群病人的 23.3%)，以費氏精確檢定顯示 *ALK* 突變發生與疾病為高風險分群有明顯正相關($p=0.0105$)。組織病理學依照細胞分化程度做區分，大方向分成未分化、部分分化及其他(細胞分化程度較高，詳細可參考附錄二)，7



位具有 *ALK* 基因突變的的病人中，2 位為未分化神經母細胞瘤(佔該群病人的 18.2%)、3 位為部分分化神經母細胞瘤(佔該群病人的 13.6%)，剩下 2 位歸類為其他(佔該群病人的 7.1%)。最後，7 位具有 *ALK* 基因突變的的病人中，有 4 位具有 *MYCN* 基因增幅 (佔該群病人的 30.8%)；3 位不具 *MYCN* 基因增幅(佔該群病人的 6.8%)，以費氏精確檢定顯示 *ALK* 突變發生與 *MYCN* 增幅有明顯正相關(Odd Ratio：6.07、95% CI：1.15-32.20 及 $p=0.0407$)。以病患是否具有 *ALK* 突變(WT、Mut⁺)分別和 NB 發病年紀(<18 months、>18 months)、病理組織學(UNB/PDNB、others)進行費式精確檢定分析，皆不具統計上顯著差異(Age： $p=1.0000$ 、Histology： $p=0.4367$)。綜合以上，在 NB 中 *ALK* 突變比較發生於 INSS Stage3/4，並與 INRG high-risk NB 以及 *MYCN*-amplified NB 顯著正相關。

4.2.4 *ALK* 基因多型性分析

將所有 DNA 檢體針對 *ALK* 基因 Exon20 到 Exon25 及其鄰近 Intron 部分分段進行 PCR 後，進行核酸定序(Sanger's sequencing)，除了從定序結果檢視 *ALK* 基因突變外，亦檢視神經母細胞瘤病人腫瘤中 *ALK* 基因 Exon20 到 Exon25(包括鄰近 Intron 部分)的單一核苷酸多型性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)分布情形，並與 34 個健康成人周邊血液單核球細胞(Peripheral blood monocyte cells, PBMCs)的 SNPs 分布做比較，本研究在 Exon20 到 25 間總共發現 6 個 SNPs (表四)。3 個 SNPs 位在 *ALK* 基因 Exon20、21、23 的 coding region，屬於 Synonymous variants，並未造成胺基酸改變：*ALK* Exon20 +3336 G/A 位點(rs146074150)之基因型為 G/G 及 G/A，對應之胺基酸為脯胺酸(proline, Pro (P))，定序結果如圖四 a；61 位神經母細胞瘤病患基因型人數分別為 G/G：60 人(98.4%)、G/A：1 人(1.6%)、A/A：0 人。而 34 位健康對照組基因型人數為 G/G：34 人(100.0%)、G/A：0 人、A/A：0 人(表四)。ALK Exon21 +3375 C/A (rs3795850)之基因型為 C/C、C/A、A/A，對應之胺基酸為甘胺酸(glycine, Gly (G))(圖四 a)；NB 病患基因型人數為 C/C：9 人



(14.8%)、C/A：23 人(37.7%)、A/A：29 人(47.5%)；而健康對照組基因型人數為 C/C：5 人(14.7%)、C/A：10 人(29.4%)、A/A：19 人(55.9%)(表四)。ALK Exon23 +3600 G/C (rs56247462)之基因型為 G/G 及 G/C，對應之胺基酸為甘胺酸丙胺酸(alanine, Ala (A)) (圖四 a)；NB 病患基因型人數為 G/G：51 人(83.6%)、G/C：10 人(16.4%)、C/C：0 人；健康對照組則是 G/G：30 人(88.2%)、G/C：4 人(11.8%)、C/C：0 人(表四)。另外在 Intron20 及 25 部分則發現 3 個 SNPs，屬於 intron variant：ALK Intron20 第 6 位置的 C/T 位點(rs4622670)，基因型為 C/C、C/T 及 T/T (圖四 b)；NB 病患基因型人數為 C/C：58 人(95.1%)、C/T：3 人(4.9%)、T/T：0 人；而健康對照組為 C/C：31 人(91.2%)、C/T：2 人(5.9%)、T/T：1 人(2.9%)(表四)。此位點除了是 intron variant，也是 splicing region variant (http://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core:g=ENSG00000171094;r=2:29223286-29223386;t=ENST00000389048;v=rs4622670;vdb=variation;vf=2794666)。ALK Intron20 第 24 位置的 G/C 位點(rs2276550)，基因型為 G/G、G/C、C/C (圖四 b)；NB 病患基因型人數 G/G：8 人(13.1%)、G/C：23 人(37.7%)及 C/C：30 人(49.2%)；而健康對照組基因型人數 G/G：5 人(14.7%)、G/C：10 人(29.4%)及 C/C：19 人(55.9%)(表四)。ALK Intron25 第 27 位置的 G/C 位點(rs3738868)，基因型為 G/G、G/T 及 T/T (圖四 b)；NB 病患基因型人數 G/G：55 人(90.2%)、G/T：6 人(9.8%)及 T/T：0 人；而健康對照組基因型人數 G/G：30 人(88.2%)、G/T：3 人(8.8%)及 T/T：1 人(2.9%)(表四)。總言之。此 6 個 SNPs 變異基因分布頻率在神經母細胞瘤腫瘤與健康成人 PBMC 並無差異。

4.3 ALK 基因表現量分析


4.3.1 神經母細胞瘤中 ALK 基因表現量之分析

將所有神經母細胞瘤病人 cDNA 檢體以即時定量聚合酶連鎖反應(real-time PCR, qPCR)偵測病人腫瘤中 ALK 基因相對表現量。所使用的參考基因(reference

genes)是 *HPRT1* 及 *SDHA* 基因，此兩個 housekeeping genes 被報導在神經母細胞瘤中的表現相對較穩定⁸³。實驗數據的計算方式是將 *HPRT1* 及 *SDHA* 兩基因之 Ct 值相乘後再開根號，求得 Ct-control 的幾何平均值；以 $2^{-[(Ct-ALK)-(Ct-control)]}$ 為 *ALK* 相對表現量。本研究以 ROC (Receiver operating characteristic) 尋找區分 *ALK* 表現量高或低的閾值(threshold, cut-off value)。由於實施 *ALK* 免疫組織化學染色之 31 例腫瘤多數為 advanced stage 且 IHC 結果為陽性反應，故無法以免疫組織化學染色結果作為黃金標準(Gold standard)尋找 *ALK* 表現量高/低之閾值，因而改利用神經母細胞瘤病患死亡與否作為 ROC 的黃金標準⁸⁴。ROC 曲線的 Y 軸為靈敏度(sensitivity)意指已死亡之患者判為 *ALK* 高表現量的機率；X 軸則為 1-特異性(1-specificity)意指已死亡之患者判為 *ALK* 低表現量的機率。由分析結果以 0.2816 為區分 *ALK* 表現量高/低最適當的切點(sensitivity 為 62.50%、specificity 為 81.82%)；而圖形的曲線下面積(area under the ROC curve, AUC)為 0.6614，但不具統計意義($p=0.1040$)(圖五)。以 0.2816 做為 *ALK* 表現量高或低的閾值，則本研究中 74 例神經母細胞瘤病患中有 42 例為 *ALK* 低量表現(56.8%)、32 例為 *ALK* 高度表現(43.2%)(圖六)，ROC 作圖的靈敏度及特異性列表詳見於附錄八。

4.3.2 *ALK* 基因表現量與神經母細胞瘤預後因子之關聯性

許多文獻指出 *ALK* 表現量與神經母細胞瘤的高度風險性相關，因此本研究便將以 qRT-PCR 所測得的神經母細胞瘤病患腫瘤中 *ALK* 基因相對表現量直接與現有的臨床資料進行統計分析，挑選的母群體為與神經母細胞瘤相關的預後因子，如發病年紀、疾病風險分群、疾病分期以及病理組織學。從分析結果可知：74 例 NB 病患發病年紀資料，有 29 例發病年紀小於 18 個月、45 例發病年紀大於 18 個月，*ALK* 基因表現量分布如圖七 a，以曼-惠特尼 U 檢定(Mann Whitney U test)分析無統計上顯著差異($p=0.1565$)。費氏精確檢定分析顯示發病年紀大於或小於 18 個月與 *ALK* 表現量高/低統計上無相關性($p=0.2367$)(表五)。分析 73 例神經母



細胞瘤疾病風險分群資料，有 31 例為低風險群、42 例為高風險群，*ALK* 基因表現量分布如圖七 b，以曼-惠特尼 U 檢定(Mann Whitney U test)分析無統計上顯著差異($p=0.8452$)。經費氏精確檢定統計可知 NB 高或低風險群與 *ALK* 高/低表現量並無明顯正相關($p=0.4463$)(表五)。而 74 例神經母細胞瘤疾病分期可細分成 1、2、3、4、4S 五種分期，其人數各為 17、3、11、38、5 人；而疾病分期亦可大致分成早期(early stage)—包含 1、2 分期，疾病較良性，共有 20 例、晚期(advanced stage)—包含 3、4 分期，疾病較惡性，共有 49 例；以及 4S 分期，有 5 例，*ALK* 基因表現量分布如圖七 c，以曼-惠特尼 U 檢定(Mann Whitney U test)分析疾病早期(S1,S2)及晚期(S3,S4)兩組別並無統計上顯著差異($p=0.5473$)。而以費氏精確檢定進行統計，早期或晚期 NB 與 *ALK* 高/低表現量並無顯著正相關($p=0.4503$)(表五)。分析 74 例病理組織學資料，各種組織型態：NBx (11 例)、UNB (13 例)、PDNB (29 例)、DNB (6 例)、GNBi (8 例)、GN (7 例)；亦可將病理組織學歸類為分化不良(unfavorable)—包含 UNB、PDNB，共 42 例及分化良好(favorable)—包含 NBx、DNB、GNBi、GN，共 32 例，*ALK* 基因表現量分布如圖七 d，以曼-惠特尼 U 檢定(Mann Whitney U test)分析具有統計上顯著差異($p=0.0152$)。若以費氏精確檢定進行統計，腫瘤細胞分化程度低的 UNB 及 PDBN 與 *ALK* 高表現量具有統計上顯著正相關($p=0.0012$)(表五)。綜合以上，腫瘤中 *ALK* 表現量與細胞不良分化有顯著相關。

4.3.3 *ALK* 基因表現量與 *ALK* 基因突變之關聯性

ALK 基因突變及 *ALK* 基因表現與惡性神經母細胞瘤表型相關，但是目前尚無研究直接指出 *ALK* 基因突變所導致酪胺酸激酶(tyrosine kinase)持續性活化會造成 *ALK* 過度表現，事實上據報導確實有一些第 4 期的神經母細胞瘤病患，雖然 *ALK* 基因沒有發生突變，其 *ALK* 表現量仍高⁷⁷。因此，我們以神經母細胞瘤病患 *ALK* 基因有無突變與 *ALK* 表現量進行分析，分析之數據僅利用具有完整 *ALK* 基因型

以及對應 *ALK* 基因表現量的 59 筆資料，經曼-惠特尼 U 檢定結果顯示 7 例具 *ALK* 突變(*ALK*^{Mut+})之神經母細胞瘤，*ALK* 相對表現量與 *ALK* 無突變者(*ALK*^{WT}，n=52) 並無顯著差異($p=0.0938$)(圖八)。若以 *ALK*^{WT/Mut+} 與 *ALK* 高/低表現量進行費氏精確檢定分析，結果顯示並無統計上顯著相關($p=0.2229$)(表五)。由此可知，NB 腫瘤中 *ALK* 的表現量高/低與 *ALK* 是否發生突變沒有關聯。

4.3.4 *ALK* 基因表現量與 *ALK* 基因多型性之關聯性

本研究亦探討 *ALK* 基因多型性與 *ALK* 基因表現的關係，是以先前實驗在 *ALK* 基因 Exon20 到 Exon25 及其鄰近 Intron 部分所看見的 6 個 SNPs 與 *ALK* 表現量做比較，僅利用具有完整 *ALK* 基因型以及對應 *ALK* 基因表現量的 59 筆資料進行分析，實際結果如圖九所示。圖九 a-c 是位在 Exon 的 3 個 SNPs—E20:rs14674150、E21:rs3795850 及 E23:rs56247462 的 *ALK* 基因表現量分布，只有 E23:rs56247462 位點得進行曼-惠特尼 U 檢定分析，其統計結果各基因型間無顯著差異($p=0.5245$)。類似結果在 Intron 的 3 個 SNPs 也能看到，所有統計結果皆無顯著相關性(圖九 d-f)。進一步以費氏精確檢定分析各 SNPs 不同表現型與 *ALK* 表現量高或低，結果皆無統計上相關性(表六)。

4.3.5 *ALK* 基因表現量與 *ALK* 組織化學染色之關聯性

31 例病患 *ALK* 組織化學染色(IHC)臨床資料依照 *ALK* 抗體染色強度分成 IHC 陰性(grade0)及 IHC 陽性(grade1,2,3)，其 *ALK* 表現量分布如圖十所示，*ALK* IHC 陽性腫瘤中 *ALK* 相對表現量較高(median: IHC(-)為 0.2698; IHC(+))為 0.5462)，由於 IHC 陰性案例數過少，故無法以曼-惠特尼 U 檢定進行統計分析。

4.3.6 *ALK* 基因表現量與 *MYCN* 基因增幅及其 *MYCN* 表現量之相關性分析

研究顯示因 *ALK* 與 *MYCN* 位於人類染色體 2p 鄰近區域，故 *ALK* 基因增幅經


常伴隨 *MYCN* 基因增幅^{7,59,80}，為觀察 NB 腫瘤中 *ALK* 與 *MYCN* 兩者表現量的關係，針對具有完整 *ALK* 基因表現以及相對應 *MYCN* 基因表現之 70 筆資料進行統計分析。以 Spearman correlation test 分析，*ALK* 基因相對表現量與 *MYCN* 基因相對表現量具有高度正相關性($r=0.5831$)，統計上具有顯著差異($p<0.0001$)(圖十一 a)。但檢視 NB 病人腫瘤 *MYCN* 增幅與否其 *ALK* 表現量分布，雖然 *MYCN*-amplified NB 腫瘤中 *ALK* 表現分布較 *MYCN*-non-amplified NB 腫瘤高，但以曼-惠特尼 U 檢定進行分析並無統計上顯著差異($p=0.0654$) (圖十一 b)。

4.4 *ALK* 基因變異及基因表現量與神經母細胞瘤病患存活率之分析

4.4.1 *ALK* 基因突變與神經母細胞瘤病患不良存活率具顯著相關性

利用目前所蒐集到的神經母細胞瘤病人臨床資料，將病人腫瘤中 *ALK* 基因是否突變與病患確診後之復發時間(time to relapse)進行比對及作圖(Kaplan-Meier Survival Curves)，便可得到與病人腫瘤中 *ALK* 基因突變相關的無事件存活率(event-free survival, EFS)。與具有完整 *ALK* 基因型分析以及相對應神經母細胞瘤病人復發時間之臨床資料有 61 筆，其中 54 例為 *ALK* 基因未發生突變(ALK^{WT})、7 例具有 *ALK* 基因突變(ALK^{Mut+})：EFS 分析神經母細胞瘤病患， ALK^{Mut+} 組的五年存活率(5-year survival rate)為 0% (存活時間中位數(median survival time)為 10.0 個月)，遠低於 ALK^{WT} 病患的五年存活率 60.4%，以 Log-rank test 統計具有顯著差異(HR：4.2，95% CI：2.6-78.4， $p=0.0021$)(圖十二 a)。分析 OS 的結果， ALK^{Mut+} 組的五年存活率為 0% (存活時間中位數為 27.7 個月)，遠低於 ALK^{WT} 組病患的 74.4%，兩組間具有統計上的顯著差異(HR：5.6，95% CI：3.7-230.0， $p=0.0015$)(圖十二 b)。

進一步進行 NB 預後因子的次群分析，分析之數據僅使用具有完整 *ALK* 基因型及相對應 NB 預後因子之臨床資料：在 advanced stage NB 次群中進行分析， ALK^{Mut+} NB 病患的五年無事件存活率(EFS)為 0%(存活時間中位數為 10.0 個月)、



ALK^{WT} NB 病患為 38.7%(存活時間中位數為 26.1 個月)，以 Long-rank test 統計不具顯著差異($p=0.0725$)(圖十三 a)。分析整體存活率(OS)的結果， ALK^{Mut+} NB 病患的五年存活率為 0% (存活時間中位數為 27.7 個月)、 ALK^{WT} NB 病患為 46.6%(存活時間中位數為 39.0 個月)，以 Long-rank test 無統計顯著差異($p=0.0851$)(圖十三 a)。在 high-riskNB 中進行次群分析， ALK^{Mut+} NB 病患的五年無事件存活率(EFS)為 0%(存活時間中位數為 10.0 個月)、 ALK^{WT} NB 病患為 25.4%(存活時間中位數為 21.8 個月)，以 Long-rank test 無統計顯著差異($p=0.2156$)(圖十三 b)。分析整體存活率(OS)的結果， ALK^{Mut+} NB 病患的五年存活率為 0%(存活時間中位數為 27.7 個月)、 ALK^{WT} NB 病患為 23.2%(存活時間中位數為 38.5 個月)，以 Long-rank test 無統計顯著差異($p=0.3431$)(圖十三 b)。在 *MYCN*-amp 次群分析中，雖然 ALK^{Mut+} 及 ALK^{WT} 病患之 EFS 與 OS 皆為 0%，且無統計上顯著差異(EFS： $p=0.1182$ ，OS： $p=0.5289$)，但存活時間中位數以 ALK^{Mut+} (EFS：7.7 個月，OS：19.2 個月)略低於 ALK^{WT} (EFS：15.8 個月，OS：UD)(圖十三 c)。MYCN non-amplification 次群分析 EFS， ALK^{Mut+} NB 病患的五年無事件存活率(EFS)為 66.7%、 ALK^{WT} NB 病患為 67.3%，以 Long-rank test 統計無顯著差異($p=0.4447$)(圖十三 c)。分析 OS 的結果， ALK^{Mut+} NB 病患的五年存活率為 100%、 ALK^{WT} NB 病患為 79.4%，以 Long-rank test 統計無顯著差異($p=0.7842$)(圖十三 c)。綜合以上，雖然在惡性神經母細胞瘤預後因子(advanced stage、high-risk)次群分析中，病患是否發生 *ALK* 突變存活分析未達顯著統計差異，可能是發生 *ALK* 突變之病人個數少，導致以 Long-rank test 統計並無顯著差異，但是比較病患的五年存活率與存活時間中位數可見 ALK^{Mut+} 仍較 ALK^{WT} 為低，因此 *ALK* 突變可能是造成惡性神經母細胞瘤疾病較快進展(disease progression)之重要因子。此外，由於 *ALK* 突變個案數少，有 *MYCN* 擴增的病例全部已復發並多數死亡，因此目前無法從我們的結果得知 *ALK* 突變在 *MYCN* 增幅/未增幅 NB 中對臨床預後的影響。



4.4.2 ALK 基因多型性與神經母細胞瘤病患存活率之相關性

將目前所收集到的神經母細胞瘤病患確診後復發時間及死亡時間之臨床資料分別與本研究出現的 6 個位在 Exon20 到 Exon25 及其鄰近 Intron 部分的 SNPs，根據其基因型做 K-M 曲線便可獲得各自的 EFS 及 OS(圖十四)，實際統計結果只有 E23 的 rs56247462 位點其不同基因型間與病患無事件存活率(EFS)具有統計上顯著差異($p=0.0423$)，其餘 SNPs 皆與病患存活率無統計差異，如表七及表八所示。值得注意的是，位在 Exon23 +3600 G/C 位點的 SNP (rs56247462)，擁有 C 對偶基因($n=10$)的病患五年存活率較 G/G 基因型為高($n=51$)，也許在 Exon23 +3600 G/C 位點基因有變異之預後較好。

4.4.3 ALK 基因表現與神經母細胞瘤病患存活率之相關性

進行所有神經母細胞瘤腫瘤($n=74$)中 ALK 表現量高/低與病患之存活分析，其中 42 例為 ALK 基因表現量低(ALK^{low})、32 例具有 ALK 基因表現量高(ALK^{high})(圖十五 a)。從無事件存活率(EFS)的 Kaplan-Meier 存活曲線可知：若神經母細胞瘤病患 ALK 基因高度表現，其五年存活率(5-year survival rate)為 35.2% (存活時間中位數為 23.0 個月)，略低於 ALK 基因低量表現病患的 47.6%(存活時間中位數為 36.7 個月)，以 Log-rank test 統計並無顯著差異($p=0.1406$)。分析整體存活率(OS)： ALK^{high} 組的神經母細胞瘤病患五年存活率為 44.5%(存活時間中位數為 48.9 個月)，略低於 ALK^{low} 組病患的 64.5% (存活時間中位數為 66.5 個月)，兩組間在統計上無顯著差異($p=0.1192$)。進一步進行 51 筆初診斷 NB 腫瘤(尚未經過化療)中與病患之存活分析，其中有 27 例為 ALK 低量表現、24 例為 ALK 高度表現。EFS 分析中， ALK^{high} 組五年存活率 42.8%(存活時間中位數 23.0 個月)，略低於 ALK^{low} 組五年存活率 60.5%(存活時間中位數 91.3 個月)，但於統計上無顯著差異(HR：2.3，95% CI：1.0-6.2， $p=0.0600$)。分析 OS： ALK^{high} 組五年存活率為 53.0%，明顯低於 ALK^{low} 的五年存活率 71.4%，並具有統計上顯著差異(HR：4.8，95% CI：1.2-13.1， $p=0.0240$)。



第五章 討論

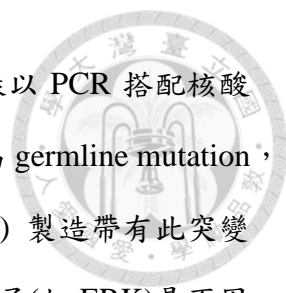
從本研究中，我們在 61 例 NB 腫瘤中發現 7 例有發生 *ALK* 基因突變，搭配臨床資料進行比對，發現 *ALK* 突變與惡性神經母細胞瘤：advanced stage、high risk、poorly differentiation, MYCN amplification 相關(表三)。而且 *ALK* 基因突變與 NB 病患預後差(EFS 及 OS 皆低)有統計上顯著差異(圖十二)。

本研究發現神經母細胞瘤中的 *ALK* 突變皆為 WT/mutant 雜合子。在這些腫瘤的 cDNA 定序分析中看到對應突變點的 WT 與 mutant 對偶基因訊號強度與 DNA 定序相當，顯示在 NB 腫瘤中 WT 與 mutant 對偶基因皆有表現，且 mutant 的轉譯表現並不比 WT 高。在 3 例 *ALK* F1174L 突變，有 2 例神經母細胞瘤病患腫瘤的 mutant allele 在基因定序時，訊號強度皆顯著低於 WT allele(圖三 a)，檢視資料結果，三例帶有 *ALK* F1174L 突變腫瘤接摘除自己先經過化療的病患，我們猜測可能因此手術取下的腫瘤組織混有非腫瘤部分，可能造成有突變對偶基因比例被稀釋，而 Sanger's sequencing 的靈敏度為 20%，可能因此偵測不到。

本研究中利用 Sanger's sequencing 檢查 *ALK* 的 kinase domain，除了檢視神經母細胞瘤中常出現的 3 個 *ALK* 基因突變熱點(F1174、F1245、R1275)，同時也可檢出是否出現其他 *ALK* 突變。從結果表二可知：61 例腫瘤中共發現 7 例發生突變(11.3%)，其中 3 例為 F1174 突變(3/7, 42.9%)、3 例為 F1245 突變(3/7, 42.9%)，以及 1 例未曾在神經母細胞瘤被報導過的 A1274 突變(1/7, 14.3%)；F1174 及 F1245 佔所有突變的 85.7%。與 2014 年 Bresler 等人發表於 Cancer Cell 的報告⁵⁶(1,956 例神經母細胞瘤中發生 *ALK* 突變比例為 8%；而 3 個突變熱點分別佔所有 *ALK* 突變之比例為 F1174：30%、F1245：12%、R1275：43%，共佔所有突變的 85%)相比，我們發現 *ALK* 突變發生率較國外報告略高，且 *ALK* 突變集中於 advanced NB，可能是因本研究中所收集的樣本中 advanced NB 比例(50/76, 65.8%)較 Bresler 等人的研究對象(216/476, 46.0%)高之故。在國人的神經母細胞瘤中，*ALK* 突變以 F1174L、F1245 為主，並未發現 R1275 突變，與國外統計差異較大。目前許多研究顯示若

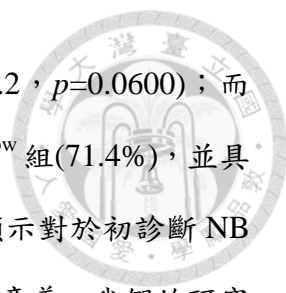
ALK 發生 F1174L 突變，則對 *ALK* 抑制劑 Crizotinib 有抗性，對藥物的感受性較差^{56,59}，因此若未來 *ALK* 抑制劑可用於國人神經母細胞瘤病患，*ALK* 基因突變檢測相當重要，對於具有 *ALK* F1174L 突變的病例，可預期病患使用 Crizotinib 的標靶治療效果不好，必須考慮改用第二代 *ALK* 抑制劑如 Certinib、Alectinib 做為病患的輔助治療。

