

复发和未复发的低级别低分期子宫内膜癌的分子评估

Cathleen E. Matrai, M.D., Kentaro Ohara, M.D., Ph.D., Kenneth Wha Eng, M.S., Shannon M. Glynn, M.D., Pooja Chandra, M.D., Sudeshna Chatterjee-Paer, M.D., Samaneh Motanagh, M.D., Susanna Mirabelli, B.S., Boaz Kurtis, M.D., Bing He, B.S., Alexandros Sigaras, M.D., Divya Gupta, M.D., Eloise Chapman-Davis, M.D., Kevin Holcomb, M.D., Andrea Sboner, Ph.D., Olivier Elemento, Ph.D., Lora Hedrick Ellenson, M.D., and Juan Miguel Mosquera, M.D., M.Sc.

摘要: 低级别低分期子宫内膜样癌 (LGLS EC) 5 年生存率高达 95%。然而, 这些肿瘤中有少部分会复发, 对此复发肿瘤的相关预后标志物或突变谱知之甚少。本研究的目的是确定原发肿瘤

外显子测序对 4 例复发和 8 例未复发的 LGLS EC 进行评估。4 例复发肿瘤中有 3 例是通过 Oncomine 数据库综合分析。由此来比较原发肿瘤和复发肿瘤

的分子图谱。3 例复发中有 2 例呈现附加突变。其中 1 例复发肿瘤附加 *TP53* 基因突变, 另一例呈现 *POLE* 和 *DDR2* 激酶基因突变。*POLE* 突变发生在核酸外切酶结构域之外。4 例复发的原发 LGLS EC 中全部检测到 *PIK3CA* 突变, 在 8 例未复发的 LGLS EC 中有 3 例检测到 *PIK3CA* 突变。与未复发的 LGLS EC 相比, 复发者呈现出更高的 MSI 评分。复发 LGLS EC 的拷贝数增加水平大于未复发的。这项研究初步显示, 3 例复发病例中有一例发生了与基因不稳定性 (*TP53*) 相关的突变, 其中 1 例也获得了 *DDR2* 激酶的突变, 这是一个潜在的治疗靶点。在后续复发的原发肿瘤中, 我们还注意到拷贝数增加、MSI 评分和 *PIK3CA* 突变水平较高。

关键词: 低级别低分期子宫内膜样癌; 复发; 全外显子测序; 微卫星不稳定性评分; 拷贝数分析

(*IJGP.2022 May.;41(3):207-219*)

From the Department of Pathology and Laboratory Medicine (C.E.M., K.O., S.Motanagh, S.Mirabelli, B.H., L.H.E., J.M.M.); Institute for Computational Biomedicine (K.W.E., P.C., A.S., O.E.); Departments of Obstetrics and Gynecology (S.C.P., D.G., E.C.D., K.H., A.S.); Physiology and Biophysics (A.S.), Weill Cornell Medicine; Caryl and Israel Englander Institute for Precision Medicine, Weill Cornell Medicine and New York Presbyterian (K.O., K.W.E., P.C., S.M., A.Sigaras, A.Sboner, O.E., L.H.E., J.M.M.); Weill Cornell Medicine (S.M.G.), New York, New York; and Cancer Genetics Incorporated, Rutherford, New Jersey (B.K.).

Present address: Lora H. Ellenson, Department of Pathology and Laboratory Medicine, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY.

C.E.M. and K.O. are co-first authors.

L.H.E. and J.M.M. share senior authorship.

This work was presented in part at the 107th Annual Meeting of the United States and Canadian Academy of Pathology in March 2018, Vancouver, BC.

The authors declare no conflict of interest.

Address correspondence to Juan Miguel Mosquera, MD, MSc, Department of Pathology and Laboratory Medicine, Weill Cornell Medicine, New York, NY 10065. E-mail: jmm9018@med.cornell.edu.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial-No Derivatives License 4.0 (CCBY-NC-ND), where it is permissible to download and share the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially without permission from the journal.