在神經母細胞瘤腫瘤編號 254 所發現的 A1274 基因變異(圖三 c)，我們暫將其認定為突變而非 SNP 的理由在於：(1) 此基因變異只發現於病患，未發生在健康人。(2) 於 Ensembl 基因資料庫(CANCER-GENOME, EVA-EXAC, PERLEGEN database)有記載(rs45502292)，屬於 mis-sense variant，單一核苷酸由 G 置換成 A，而導致第 1274 號胺基酸由丙胺酸(alanine)變成蘇胺酸(threonine)；而此基因變異發生頻率極低，G allele: A allele=12,1411:1 (EVA-EXAC database)。(3) 根據 NCBI 基因資料庫(MMDB—Entrez's 'Structure' database)查詢到 *ALK* 3D 結構，此基因變異座落的位置為 *ALK* tyrosine kinase domain 的 ATP binding site、active site 以及 activation loop (A-loop)(附錄九)，皆是參與 *ALK* 活化的重要位置。(4) 根據在 NCBI 基因資料庫(Conserved Domain Database, CDD)查詢 *ALK* 基因第 1274 號胺基酸 alanine 位於 *ALK* A-loop，此位點在不同物種間的 *ALK* A-loop 序列具有高度相似性，顯示若此位點發生基因變異應具有重要意義(附錄十)。(5) 依照發病年紀(44.5 個月，3.71 歲)與疾病分期(Stage 4)，此腫瘤屬於惡性神經母細胞瘤。然而，此基因變異也具有不排除為 SNP 的理由：(1) 此基因變異目前在神經母細胞瘤未曾被報導過，而唯一出現過的記錄是 2007 年 Greenman 等人報導 *ALK* A1274T 發生於一名罹患大腸腺癌(colorectal adenocarcinoma) 的 75 歲男性並定義其為基因變異型(germline variant)⁸⁵。(2) 關於本病例神經母細胞瘤預後指標，除了病患發病年紀較晚以及屬於 Stage 4 外，沒有 *MYCN* 增幅、追蹤 21.9 個月未發生疾病復發或死亡。此外腫瘤 *ALK* 相對表現為低量。雖然目前我們暫將 *ALK* A1274T 基因視為與神經母細胞瘤相關之突變，但後續應做一些實驗進一步證實目前的說法。例如：(1) 取得腫瘤




編號 254 此病患的其他組織(如周邊血液、口腔黏膜細胞)，同樣以 PCR 搭配核酸定序方式確認該基因變異是否出現在一般組織中，以確定是否為 germline mutation，若是，則應該考慮檢測父母或其他親屬，查詢相關家族病史。(2) 製造帶有此突變的 plasmid，transfect 至 NB 細胞後，偵測 ALK 下游訊息傳遞分子(如 ERK)是否因而活化。(3) 可進行一系列細胞功能性試驗(functional assay)：在 ALK 無突變的 NB 細胞中製造此突變(例如 site directed mutagenesis)，與對照細胞是否產生與腫瘤癌化相關特性之改變，如 colony formation、migration、invasion、xenograft tumor formation 等。

以 ALK 基因突變與 ALK 基因表現量分別探討神經母細胞瘤病患的無事件存活率及整體存活率，其結果顯示有 ALK^{Mut+} 組相較於 ALK^{WT} 組與病患五年存活率較低具有高度正相關(EFS：HR 4.2，95% CI 2.6-78.4， $p=0.0021$ 及 OS：HR 5.6，95% CI 3.7-230.0， $p=0.0015$)(圖十二)。但本研究中 ALK^{Mut+} 組造成病患存活率較低，雖然可能與具 ALK 突變的病患多為第 4 期、high risk 及 MYCN 增幅有關；然而，進行 advanced stage NB($n=37$)及 high-risk NB($n=30$)次群分析，帶有 ALK 突變的腫瘤，病患之五年存活率與存活時間中位數皆較 ALK 未發生突變為低(圖十三 a,b)，顯示 ALK 突變對於惡性神經母細胞瘤是促進疾病進展因子。在所有 NB 腫瘤中 ALK 基因表現高/低與病患五年存活率之分析中，雖然 ALK 高表現組傾向較差存活，但統計上無顯著差異(EFS： $p=0.1406$ 及 OS： $p=0.1192$)，而本研究中個案無論 ALK 高度或低量表現，病患的五年存活率皆僅剩 40%左右(圖十五)，可能原因有：(1) 本研究中收集的樣本多為 advanced NB (50/76，65.8%)有關，advanced NB 病患預後本來就差，因此研究結果無法顯示 ALK 相對高或低表現量與病患存活率之關聯性。(2) 根據 2015 年 Regairaz 等人發表的研究⁸⁶，說明神經母細胞瘤腫瘤有 ALK 基因表現並非導致 NB 癌化的關鍵，能表現活化態 phospho-ALK 才更重要。我們進一步進行初診斷 NB 腫瘤(尚未經過化療)中 ALK 高/低表現與病患之存活分析，發現 ALK^{high} 組 EFS 的五年存活率(42.8%，存活時間中位數 23.0 個月)低於 ALK^{low} 組



(60.5%，存活時間中位數 91.3 個月)(HR：2.3，95% CI：1.0-6.2， $p=0.0600$)；而 OS 分析中， ALK^{high} 組 EFS 的五年存活率(53.0%)明顯低於 ALK^{low} 組(71.4%)，並具有統計上顯著差異(HR：4.8，95% CI：1.2-13.11， $p=0.0240$)，顯示對於初診斷 NB 腫瘤而言，腫瘤中 ALK 基因高/低表現對於 NB 病患存活具臨床意義。我們的研究中看到 ALK 發生突變與 ALK 相對表現量並無明顯關聯，但帶有 ALK kinase 活化性突變的個案疾病進展較快，因此頗能支持 ALK 活化性突變是 NB 癌化過程中重要的促進因子。但是以 K-M survival curve 分析 31 例已完成 ALK 免疫組織化學染色 NB 病人(附錄十一)，其中 2 例為 IHC 陰性、29 例為 IHC 陽性。從 EFS 及 OS 分析皆是 ALK IHC 陰性的 NB 病患存活率低於 IHC 陽性者(EFS： $p=0.0214$ 、OS： $p=0.0123$)，造成結果與預期完全相反的原因，應是 2 例 IHC 陰性 NB 病患皆為 advanced stage(第 4 期)，而且近期追蹤皆已復發並死亡。本研究最初是以適用於 NSCLC 樣本中測定 ALK 表現的抗體 D5F3 進行 NB 檢體組織免疫化學染色結果來設定 ALK qRT-PCR 檢測其相對表現量高/低的閾值，其結果無法找出適當閾值區分 ALK 高/低表現量(附錄十二)，除了與 IHC 陰性案例數少有關，應也與上述提到的 IHC 陰性患者皆屬 advanced stage 有關。

透過本研究實驗數據與系列臨床資料的統計分析，我們驗證了：(1) ALK 基因突變常出現在惡性神經母細胞瘤-INSS 分期較後期(尤其是 Stage 4)、細胞分化程度較低者(如：UNB、PDNB)、風險分群較高者(high-risk)。具有 MYCN 增幅的 NB 患者，病患的預後較差，死亡率高；而在惡性神經母細胞瘤中 ALK 突變似乎可加速疾病進展。ALK 突變病例在現今未使用 ALK 抑制劑的傳統治療下大多數復發死亡。因此透過檢測病患腫瘤是否具 ALK 基因突變及為何種突變，能在診斷早期預測病人的預後及選擇何種 ALK 抑制劑作為病患的輔助治療。(2) 不論 ALK 基因是否突變，神經母細胞瘤腫瘤仍可能有 ALK 高度表現；而 ALK 的高表現量在 ALK^{WT} 及 ALK^{Mut+} 病患中皆可發現。(3) 腫瘤中 ALK 表現與 MYCN 表現有顯著正相關。2013 年 Hasan 等人的研究⁷，在神經母細胞瘤臨床樣本中發現 MYCN-amplified NB 其




ALK 高度表現；且 MYCN 能透過與 *ALK* 的 promoter region 結合來增加 *ALK* 的轉錄表現。Schönherr 等人⁸⁰ 則提出 *ALK* 訊息傳導可活化 ERK，從而啟動 *MYCN* 的 promoter。我們看到 *ALK* 表現在有 *MYCN* 增幅 NB 中較無 *MYCN* 增幅 NB 腫瘤中較高(但統計尚未達顯著差異)，但 *ALK* 與 *MYCN* 表現呈顯著正相關，結果支持 Hasan, Schönherr 等人的論點(圖十一)。在本計畫中，*ALK* 表現只在分化不良的 NB 腫瘤中顯著較高(圖七、表五)，並且腫瘤中 *ALK* 高表現與病人不良預後有顯著關聯(圖十五)。透過在網路可及的國際癌症資料庫分析，*ALK* 高表現的確與 NB 的不良臨床預後相關，且以往在細胞實驗及腫瘤移植小鼠模型中都看到 *ALK* 抑制劑可以抑制腫瘤的發生，*ALK* 抑制劑搭配現行的治療對於 NB 腫瘤(尤其是高危險性或帶有 *ALK* 突變的惡性神經母細胞瘤)仍具有相當大的潛力。此外，由於國人的 NB 病例帶有對 Crizotinib 具抗藥性的 *ALK* F1174L 突變比例較國外為高，未來若要使用 *ALK* 抑制劑治療國人神經母細胞瘤，*ALK* 基因 kinase domain 突變之篩檢將十分重要。

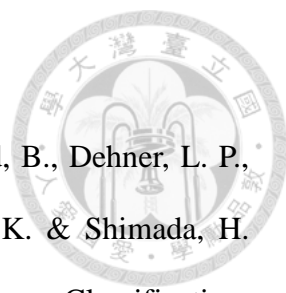
第六章 參考文獻


- 1 Brodeur, G. M. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* **3**, 203-216 (2003).
- 2 中華民國兒童癌症基金會. 兒童神經母細胞瘤, <http://www.ccroc.org.tw/child/child_affection_read.php?a_id=15> (
- 3 Hoehner, J. C., Gestblom, C., Hedborg, F., Sandstedt, B., Olsen, L. & Pahlman, S. A developmental model of neuroblastoma: differentiating stroma-poor tumors' progress along an extra-adrenal chromaffin lineage. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **75**, 659-675 (1996).
- 4 Center, S. F.-H. a. M. *Unusual Cancers of Childhood Treatment (PDQ®)* *, <<https://www.saintfranciscare.com/saintfranciscoctors/cancercenter/nci/CancerSummaryHP.aspx?id=CDR62872.xml>> (
- 5 Janz, L. E. a. T. *Childhood cancer incidence and mortality in Canada*, <<http://www.statcan.gc.ca/pub/82-624-x/2015001/article/14213-eng.htm>> (
- 6 CelebrityDiagnosis. *An Overview of Childhood Cancer*, <<http://www.celebritydiagnosis.com/2014/09/hear-sara-bareillescyndi-lauper-ma-shup-truly-brave-support-childhood-cancer-patients/>> (
- 7 Hasan, M. K., Nafady, A., Takatori, A., Kishida, S., Ohira, M., Suenaga, Y., Hossain, S., Akter, J., Ogura, A., Nakamura, Y., Kadomatsu, K. & Nakagawara, A. ALK is a MYCN target gene and regulates cell migration and invasion in neuroblastoma. *Scientific Reports* **3**, 3450, doi:10.1038/srep03450 (2013).
- 8 Philip A. Pizzo, D. G. P. *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. 895–937 (2002).
- 9 NIH. *Neuroblastoma Treatment (PDQ®)—Health Professional Version*, <http://www.cancer.gov/types/neuroblastoma/hp/neuroblastoma-treatment-pdq#cit/section_1.5> (



- 
- 10 Howlader N, N. A., Krapcho M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009.
- 11 Gurney, J. G., Ross, J. A., Wall, D. A., Bleyer, W. A., Severson, R. K. & Robison, L. L. Infant cancer in the U.S.: histology-specific incidence and trends, 1973 to 1992. *Journal of pediatric hematology/oncology* **19**, 428-432 (1997).
- 12 London, W. B., Castleberry, R. P., Matthay, K. K., Look, A. T., Seeger, R. C., Shimada, H., Thorner, P., Brodeur, G., Maris, J. M., Reynolds, C. P. & Cohn, S. L. Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **23**, 6459-6465, doi:10.1200/jco.2005.05.571 (2005).
- 13 中華民國兒童癌症基金會. 100-103 年度新發病個案疾病分類、年齡及性別統計表.
- 14 內政部統計處. 102-104 年人口結構分析.
- 15 Mosse, Y. P., Laudenslager, M., Longo, L., Cole, K. A., Wood, A., Attiyeh, E. F., Laquaglia, M. J., Sennett, R., Lynch, J. E., Perri, P., Laureys, G., Speleman, F., Kim, C., Hou, C., Hakonarson, H., Torkamani, A., Schork, N. J., Brodeur, G. M., Tonini, G. P., Rappaport, E., Devoto, M. & Maris, J. M. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* **455**, 930-935, doi:10.1038/nature07261 (2008).
- 16 Triche, T. J. Neuroblastoma--biology confronts nosology. *Archives of pathology & laboratory medicine* **110**, 994-996 (1986).
- 17 Messina, J. A., Cheng, S. C., Franc, B. L., Charron, M., Shulkin, B., To, B., Maris, J. M., Yanik, G., Hawkins, R. A. & Matthay, K. K. Evaluation of semi-quantitative scoring system for metaiodobenzylguanidine (mIBG) scans in patients with relapsed neuroblastoma. *Pediatric blood & cancer* **47**, 865-874,


- doi:10.1002/pbc.20777 (2006).
- 18 Brodeur, G. M., Pritchard, J., Berthold, F., Carlsen, N. L., Castel, V., Castleberry, R. P., De Bernardi, B., Evans, A. E., Favrot, M., Hedborg, F. & et al. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **11**, 1466-1477 (1993).
- 19 BD, J. *Neuroblastoma Workup*, <<http://emedicine.medscape.com/article/439263-workup>> (2015).
- 20 Maris, J. M. Recent advances in neuroblastoma. *The New England journal of medicine* **362**, 2202-2211, doi:10.1056/NEJMra0804577 (2010).
- 21 Kushner, B. H. & Cheung, N. K. Neuroblastoma--from genetic profiles to clinical challenge. *The New England journal of medicine* **353**, 2215-2217, doi:10.1056/NEJMp058251 (2005).
- 22 Park, J. R., Eggert, A. & Caron, H. Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. *Pediatric clinics of North America* **55**, 97-120, x, doi:10.1016/j.pcl.2007.10.014 (2008).
- 23 Evans, A. E., D'Angio, G. J., Propert, K., Anderson, J. & Hann, H. W. Prognostic factor in neuroblastoma. *Cancer* **59**, 1853-1859 (1987).
- 24 Roy Choudhury, S., Karmakar, S., Banik, N. L. & Ray, S. K. Targeting angiogenesis for controlling neuroblastoma. *Journal of oncology* **2012**, 782020, doi:10.1155/2012/782020 (2012).
- 25 NANT. *Neuroblastoma*, <http://www.nant.org/Patients_and_Families/neuroblastoma.php> (
- 26 Shimada, H., Ambros, I. M., Dehner, L. P., Hata, J., Joshi, V. V., Roald, B., Stram, D. O., Gerbing, R. B., Lukens, J. N., Matthay, K. K. & Castleberry, R. P. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system).

- 
- Cancer* **86**, 364-372 (1999).
- 27 Peuchmaur, M., d'Amore, E. S., Joshi, V. V., Hata, J., Roald, B., Dehner, L. P., Gerbing, R. B., Stram, D. O., Lukens, J. N., Matthay, K. K. & Shimada, H. Revision of the International Neuroblastoma Pathology Classification: confirmation of favorable and unfavorable prognostic subsets in ganglioneuroblastoma, nodular. *Cancer* **98**, 2274-2281, doi:10.1002/cncr.11773 (2003).
- 28 Shimada, H. B., J; Sano, H. Neuroblastoma and Related Tumors. *Pathology Case Reviews* **10**, 252-256 (2005).
- 29 Monclair, T., Brodeur, G. M., Ambros, P. F., Brisse, H. J., Cecchetto, G., Holmes, K., Kaneko, M., London, W. B., Matthay, K. K., Nuchtern, J. G., von Schweinitz, D., Simon, T., Cohn, S. L. & Pearson, A. D. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **27**, 298-303, doi:10.1200/jco.2008.16.6876 (2009).
- 30 Strother, D. R., London, W. B., Schmidt, M. L., Brodeur, G. M., Shimada, H., Thorner, P., Collins, M. H., Tagge, E., Adkins, S., Reynolds, C. P., Murray, K., Lavey, R. S., Matthay, K. K., Castleberry, R., Maris, J. M. & Cohn, S. L. Outcome after surgery alone or with restricted use of chemotherapy for patients with low-risk neuroblastoma: results of Children's Oncology Group study P9641. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **30**, 1842-1848, doi:10.1200/jco.2011.37.9990 (2012).
- 31 Baker, D. L., Schmidt, M. L., Cohn, S. L., Maris, J. M., London, W. B., Buxton, A., Stram, D., Castleberry, R. P., Shimada, H., Sandler, A., Shamberger, R. C., Look, A. T., Reynolds, C. P., Seeger, R. C. & Matthay, K. K. Outcome after reduced chemotherapy for intermediate-risk neuroblastoma. *The New England*

- 
- journal of medicine* **363**, 1313-1323, doi:10.1056/NEJMoa1001527 (2010).
- 32 Brodeur, G. M. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* **3**, 203-216, doi:10.1038/nrc1014 (2003).
- 33 Seeger, R. C., Brodeur, G. M., Sather, H., Dalton, A., Siegel, S. E., Wong, K. Y. & Hammond, D. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *The New England journal of medicine* **313**, 1111-1116, doi:10.1056/nejm198510313131802 (1985).
- 34 Kohl, N. E., Gee, C. E. & Alt, F. W. Activated expression of the N-myc gene in human neuroblastomas and related tumors. *Science (New York, N.Y.)* **226**, 1335-1337 (1984).
- 35 Riley, R. D., Heney, D., Jones, D. R., Sutton, A. J., Lambert, P. C., Abrams, K. R., Young, B., Wailoo, A. J. & Burchill, S. A. A systematic review of molecular and biological tumor markers in neuroblastoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **10**, 4-12 (2004).
- 36 Bown, N., Cotterill, S., Lastowska, M., O'Neill, S., Pearson, A. D., Plantaz, D., Meddeb, M., Danglot, G., Brinkschmidt, C., Christiansen, H., Laureys, G., Speleman, F., Nicholson, J., Bernheim, A., Betts, D. R., Vandesompele, J. & Van Roy, N. Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *The New England journal of medicine* **340**, 1954-1961, doi:10.1056/nejm199906243402504 (1999).
- 37 White, P. S., Maris, J. M., Beltinger, C., Sulman, E., Marshall, H. N., Fujimori, M., Kaufman, B. A., Biegel, J. A., Allen, C., Hilliard, C., Valentine, M. B., Look, A. T., Enomoto, H., Sakiyama, S. & Brodeur, G. M. A region of consistent deletion in neuroblastoma maps within human chromosome 1p36.2-36.3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

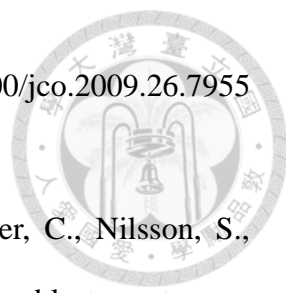



- America* **92**, 5520-5524 (1995).
- 38 Saito-Ohara, F., Imoto, I., Inoue, J., Hosoi, H., Nakagawara, A., Sugimoto, T. & Inazawa, J. PPM1D is a potential target for 17q gain in neuroblastoma. *Cancer research* **63**, 1876-1883 (2003).
- 39 Giannini, G., Cerignoli, F., Mellone, M., Massimi, I., Ambrosi, C., Rinaldi, C., Dominici, C., Frati, L., Screpanti, I. & Gulino, A. High mobility group A1 is a molecular target for MYCN in human neuroblastoma. *Cancer research* **65**, 8308-8316, doi:10.1158/0008-5472.can-05-0607 (2005).
- 40 Lasorella, A., Nosedà, M., Beyna, M., Yokota, Y. & Iavarone, A. Id2 is a retinoblastoma protein target and mediates signalling by Myc oncoproteins. *Nature* **407**, 592-598, doi:10.1038/35036504 (2000).
- 41 Lasorella, A., Boldrini, R., Dominici, C., Donfrancesco, A., Yokota, Y., Inserra, A. & Iavarone, A. Id2 is critical for cellular proliferation and is the oncogenic effector of N-myc in human neuroblastoma. *Cancer research* **62**, 301-306 (2002).
- 42 Hogarty, M. D., Norris, M. D., Davis, K., Liu, X., Evageliou, N. F., Hayes, C. S., Pawel, B., Guo, R., Zhao, H., Sekyere, E., Keating, J., Thomas, W., Cheng, N. C., Murray, J., Smith, J., Sutton, R., Venn, N., London, W. B., Buxton, A., Gilmour, S. K., Marshall, G. M. & Haber, M. ODC1 is a critical determinant of MYCN oncogenesis and a therapeutic target in neuroblastoma. *Cancer research* **68**, 9735-9745, doi:10.1158/0008-5472.can-07-6866 (2008).
- 43 Rounbehler, R. J., Li, W., Hall, M. A., Yang, C., Fallahi, M. & Cleveland, J. L. Targeting ornithine decarboxylase impairs development of MYCN-amplified neuroblastoma. *Cancer research* **69**, 547-553, doi:10.1158/0008-5472.can-08-2968 (2009).
- 44 Chen, L., Iraci, N., Gherardi, S., Gamble, L. D., Wood, K. M., Perini, G., Lunec,

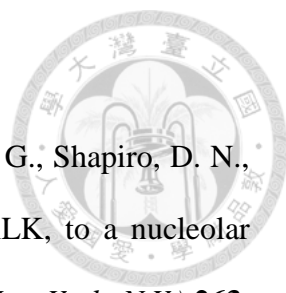
- 
- J. & Tweddle, D. A. p53 is a direct transcriptional target of MYCN in neuroblastoma. *Cancer research* **70**, 1377-1388, doi:10.1158/0008-5472.can-09-2598 (2010).
- 45 Hatzi, E., Murphy, C., Zoepfel, A., Ahorn, H., Tontsch, U., Bamberger, A. M., Yamauchi-Takahara, K., Schweigerer, L. & Fotsis, T. N-myc oncogene overexpression down-regulates leukemia inhibitory factor in neuroblastoma. *European journal of biochemistry / FEBS* **269**, 3732-3741 (2002).
- 46 Fredlund, E., Ringner, M., Maris, J. M. & Pahlman, S. High Myc pathway activity and low stage of neuronal differentiation associate with poor outcome in neuroblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 14094-14099, doi:10.1073/pnas.0804455105 (2008).
- 47 Sawai, S., Shimono, A., Wakamatsu, Y., Palmes, C., Hanaoka, K. & Kondoh, H. Defects of embryonic organogenesis resulting from targeted disruption of the N-myc gene in the mouse. *Development (Cambridge, England)* **117**, 1445-1455 (1993).
- 48 Sawai, S., Shimono, A., Hanaoka, K. & Kondoh, H. Embryonic lethality resulting from disruption of both N-myc alleles in mouse zygotes. *The New biologist* **3**, 861-869 (1991).
- 49 Weiss, W. A., Aldape, K., Mohapatra, G., Feuerstein, B. G. & Bishop, J. M. Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. *The EMBO journal* **16**, 2985-2995, doi:10.1093/emboj/16.11.2985 (1997).
- 50 Janoueix-Lerosey, I., Schleiermacher, G., Michels, E., Mosseri, V., Ribeiro, A., Lequin, D., Vermeulen, J., Couturier, J., Peuchmaur, M., Valent, A., Plantaz, D., Rubie, H., Valteau-Couanet, D., Thomas, C., Combaret, V., Rousseau, R., Eggert, A., Michon, J., Speleman, F. & Delattre, O. Overall genomic pattern is a predictor of outcome in neuroblastoma. *Journal of clinical oncology : official*

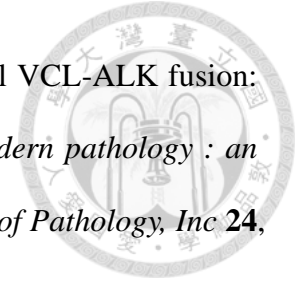
journal of the American Society of Clinical Oncology **27**, 1026-1033,
doi:10.1200/jco.2008.16.0630 (2009).

- 51 Schleiermacher, G., Michon, J., Ribeiro, A., Pierron, G., Mosseri, V., Rubie, H., Munzer, C., Benard, J., Auger, N., Combaret, V., Janoueix-Lerosey, I., Pearson, A., Tweddle, D. A., Bown, N., Gerrard, M., Wheeler, K., Noguera, R., Villamon, E., Canete, A., Castel, V., Marques, B., de Lacerda, A., Tonini, G. P., Mazzocco, K., Defferrari, R., de Bernardi, B., di Cataldo, A., van Roy, N., Brichard, B., Ladenstein, R., Ambros, I., Ambros, P., Beiske, K., Delattre, O. & Couturier, J. Segmental chromosomal alterations lead to a higher risk of relapse in infants with MYCN-non-amplified localised unresectable/disseminated neuroblastoma (a SIOOPEN collaborative study). *British journal of cancer* **105**, 1940-1948, doi:10.1038/bjc.2011.472 (2011).
- 52 Defferrari, R., Mazzocco, K., Ambros, I. M., Ambros, P. F., Bedwell, C., Beiske, K., Benard, J., Berbegall, A. P., Bown, N., Combaret, V., Couturier, J., Erminio, G., Gambini, C., Garaventa, A., Gross, N., Haupt, R., Kohler, J., Jeison, M., Lunec, J., Marques, B., Martinsson, T., Noguera, R., Parodi, S., Schleiermacher, G., Tweddle, D. A., Valent, A., Van Roy, N., Vicha, A., Villamon, E. & Tonini, G. P. Influence of segmental chromosome abnormalities on survival in children over the age of 12 months with unresectable localised peripheral neuroblastic tumours without MYCN amplification. *British journal of cancer* **112**, 290-295, doi:10.1038/bjc.2014.557 (2015).
- 53 Schleiermacher, G., Janoueix-Lerosey, I., Ribeiro, A., Klijanienko, J., Couturier, J., Pierron, G., Mosseri, V., Valent, A., Auger, N., Plantaz, D., Rubie, H., Valteau-Couanet, D., Bourdeaut, F., Combaret, V., Bergeron, C., Michon, J. & Delattre, O. Accumulation of segmental alterations determines progression in neuroblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American*

- 
- Society of Clinical Oncology* **28**, 3122-3130, doi:10.1200/jco.2009.26.7955 (2010).
- 54 Caren, H., Kryh, H., Nethander, M., Sjoberg, R. M., Trager, C., Nilsson, S., Abrahamsson, J., Kogner, P. & Martinsson, T. High-risk neuroblastoma tumors with 11q-deletion display a poor prognostic, chromosome instability phenotype with later onset. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 4323-4328, doi:10.1073/pnas.0910684107 (2010).
- 55 Joshi, V. V., Cantor, A. B., Brodeur, G. M., Look, A. T., Shuster, J. J., Altshuler, G., Larkin, E. W., Holbrook, C. T., Silverman, J. F., Norris, H. T. & et al. Correlation between morphologic and other prognostic markers of neuroblastoma. A study of histologic grade, DNA index, N-myc gene copy number, and lactic dehydrogenase in patients in the Pediatric Oncology Group. *Cancer* **71**, 3173-3181 (1993).
- 56 Bresler, S. C., Weiser, D. A., Huwe, P. J., Park, J. H., Krytska, K., Ryles, H., Laudenslager, M., Rappaport, E. F., Wood, A. C., McGrady, P. W., Hogarty, M. D., London, W. B., Radhakrishnan, R., Lemmon, M. A. & Mosse, Y. P. ALK mutations confer differential oncogenic activation and sensitivity to ALK inhibition therapy in neuroblastoma. *Cancer cell* **26**, 682-694, doi:10.1016/j.ccell.2014.09.019 (2014).
- 57 Iwahara, T., Fujimoto, J., Wen, D., Cupples, R., Bucay, N., Arakawa, T., Mori, S., Ratzkin, B. & Yamamoto, T. Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene* **14**, 439-449, doi:10.1038/sj.onc.1200849 (1997).
- 58 Morris, S. W., Naeve, C., Mathew, P., James, P. L., Kirstein, M. N., Cui, X. & Witte, D. P. ALK, the chromosome 2 gene locus altered by the t(2;5) in non-Hodgkin's lymphoma, encodes a novel neural receptor tyrosine kinase that

- 
- is highly related to leukocyte tyrosine kinase (LTK). *Oncogene* **14**, 2175-2188, doi:10.1038/sj.onc.1201062 (1997).
- 59 Mano, H. ALKoma: a cancer subtype with a shared target. *Cancer discovery* **2**, 495-502, doi:10.1158/2159-8290.cd-12-0009 (2012).
- 60 Beckmann, G. & Bork, P. An adhesive domain detected in functionally diverse receptors. *Trends in biochemical sciences* **18**, 40-41 (1993).
- 61 Pulford, K., Lamant, L., Morris, S. W., Butler, L. H., Wood, K. M., Stroud, D., Delsol, G. & Mason, D. Y. Detection of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and nucleolar protein nucleophosmin (NPM)-ALK proteins in normal and neoplastic cells with the monoclonal antibody ALK1. *Blood* **89**, 1394-1404 (1997).
- 62 Stoica, G. E., Kuo, A., Aigner, A., Sunitha, I., Souttou, B., Malerczyk, C., Caughey, D. J., Wen, D., Karavanov, A., Riegel, A. T. & Wellstein, A. Identification of anaplastic lymphoma kinase as a receptor for the growth factor pleiotrophin. *The Journal of biological chemistry* **276**, 16772-16779, doi:10.1074/jbc.M010660200 (2001).
- 63 Stoica, G. E., Kuo, A., Powers, C., Bowden, E. T., Sale, E. B., Riegel, A. T. & Wellstein, A. Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types. *The Journal of biological chemistry* **277**, 35990-35998, doi:10.1074/jbc.M205749200 (2002).
- 64 Mathivet, T., Mazot, P. & Vigny, M. In contrast to agonist monoclonal antibodies, both C-terminal truncated form and full length form of Pleiotrophin failed to activate vertebrate ALK (anaplastic lymphoma kinase)? *Cellular signalling* **19**, 2434-2443, doi:10.1016/j.cellsig.2007.07.011 (2007).
- 65 Pulford, K., Lamant, L., Espinos, E., Jiang, Q., Xue, L., Turturro, F., Delsol, G. & Morris, S. W. The emerging normal and disease-related roles of anaplastic lymphoma kinase. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **61**, 2939-2953,

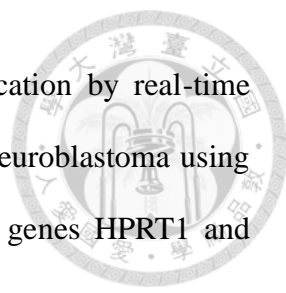
- 
- doi:10.1007/s00018-004-4275-9 (2004).
- 66 Morris, S. W., Kirstein, M. N., Valentine, M. B., Dittmer, K. G., Shapiro, D. N., Saltman, D. L. & Look, A. T. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science (New York, N.Y.)* **263**, 1281-1284 (1994).
- 67 Lawrence, B., Perez-Atayde, A., Hibbard, M. K., Rubin, B. P., Dal Cin, P., Pinkus, J. L., Pinkus, G. S., Xiao, S., Yi, E. S., Fletcher, C. D. & Fletcher, J. A. TPM3-ALK and TPM4-ALK oncogenes in inflammatory myofibroblastic tumors. *The American journal of pathology* **157**, 377-384, doi:10.1016/s0002-9440(10)64550-6 (2000).
- 68 Jazii, F. R., Najafi, Z., Malekzadeh, R., Conrads, T. P., Ziaee, A. A., Abnet, C., Yazdznbod, M., Karkhane, A. A. & Salekdeh, G. H. Identification of squamous cell carcinoma associated proteins by proteomics and loss of beta tropomyosin expression in esophageal cancer. *World journal of gastroenterology* **12**, 7104-7112 (2006).
- 69 Sugawara, E., Togashi, Y., Kuroda, N., Sakata, S., Hatano, S., Asaka, R., Yuasa, T., Yonese, J., Kitagawa, M., Mano, H., Ishikawa, Y. & Takeuchi, K. Identification of anaplastic lymphoma kinase fusions in renal cancer: large-scale immunohistochemical screening by the intercalated antibody-enhanced polymer method. *Cancer* **118**, 4427-4436, doi:10.1002/cncr.27391 (2012).
- 70 Soda, M., Choi, Y. L., Enomoto, M., Takada, S., Yamashita, Y., Ishikawa, S., Fujiwara, S., Watanabe, H., Kurashina, K., Hatanaka, H., Bando, M., Ohno, S., Ishikawa, Y., Aburatani, H., Niki, T., Sohara, Y., Sugiyama, Y. & Mano, H. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* **448**, 561-566, doi:10.1038/nature05945 (2007).
- 71 Debelenko, L. V., Raimondi, S. C., Daw, N., Shivakumar, B. R., Huang, D.,



- Nelson, M. & Bridge, J. A. Renal cell carcinoma with novel VCL-ALK fusion: new representative of ALK-associated tumor spectrum. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **24**, 430-442, doi:10.1038/modpathol.2010.213 (2011).
- 72 Marino-Enriquez, A., Ou, W. B., Weldon, C. B., Fletcher, J. A. & Perez-Atayde, A. R. ALK rearrangement in sickle cell trait-associated renal medullary carcinoma. *Genes, chromosomes & cancer* **50**, 146-153, doi:10.1002/gcc.20839 (2011).
- 73 Chen, Y., Takita, J., Choi, Y. L., Kato, M., Ohira, M., Sanada, M., Wang, L., Soda, M., Kikuchi, A., Igarashi, T., Nakagawara, A., Hayashi, Y., Mano, H. & Ogawa, S. Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature* **455**, 971-974, doi:10.1038/nature07399 (2008).
- 74 George, R. E., Sanda, T., Hanna, M., Frohling, S., Luther, W., 2nd, Zhang, J., Ahn, Y., Zhou, W., London, W. B., McGrady, P., Xue, L., Zozulya, S., Gregor, V. E., Webb, T. R., Gray, N. S., Gilliland, D. G., Diller, L., Greulich, H., Morris, S. W., Meyerson, M. & Look, A. T. Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature* **455**, 975-978, doi:10.1038/nature07397 (2008).
- 75 Janoueix-Lerosey, I., Lequin, D., Brugieres, L., Ribeiro, A., de Pontual, L., Combaret, V., Raynal, V., Puisieux, A., Schleiermacher, G., Pierron, G., Valteau-Couanet, D., Frebourg, T., Michon, J., Lyonnet, S., Amiel, J. & Delattre, O. Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature* **455**, 967-970, doi:10.1038/nature07398 (2008).
- 76 R2 database, <<http://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>> (
- 77 Passoni, L., Longo, L., Collini, P., Coluccia, A. M., Bozzi, F., Podda, M., Gregorio, A., Gambini, C., Garaventa, A., Pistoia, V., Del Grosso, F., Tonini, G.



- P., Cheng, M., Gambacorti-Passerini, C., Anichini, A., Fossati-Bellani, F., Di Nicola, M. & Luksch, R. Mutation-independent anaplastic lymphoma kinase overexpression in poor prognosis neuroblastoma patients. *Cancer research* **69**, 7338-7346, doi:10.1158/0008-5472.can-08-4419 (2009).
- 78 Zhu, S., Lee, J. S., Guo, F., Shin, J., Perez-Atayde, A. R., Kutok, J. L., Rodig, S. J., Neuberg, D. S., Helman, D., Feng, H., Stewart, R. A., Wang, W., George, R. E., Kanki, J. P. & Look, A. T. Activated ALK collaborates with MYCN in neuroblastoma pathogenesis. *Cancer cell* **21**, 362-373, doi:10.1016/j.ccr.2012.02.010 (2012).
- 79 Nur Atiqah Roshidi, R. R. M. a. S. D. ALK/MYCN Coamplification in Neuroblastoma: A Short Review. *Academic Journal of Cancer Research* **7**, 27-33 (2014).
- 80 Schonherr, C., Ruuth, K., Kamaraj, S., Wang, C. L., Yang, H. L., Combaret, V., Djos, A., Martinsson, T., Christensen, J. G., Palmer, R. H. & Hallberg, B. Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) regulates initiation of transcription of MYCN in neuroblastoma cells. *Oncogene* **31**, 5193-5200, doi:10.1038/onc.2012.12 (2012).
- 81 Heukamp, L. C., Thor, T., Schramm, A., De Preter, K., Kumps, C., De Wilde, B., Odersky, A., Peifer, M., Lindner, S., Spruessel, A., Pattyn, F., Mestdagh, P., Menten, B., Kuhfittig-Kulle, S., Kunkele, A., Konig, K., Meder, L., Chatterjee, S., Ullrich, R. T., Schulte, S., Vandesompele, J., Speleman, F., Buttner, R., Eggert, A. & Schulte, J. H. Targeted expression of mutated ALK induces neuroblastoma in transgenic mice. *Science translational medicine* **4**, 141ra191, doi:10.1126/scitranslmed.3003967 (2012).
- 82 Greengard EG, P. J. ALK-Related Neuroblastic Tumor Susceptibility. *GeneReviews* (2015).

- 
- 83 Fischer M, S. M., Berthold F. Reliable transcript quantification by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction in primary neuroblastoma using normalization to averaged expression levels of the control genes HPRT1 and SDHA. *J Mol Diagn.* **7**, 89-96 (2005).
- 84 Bonvini, P., Zin, A., Alaggio, R., Pawel, B., Bisogno, G. & Rosolen, A. High ALK mRNA expression has a negative prognostic significance in rhabdomyosarcoma. *British journal of cancer* **109**, 3084-3091, doi:10.1038/bjc.2013.653 (2013).
- 85 Greenman, C., Stephens, P., Smith, R., Dalgliesh, G. L., Hunter, C., Bignell, G., Davies, H., Teague, J., Butler, A., Stevens, C., Edkins, S., O'Meara, S., Vastrik, I., Schmidt, E. E., Avis, T., Barthorpe, S., Bhamra, G., Buck, G., Choudhury, B., Clements, J., Cole, J., Dicks, E., Forbes, S., Gray, K., Halliday, K., Harrison, R., Hills, K., Hinton, J., Jenkinson, A., Jones, D., Menzies, A., Mironenko, T., Perry, J., Raine, K., Richardson, D., Shepherd, R., Small, A., Tofts, C., Varian, J., Webb, T., West, S., Widaa, S., Yates, A., Cahill, D. P., Louis, D. N., Goldstraw, P., Nicholson, A. G., Brasseur, F., Looijenga, L., Weber, B. L., Chiew, Y. E., DeFazio, A., Greaves, M. F., Green, A. R., Campbell, P., Birney, E., Easton, D. F., Chenevix-Trench, G., Tan, M. H., Khoo, S. K., Teh, B. T., Yuen, S. T., Leung, S. Y., Wooster, R., Futreal, P. A. & Stratton, M. R. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* **446**, 153-158, doi:10.1038/nature05610 (2007).
- 86 Regairaz, M., Munier, F., Sartelet, H., Castaing, M., Marty, V., Renauleaud, C., Doux, C., Delbe, J., Courty, J., Fabre, M., Ohta, S., Viehl, P., Michiels, S., Valteau-Couanet, D. & Vassal, G. Mutation-Independent Activation of the Anaplastic Lymphoma Kinase in Neuroblastoma. *The American journal of pathology* **186**, 435-445, doi:10.1016/j.ajpath.2015.10.016 (2016).



圖與表

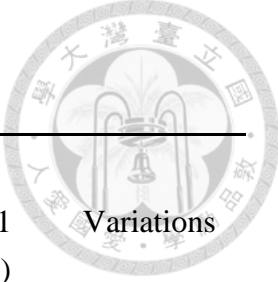
表一、臺大醫院神經母細胞瘤病人臨床資料



Prognosis factors (N=74)	n	(%)
Age		
<18 months	29	39.2
>18 months	45	60.8
Stage (INSS)		
Early stage	20	27.0
Stage 1	17	23.0
Stage 2	3	4.1
Advanced stage	49	66.2
Stage 3	11	14.9
Stage 4	38	51.4
Stage 4S	5	6.8
Risk (INRG)		
Very-low risk	8	10.8
Low risk	12	16.2
Intermediate risk	11	14.9
High risk	42	56.8
NA	1	1.4
Histology (INPC)		
Favorable	32	43.2
NBx	11	14.9
DNB	6	8.1
GNBi	8	10.8
GN	7	9.5
Unfavorable	42	56.8
UNB	13	17.6
PDNB	29	39.2
MYCN amplification		
Non-amplification	56	75.7
Amplification	14	18.9
NA	4	5.4

NA：資料尚未齊備。

表二、61 例神經母細胞瘤病人腫瘤中 *ALK* 基因突變情形



Hotspot of <i>ALK</i> mutations	Location	SNP ID	Nucleotide position ^a and allelic form	NB N=61 n (%)	Variations
F1174	Exon23	rs281864719	+3522 C/A	3 (4.9)	Phe>Leu
F1245	Exon24	rs281864720	+3733 T/G	1 (1.6)	Phe>Val
F1245	Exon24	COSM28492	+3733 T/A	1 (1.6)	Phe>Ile
F1245	Exon24	COSM28493	+3735 C/A	1 (1.6)	Phe>Leu
R1274	Exon25	rs45502292	+3820 A/G	1 (1.6)	Ala>Thr
R1275	Exon25	rs113994087	+3824 G/A	0 (0.0)	Arg>Gln
Total				7 (11.3)	

^a根據 Ensembl 資料庫 *ALK*-001_ENST00000389048, 由轉譯起始點(translation start site)開始計算(+1)

表三、神經母細胞瘤病人 *ALK* 基因突變與預後分子之分析

Prognosis factors	No. with <i>ALK</i> mutation/ No. of subset NB (%)	% in <i>ALK</i> mutants	P value
Age			
>18 months	4/32 (12.5)	57.1	
<18 months	3/29 (10.3)	42.9	
INSS stage			
Advanced stage (3,4)	7/37 (18.9)	100.0	0.0823
Early stage (1,2)	0/19 (0.0)	0.0	
Stage 4S	0/5 (0.0)	0.0	
Risk (INRG)			
High risk	7/30 (23.3)	85.7	0.0105*
Low/ intermediate risk	0/30 (0.0)	0.0	
NA	0/1 (0.0)	14.3	
Histology (INPC)			
UNB	2/11 (18.2)	28.6	0.4367
PDNB	3/22 (13.6)	42.9	
others	2/28 (7.1)	28.6	
<i>MYCN</i> amplification			
Amplification	4/13 (30.8)	57.1	0.0407*
Non-amplification	3/44 (6.8)	42.9	
NA	0/4 (0.0)	0.0	

NA：資料尚未齊備。

表四、國人神經母細胞瘤腫瘤與健康成人 PBMCs 中 *ALK* 基因多型性分布

Location	SNP ID	Nucleotide position ^a and allelic form	Genotype	NB		Health	
				N=61	n(%)	N=34	n(%)
Exon20	rs146074150	+3336 G/A	G/G	60	(98.4)	34	(100.0)
			G/A	1	(1.6)	0	(0.0)
			A/A	0	(0.0)	0	(0.0)
Exon21	rs3795850	+3375 C/A	C/C	9	(14.8)	5	(14.7)
			C/A	23	(37.7)	10	(29.4)
			A/A	29	(47.5)	19	(55.9)
Exon23	rs56247462	+3600 G/C	G/G	51	(83.6)	30	(88.2)
			G/C	10	(16.4)	4	(11.8)
			C/C	0	(0.0)	0	(0.0)
Intron20	rs4622670	C/T	C/C	58	(95.1)	31	(91.2)
			C/T	3	(4.9)	2	(5.9)
			T/T	0	(0.0)	1	(2.9)
Intron20	rs2276550	G/C	G/G	8	(13.1)	5	(14.7)
			G/C	23	(37.7)	10	(29.4)
			C/C	30	(49.2)	19	(55.9)
Intron25	rs3738868	G/T	G/G	55	(90.2)	30	(88.2)
			G/T	6	(9.8)	3	(8.8)
			T/T	0	(0.0)	1	(2.9)

表五、*ALK* 基因表現量與神經母細胞瘤預後因子之統計結果

Prognosis factors	n	<i>ALK</i> expression		Odd ratio	95% CI	p value
		<i>ALK</i> ^{High}	<i>ALK</i> ^{Low}			
Age						
<18 months	29	15	14	1		
>18 months	45	17	28	0.57	0.22-1.46	0.2367
INSS stage						
Early stage (1,2)	20	7	13	1		
Advanced stage (3,4)	49	22	27	1.51	0.51-4.45	0.4503
Risk (INRG)						
Low/ intermediate risk	31	12	19	1		
High risk	42	20	22	1.44	0.56-3.70	0.4463
Histology (INPC)						
Others	32	7	25	1		
UNB/PDNB	42	25	17	5.25	1.85-14.86	0.0012*
<i>MYCN</i> amplification						
No	56	22	34	1		
Yes	14	9	5	2.78	0.82-9.40	0.0919
<i>ALK</i> mutation						
<i>ALK</i> ^{WT}	52	21	31	1		
<i>ALK</i> ^{Mut+}	7	5	2	3.69	0.65-20.84	0.2229

Cut-off value of *ALK* high expression=0.2816.

表六、*ALK* 基因表現量與 *ALK* 基因多型性之統計結果

Prognosis factors	n	<i>ALK</i> expression		Odd ratio	95% CI	p value
		<i>ALK</i> ^{High}	<i>ALK</i> ^{Low}			
E20 : rs14674150						
G/G	58	26	32			
G/A	1	0	1			
E21 : rs3795850						
C/C	9	4	5	1		
C/A	23	12	11	1.36	0.29-6.42	0.9999
A/A	27	10	17	0.74	0.16-3.39	0.9999
E23 : rs56247462						
G/G	49	23	26	1		
G/C	10	3	7	0.48	0.11-2.10	0.4880
I20 : rs4622670						
C/C	56	25	31	1		
C/T	3	1	2	0.62	0.05-7.24	1.0000
I20 : rs2276550						
G/G	8	4	4	1		
G/C	23	11	12	0.92	0.18-4.58	1.0000
C/C	28	11	17	0.64	0.13-3.14	0.6940
I25 : rs3738868						
G/G	53	24	29	1		
G/T	6	2	4	0.60	0.10-3.59	0.6852

Cut-off value of *ALK* high expression=0.2816

表七、*ALK* 基因多型性與神經母細胞瘤病患無事件存活率(EFS)之統計結果

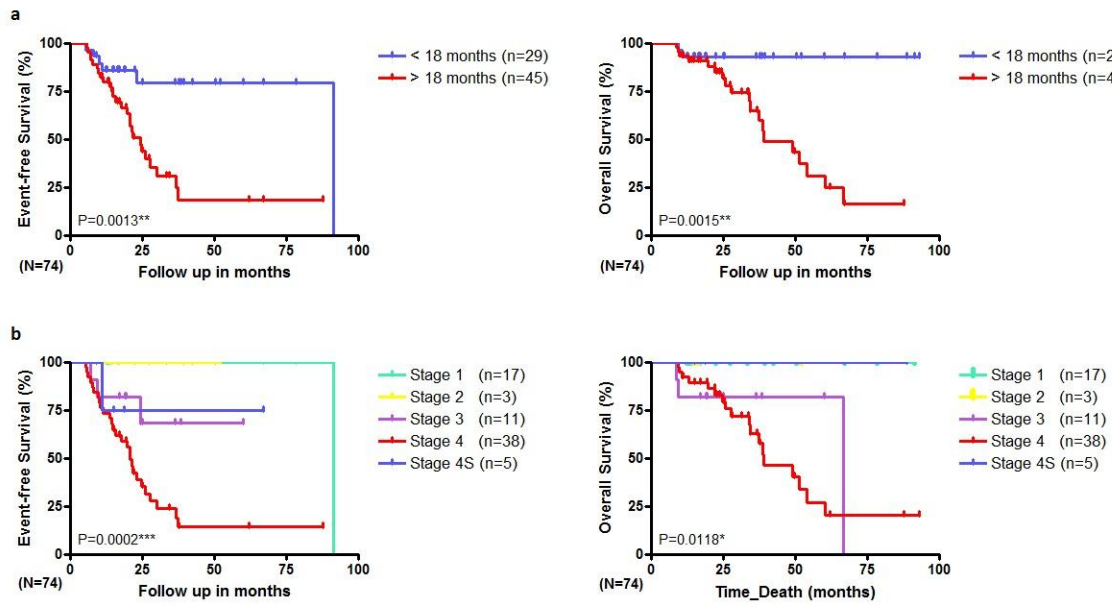
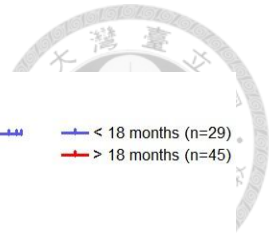
<i>ALK</i> gene polymorphism	Genotype	N	5-year event-free survival (%)	Median time of EFS (months)	<i>p</i> -value ¹
E20 : rs146074150	G/G	60	56.9	UD ²	0.4317
	G/A	1	0.0	26.1	
E21 : rs3795850	C/C	9	71.1	UD	0.5159
	C/A	23	61.8	UD	
	A/A	29	43.4	27.5	
E23 : rs56247462	G/G	51	48.2	30.0	0.0423*
	G/C	10	100.0	UD	
I20 : rs4622670	C/C	58	54.0	UD	0.9339
	C/T	3	66.7	UD	
I20 : rs2276550	G/G	8	65.6	UD	0.6995
	G/C	23	60.8	UD	
	C/C	30	46.9	27.5	
I25 : rs3738868	G/G	55	55.4	UD	0.8545
	G/T	6	50.0	51.4	

¹Log-rank test; ²UD: undefined.

表八、*ALK* 基因多型性與神經母細胞瘤病患整體存活率(OS)之統計結果

<i>ALK</i> gene polymorphism	Genotype	N	5-year overall survival (%)	Median time of OS (Mns)	<i>p</i> -value ¹
E20 : rs146074150	G/G	60	63.8	UD ²	0.6492
	G/A	1	100.0	UD	
E21 : rs3795850	C/C	9	88.9	UD	0.7454
	C/A	23	76.9	UD	
	A/A	29	6.0	48.9	
E23 : rs56247462	G/G	51	60.9	UD	0.1992
	G/C	10	100.0	UD	
I20 : rs4622670	C/C	58	63.5	UD	0.7002
	C/T	3	66.7	UD	
I20 : rs2276550	G/G	8	87.5	UD	0.8431
	G/C	23	75.7	UD	
	C/C	30	39.5	48.9	
I25 : rs3738868	G/G	55	65.8	UD	0.8305
	G/T	6	50.0	63.5	

¹ Log-rank test; ² UD: undefined.