子 宫癌症是发达国家最常见的妇科癌症, 2019 年美国新增病例超过 60000 例, 为女性第二大流行性癌症^[1, 2]。据估计, 到 2030 年, 子宫癌症将成为女性第三大常见癌症, 发病率每年平均增长 2.9%^[3]。此外, 自 2000 年以来, 死亡率一直在上升^[4]。子宫内膜癌 (EC) 是最常见的子宫癌症类型, 占 90% 以上^[1]。

尽管这些数据令人震惊, 但是 EC 的临床诊断方法基本上停滞不前, 仍然依赖于 30 多年前提出的二元模型^[5]。在该模型中, EC 分为两种亚型: I 型, 低级别, 具有子宫内膜样组织学,

激素受体阳性, 预后好; II 型, 高级别, 具有非子宫内膜样组织学, 通常激素受体阴性, 预后差^[6]。大多数 EC 为 I 型, 常为低级别、低分期子宫内膜样癌 (LGLS EC)。这些患者以手术治疗为主, 5 年生存率为 95%^[2]。目前的风险分层系统利用年龄、肌层浸润深度、组织学分级和淋巴管血管间隙侵犯等临床病理信息来确定复发风险高的亚组^[7-10]。然而, 尽管有多种不同的分层方法, 对于 LGLS EC 患者最终是否会进展的预测仍然不准确和难以捉摸^[11, 12]。因此, 迫切需要明确能够从 LGLS EC 中筛选出生物学行为更具有侵袭性亚群的参数, 这将指导辅助治疗或更广泛的早期干预。

在肿瘤的分子和遗传学特征不断进展的时代, 有希望更准确地判断 EC 的预后亚型。从癌症基因组图谱 (TCGA) 分析的数据显示, EC 具有 4 种不同预后的分子亚型, 既微卫星不稳定性、POLE 超突变、低拷贝数和高拷贝数^[13]。这些发现已被证实临床风险分层中使用分子数据的巨大潜力。最近的研究表明, 运用分子和临床病理因素可以改善风险评估和预测效果^[14-18]。

分子分析揭示了许多可能的预后标志物, 这有助于识别出 LGLS 亚型中复发风险高的患者。在 LGLS EC 患者中, 已经发现 *CTNNB1* 突变与较差的无复发生存率和总生存率相关^[19-22]。然而, 伴 *CTNNB1* 突变的肿瘤患者往往具有其他良好临床病理特征, 如年轻, 肿瘤低级别, 没有肌层浸润, 很少发生血管淋巴管浸润^[21]。此外, 在 LGLS EC 中 *NF-YA* (一种参与促生长相关基因激活的转录因子) 高表达和 *lamin-a* (一种与细胞分化相关的蛋白质) 低表达的组合已被认为是肿瘤侵袭性的潜在标志物^[23]。ASRGL1 蛋白的低表达也被发现对 EC 的生存率有预后影响^[24]。最后, 虽然只有很少一部分 LGLS EC 发生突变, 但 *p53* 的突变与较差的无复发生存率相关^[21], 尽管这是一个更复杂的问题。在具有低级别和高级别肿瘤的 EC 的异质群体中, 已经注意到 *TP53* 伴随 *PIK3CA*、*PTEN* 和 *PPP2R1A* 突变是原发肿瘤发生的驱动因素。然而, 在 LGLS EC 中, 目前尚不清楚 *TP53* 的突变是否是复发和转移事件的驱动因素, 或者只是在此过程中的其他分子事件的协同因素^[25]。因此, 在 LGLS EC 中, 涉及肿瘤进展和复发过程的途径仍不完全清楚。

在这项研究中, 我们分析了 LGLS EC 患者原发和复发肿瘤分子及基因组, 以便更好地阐明肿瘤复发及进展过程潜在的基因层面危险因素。

材料与方法

病例选择和病理检查

本研究是根据机构审查委员会批准的方案 (WCM IRB# 1007011157) 进行的。在我们的外科病理档案中确定了 12 例 LGLS EC, 包括 4 例复发病例和 8 例年龄、组织学和体重指数都互相匹配的未复发病例。肿瘤形态由两位擅长妇科病理学的专家 (L.H.E. 和 C.E.M.) 核查诊断。在本研究中, 低级别定义为 I 级, 低分期定义为确诊时综合分期为 FIGO 1A 期。临床病理数据见表 1。

全外显子测序 (WES)

通过使用 Illumina HiSeq 2500 测序系统 (2×101 bp; Illumina, San Diego, CA) 对患者肿瘤与匹配的胚系 DNA 进行全外显子测序, 如前描述的方法^[26]。我们临床分级的 WES 测试版本 1 (EXaCT-1) 已获得纽约州卫生部 (ID#43032) 的批准, Rennert 等^[27]对此进行了详细描述。通过开发和实施新的计算方法来同步检测体细胞点突变、插入突变、拷贝数变异、肿瘤突变负荷和微卫星不稳定性 (MSI) 状态, 该方法可评估大于 21000 个的基因。根据临床或生物学相关性及可行性对 WES 结果进行分类。49 个可行或具有临床意义的基因的改变归入“1 类”, 508 个已知癌症相关基因的改变归入“2 类”, 未知意义的体细胞改变归入“3 类”。每个样本的肿瘤突变负荷 (TMB) 的计算为每百万覆盖区域碱基数中的突变数^[26, 28]。