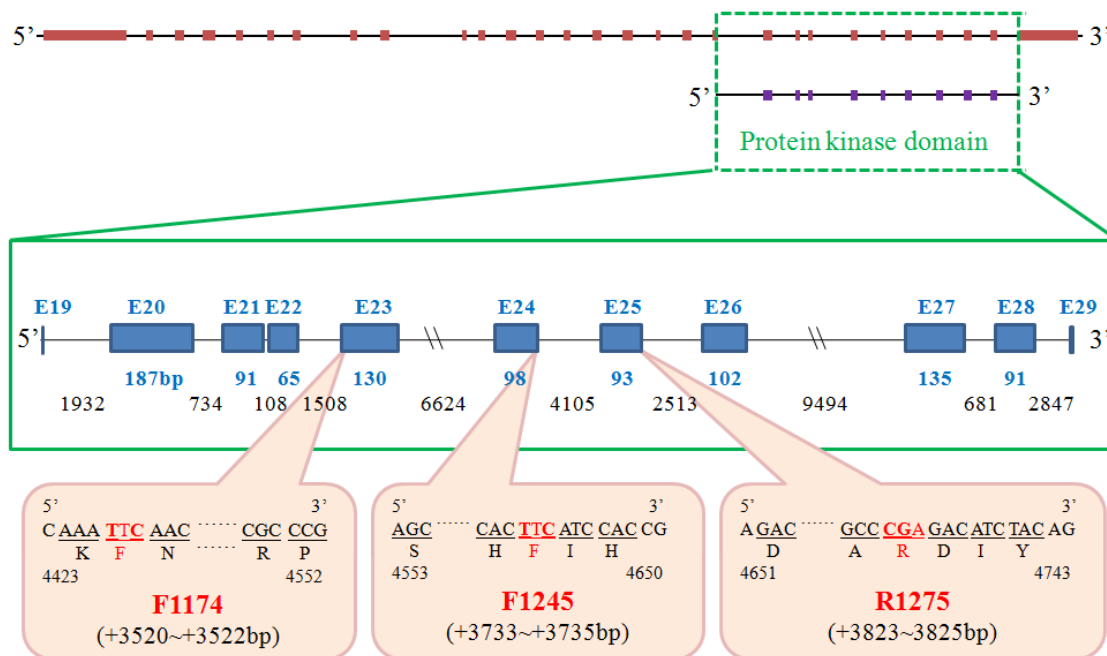


圖一、神經母細胞瘤預後因子與事件發生存活率(EFS)及整體存活率(OS)之關係。

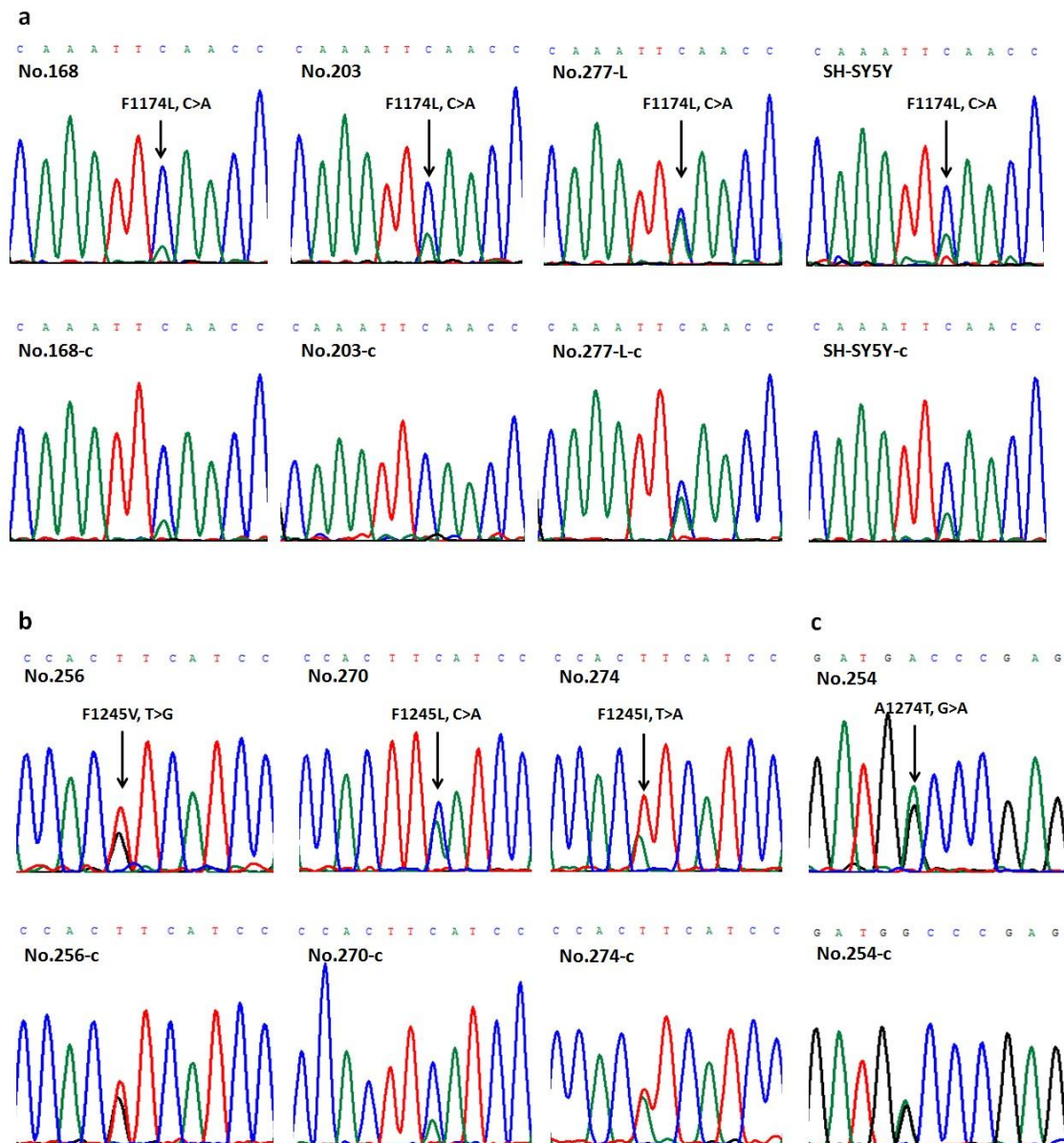
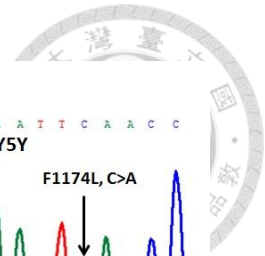
a. 若神經母細胞瘤病患之發病年紀大於 18 個月，其 EFS 及 OS 皆遠低於發病年紀小於 18 個月的病患($p=0.0013$ 及 $p=0.0015$)。 b. INSS 分期第 4 期神經母細胞瘤病患之 EFS，其五年存活率 14.2% 以及 OS 之五年存活率 27.0%，皆遠低於 INSS 分期較早期的病患。



ALK-001 ENST00000389048
 Chromosome 2: 29,192,774 - 29,921,566
 Length: 6220bp ; Protein: 1620aa



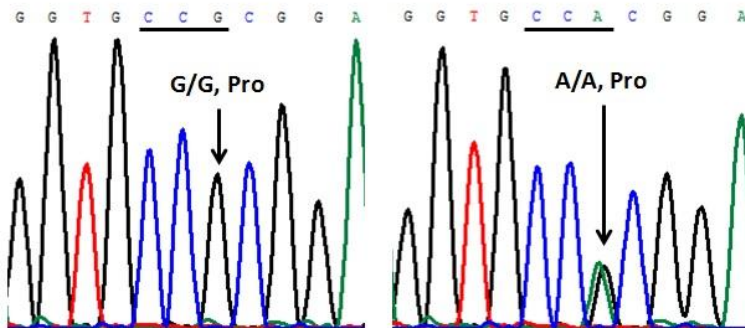
圖二、ALK 基因突變熱點之分佈情形。ALK 基因的活化性突變(activating mutation) 幾乎皆位在酪胺酸激酶範圍 (tyrosine kinase domain) 部份，涵蓋了 ALK 基因 Exon20 到 Exon29，其中最常出現的三個突變熱點(hotspots of mutation)分別是位在 Exon23、24、25 的 F1174、F1245、R1275。本研究針對 Exon20 到 Exon25 及其鄰近 intron 部份分段進行 PCR，之後進行核酸定序，以檢測 ALK 基因突變及基因多型性。



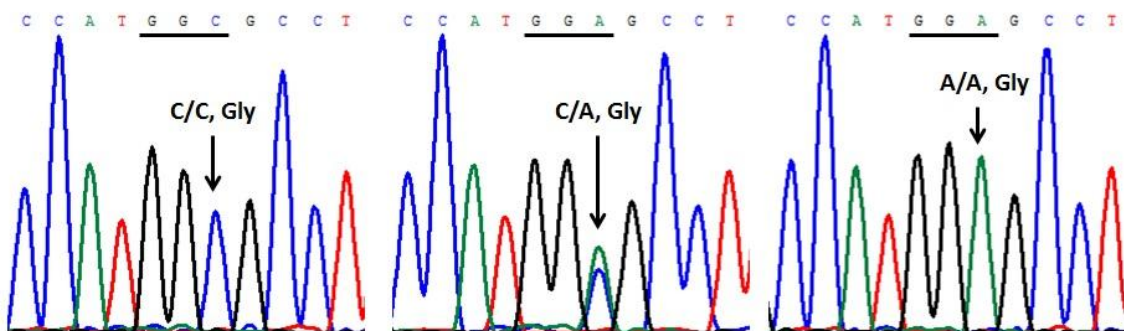
圖三、帶有神經母細胞瘤病人腫瘤及細胞株 DNA 與 cDNA 樣本之 *ALK* 突變點核
 酸定序。 a. 從神經母細胞瘤腫瘤中發現 3 例具 *ALK* F1174L 突變(TTC>TTA)，
 此突變點已知在神經母細胞瘤細胞株—SH-SY5Y 中也有。病患腫瘤與細胞株中常
 可見 F1174 此突變位點的正常(C)與突變(A)對偶基因產生訊號比例不一致。 b. 病
 患腫瘤可見 3 例 *ALK* F1245 突變，此 3 個案例發生的單一核苷酸置換不同，造成
 的胺基酸改變也不一樣，分別是 F1245V (TTC>GTC)、F1245L (TTC>TTA)、F1245I
 (TTC>ATC)。 c. 此 *ALK* 基因突變點—A1274T (GCC>ACC)，目前尚未於神經母
 細胞瘤中被報導過。

a

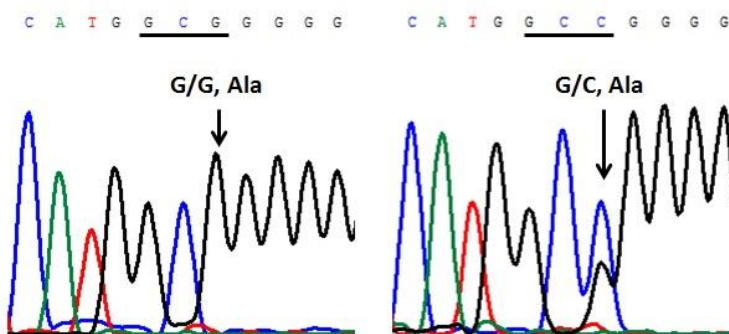
E20: rs146074150 +3336 G/A (1112 Pro)



E21: rs3795850 +3375 C/A (1124 Gly)



E23: rs56247462 +3600 G/C (1199 Ala)

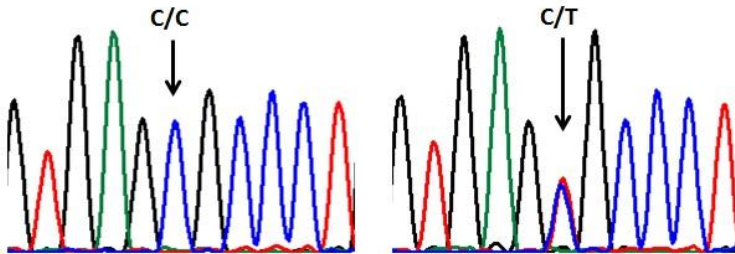


圖四、神經母細胞瘤病人腫瘤中 *ALK* 基因多型性之核酸定序結果。 a. 在 *ALK* 基因 Exon20、21、23 中各出現 1 個 SNP: +3336 G/A (1112 Pro)、+3375 C/A (1124 Gly)、+3600 G/C (1199 Ala)，皆屬於同義變異，並未造成胺基酸改變。

b

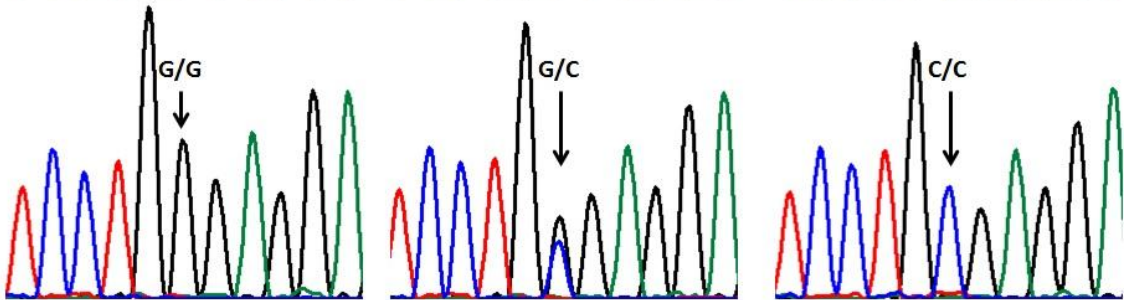
I20: rs4622670 C/T

G T G A G C G C C C T G T G A G C G C C C T



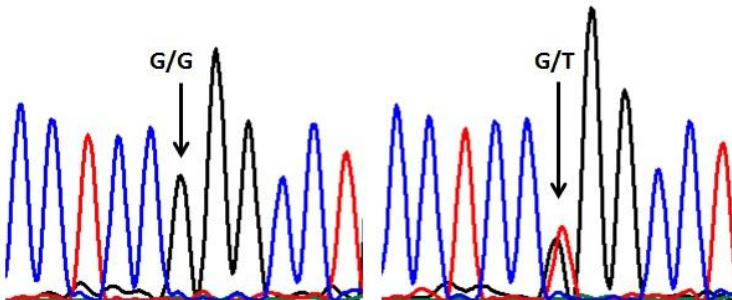
I20: rs2276550 G/C

T C C T G G G A G G A T C C T G G G A G G A T C C T G C G A G G A

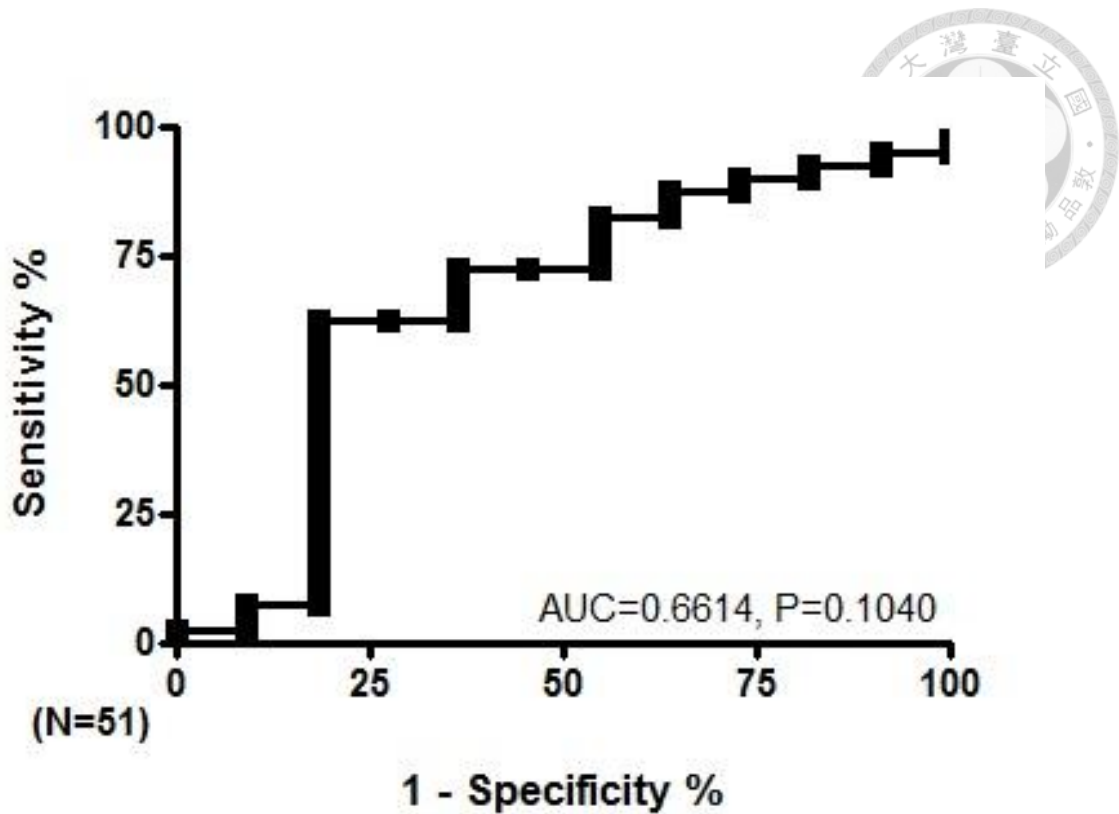


I25: rs3738868 G/T

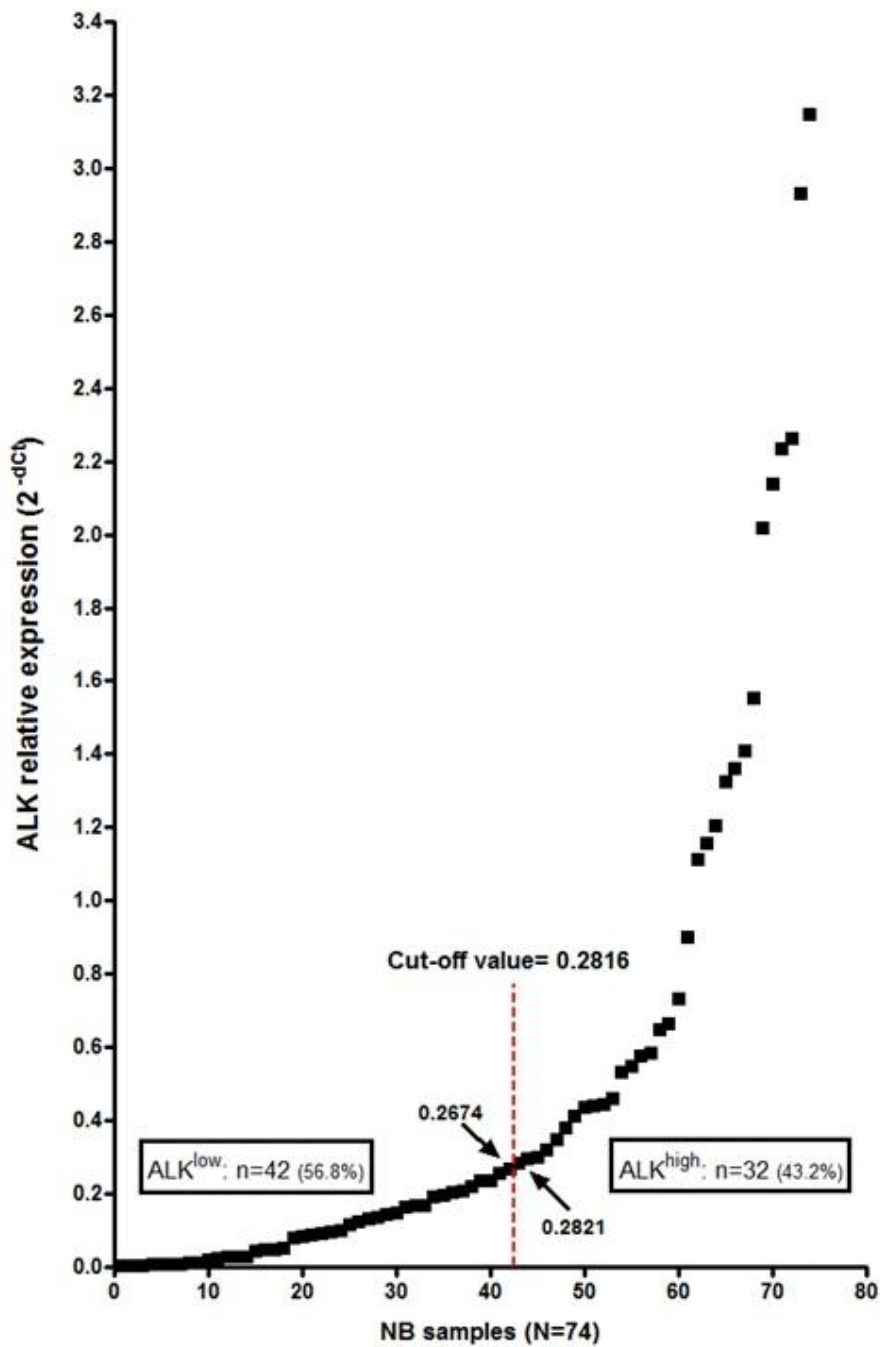
C C T C C G G G C C T C C T C C T G G C C T



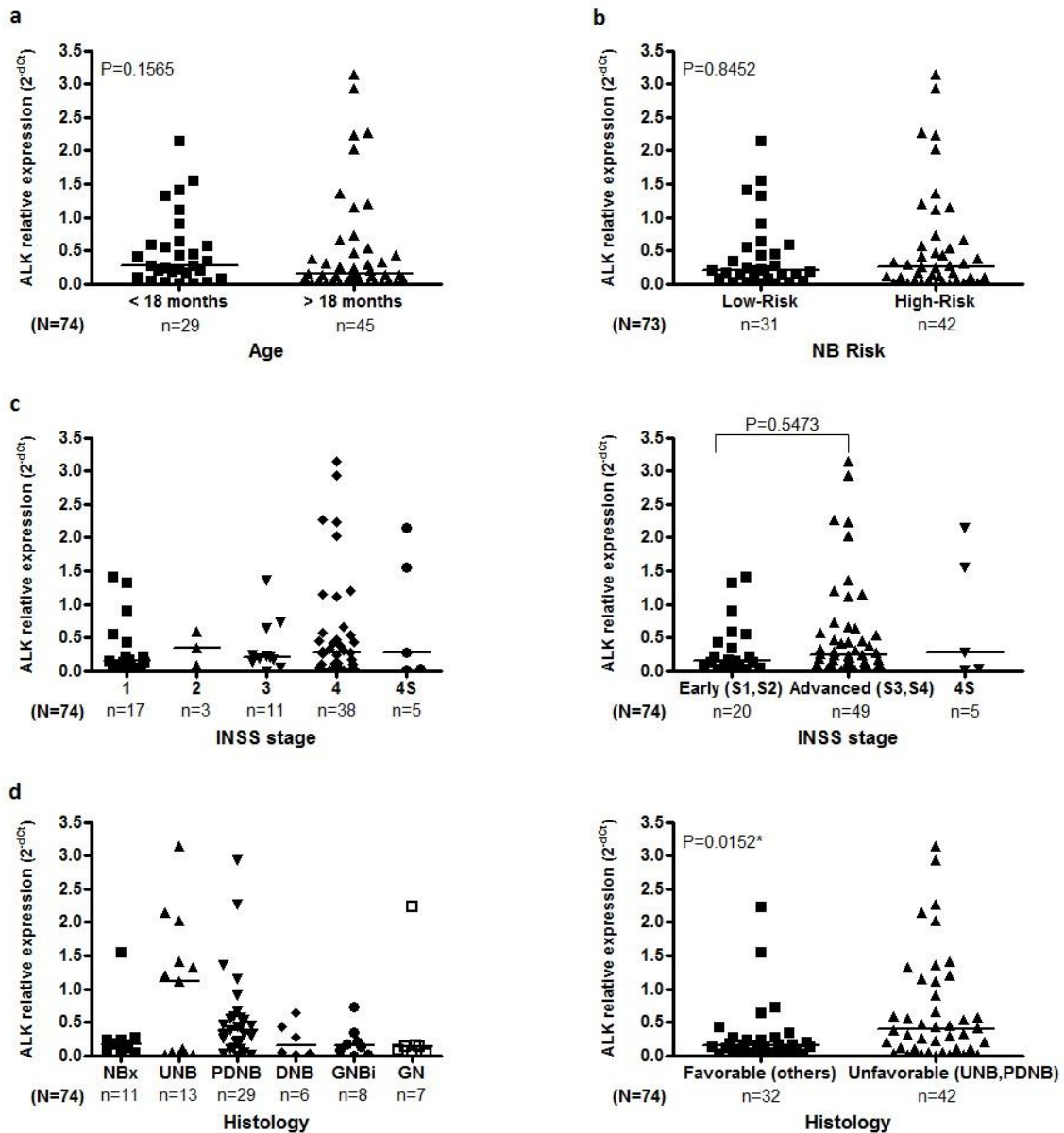
圖四(續)、神經母細胞瘤病人腫瘤中 *ALK* 基因多型性之核酸定序結果。b. 在 *ALK* 基因 Intron20 第 6 及 24 位置與 Intron25 第 27 位置皆出現 SNP，皆屬 Intron variant，Intron20 的第 6 位置同時也屬於 splicing region variant。



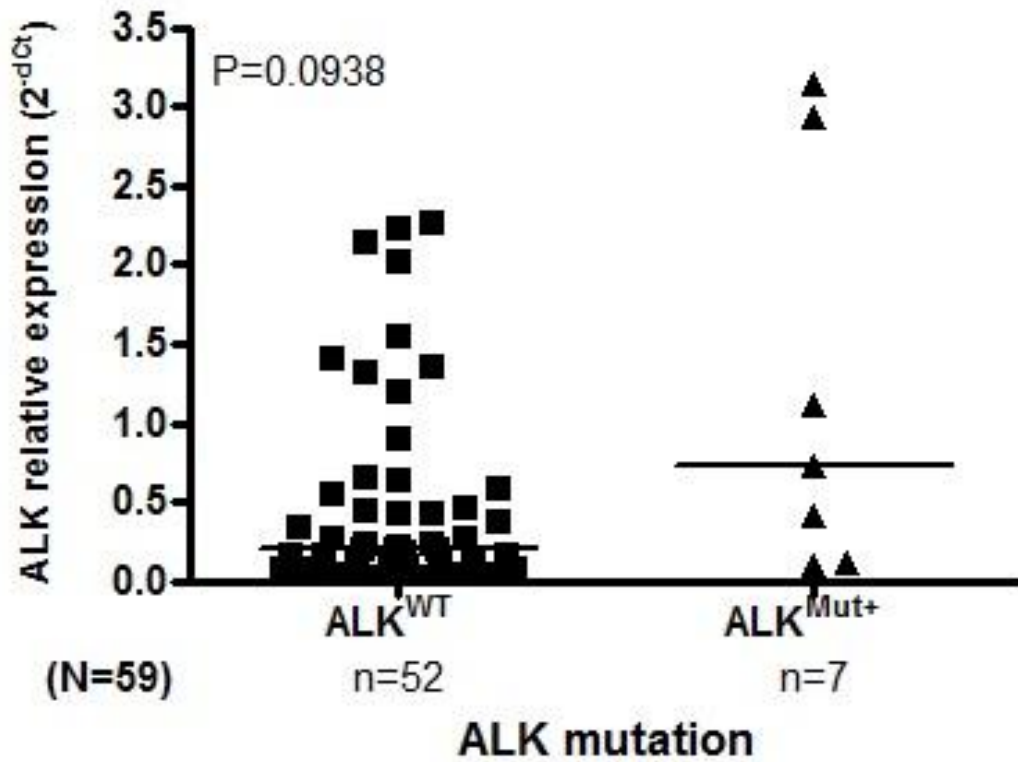
圖五、神經母細胞病患存亡結果與初診斷腫瘤中 *ALK* 表現量之 ROC 曲線。利用 51 例初診斷腫瘤(化療前)之神經母細胞瘤病患死亡與否作為 ROC 的黃金標準(Gold standard)($n=51$)。ROC 曲線的 Y 軸為靈敏性(sensitivity)意指已死亡之患者 *ALK* 判為高表現量的機率；X 軸則為 1-特異性(1-specificity)意指已死亡之患者判為 *ALK* 低表現量的機率。分析結果顯示 0.2816 為區分 *ALK* 表現量高/低最適當的切點 (sensitivity 為 62.50%、specificity 為 81.82%)；而圖形的曲線下面積(area under the ROC curve, AUC)為 0.6614，但不具統計意義(p value=0.1040)。



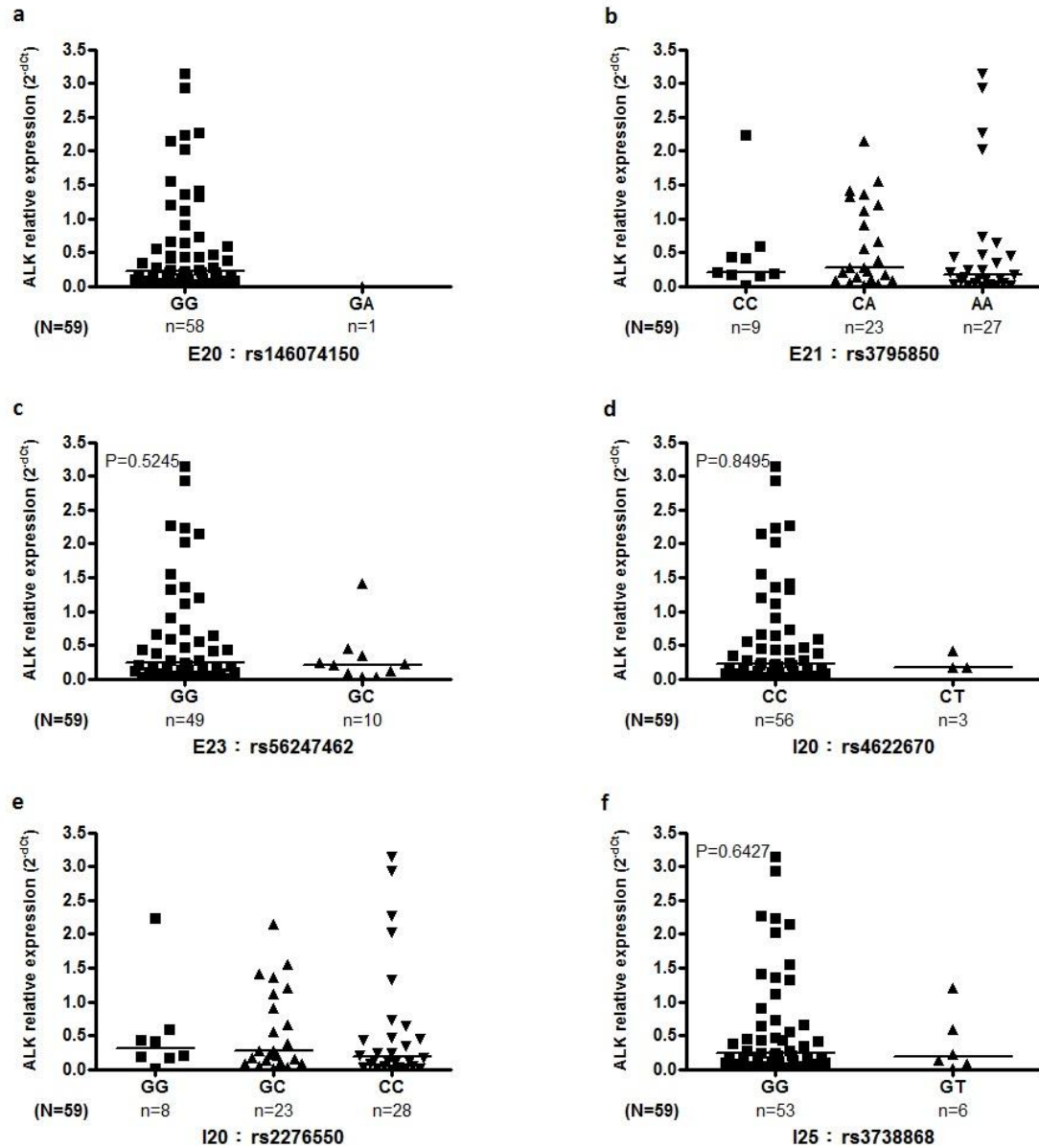
圖六、神經母細胞瘤病人腫瘤中 *ALK* 基因表現量分佈圖。根據 ROS 分析結果，以 0.2816 做為定義 *ALK* 表現量高或低的閾值(threshold)，則本研究中 74 例神經母細胞瘤病患中有 42 例為 *ALK* 低量表現(56.8%)、32 例為 *ALK* 高度表現(43.2%)。



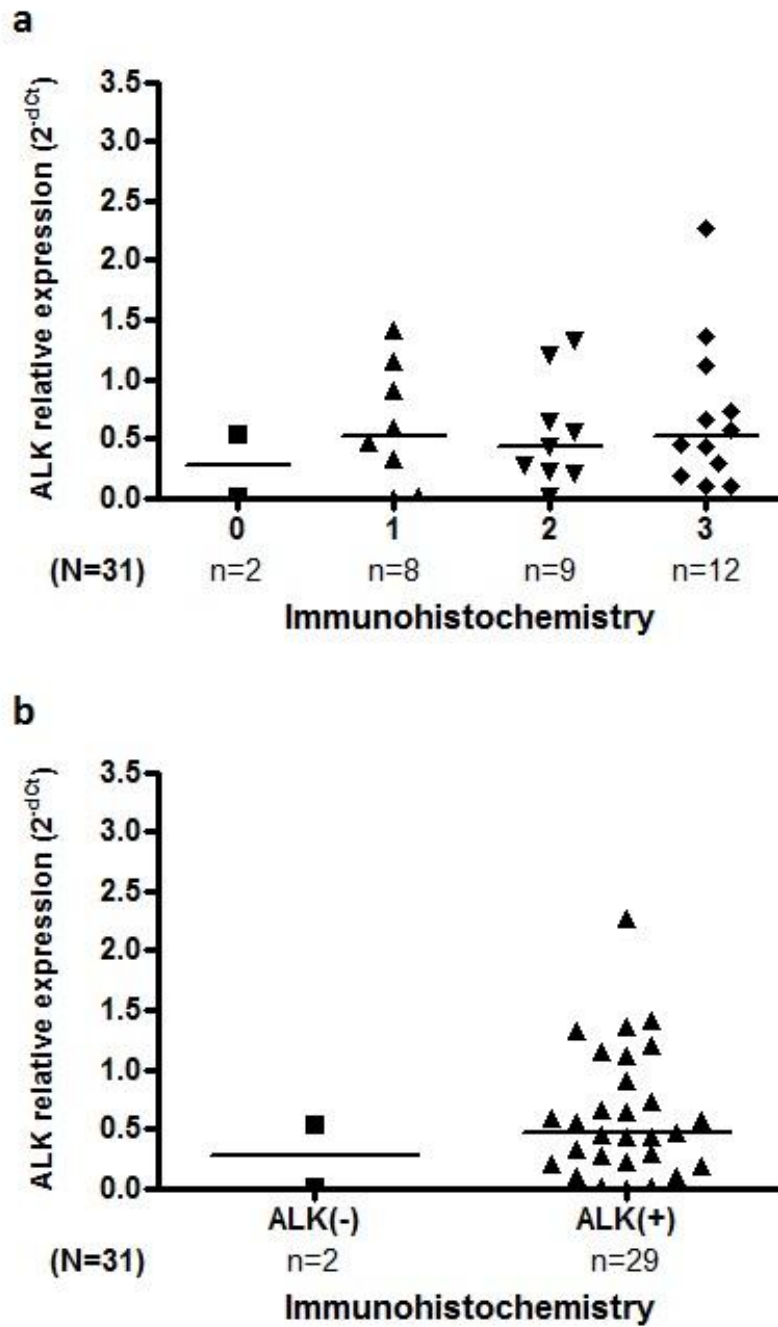
圖七、腫瘤中 *ALK* 基因表現量與神經母細胞瘤預後因子之關係。a. 病患發病年紀：以曼-惠特尼 U 檢定，發病年紀於 *ALK* 表現量高無統計上顯著差異($p=0.1565$)。b. 疾病風險分群：經曼-惠特尼 U 檢定可知 NB 高或低風險群(very-low risk、low risk 及 intermediate risk)之 *ALK* 高/低表現量並無顯著差異($p=0.8452$)。c. INSS 分期：結果顯示早期(S1,S2)或晚期(S3,S4)NB 與 *ALK* 高/低表現量並無顯著差異($p=0.5473$)。d. 病理組織學：結果顯示，腫瘤細胞分化程度低(UNB/PDNB)或高(others)與 *ALK* 高/低表現量具有統計上顯著差異($p=0.0152$)。



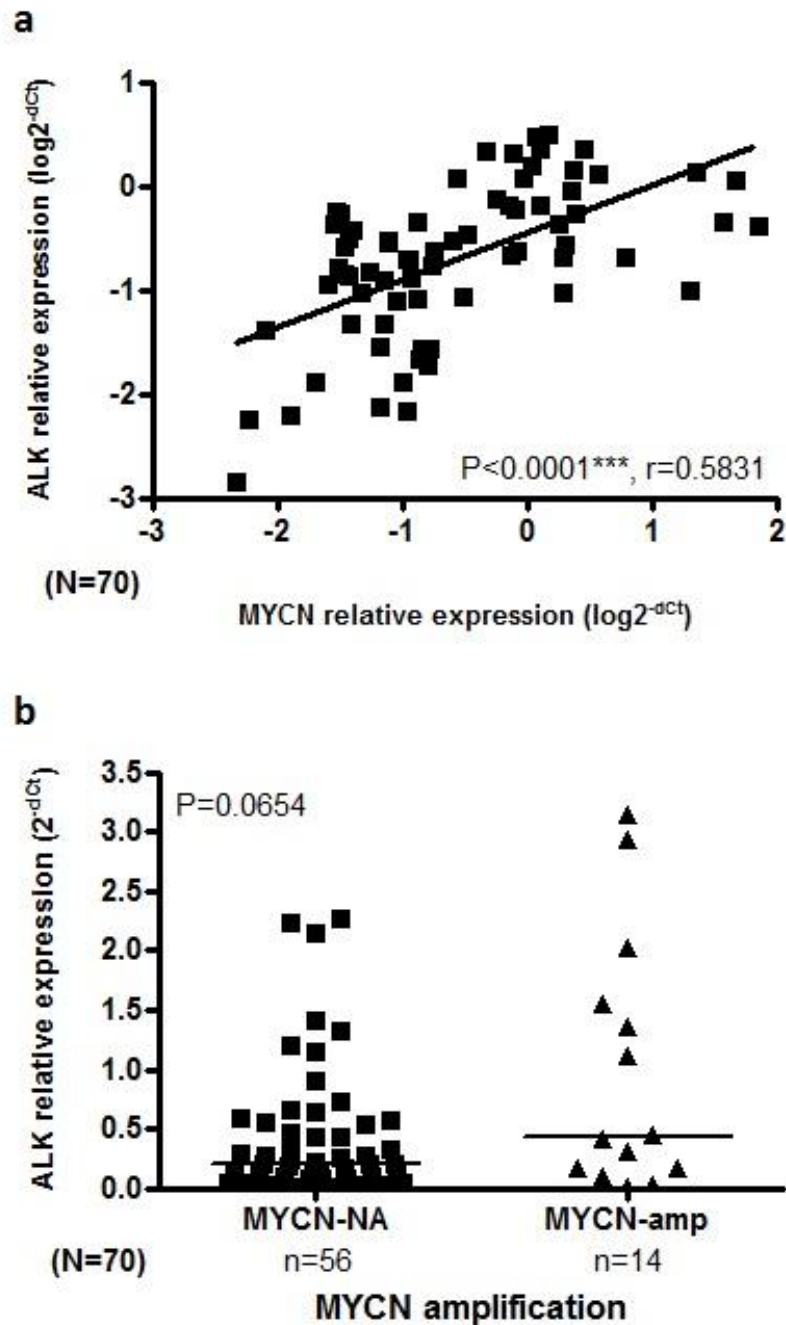
圖八、NB 腫瘤中 *ALK* 基因表現量與 *ALK* 基因突變之分析。本圖僅使用具有完整 *ALK* 基因型以及對應 *ALK* 相對表現量之數據進行分析(n=59)。無論 *ALK*^{WT} 與 *ALK*^{Mut+} 的神經母細胞病患腫瘤中 *ALK* 表現量分布無顯著差異(p=0.0938)。



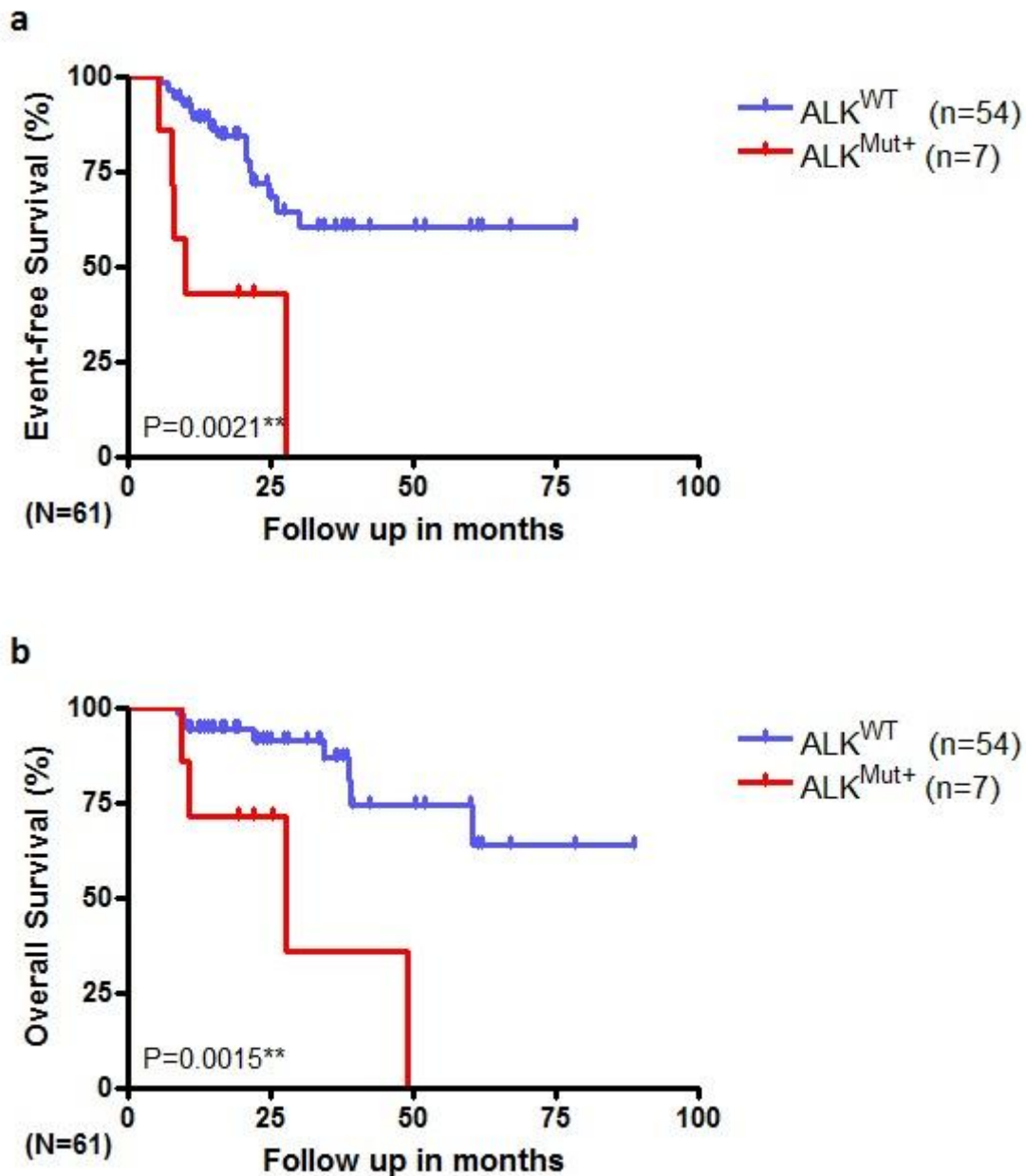
圖九、NB 腫瘤上 *ALK* 基因表現量與 *ALK* 基因多型性之分析。本圖僅使用具有完整 *ALK* 基因型以及對應 *ALK* 相對表現量之數據進行分析(n=59)。 a-c 圖為位在 *ALK* Exon20,21,23 的 SNPs 之 *ALK* 表現量分布，其中只有 Exon23 可進行曼-惠特尼 U 檢定，不同基因型間 *ALK* 表現量無統計上差異(p=0.5245)。 d-f 圖為位在 Intron20 及 25 的 SNPs 之 *ALK* 表現量分布，各組間不同基因型的 *ALK* 表現量皆無差異(p=0.8495 及 p=0.6427)。



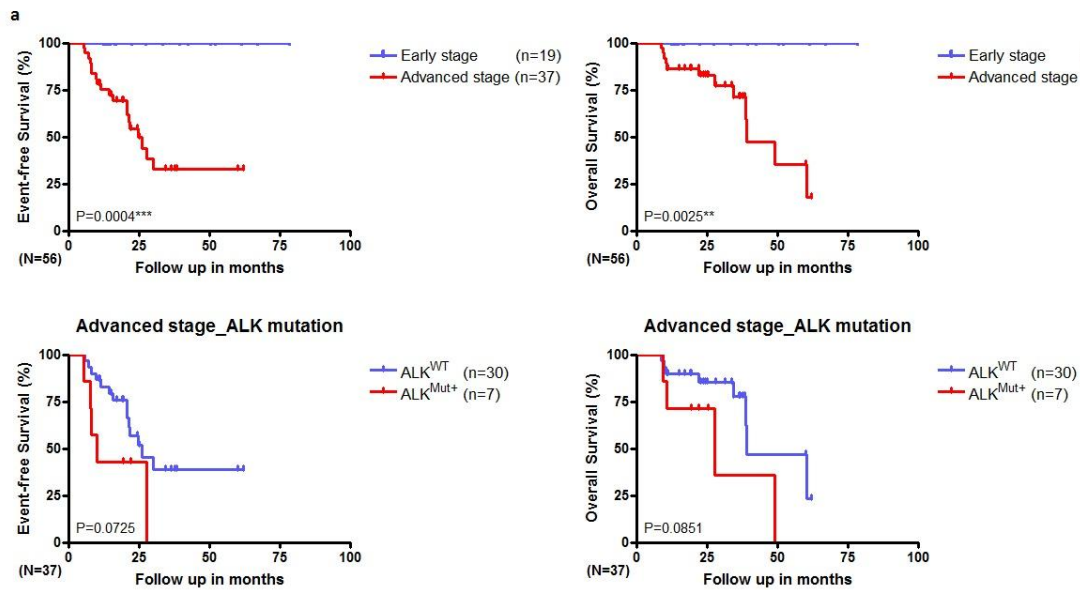
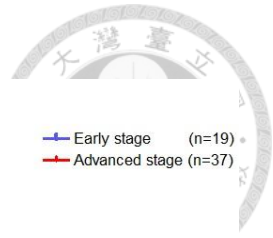
圖十、NB 腫瘤中 *ALK* 基因表現量與 *ALK* 組織化學染色之關聯性。 a. *ALK* 抗體染色強度(grade0,1,2,3)之 *ALK* 表現量分布。 b. 依照 *ALK* IHC 陰性(grade0)及 IHC 陽性(grade1,2,3)之 *ALK* 表現量分布。



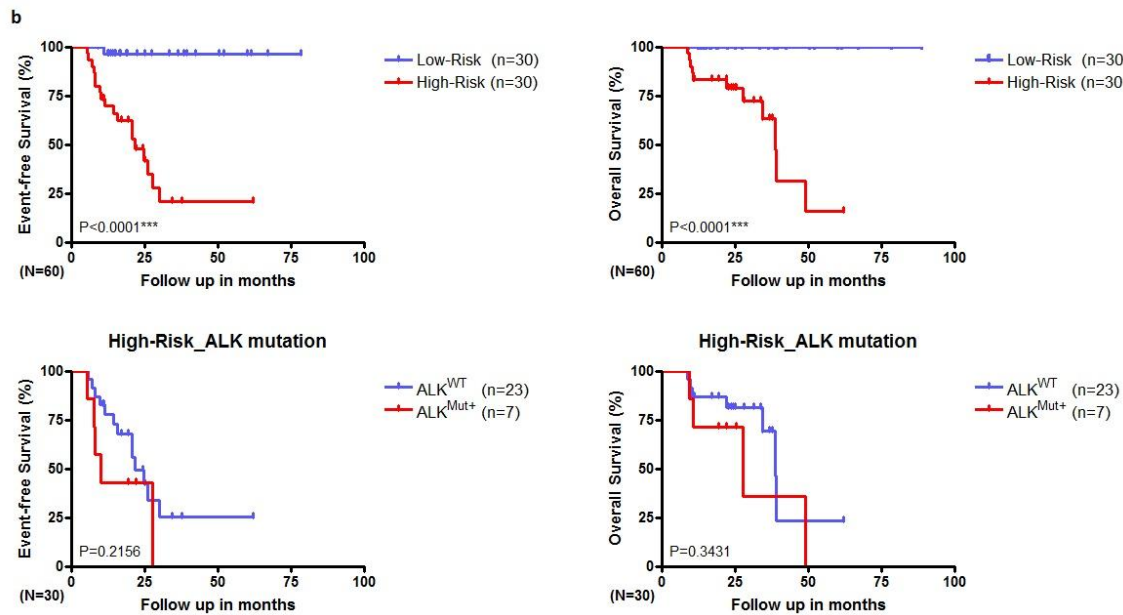
圖十一、*ALK* 基因表現量與 *MYCN* 基因表現量之關係。本圖僅使用具有完整 *ALK* 及相對應 *MYCN* 表現量之 qPCR 數據進行分析(n=70)。a. 以 Spearman correlation test 分析病患腫瘤中 *ALK* 及 *MYCN* 表現量，兩者具有高度正相關($r=0.5831$ ； $p<0.0001$)。b. 以曼-惠特尼 U 檢定進行統計，無論 NB 腫瘤為 *MYCN* 是否增幅，與 *ALK* 表現量無統計上差異($p=0.0654$)。