MSIsensor 计算 MSI

用 MSIsensor 软件来计算 MSI, 可量化配对肿瘤与正常基因组测序数据中的 MSI, 并报告人类基因组中相应微卫星位点的体细胞状态^[29]。MSIsensor 得分的计算是检测到的微卫星稳定位点总数中不稳定的微卫星数量。

OncoPrint 综合分析

根据以往的肿瘤 DNA 和 RNA 提取方法和定量分析^[30], 按照厂家说明, 在 IonTorrent_S5 XL 平台上应用 OncoPrint 综合分析版本 3 (OCAv3) (Thermo Fisher Scientific)。每次试验均设置平行阳性对照。OCAv3 是一种基于扩增子的靶向检测方法, 能够检测 161 个独特基因的相关 SNV、扩增、基因融合和插入或缺失 (表 2)。

体细胞拷贝数改变的检测 (SCNA)

表1. 临床病理与分子特征

病例	年龄 (yr)	诊断	FIGO 分期	临床特征	治疗	随访	复发部位	复发时间	分子
1	56	G1 EC	1A	BMI:27.8 无HRT 有卵巢癌家族史	原发: 机器人全子宫切除术/BSO/LND 复发: 外科切除, 放化疗, 后续另外腹膜原发性癌的辅助化疗	复发和另外原发癌后处于无疾病状态	骨盆中线肿块	1年 (12个月)	PTEN、PIK3CA 突变, MYC 突变*, 1q获得
2	69	G1 EC 30%浸润	1A	BMI:38.5 无HRT	原发: 经腹全子宫切除术/BSO/LND, 经阴道放射治疗 第一次复发: 手术切除, 然后进行放射和抗激素治疗 第二次复发: 手术切除	第二次复发后于2015年随访丢失	(1) 锁骨上淋巴结 (2) 颈后肿块	3年 (37个月) 7.5年 (距离第一次复发4.5年)	PTEN、PIK3CA、ARID1A突变 ATM突变, TP53突变 + 8p缺失, 8q获得, 18p获得, 18q获得
3	54	G1 EC 12%浸润	1A	BMI:21.5 有HRT	原发: 机器人全子宫切除术/BSO/LND, 阴道近距离放疗 复发: 选择无进一步治疗, 住院临终关怀	2013年5月死于疾病	骨盆肿块	5年 (58个月)	PTEN、PIK3CA、ARID1A、EGFR突变
4	80	G1 EC 15%浸润	1A	肥胖 (BMI未知) 无HRT	原发: 经腹全子宫切除术/BSO/LND/阑尾切除术 复发性盆腔放疗和阴道近距离放疗	复发后处于NED于2019年死于医疗原因	骨盆/阴道	5.5年 (67个月)	PTEN、PIK3CA、DDR2突变, 1q获得
5	59	G1 EC 无浸润	1A	BMI:34.5 无HRT	机器人全子宫切除术/BSO/LND	术后9年处于NED	无	NA	KIT突变
6	59	G1 EC 6%浸润	1A	BMI:28.3 无HRT	机器人全子宫切除术/BSO/LND	22个月处于NED后失去随访	无	NA	PTEN、PIK3CA、ARID1A突变
7	63	G1 EC 无浸润	1A	BMI:25.8 无HRT	机器人全子宫切除术/BSO/LND	术后11年处于NED	无	NA	PIK3CA、ARID1A突变
8	67	G1 EC 33%浸润	1A	BMI:23 无HRT	机器人全子宫切除术/BSO/LND 阴道近距放射治疗	术后9年处于NED	无	NA	KIT突变
9	53	G1 EC 无浸润	1A	BMI:26.9 无HRT	机器人全子宫切除术/BSO/LND	术后10年处于NED	无	NA	PTEN突变, 19p获得, 21q获得
10	52	G1 EC 无浸润	1A	BMI:30.5 无HRT	腹腔镜全子宫切除术/BSO/LND	术后10年处于NED	无	NA	PIK3CA、ARID1A、POLE突变, TMB高
11	79	G1 EC 7%浸润	1A	BMI:35 无HRT	机器人全子宫切除术/BSO/LND	术后3年处于NED后失访	无	NA	PTEN、ARID1A突变
12	75	G1 EC 21%浸润	1A	BMI:20 无HRT	腹腔镜全子宫切除术/BSO/LND	术后11年处于NED	无	NA	PTEN、ARID1A突变

*表示仅在初始阶段确定的结果。

†表示仅在转移中确定的结果。

BMI 体重指数; BSO, 双侧输卵管卵巢切除术; EC, 子宫内膜样癌; G1, 1级; HRT, 激素替代疗法; LND, 淋巴结清扫; NA, 无法使用; NED, 无疾病状态; TMB, 肿瘤突变负荷。

表2. Oncomine综合分析 (OCAv3) 包含的基因列表

热点基因	全长基因					拷贝基因	基因融合 (基因内和之间)		
AKT1	FGFR1	KRAS	PIK3CA	ARID1A	NOTCH2	AKT1	FGFR3	AKT2	MYB
AKT2	FGFR2	MAGOH	PIK3CB	ATM	NOTCH3	AKT2	FGFR4	ALK	MYBL1
AKT3	FGFR3	MAP2K1	PPP2R1A	ATR	PALB2	AKT3	FLT3	AR	NF1
ALK	FGFR4	MAP2K2	PTPN11	ATR	PIK3R1	ALK	IGF1R	AXL	NOTCH1
ARAF	FLT3	MAP2K4	RAC1	BAP1	PMS2	AR	KIT	BRAF	NOTCH4
AXL	FOXL2	MAPK1	RAF1	BRCA1	POLE	AXL	KRAS	BRCA1	NRG
BRAF	GATA2	MAX RET	RET	BRCA2	PTCH1	BRAF	MDM2	BRCA2	NTRK1
BTK	GNA11	MDM4	RHEB	CDKN2A	PTEN	CCND1	MDM4	CDKN2A	NTRK2
CBL	GNAQ	MED12	RHOA	CDK12	RAD50	CCND2	MET	EGFR	NTRK3
CCND1	GNAS	MET	ROS1	CDKN1B	RAD51	CCND3	MYC	ERBB2	NUTM1
CDK4	HIST1h3B	MTOR	SF3B1	CDKN2B	RAD51B	CCNE1	MYCL	ERBB4	PDGFRA
CDK6	HNF1A	MYC	SMAD4	CHEK1	RAD51C	CDK2	MYCN	ERG	PDGFRB
CHEK2	HRAS	MYCN	SMO	CREBBP	RAD51D	CDK4	NTRK1	ESR1	PIK3CA
CSF1R	H3F3A	MYD88	SPOP	FANCA	RB1	CDK6	NTRK2	ETV1	PRKACB
CTNNB1	IDH1	NFE2L2	SRC	FANCD2	RNF43	CDKN2A	NTRK3	ETV4	PPARG
DDR2	IDH2	NRAS	STAT3	FBXW7	SETD2	CDKN2B	PDGFRA	ETV5	PTEN
EGFR	JAK1	NTRK1	TERT	MLH1	SLX4	EGFR	PDGFRB	FGFR1	RAD51B
ERBB2	JAK2	PDGFRFA	TOP1	MRE11A	SMARCA4	ERB2	PIK3CA	FGFR2	RAF1
ERBB3	JAK3	PDGFRB	U2AF1	MSH2	SMARCB1	ESR1	PIK3CB	FGFR3	RB1
ERBB4	KDR		XPO1	MSH6	STK11	FGF19	PPARG	FGFR	RELA
ERCC2	KIT			NBN	TP53	FGF3	RICTOR	FLT3	RET
ESR1	KNSTRN			NF1	TSC1	FGFR1	TERT	JAK2	ROS1
EZH2				NF2	TSC2	FGFR2	TSC1	KRAS	RSPO2
				NOTCH1			TSC2	MDM4	RSPO3
								MET	TERT