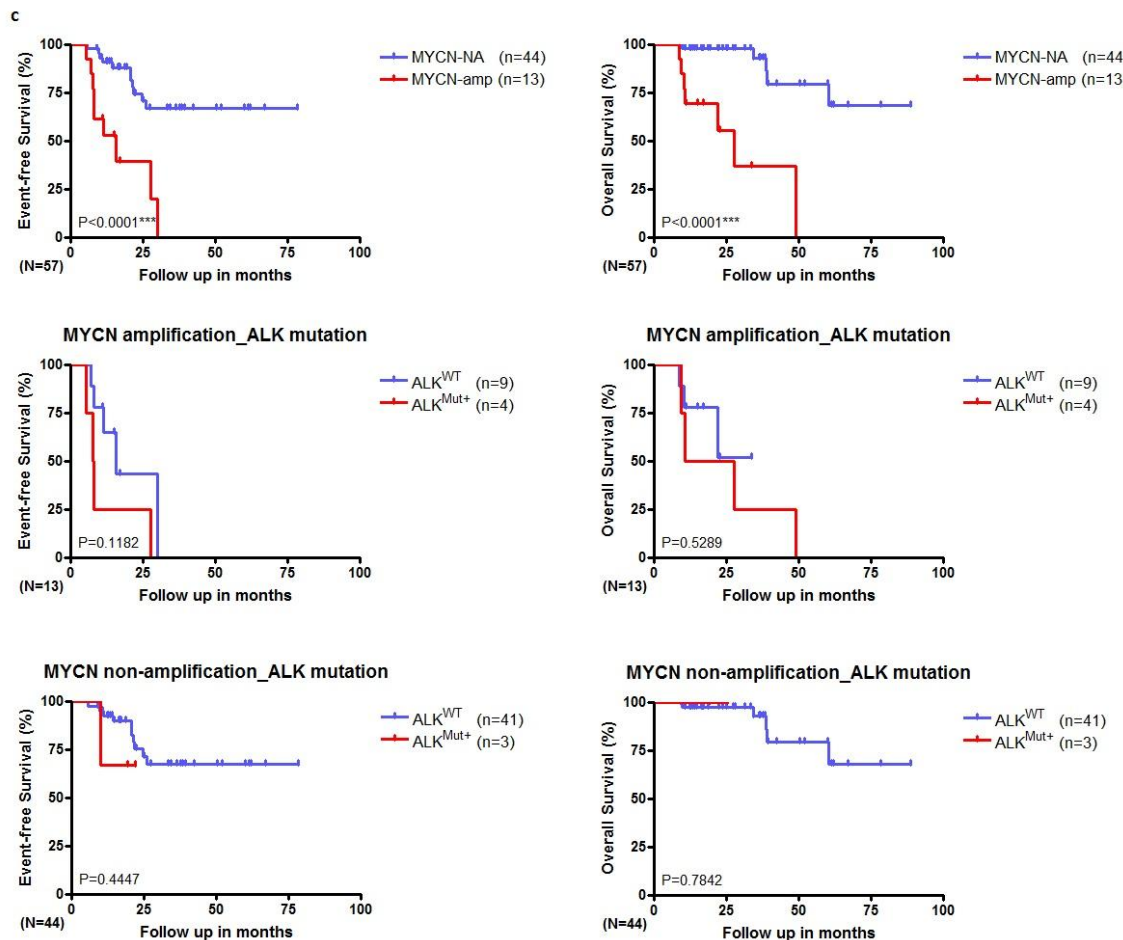
圖十二、*ALK* 基因突變與神經母細胞瘤病患不良存活率相關。a.神經母細胞瘤病患的無事件存活率(EFS), *ALK*^{Mut+}組病患的五年存活率為 0% (存活時間中位數為 10.0 個月)、*ALK*^{WT}組病患為 60.4%，兩者間具有統計上顯著差異(HR：4.2，95% CI：2.6-79.43， $p=0.0021$)。b.神經母細胞瘤病患的整體存活率(OS)，*ALK*^{Mut+}組病患的五年存活率為 0% (存活時間中位數為 27.7 個月)、*ALK*^{WT}組病患為 74.4%，兩者間具有統計上顯著差異(HR：5.6，95% CI：3.7-230.0， $p=0.0015$)。



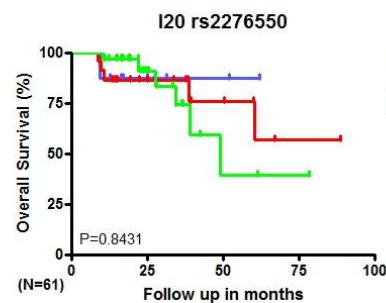
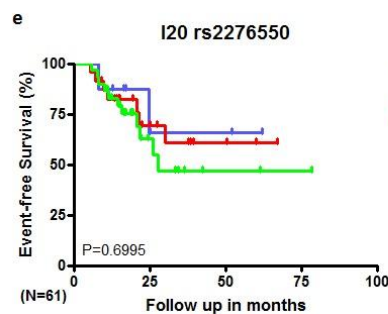
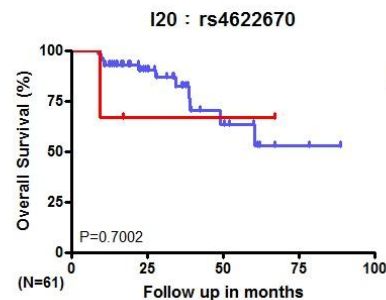
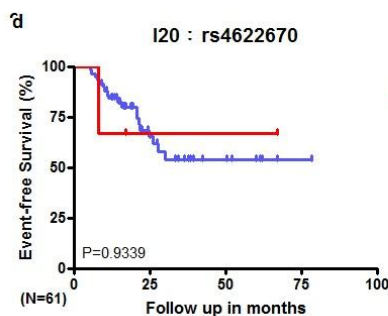
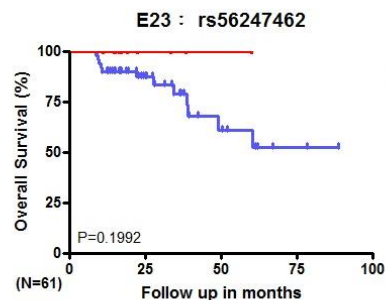
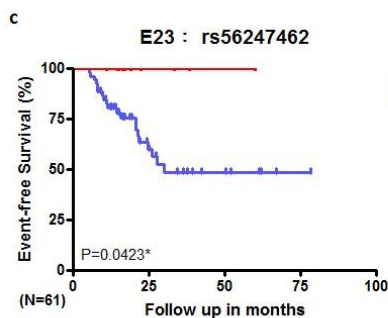
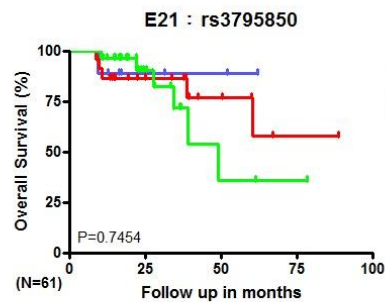
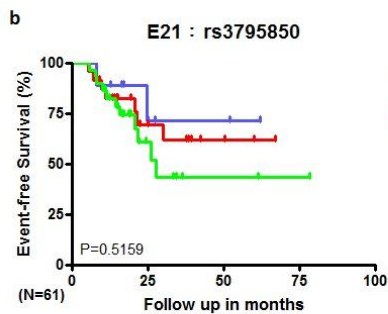
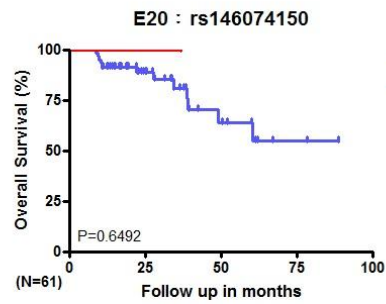
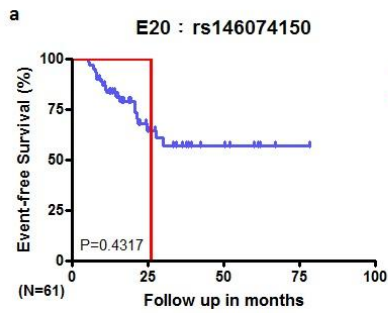
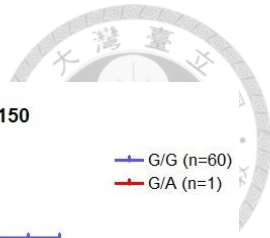
圖十三、*ALK* 基因突變與惡性神經母細胞瘤及病患不良存活率相關。 a. 僅使用具有完整 *ALK* 基因型分析及相對應疾病分期之臨床資料(n=56)，此圖未包含 4S 分期(n=5)。EFS 分析：advanced stage (S3,S4) NB 病患之五年存活率為 33.1% (存活時間中位數為 24.5 個月)、early stage (S1,S2) NB 病患則為 100%，兩者間具統計上顯著差異($p=0.0004$)。而 OS 分析：advanced stage NB 病患之五年存活率為 35.5% (存活時間中位數為 39.0 個月)、early stage NB 病患則為 100%，兩者間具統計上顯著差異($p=0.0025$)。在 advanced stage 次群分析中， ALK^{Mut+} NB 病患的五年存活率 EFS：0% (存活時間中位數為 10.0 個月)、OS：0%(存活時間中位數為 27.7 個月)； ALK^{WT} NB 病患的五年存活率 EFS：38.7% (存活時間中位數為 26.1 個月)、OS：46.6% (存活時間中位數為 39.0 個月)，雖以 Log-rank test 統計兩者間無顯著差異(EFS： $p=0.0725$ 及 OS： $p=0.0851$)，但比較病患存活時間中位數，可見 ALK^{Mut+} 較 ALK^{WT} 為低。

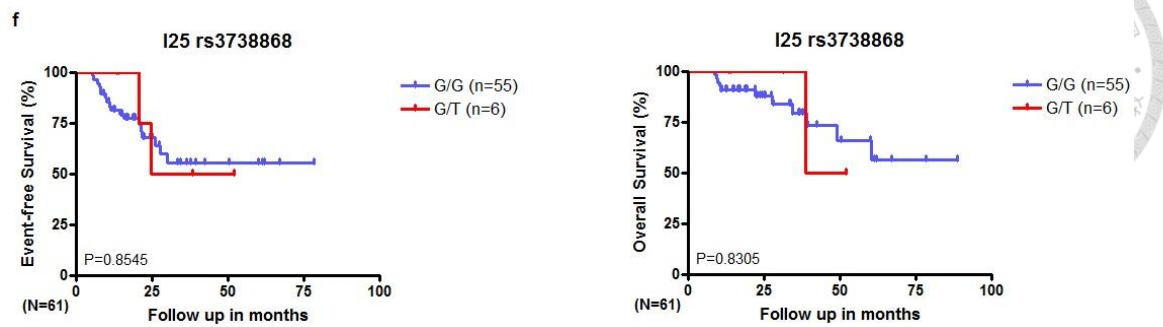


圖十三(續)、*ALK* 基因突變與惡性神經母細胞瘤及病患不良存活率相關。b. 僅使用具有完整 *ALK* 基因型分析及相對應風險分群之臨床資料(n=60)。EFS 分析：high-risk NB 病患之五年存活率為 21.0% (存活時間中位數為 21.8 個月)、low-risk NB 病患則為 96.6%，兩者間具統計上顯著差異($p < 0.0001$)。而 OS 分析：high-risk NB 病患之五年存活率為 15.8% (存活時間中位數為 38.5 個月)、low-risk NB 病患則為 100%，兩者間具統計上顯著差異($p < 0.0001$)。在 high-risk 次群分析中， ALK^{Mut+} NB 病患的五年存活率 EFS：0% (存活時間中位數為 10.0 個月)、OS：0% (存活時間中位數為 27.7 個月)； ALK^{WT} NB 病患的五年存活率 EFS：25.4% (存活時間中位數為 21.8 個月)、OS：23.2% (存活時間中位數為 38.5 個月)，雖以 Long-rank test 統計，兩者間無統計上顯著差異(EFS： $p = 0.2156$ 及 OS： $p = 0.3431$)，但比較病患存活時間中位數，可見 ALK^{Mut+} 較 ALK^{WT} 為低。

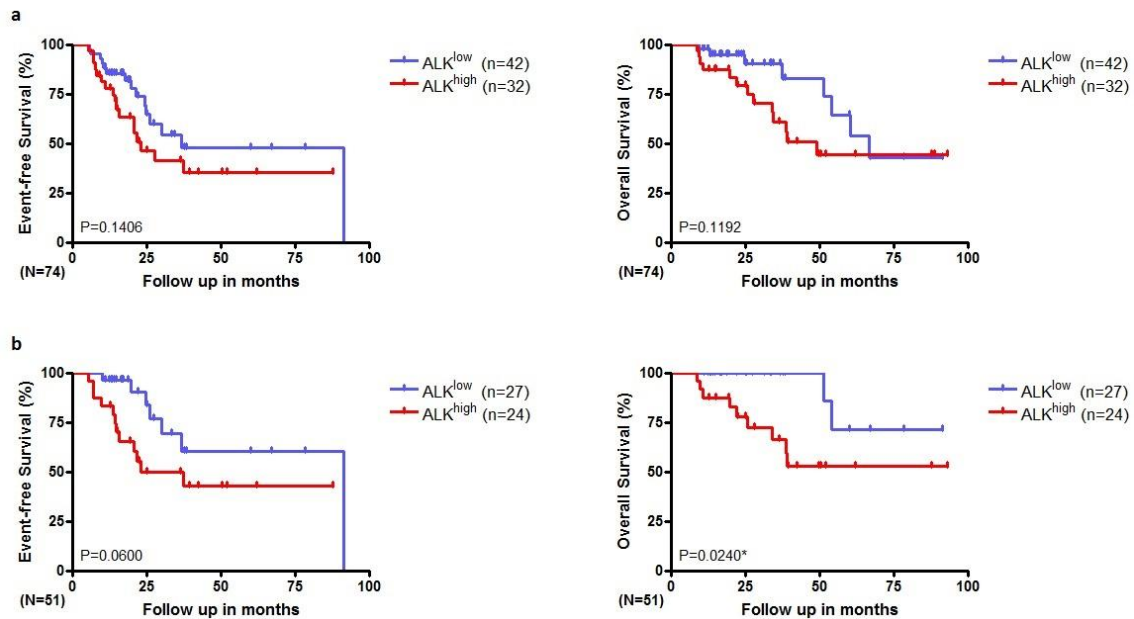
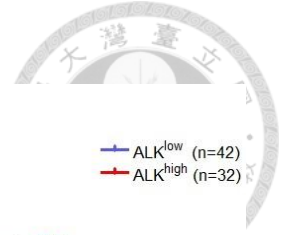


圖十三(續)、*ALK* 基因突變與惡性神經母細胞瘤及病患不良存活率相關。c. 僅使用具有完整 *ALK* 基因型分析及相對應 *MYCN* 增幅之臨床資料(n=57)。EFS 分析：*MYCN*-amplified NB 病患之五年存活率為 0% (存活時間中位數為 15.8 個月)、*MYCN*-non-amplified NB 病患則為 66.6%，兩者間具統計上顯著差異($p < 0.0001$)。而 OS 分析：*MYCN*-amplified NB 病患之五年存活率為 0% (存活時間中位數為 27.7 個月)、*MYCN*-non-amplified NB 病患則為 79.5%，兩者間具統計上顯著差異($p < 0.0001$)。在 *MYCN*-amp 次群分析中，雖然 ALK^{Mut+} 及 ALK^{WT} 病患之 EFS 與 OS 皆為 0%，且無統計上顯著差異(EFS： $p=0.1182$ ；OS： $p=0.5289$)，但存活時間中位數以 ALK^{Mut+} (EFS：7.7 個月，OS：19.2 個月)略低於 ALK^{WT} (EFS：15.8 個月，OS：UD)。而 *MYCN*-non-amp 次群分析中， ALK^{Mut+} NB 病患的五年存活率 EFS：66.7%、OS：100%； ALK^{WT} NB 病患 EFS：67.3%、OS：79.4%，兩者間於 EFS 與 OS 皆無統計上顯著差異(EFS： $p=0.4447$ ；OS： $p=0.7842$)。





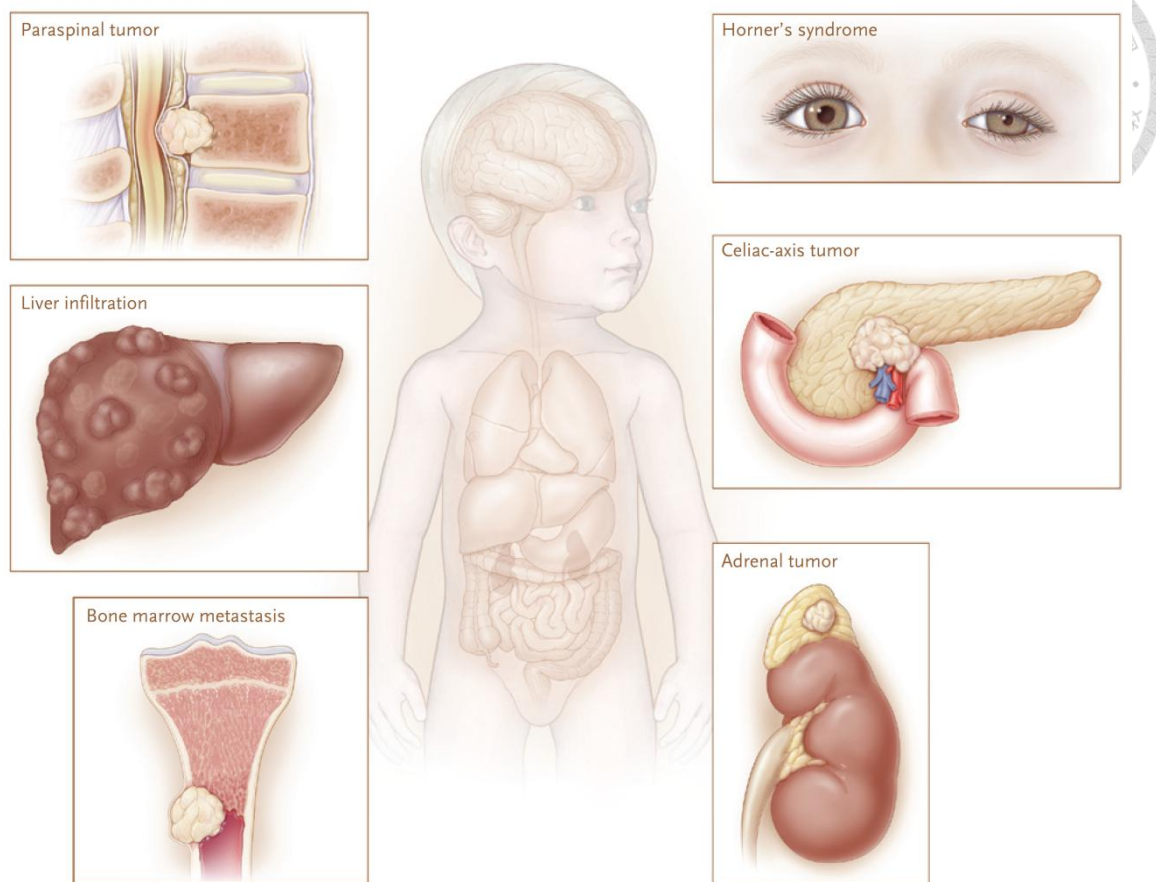
圖十四、*ALK* 基因多型性與神經母細胞瘤病患存活率之相關性。 a. Exon20 +3336 C/A 位點的兩種基因型，病患的存活率無論 EFS 或 OS 皆無統計差異(EFS： $p=0.4317$ 及 OS： $p=0.6492$)。 b. Exon21 +3375 C/A 位點的三種基因型間無論 EFS 或 OS 於統計上皆無顯著差異(EFS： $p=0.5159$ 及 OS： $p=0.7454$)。 c. Exon23 +3600 G/C 位點的 G/G、G/C 基因型，病患存活率在 EFS 具有統計差異($p=0.0423$)，但 OS 則無統計上顯著差異($p=0.1992$)，其中擁有 C 對偶基因的病患五年存活率高於 G 對偶基因，也許此位點出現基因變異之預後較好。 d-f. 在 Intron 的 SNPs，各基因型的病患存活率無論 EFS 及 OS 皆無統計上差異。



圖十五、*ALK* 基因表現與神經母細胞瘤病患存活率之相關性。 a. 所有 NB 腫瘤中 *ALK* 高/低表現與 NB 病患之存活分析。無事件存活率(EFS)：*ALK*^{high} 組病患的五年存活率為 35.2% (存活時間中位數為 23.0 個月)、*ALK*^{low} 組病患為 47.6% (存活時間中位數為 36.7 個月)，兩者間不具統計上顯著差異($p=0.1406$)。而整體存活率(OS)：*ALK*^{high} 組病患的五年存活率為 44.5% (存活時間中位數為 48.9 個月)、*ALK*^{low} 組病患為 64.5% (存活時間中位數為 66.5 個月)，兩者間無統計上顯著差異($p=0.1192$)。 b. 初診斷 NB 腫瘤(尚未經過化療)中 *ALK* 高/低表現與 NB 病患之存活分析。無事件存活率(EFS)：*ALK*^{high} 組病患的五年存活率為 42.8% (存活時間中位數為 23.0 個月)、*ALK*^{low} 組病患為 60.5% (存活時間中位數為 91.3 個月)，兩者間不具統計上顯著差異(HR：2.3，95% CI：1.0-6.2， $p=0.0600$)。而整體存活率(OS)：*ALK*^{high} 組病患的五年存活率為 53.0%、*ALK*^{low} 組病患為 71.4%，兩者間具有統計上顯著差異(HR：4.8，95% CI：1.2-13.1， $p=0.0240$)。



附錄



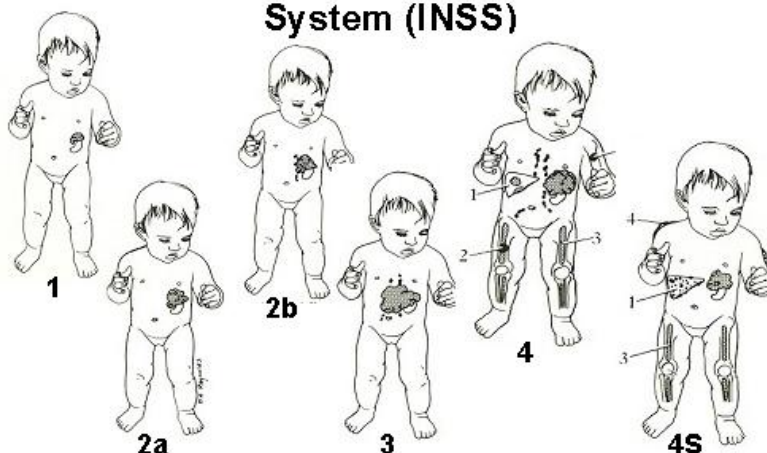
附錄一、神經母細胞瘤的臨床表現

資料來源：John M. Maris, M.D.: Recent Advances in Neuroblastoma, N Engl J Med

2010; 362:2202-2211



International Neuroblastoma Staging System (INSS)



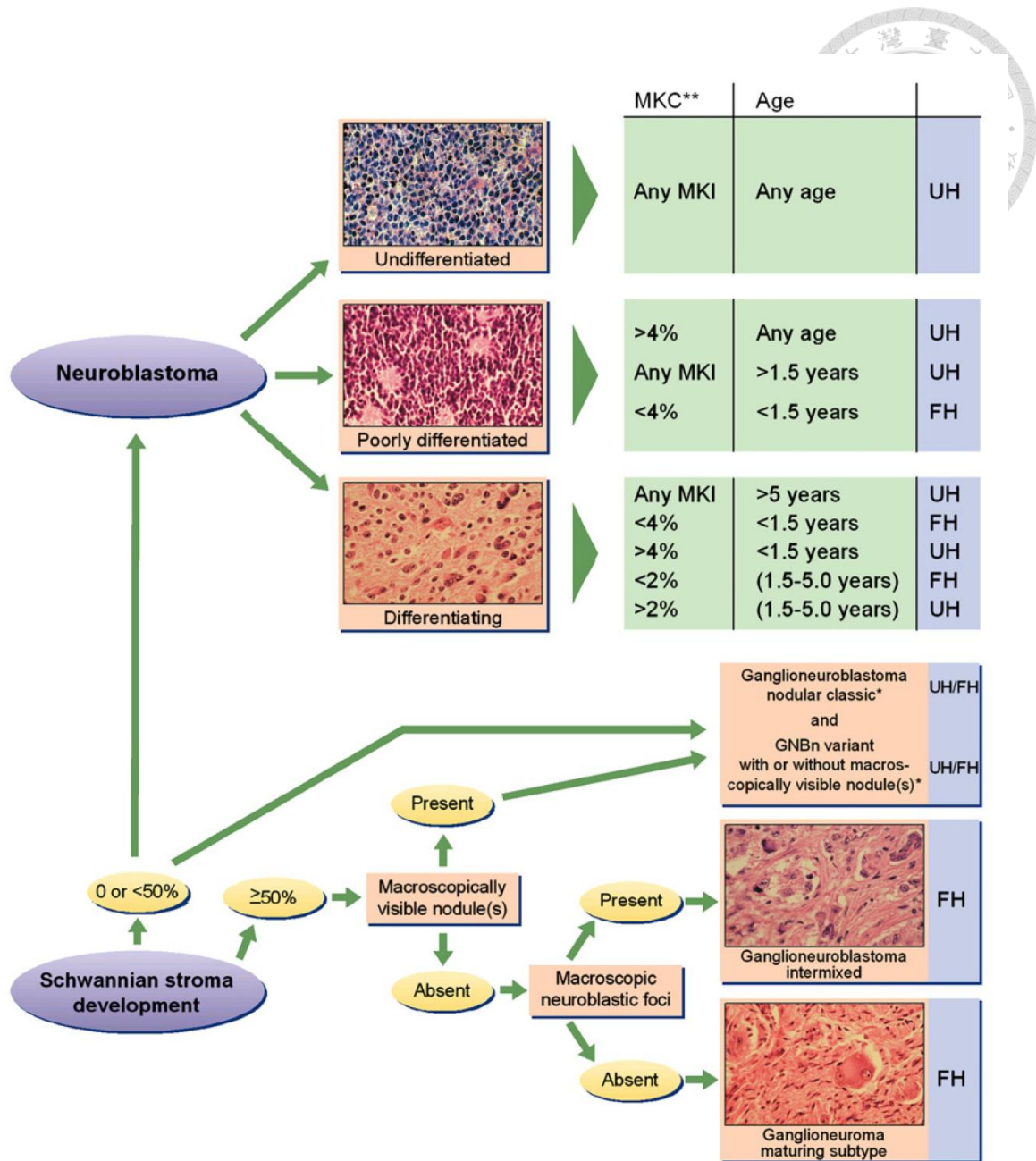
Stage 1	Localized tumor confined to the area of origin, completely removed during surgery, and identifiable ipsilateral and contralateral lymph nodes negative microscopically.
Stage 2A	Localized tumor with incomplete gross excision, identifiable ipsilateral and contralateral, and nonadherent lymph nodes negative for tumor microscopy.
Stage 2B	Unilateral tumor with complete or incomplete gross excision, with positive ipsilateral non-adherent regional lymph nodes, identifiable enlarged contralateral lymph nodes negative microscopically.
Stage 3	Unresectable tumor infiltrating across the midline, with or without regional lymph node involvement, unilateral tumor with contralateral regional lymph node, and midline tumor with bilateral extended lymph node involvement.
Stage 4	Spread of tumor to distant lymph nodes, skin, bone, bone marrow, and liver or other organs.
Stage 4S	Localized primary tumor, as defined for stage 1, 2A, or 2B, with metastases limited to skin, liver, and bone marrow in children younger than 1 year. Presence of elevated serum ferritin levels and E-rosette inhibitory factor distinguish stage 4 neuroblastoma from stage 4S.

附錄二、國際神經母細胞瘤分期系統 (International Neuroblastoma Staging System, INSS)

參考資料：

Roy Choudhury S, Karmakar S, Banik NL, Ray SK.: Targeting angiogenesis for controlling neuroblastoma., J Oncol. 2012; 2012:782020.

NANT : http://www.nant.org/Patients_and_Families/neuroblastoma.php



附錄三、國際神經母細胞瘤病理學分類 (International Neuroblastoma Pathology Classification, INPC)

參考資料：Park JR, Eggert A, Caron H.: Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment., *Pediatr Clin North Am.* 2008 Feb; 55(1):97-120



Table 1. Image-Defined Risk Factors in Neuroblastic Tumors

Ipsilateral tumor extension within two body compartments Neck-chest, chest-abdomen, abdomen-pelvis
Neck Tumor encasing carotid and/or vertebral artery and/or internal jugular vein Tumor extending to base of skull Tumor compressing the trachea
Cervico-thoracic junction Tumor encasing brachial plexus roots Tumor encasing subclavian vessels and/or vertebral and/or carotid artery Tumor compressing the trachea
Thorax Tumor encasing the aorta and/or major branches Tumor compressing the trachea and/or principal bronchi Lower mediastinal tumor, infiltrating the costo-vertebral junction between T9 and T12
Thoraco-abdominal Tumor encasing the aorta and/or vena cava
Abdomen/pelvis Tumor infiltrating the porta hepatis and/or the hepatoduodenal ligament Tumor encasing branches of the superior mesenteric artery at the mesenteric root Tumor encasing the origin of the coeliac axis, and/or of the superior mesenteric artery Tumor invading one or both renal pedicles Tumor encasing the aorta and/or vena cava Tumor encasing the iliac vessels Pelvic tumor crossing the sciatic notch
Intraspinal tumor extension whatever the location provided that: More than one third of the spinal canal in the axial plane is invaded and/ or the perimedullary leptomeningeal spaces are not visible and/or the spinal cord signal is abnormal
Infiltration of adjacent organs/structures Pericardium, diaphragm, kidney, liver, duodeno-pancreatic block, and mesentery
Conditions to be recorded, but <i>not</i> considered IDRFs Multifocal primary tumors Pleural effusion, with or without malignant cells Ascites, with or without malignant cells
Abbreviation: IDRFs, image-defined risk factors.

附錄四、神經母細胞瘤影像限定之風險因子(Image defined risk factors, IDRFs)

資料來源：Monclair T, Brodeur GM, Ambros PF, et al.: The International

Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. J Clin

Oncol 2009; 27(2): 298-303.

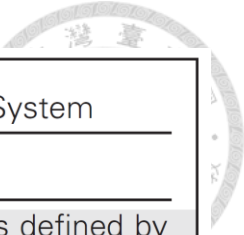


Table 2. International Neuroblastoma Risk Group Staging System

Stage	Description
L1	Localized tumor not involving vital structures as defined by the list of image-defined risk factors and confined to one body compartment
L2	Locoregional tumor with presence of one or more image-defined risk factors
M	Distant metastatic disease (except stage MS)
MS	Metastatic disease in children younger than 18 months with metastases confined to skin, liver, and/or bone marrow

NOTE. See text for detailed criteria. Patients with multifocal primary tumors should be staged according to the greatest extent of disease as defined in the table.

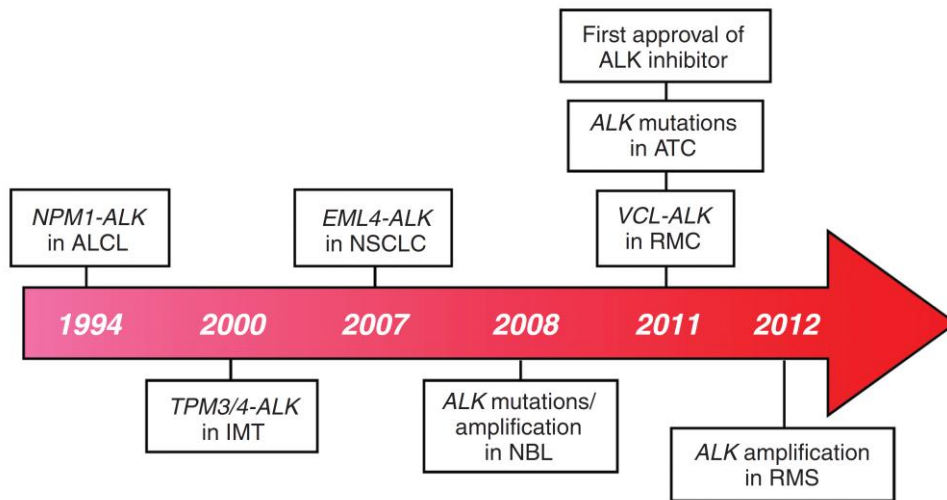
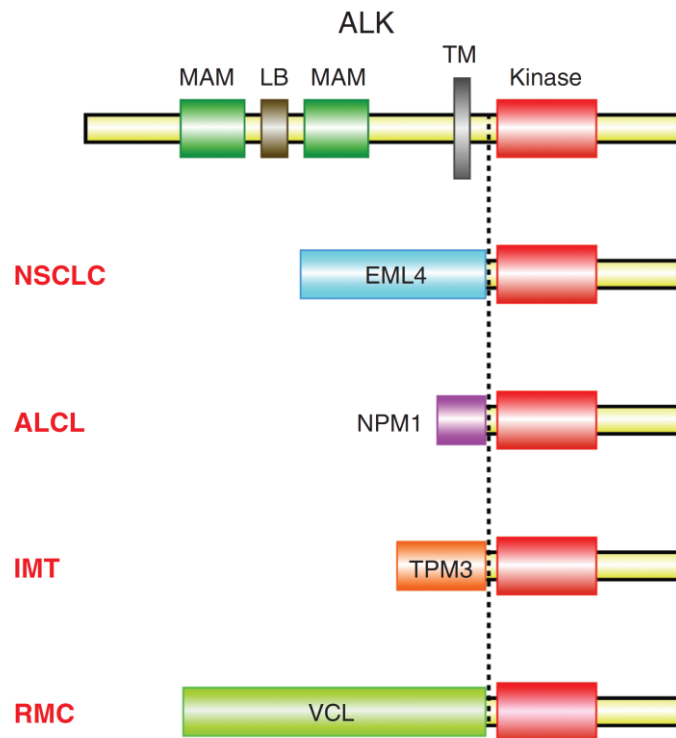
附錄五、國際神經母細胞瘤風險群分期系統(International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Staging System

資料來源：Monclair T, Brodeur GM, Ambros PF, et al.: The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* 2009; 27(2): 298-303.

INRG Stage	Age (months)	Histologic Category	Grade of Tumor Differentiation	MYCN	11q Aberration	Ploidy	Pretreatment Risk Group
L1/L2		GN maturing; GNB intermixed					A Very low
L1		Any, except GN maturing or GNB intermixed		NA			B Very low
				Amp			K High
L2	< 18	Any, except GN maturing or GNB intermixed		NA	No		D Low
					Yes		G Intermediate
							E Low
	≥ 18	GNB nodular; neuroblastoma	Differentiating	NA	No		
					Yes		H Intermediate
							N High
		Poorly differentiated or undifferentiated	NA				
			Amp				
M	< 18			NA		Hyperdiploid	F Low
	< 12			NA		Diploid	I Intermediate
	12 to < 18			NA		Diploid	J Intermediate
	< 18			Amp			O High
	≥ 18						P High
MS	< 18			NA	No		C Very low
					Yes		Q High
					Amp		R High

附錄六、INRG Consensus Pretreatment Classification schema.

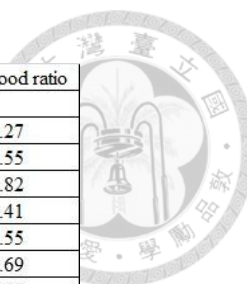
資料來源：Cohn SL, Pearson AD, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, Faldum A, Hero B, Iehara T, Machin D, Mosseri V, Simon T, Garaventa A, Castel V, Matthay KK; INRG Task Force.: The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol.* 2009; 27(2):289-97.



附錄七、*ALK* 基因結構、*ALK* 融合基因及 *ALK* 基因的腫瘤學歷史

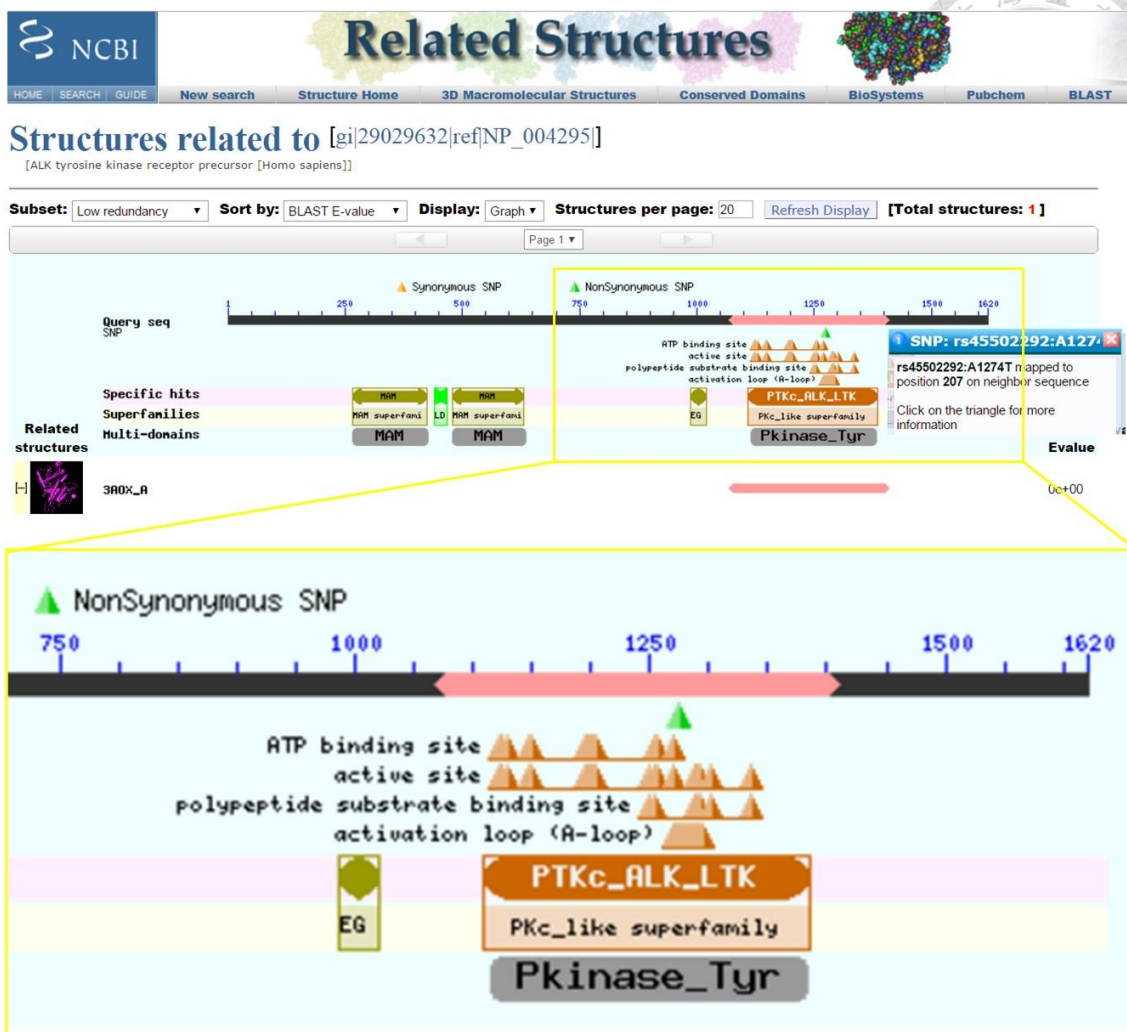
資料來源：Mano H: *ALK*oma: a cancer subtype with a shared target. *Cancer Discov.*

2012 Jun; 2(6):495-502.



Cutoff	Sensitivity%	95% CI	Specificity%	95% CI	Likelihood ratio
< 0.0025	2.5	0.06327% to 13.16%	100	71.51% to 100.0%	
< 0.00495	2.5	0.06327% to 13.16%	90.91	58.72% to 99.77%	0.27
< 0.0069	5	0.6114% to 16.92%	90.91	58.72% to 99.77%	0.55
< 0.0103	7.5	1.574% to 20.39%	90.91	58.72% to 99.77%	0.82
< 0.01605	7.5	1.574% to 20.39%	81.82	48.22% to 97.72%	0.41
< 0.0202	10	2.793% to 23.66%	81.82	48.22% to 97.72%	0.55
< 0.0245	12.5	4.186% to 26.80%	81.82	48.22% to 97.72%	0.69
< 0.0282	15	5.710% to 29.84%	81.82	48.22% to 97.72%	0.83
< 0.03535	17.5	7.338% to 32.78%	81.82	48.22% to 97.72%	0.96
< 0.04415	20	9.052% to 35.65%	81.82	48.22% to 97.72%	1.1
< 0.0628	22.5	10.84% to 38.45%	81.82	48.22% to 97.72%	1.24
< 0.08115	25	12.69% to 41.20%	81.82	48.22% to 97.72%	1.38
< 0.0889	27.5	14.60% to 43.89%	81.82	48.22% to 97.72%	1.51
< 0.09685	30	16.56% to 46.53%	81.82	48.22% to 97.72%	1.65
< 0.1074	32.5	18.57% to 49.13%	81.82	48.22% to 97.72%	1.79
< 0.1190	35	20.63% to 51.68%	81.82	48.22% to 97.72%	1.93
< 0.1266	37.5	22.73% to 54.20%	81.82	48.22% to 97.72%	2.06
< 0.1365	40	24.86% to 56.67%	81.82	48.22% to 97.72%	2.2
< 0.1452	42.5	27.04% to 59.11%	81.82	48.22% to 97.72%	2.34
< 0.1575	45	29.26% to 61.51%	81.82	48.22% to 97.72%	2.48
< 0.1798	47.5	31.51% to 63.87%	81.82	48.22% to 97.72%	2.61
< 0.1943	50	33.80% to 66.20%	81.82	48.22% to 97.72%	2.75
< 0.1996	52.5	36.13% to 68.49%	81.82	48.22% to 97.72%	2.89
< 0.2046	55	38.49% to 70.74%	81.82	48.22% to 97.72%	3.03
< 0.2131	57.5	40.89% to 72.96%	81.82	48.22% to 97.72%	3.16
< 0.2438	60	43.33% to 75.14%	81.82	48.22% to 97.72%	3.3
< 0.2816	62.5	45.80% to 77.27%	81.82	48.22% to 97.72%	3.44
< 0.2984	62.5	45.80% to 77.27%	72.73	39.03% to 93.98%	2.29
< 0.3097	62.5	45.80% to 77.27%	63.64	30.79% to 89.07%	1.72
< 0.3494	65	48.32% to 79.37%	63.64	30.79% to 89.07%	1.79
< 0.4081	67.5	50.87% to 81.43%	63.64	30.79% to 89.07%	1.86
< 0.4404	70	53.47% to 83.44%	63.64	30.79% to 89.07%	1.92
< 0.4519	72.5	56.11% to 85.40%	63.64	30.79% to 89.07%	1.99
< 0.4963	72.5	56.11% to 85.40%	54.55	23.38% to 83.25%	1.59
< 0.5401	72.5	56.11% to 85.40%	45.45	16.75% to 76.62%	1.33
< 0.5618	75	58.80% to 87.31%	45.45	16.75% to 76.62%	1.38
< 0.5817	77.5	61.55% to 89.16%	45.45	16.75% to 76.62%	1.42
< 0.6170	80	64.35% to 90.95%	45.45	16.75% to 76.62%	1.47
< 0.6556	82.5	67.22% to 92.66%	45.45	16.75% to 76.62%	1.51
< 0.6983	82.5	67.22% to 92.66%	36.36	10.93% to 69.21%	1.3
< 0.8166	85	70.16% to 94.29%	36.36	10.93% to 69.21%	1.34
< 1.006	87.5	73.20% to 95.81%	36.36	10.93% to 69.21%	1.38
< 1.135	87.5	73.20% to 95.81%	27.27	6.022% to 60.97%	1.2
< 1.181	90	76.34% to 97.21%	27.27	6.022% to 60.97%	1.24
< 1.265	90	76.34% to 97.21%	18.18	2.283% to 51.78%	1.1
< 1.343	92.5	79.61% to 98.43%	18.18	2.283% to 51.78%	1.13
< 1.386	92.5	79.61% to 98.43%	9.091	0.2299% to 41.28%	1.02
< 1.715	95	83.08% to 99.39%	9.091	0.2299% to 41.28%	1.04
< 2.126	95	83.08% to 99.39%	0	0.0% to 28.49%	0.95
< 2.248	97.5	86.84% to 99.94%	0	0.0% to 28.49%	0.97

附錄八、以 NB 病患存亡與 ALK 表現量進行 ROC 作圖之靈敏度及特異性結果。



附錄九、*ALK* A1274T 突變(rs45502292)位於 *ALK* 基因 TKD 活化位。

資料來源：NCBI_MMDB_Entrez's 'Structure' database：

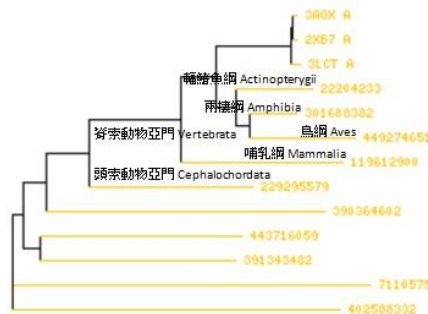
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cblast/cblast.cgi?client=snp&master_gi=29029632&neighbor_gi=333944147&snp_pos=207&snp_title=dbSNP:rs45502292&snp_desc=rs45502292_A1274T&snp_color=2&snp_id=rs45502292



Conserved Protein Domain Family PTKc_ALK_LTK



cd05036 Sequence Cluster



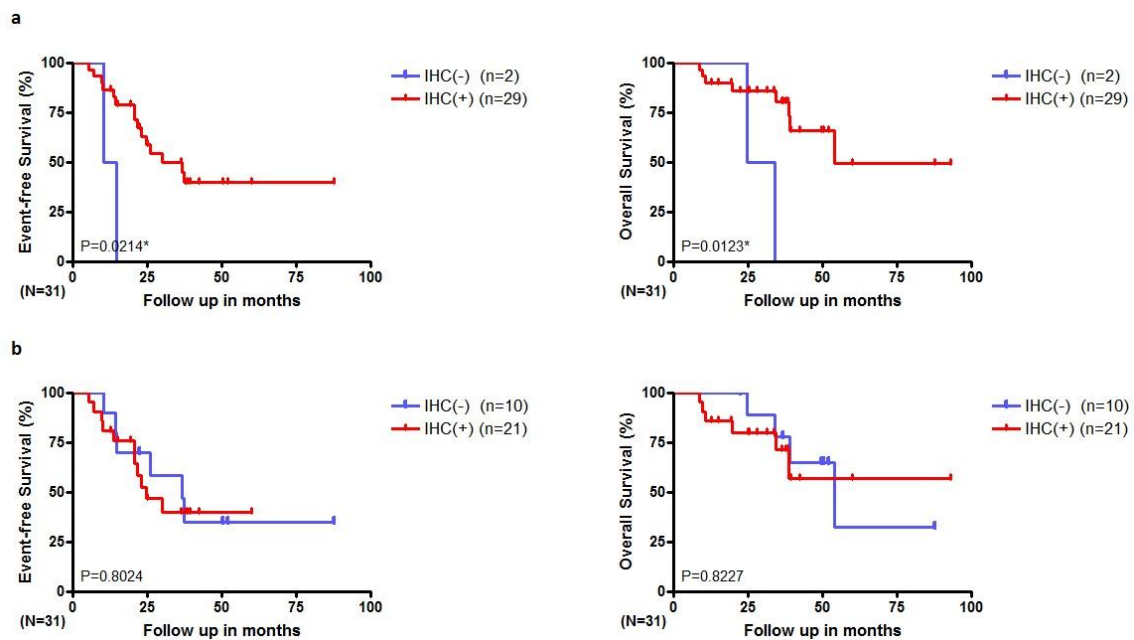
Chain A, X-Ray Crystal Structure Of Human Anaplastic Lymphoma Kinase In Complex With Ch5424802
 Chain A, Structure Of Human Anaplastic Lymphoma Kinase In Complex With Nvp- Tae684
 Chain A, Crystal Structure Of The Anaplastic Lymphoma Kinase Catalytic Domain [*Homo sapiens* (human)]
 novel protein similar to vertebrate anaplastic lymphoma kinase (ALK) and leukocyte tyrosine kinase receptor precursor (LTK or TYK1), partial [*Danio rerio* (zebrafish)]
 PREDICTED: ALK tyrosine kinase receptor-like [*Xenopus (Silurana) tropicalis* (western clawed frog, 熱帶爪蟾)]
 ALK tyrosine kinase receptor, partial [*Columba livia* (rock pigeon, 野鴿)]
 leukocyte tyrosine kinase, isoform CRA_a [*Homo sapiens* (human)]
 hypothetical protein BRAFLDRAFT_216804, partial [*Branchiostoma floridae* (Florida lancelet, 佛羅里達文昌魚)]
 PREDICTED: leukocyte tyrosine kinase receptor [*Strongylocentrotus purpuratus* (purple sea urchin, 紫海膽)]
 hypothetical protein CAPTEDRAFT_42843, partial [*Capitella teleta*, 海蠔蟲]
 PREDICTED: ALK tyrosine kinase receptor-like [*Metaseiulus occidentalis* (western predatory mite, 西部捕食蟎)]
 receptor protein tyrosine kinase ALK splice variant A [*Drosophila melanogaster* (fruit fly)]
 TK/ALK protein kinase [*Wuchereria bancrofti*, 班氏絲蟲]

		170	180	190	200	210	220	230	240																																					
	Activation loop (A-loop)	. . . * * * * * * * * . . .																																												
	Feature 4	#####																																												
	3A0X_A	201	IGDFGARDIYRASYYRKGCCAMLPVKWMPPEAFMEg	I	F	T	S	K	T	D	T	W	S	F	G	V	L	L	W	E	I	F	S	L	G	Y	M	P	P	S	K	N	Q	E	V	L	F	V	T	S	G	G	R	280		
	2X87_A	176	IGDFGARDIYRASYYRKGCCAMLPVKWMPPEAFMEg	I	F	T	S	K	T	D	T	W	S	F	G	V	L	L	W	E	I	F	S	L	G	Y	M	P	P	S	K	N	Q	E	V	L	F	V	T	S	G	G	R	255		
	3LCT_A	202	IGDFGARDIYRAGYYRKGCCAMLPVKWMPPEAFMEg	I	F	T	S	K	T	D	T	W	S	F	G	V	L	L	W	E	I	F	S	L	G	Y	M	P	P	S	K	N	Q	E	V	L	F	V	T	S	G	G	R	281		
	[<i>Danio rerio</i> (zebrafish, 斑馬魚)]	gi 22204233	718	IGDFGARDIYRASYYRKGGRAMLVVKWMPPEAFLEg	I	F	T	C	K	T	D	T	W	S	F	G	V	L	L	W	E	I	F	S	L	G	Y	M	P	P	C	K	T	N	Q	E	V	L	F	V	T	G	G	R	797	
	[<i>Homo sapiens</i> (human, 人類)]	gi 119612900	662	IGDFGARDIYRASYYRGRDRALVVKWMPPEAFLEg	I	F	T	S	K	T	D	S	W	S	F	G	V	L	L	W	E	I	F	S	L	G	Y	M	P	P	G	R	T	N	Q	E	V	L	D	F	V	V	G	G	R	741
	[<i>Drosophila melanogaster</i> (fruit fly, 果蠅)]	gi 7110575	1345	IADFGNSRDIYRSDYYRKGCCAMLPVKWMPPEAFLDg	I	F	T	S	K	T	D	V	S	F	G	V	L	L	W	E	V	F	S	L	G	R	S	P	Y	P	G	H	N	T	Q	M	V	L	V	R	G	G	R	1424		
	[<i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i> (western clawed frog, 熱帶爪蟾)]	gi 301608382	983	IGDFGARDIYRASYYRKGGRAMLVVKWMPPEAFLEg	V	F	T	S	K	T	D	T	W	S	F	G	V	L	L	W	E	I	F	S	L	G	Y	M	P	P	C	K	T	N	Q	E	V	L	F	V	T	S	G	G	R	1062
	[<i>Branchiostoma floridae</i> (Florida lancelet, 佛羅里達文昌魚)]	gi 229295579	644	IGDFGARDIYRSNYYRKGGRAMLVVKWMPPEAFLDg	V	F	T	T	K	D	V	S	F	G	V	L	L	W	E	V	M	S	L	G	Y	M	P	P	G	K	S	N	Q	E	V	M	Q	F	V	T	E	G	G	R	723	
	[<i>Columba livia</i> (rock pigeon, 野鴿)]	gi 449274651	901	IGDFGARDIYRASYYRKGGRAMLVVKWMPPEAFLEg	I	F	T	S	K	T	D	T	W	S	F	G	V	L	L	W	E	I	F	S	L	G	Y	M	P	P	C	K	T	N	Q	E	V	L	F	V	T	S	G	G	R	980
	[<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> (purple sea urchin, 紫海膽)]	gi 390364602	819	IADFGARDIYRADYYRKGQALVVKWMPPEAFQDg	I	F	T	S	K	T	D	V	W	A	Y	G	V	L	L	W	E	I	S	L	G	F	M	P	P	G	M	S	N	Q	E	V	I	Q	F	V	S	A	G	E	R	898
	[<i>Capitella teleta</i> , 海蠔蟲]	gi 443716059	216	IADFGARDIYRADYYRKGCCAMLPVKWMPPEAFLDg	I	F	T	S	K	T	D	V	S	F	G	V	L	L	W	E	V	F	S	L	G	Y	M	P	P	G	R	G	N	Q	E	V	M	Q	L	V	T	A	G	G	R	295
	[<i>Metaseiulus occidentalis</i> (western predatory mite, 西部捕食蟎)]	gi 391343482	1122	IADFGARDIYRADYYRKGCCAMLPVKWMPPEAFLDg	I	F	T	S	K	T	D	V	S	F	G	V	L	L	W	E	V	M	S	M	G	Y	M	P	P	G	R	G	N	Q	E	V	M	Q	M	V	T	G	G	S	R	1201
	[<i>Wuchereria bancrofti</i> , 班氏絲蟲]	gi 402588332	595	IADFGARDIYRQDYRKGCCAMLPVKWMPPEAFLDg	V	F	T	V	K	T	D	V	S	F	G	V	L	L	W	E	I	F	S	L	G	Y	M	P	P	G	R	S	N	Q	E	V	M	S	L	I	V	N	G	G	R	674