按 EXaCT1 V0.9 途径, 用 CNVseeqer^[31] 计算该队列中匹配的肿瘤与正常的拷贝数得分^[27]。将肿瘤样本和匹配对照样本中总覆盖率 <100 个 reads 的捕获区域滤掉。对于 SCNA, 分别通过在肿瘤样本和匹配对照样本中均衡的读取总数, 从而标化这些样本的总数据。然后计算肿瘤样本与对照样本标化计数的比率。根据肿瘤样本和对照样本的标化计数之比的 log₂ 值, 对这些捕获区域进行核型排序, 并按照基因组坐标进行排序。使用 R 软件包 DNACopy^[32] 中实现的循环二进制分割算法对这些工具箱的标化比值进行分割。该算法输出部分, 同样用 log₂ 值表示这些片段的捕获区域。该 log₂ 值表明片段是否有 DNA 拷贝数获得 (扩增) 或 DNA 拷贝数丢失 (缺失)。log₂ 为负值表示缺失了一段, 正值表示扩增了一段。log₂ 值大于 0.5 示扩增, 小于 -0.5 归类为缺失。然后, 我们采用惯用脚本将此算法提取的片段用 RefSeq 基因标注出来, 这些片段的转录起始和结束位点与分配给这些片段的基因组坐标重叠。根据之前报告的方法^[33], 拷贝数改变 (CNA) 负荷计算为癌症基因组拷贝数改变的百分比。

校正SCNA的肿瘤纯度

利用 CLONET 对拷贝数评分进行倍体和纯度校正^[34]。当 CLONET 无法估计肿瘤样本纯度时, 我们使用病理学估计肿瘤纯度。当 CLONET 无法调整拷贝数分数时, 通过以下公式调整。

用染色体臂计算SCNA

我们将 hg19/b37 基因组组合到染色体臂中。每个染色体的 p (短) 臂和 q (长) 臂的基因组坐标是使用 UCSC 细胞染色体文件 (<http://hgdownload.cse.ucsc.edu/golden-path/hg19/database/cytoband.txt.gz>)。用 CNVseeqer 先生成的片段, 每个相关的片段的 log₂ 分数使用上述方法校正。根据基因组坐标, 使用惯用脚本将校正的片段组合到染色体臂中。为了计算每个臂的 SCNA 负荷, 根据 log₂ 阈值计算碱基改变的分數 (>0.5 表示扩增和 <-0.5 表示缺失)。

Sanger测序

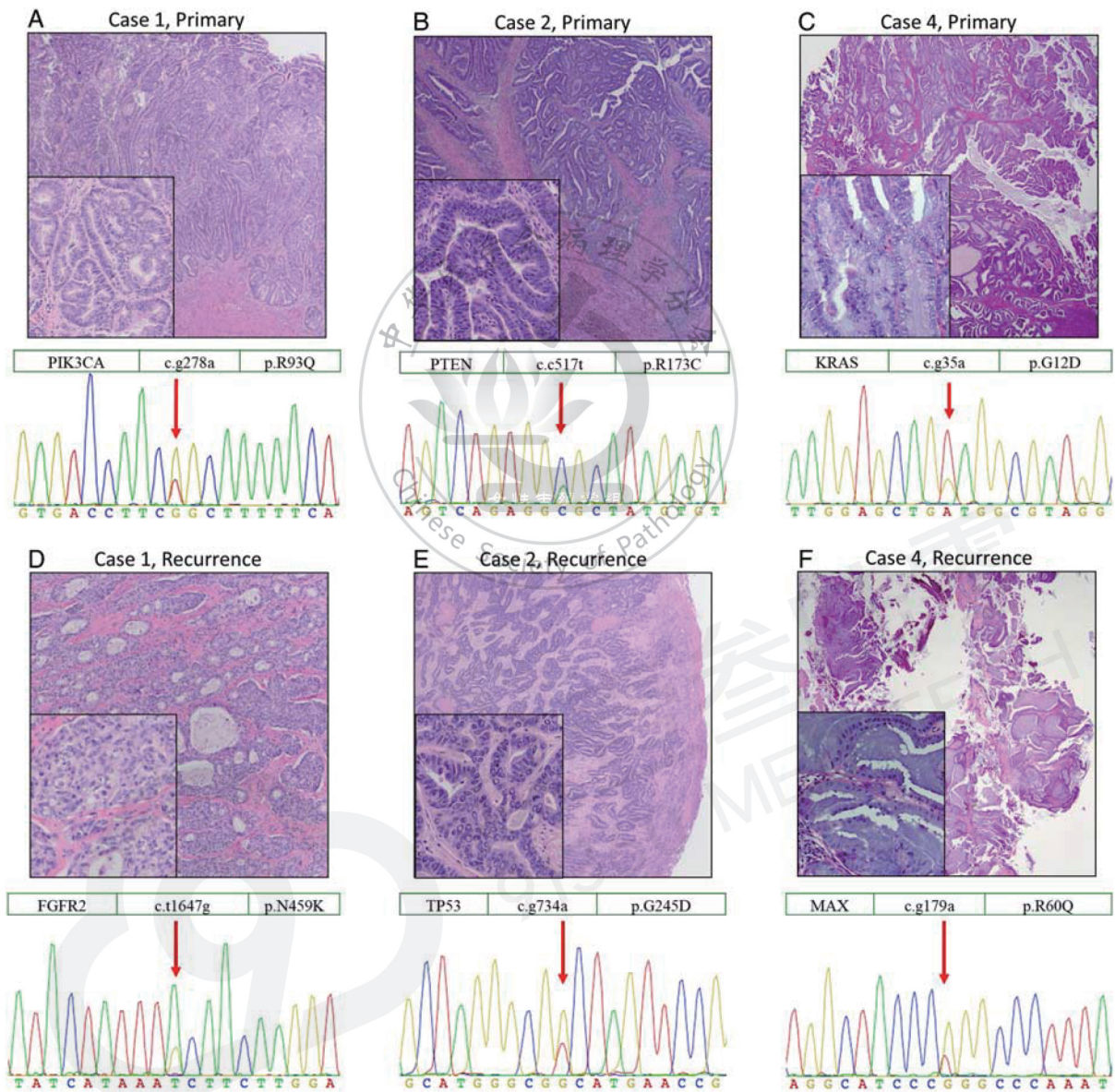


图1.低级别低分期子宫内膜样癌复发的组织病理学分析。上面一行对应原发肿瘤，下面一行对应复发肿瘤，用低和高放大倍率（插图）图像表示。(A) 非侵袭性高分化肿瘤（病例 1）和 (D) 2 年后骨盆复发。Sanger 测序证实 *PIK3CA* 和 *FGFR2* 突变。(B) 侵袭性（子宫肌层厚度的 30%）高分化肿瘤（病例 2）和 (E) 宫颈右后复发（冰冻标本），8 年后。Sanger 测序证实 *PTEN* 和 *TP53* 突变。(C) 侵袭性（肌层厚度的 15%）高分化肿瘤，具有黏液特征（病例 4）和 (F) 6 年后阴道复发。Sanger 测序证实 *KRAS* 和 *MAX* 突变。

如前所述^[30]，对于感兴趣的基因，用设制的 PCR 引物对合适的人类 gDNA 对照样品进行 PCR，该引物旨在扩增 FFPE 样品中的短片段（约 200–400bp）。使用 DNAS-TAR Lasergene12 软件进行数据分析，SNP 检测阈值设置为 10%。只要满足序列质量和覆盖范围，就会调用参考序列的突变。

结果

临床特征

表 1 总结了详细的临床病理特征。4 例复发的 LGLS EC（包括原发和复发）和 8 例未复发。病例被入选复发部位包括骨盆、阴道、淋巴结和颈部。一名患者（病例 2）在初次手术后接受了阴道辅助近距离放射治疗（在 2009 年更新 EC FIGO 分期