↑ ALK A1274T

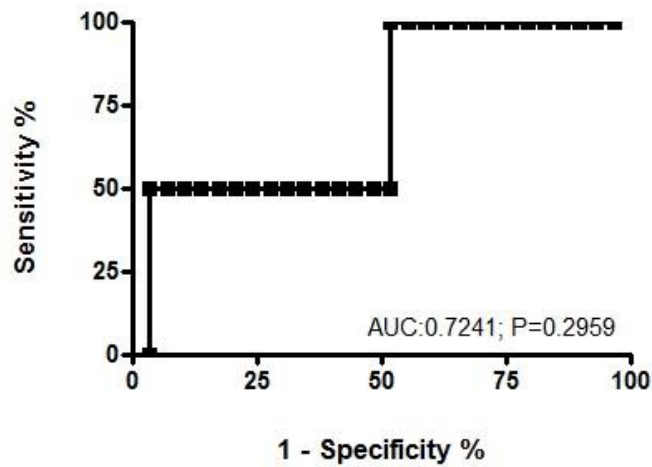
附錄十、ALK A1274T 位點(rs45502292)在各物種間具高度相似性。

資料來源：NCBI_Conserved Domain Database：<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=270632>



附錄十一、ALK 免疫組織化學染色與神經母細胞病患存活率之關聯性。a. 神經母細胞瘤病患的無事件存活率(EFS)，ALK 陽性病患(grade1,2,3)的五年存活率 EFS 為 39.8% (存活時間中位數為 30.0 個月)、OS 為 49.3% (存活時間中位數為 54.0 個月)；ALK 陰性病患(grade0)五年存活率 EFS 及 OS 皆為 0% (存活時間中位數 EFS 為 12.5 個月、OS 為 29.3 個月)，兩者間具統計上顯著差異(EFS： $p=0.0214$ 及 OS： $p=0.0123$)。

b. 神經母細胞瘤病患的無事件存活率(EFS)，ALK 陽性病患(grade2,3)的五年存活率 EFS 為 40.0% (存活時間中位數為 24.5 個月)、OS 為 56.9% (存活時間中位數：UD)；ALK 陰性病患(grade0,1)五年存活率 EFS 為 35.0% (存活時間中位數為 36.7 個月)、OS 為 32.4% (存活時間中位數為 54.0 個月)，兩者間不具統計上顯著差異(EFS： $p=0.8024$ 及 OS： $p=0.8227$)。



Cutoff	Sensitivity%	95% CI	Specificity%	95% CI	Likelihood ratio
< 0.00355	0	0.0% to 84.19%	96.55	82.24% to 99.91%	0
< 0.0066	50	1.258% to 98.74%	96.55	82.24% to 99.91%	14.5
< 0.0103	50	1.258% to 98.74%	93.1	77.23% to 99.15%	7.25
< 0.0539	50	1.258% to 98.74%	89.66	72.65% to 97.81%	4.83
< 0.09685	50	1.258% to 98.74%	86.21	68.34% to 96.11%	3.62
< 0.1459	50	1.258% to 98.74%	82.76	64.23% to 94.15%	2.9
< 0.1980	50	1.258% to 98.74%	79.31	60.28% to 92.01%	2.42
< 0.2118	50	1.258% to 98.74%	75.86	56.46% to 89.70%	2.07
< 0.2438	50	1.258% to 98.74%	72.41	52.76% to 87.27%	1.81
< 0.2816	50	1.258% to 98.74%	68.97	49.17% to 84.72%	1.61
< 0.3071	50	1.258% to 98.74%	65.52	45.67% to 82.06%	1.45
< 0.3771	50	1.258% to 98.74%	62.07	42.26% to 79.31%	1.32
< 0.4372	50	1.258% to 98.74%	58.62	38.94% to 76.48%	1.21
< 0.4418	50	1.258% to 98.74%	55.17	35.69% to 73.55%	1.12
< 0.4519	50	1.258% to 98.74%	51.72	32.53% to 70.55%	1.04
< 0.4963	50	1.258% to 98.74%	48.28	29.45% to 67.47%	0.97
< 0.5401	100	15.81% to 100.0%	48.28	29.45% to 67.47%	1.93
< 0.5618	100	15.81% to 100.0%	44.83	26.45% to 64.31%	1.81
< 0.5817	100	15.81% to 100.0%	41.38	23.52% to 61.06%	1.71
< 0.6170	100	15.81% to 100.0%	37.93	20.69% to 57.74%	1.61
< 0.6556	100	15.81% to 100.0%	34.48	17.94% to 54.33%	1.53
< 0.6983	100	15.81% to 100.0%	31.03	15.28% to 50.83%	1.45
< 0.8166	100	15.81% to 100.0%	27.59	12.73% to 47.24%	1.38
< 1.006	100	15.81% to 100.0%	24.14	10.30% to 43.54%	1.32
< 1.135	100	15.81% to 100.0%	20.69	7.994% to 39.72%	1.26
< 1.181	100	15.81% to 100.0%	17.24	5.846% to 35.77%	1.21
< 1.265	100	15.81% to 100.0%	13.79	3.889% to 31.66%	1.16
< 1.343	100	15.81% to 100.0%	10.34	2.186% to 27.35%	1.12
< 1.386	100	15.81% to 100.0%	6.897	0.8464% to 22.77%	1.07
< 1.836	100	15.81% to 100.0%	3.448	0.08726% to 17.76%	1.04


附錄十二、以 ALK IHC 與 *ALK* 表現量進行 ROC 作圖及其靈敏度和特異性之結果。

附錄十三、實驗步驟

【實驗步驟 1】傳統常規 DNA 萃取

1. 將 EDTA blood sample (3ml 全血)以 3000rpm, 10mins, 4°C 離心，去除 plasma。
(KUBOTA8800)
2. 加入 1X RBCL (Red blood cell lysis buffer)使最終體積約為 10mL，並劇烈震盪 5~10 秒，使之沒有團塊。離心 3000rpm, 10mins, 4°C。(KUBOTA8800)
3. 離心完後直接將採血管蓋子打開，上層溶血倒入含有漂白水之廢液瓶中，留意勿將底部之細胞團塊倒入廢液中，倒扣採血管在擦手紙上(勿超過 45 度斜角)。
4. 步驟 2~4 重複 2~3 次，使紅血球完全去除。
5. 配置 PK Mixture (n+1)的份量。(使用前配置)
6. 加入 700μL PK Mixture 至採血管中，將白色團塊打散後移置於 1.5mL 微量離心管當中。將離心管架重疊，綑綁斜放於 37°C 培養箱中，以 80rpm 轉速震盪隔夜(至少 12 小時)。
7. 次日，待實驗樣品冷卻至室溫，加入 250μL 6N NaCl (約 1/4 體積)，劇烈震盪 (vortex) 15 秒，使變性蛋白析出。離心 15000rpm, 10mins, 4°C。(HERMLE Z233MJK-2)
8. 將上清液吸取至新的 1.5mL 微量離心管中，再離心 15000rpm, 10mins, 4°C。
(HERMLE Z233MJK-2)
9. 取上清液至新的 1.5mL 微量離心管中，共分成兩管 (約 450μL/管)。
10. 加入 450μL isopropanol (1:1 體積)，均勻反轉微量離心管，即可見白色雲狀 DNA 析出。離心 15000rpm, 10mins, 4°C。(HERMLE Z233MJK-2) (其中一份 DNA 繼續步驟 11；另一份則保存於酒精中，室溫下保存)。
11. 小心去除上清液後，加入 1mL 75% 酒精清洗 DNA，以 vortex 使 DNA 沉澱物懸浮。



- 
12. 離心 15000rpm, 5mins, 4°C, 去除酒精。重複步驟 15~16。(HERMLE Z233MJK-2)
 13. 將微量離心管打開蓋子，倒扣於微量離心管架，待酒精完全揮發，直至 DNA 沉澱物由白色轉為透明狀。
 14. 加入 300μL ddH₂O 回溶，並以 56°C 加熱約 2 小時，促進 DNA 完全溶解後，置於-20°C 存放。



【實驗步驟 2】傳統常規 RNA 萃取

※ 注意事項：實驗進行前將桌面及所有儀器、器具以 70% 酒精擦拭後，噴 RNase inhibitor。

1. 將預留之細胞(至少 5×10^6 cell) 離心 1200rpm, 5mins，並將上清液去除。
(KUBOTA2100)
2. 加入 1mL TRIzol[®] LS Reagent，將其以微量吸管多次吸吐均勻打散。
($1 \times 10^6 \sim 10 \times 10^6$ 皆加 1mL TRIzol)
3. 將均勻混合的細胞/TRIzol 混合液移至 1.5mL RNase-free 微量離心管中。(若未要馬上抽 RNA，於此步驟後將細胞儲存於 -80°C)
4. 加入 200 μL chloroform，上下翻轉微量離心管 15sec，直至細胞液呈乳色。放置室溫 5mins。
5. 離心 15000rpm, 15mins, 4°C 。(HERMLE Z233MJK-2)
(離心完應分三層：aqueous phase、inter phase、organic phase；而 RNA 位在 aqueous phase，DNA 及蛋白質則分別位於 inter phase 以及 organic phase)
6. 取上清液(約 500 μL)至新的 1.5mL 微量離心管。
7. 加入 500 μL isopropanol (1:1 體積)溫和混勻，置於室溫 10mins。
8. 離心 15000rpm, 5mins, 4°C 。離心後可見底部有 RNA 沉澱物。(HERMLE Z233MJK-2)
9. 去除上清液後，加入 1mL 70% ethanol 清洗 RNA，輕彈使 RNA 沉澱物懸浮。
10. 離心 15000rpm, 5mins, 4°C 。重複步驟 9~10。(HERMLE Z233MJK-2)
11. 吸乾上清液(要盡量將酒精去除)，將微量離心管開蓋放置離心管架上，於抽風櫃內抽氣 5mins，快速風乾 RNA。(若過度風乾會降低 RNA 溶解度)
12. 用 20 μL DEPC water 回溶 RNA，置於 -80°C 存放。

【實驗步驟 3】以 DNA、RNA 及蛋白質萃取套組萃取神經母細胞腫瘤樣本



◎前準備：

- ✓ 確認 Buffer DNA Wash, Wash Buffer RA3, and rDNase 已準備妥當。
- ✓ 所有器具以 RNase inhibitor 噴過一遍，以避免 RNA 操作過程中 degrade。

1. 打碎至多 30mg human/animal tissue 或離心收集至多 5×10^6 cultured cells。

- (1) 研鉢和研杵需經高溫高壓滅菌，烘乾，置於 -80°C 冰箱降溫。
- (2) 實驗進行前，動物組織需秤重(檢體重量與 Lysis Buffer RP1 加的量有關)。
- (3) 準備液態氮筒，放置些許液態氮；準備冰桶，裝碎冰。
- (4) 研鉢置於冰上，將動物組織夾至鉢中，以鐵勺舀少許液態氮倒至鉢中，以杵研磨組織置粉狀，需快速，避免組織液化。
- (5) 粉狀組織以 dropper(前端已剪成 U 型，非管狀)掃至新的 1.5mL 微量離心管 (自備)。

2. 加入 350 μL Buffer RP1 以及 3.5 μL β -mercaptoethanol (β -ME)，大力震盪。
3. 取 1 個 NucleoSpin Filter (violet ring)，置於 2mL Collection Tube；將上步驟混勻的檢體液移至 filter 中，離心 15,000rpm, 1min, 4°C 。
4. 將過濾下來的檢體移至新的 1.5mL 微量離心管(自備)，加入 350 μL 70% ethanol，pipetting 大約 5 次(或上下翻轉使之混勻)。
5. 準備一組 NucleoSpin TriPrep Column (light blue ring)，將 lysate 移至 Column 中。
6. 離心 15000rpm, 1min, 4°C 。
7. 將 NucleoSpin TriPrep Column 放進新的 2mL Collection Tube。(RNA 和 DNA 會留在 column membrane 上；而 Protein 位在下方液體中，若要抽 protein，需將下方液體預留下來。)
8. 加入 500 μL DNA wash 至 NucleoSpin TriPrep Column，離心 15000rpm, 1min, 4°C ，隨後去除 Collection Tube 中的廢液。重覆此步驟。
9. 自備一個新的 1.5mL 微量離心管，將蓋子剪掉，把 NucleoSpin TriPrep Column 放進管中；離心 15000rpm, 3min, 4°C ，將殘餘酒精甩乾。再將 Column 的蓋子打開，靜置 3mins，以確保殘餘酒精完全揮發。



10. 將 100 μ L DNA Elute 注入 membrane 中，靜置 1min；隨後離心 15000rpm, 1min, 4 $^{\circ}$ C，將 DNA elute 下來。把 eluted DNA 移至新的 1.5mL 微量離心管(自備)。

(向下繼續進行 RNA 純化)

11. 自備新的 1.5mL 微量離心管配置 rDNase reaction mixture，並將 95 μ L rDNase reaction mixture 注入 column 的 silica membrane 中央，置於室溫 15mins。

	each	N=?
Reconstituted rDNase	10	
Reaction Buffer for rDNase	90	

12. 加入 200 μ L Buffer RA2 至 NucleoSpin TriPrep Column，離心 15,000rpm，30sec。
隨後將 NucleoSpin TriPrep Column 放至新的 2mL Collection Tube。

13. 加入 600 μ L Buffer RA3 至 NucleoSpin TriPrep Column，離心 15,000rpm，30sec。
去除 Collection Tube 中廢液。

14. 加入 250 μ L Buffer RA3 至 NucleoSpin TriPrep Column，離心 15,000rpm，2mins，
完全地乾燥 membrane。

15. 自備一個去蓋 1.5mL RNase-free 微量離心管，將 NucleoSpin TriPrep Column 放
進微量離心管中。

16. 加入 40 μ L RNase-free H₂O 來 elute RNA，離心 15,000rpm，1min。將 RNA 移至
試劑套組提供之 RNase-free 微量離心管(1.5mL Collection Tube)。



【實驗步驟 4】cDNA 製備

(a) SuperScript[®] III First-Strand Synthesis System

1. 將所有會用到的器具、試劑、桌面以及抽風櫃等，先以 75% 酒精擦拭後，再噴 RNase inhibitor。
2. 於抽風櫃中配置 RNA/primer 混合液後取出。

	each (μL)
Total RNA (2 μg)	n
Primer (Oligo dT)	1
10 μM dNTP mix	1
DEPC H ₂ O	8-n

3. 視不同實驗樣本之 RNA 濃度，將不同體積之 RNA 加進 0.2mL 微量離心管中 (終體積為 10 μL)，均勻混合，快速離心 (spin down) 後放進 PCR 機台培養於 65 $^{\circ}\text{C}$, 5mins，隨後置於冰上冰鎮 1min。
4. 步驟 3 之等待時間，於抽風櫃中配置 cDNA 合成混合液。

	each (μL)
10X RT buffer	2
25mM MgCl ₂	4
0.1M DTT	2
RNase OUT [™]	1
SS III RT	1

5. 將 10 μL cDNA 合成混合液加進含 RNA 的微量離心管中。
6. 進行反轉錄：50 $^{\circ}\text{C}$, 50mins → 85 $^{\circ}\text{C}$, 5mins → ice, 1min。
7. 加入 1 μL RNase H 至各微量離心管中，培養 37 $^{\circ}\text{C}$, 20mins。
8. 將 cDNA 存放於 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。



(b) Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit with dsDNase

1. 將所有會用到的器具、試劑、桌面以及抽風櫃等，先以 75% 酒精擦拭後，再噴 RNase inhibitor。
2. 於抽風櫃中配置 RNA/dsDNase 混合液後取出。

	each (μL)
Total RNA (2 μg)	n
10X dsDNase Buffer	1
dsDNase	1
Nuclease-free Water	8-n

3. 視不同實驗樣本之 RNA 濃度，將不同體積之 RNA 加進 0.2mL 微量離心管中 (終體積為 10 μL)，均勻混合，快速離心 (spin down) 後放進 PCR 機台培養於 37 $^{\circ}\text{C}$, 2mins，隨後置於冰上冰鎮。
4. 於抽風櫃中配置反轉錄酵素混合液，均勻混合後快速離心。

	each (μL)
5X Reaction Mix	4
Maxima Enzyme Mix	2
Nuclease-free Water	4

5. 將 10 μL 反轉錄酵素混合液加進含 RNA 的微量離心管中。
6. 進行反轉錄：25 $^{\circ}\text{C}$, 10mins \rightarrow 50 $^{\circ}\text{C}$, 30mins \rightarrow 85 $^{\circ}\text{C}$, 5mins。
7. 將 cDNA 存放於 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

**【實驗步驟 5】聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 及
反轉錄聚合酶連鎖反應 (Reverse Transcription-PCR, RT-PCR)**



1. 將 genomic DNA 取 1 μ L 置於 0.2mL 微量離心管中。
2. 配製聚合酶連鎖反應混合液。[註：本研究中每一對引子的最佳反應條件不盡相同，詳細反應條件如下]

[PCR Mixture 1] (with 2.0mM MgCl₂)

	each (μ L)	最終濃度
10X PCR Buffer	3	1X
2.5mM dNTP	2.4	0.2mM
10 μ M Forward primer	1	0.3 μ M
10 μ M Reverse primer	1	0.3 μ M
DreamTaq DNA Polymerase	0.15	0.75U
ddH ₂ O	22.45	

[PCR Mixture 2] (with 1.5mM MgCl₂)

	each (μ L)	最終濃度
10X PCR Buffer	3	1X
2.5mM dNTP	2.4	0.2mM
10 μ M Forward primer	1	0.3 μ M
10 μ M Reverse primer	1	0.3 μ M
DreamTaq DNA Polymerase	0.15	0.75U
ddH ₂ O	22.45	

3. 聚合酶連鎖反應所使用條件溫度設定

Program No.	Hot Start (°C/sec)	Denature (°C/sec)	Annealing (°C/sec)	Extension (°C/sec)	Cycle
1	95/90	95/30	55/30	72/30	35
2	95/90	95/30	60/30	72/30	40
3	95/90	95/30	60/30	72/60	40
4	95/120	95/15	55/30	72/60	40
5	95/90	95/30	63/30	72/60	40
6	95/90	95/30	63/30	72/30	40



4. 本研究中每對引子之聚合酶連鎖反應條件

(a) *ALK* 基因

Genomic DNA

PCR Primer Pair	PCR Mixture	PCR Program
<i>ALK</i> I19.1/I20.2	2	2,3
<i>ALK</i> I20.1/I22.2	2	2,3
<i>ALK</i> I22.1/I23.2	1	2,3
<i>ALK</i> I23.1/I24.2	2	2,3
<i>ALK</i> I24.1/I25.2	2	2,3

cDNA

PCR Primer Pair	PCR Mixture	PCR Program
<i>ALK</i> E19.1/E29.2	2	5
<i>ALK</i> E22.1/E26.2	2	5,6
<i>ALK</i> E22.1/E27.2	2	5,6

(b) 參考基因

Genomic DNA

PCR Primer Pair	PCR Mixture	PCR Program
β -2M	1	1

cDNA

PCR Primer Pair	PCR Mixture	PCR Program
β -2M	1	1
β -actin	1	4
<i>GAPDH</i>	1	1

5. 取 5 μ L PCR 產物於 1.5~2% 洋菜膠片電泳分離, EtBr 染色後於 UV 光下確認。



【實驗步驟 6】聚合酶連鎖反應產物純化與定序

以 Favorgen FavorPrep™ GEL/PCR Purification Mini Kit 進行純化

1. 將 PCR 產物移到一個新的 1.5mL 微量離心管，並加入 5 倍體積的 FADF buffer，均勻混合。
2. 取一個 FADF column 放進 Collection Tube 中。
3. 將 PCR 產物/FADF buffer 混合液移至 FADF column，離心 15,000rpm, 1min, 4°C，倒掉 Collection Tube 中的廢液。
4. 加入 750μL Wash Buffer 至 FADF Column，離心 15,000rpm, 1min, 4°C，倒掉廢液。
5. 將 FADF Column 再次離心 15,000rpm, 3min, 4°C，乾燥 column。
6. 將 FADF Column 放置於一個新的去蓋 1.5mL 微量離心管。
7. 加入 40μL Elution buffer 至 FADF Column 的 membrane 中央，並靜置 2min。
8. 離心 15,000rpm, 2min, 4°C，使 DNA elute 出來。
9. 所收集到的產物以 1.5~2% 洋菜膠片電泳分離，EtBr 染色後於 UV 光下確認純度，並對照色帶亮度推估產物 DNA 濃度。

依照台大醫學院第二共同研究中心之建議準備樣品並委託其定序。(機台為 ABI 3730；套組為 BigDye v3.1)

	each (μL)
DNA template (1~2ng/100bp)	n
2.5μM primer	1
ddH ₂ O	5-n

10. 剩餘純化後的 PCR 產物儲存於-20°C。



【實驗步驟 7】即時定量聚合酶連鎖反應

(a) 標準曲線

- 將 8 連排按照順序置於 PCR 96 well plate，處理檢體前，先將 1 μ L 滅菌水加入 NTC well 中。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC	NTC	NTC									
1:4096	B											
1:1024	C											
1:256	D											
1:64	E											
1:16	F											
1:4	G											
1:1	H											

- 將檢體進行序列稀釋。

		1	1/4	1/16	1/64	1/256	1/1024	1/4096
ddH ₂ O	共 52.5 μ L	0 μ L	7.5 μ L	9 μ L	9 μ L	9 μ L	9 μ L	9 μ L
sample	共 9.5 μ L	7 μ L	2.5 μ L					
			10 μ L					
				3 μ L	3 μ L	3 μ L	3 μ L	3 μ L
								3 μ L(丟棄)
			7 μ L	9 μ L				

- 取 1 μ L cDNA 至對應濃度之 well 中。
- 於抽氣櫃中配製即時定量聚合酶連鎖反應混合液。

	each
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	10
Forward primer	0.7
Reverse primer	0.7
Water, nuclease-free	7.6
Total volume (μ L)	19

- 將 19 μ L 反應混合液加至 8 連排每個 well 中，總體積 20 μ L，快速離心後上機。
- PCR program : 50 $^{\circ}$ C, 2 min \rightarrow 95 $^{\circ}$ C, 10 min \rightarrow (95 $^{\circ}$ C, 15 sec ; 60 $^{\circ}$ C, 30 sec ; 72 $^{\circ}$ C, 30 sec)₄₀。



(b) 基因相對表現量

1. 將 8 連排按照順序置於 PCR 96 well plate，處理檢體前，先將 1 μ L water 加入 NTC well 中。
2. 將 cDNA 做 10 倍稀釋，取 1 μ L 至對應濃度之 well 中。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC	NTC	NTC									
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

3. 於抽氣櫃中配製即時定量聚合酶連鎖反應混合液。

	each
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	10
Forward primer	0.7
Reverse primer	0.7
Water, nuclease-free	7.6
Total volume (μ L)	19

4. 將 19 μ L 反應混合液加至 8 連排每個 well 中，總體積 20 μ L，快速離心後上機。
5. PCR program : 50 $^{\circ}$ C, 2 min \rightarrow 95 $^{\circ}$ C, 10 min \rightarrow (95 $^{\circ}$ C, 15 sec ; 60 $^{\circ}$ C, 30 sec ; 72 $^{\circ}$ C, 30 sec) $_{40}$ 。