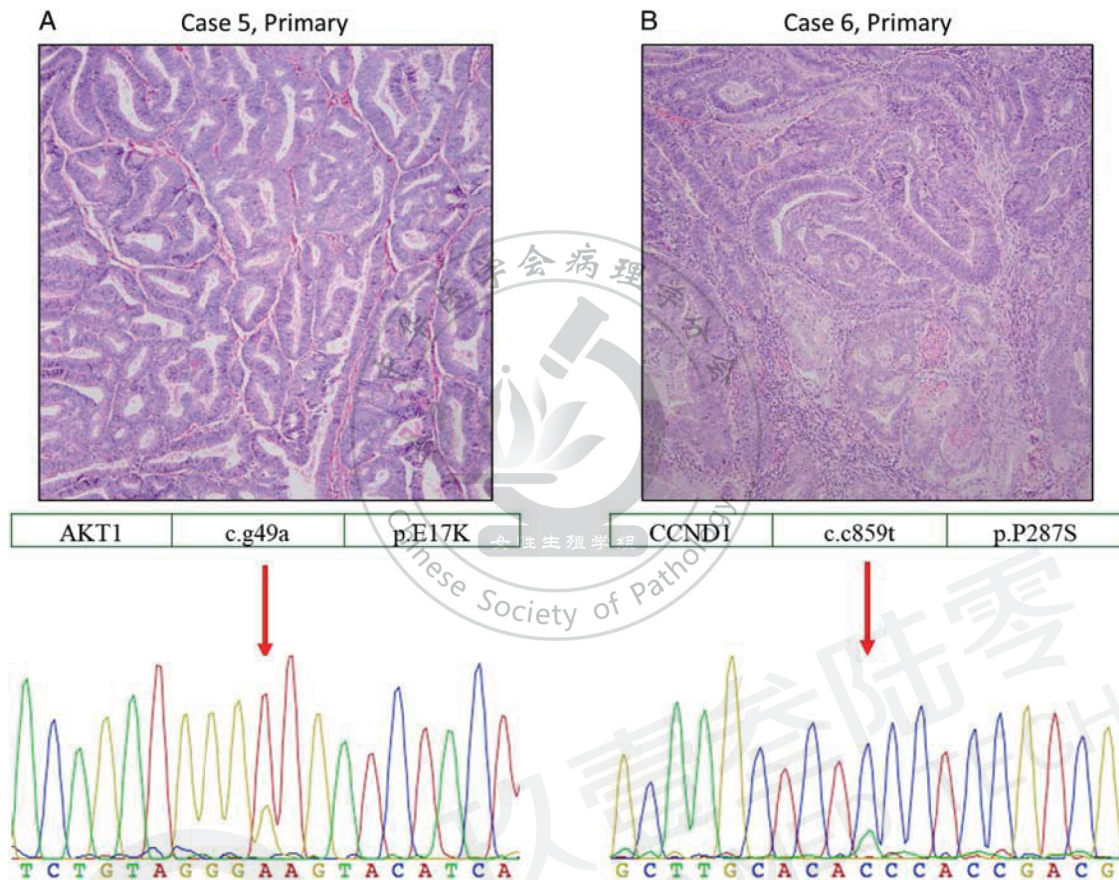


图2.低级别低分期子宫内膜样癌无复发的组织病理学分析。(A) 无浸润、高分化的肿瘤(病例5)。Sanger 测序证实 *AKT1* 突变。(B) 侵袭性(肌层的 33%) 高分化肿瘤(病例8)。Sanger 测序确认 *CCND1* 突变。

之前的治疗)。对所有患者进行随访, 平均 114 个月(范围 24-180 个月)。LGLS EC 无复发病例的平均观察期为 100 个月(范围 24-135 个月)。所有患者发生于绝经后, 平均年龄 67 岁。

组织病理学

所有病例的 HE 染色切片均由 2 名擅长妇科病理学的病理医生(L.H.E. 和 C.E.M.) 来评估。依据典型形态学对所有病例进行评估和确诊。所有病例均显示 1 级高分化子宫内膜样癌的特征, 包括腺体结构, 缺乏明显的实体生长, 管腔边界光滑, 栅栏状核以及轻度至中度核异型性。病例 4 表现为局灶性黏液分化。组织学特征见图 1 和图 2。虽然病例 2 复发肿瘤的细胞异型性较原发肿瘤稍大, 但所有复发性肿瘤也表现出低级别的结构和细胞学特征。

复发和未复发的 LGLS EC 的基因组图谱

12 例原发性 LGLS EC 做了 WES 测序和 OncoPrint 分析,

4 例复发肿瘤中有 3 例行 OncoPrint 分析(图 3), WES 检测肿瘤和胚系样本的中位覆盖度分别为 89.8x 和 91.2x, OCAv3 覆盖度为 1362x。第 4 例因样本不足而排除。3 例复发病例中有 2 例在复发中显示出附加的突变。最常见的基因突变是 *PTEN* (73.3%)、*PIK3CA* (66.7%) 和 *ARID1A* (53.3%), 这与 TCGA 先前报道的结果一致^[13]。我们发现 LGLS EC 复发和未复发的突变发生率没有显著差异。比较原发 LGLS EC 和匹配的复发肿瘤之间的突变, 我们在病例 2 中发现了一个额外的 *TP53* 突变(p.Gly245Asp); 在病例 4 中发现 *POLE* 无义突变(p.Glu1951Ter) 和受体酪氨酸激酶 *DDR2* 突变(p.Leu239Met)。检测到的 *POLE* 突变发生在校对域之外(残基 86-426)。据 PolyPhen-2 预测, *DDR2* 突变是有害的^[35]。病例 1 的复发肿瘤没有产生额外的突变。病例 3 没有足够的样本可进行测序。在 4 例复发的原发 LGLS EC 中和 8 例无病生存期病例中有 3 例检测到 *PIK3CA* 突变。

其次, 我们分析了原发肿瘤的 WES 数据, 以确定复发的

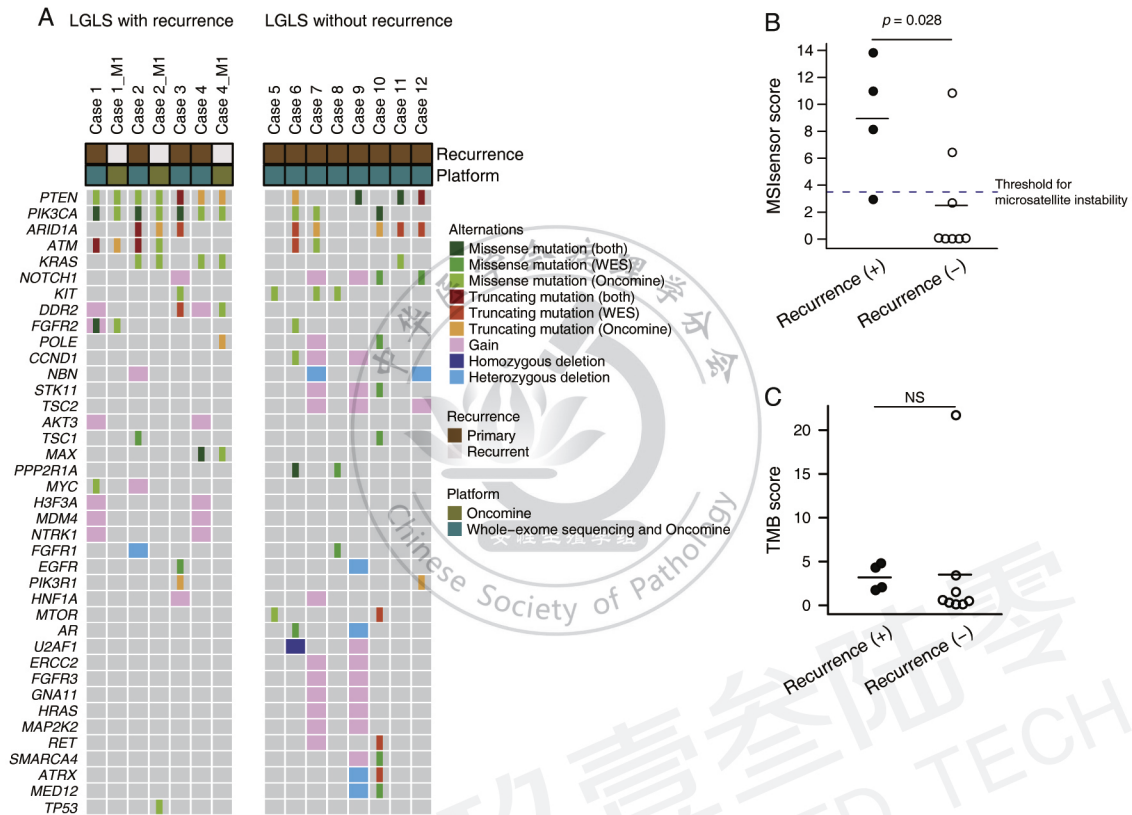


图3.有无复发的低级别、低分期子宫内膜样癌的基因组图谱。(A) 癌基因图显示,在至少2个肿瘤样本中,除 *TP53* 外,癌症基因突变和/或拷贝数改变。不包括意义未知的突变。每列对应1个肿瘤样本。(B和C) 有无复发 LGLS EC 的 MSI-sensor 和 TMB 评分。蓝色虚线表示微卫星不稳定的阈值。黑线代表每组得分的平均值。NS 表示不显著; TMB, 肿瘤突变负荷; WES, 全外显子测序。

LGLS EC 的 MSI 状态和 TMB 是否与未复发的不同。3 例复发和 2 例未复发的 LGLS EC 为 MSI-H (图 3b.)。复发的 LGLS EC 中的 MSI-sensor 评分显著高于未复发的患者。一例无复发 LGLS EC 中,具有 *POLE* 突变 (p.Ser1380Leu,第 10 例) 的 TMB 明显增高 (图.3C)。复发和未复发 LGLS EC 之间的 TMB 无统计学差异。

在复发的 LGLS EC 病例中,我们没有发现 MSI 相关或癌症相关基因的胚系突变,而在病例 5 中鉴定出 *AKT1* 变异 (p.Glu17Lys),在病例 10 中鉴定出 *APC* 无义突变 (p.Arg876*)。

复发和未复发 LGLS EC 的体细胞拷贝数改变

对所有原发 LGLS EC 应用 WES 数据评估 SCNA。在复发的 3 例 LGLS EC 中,SCNA 图谱显示出染色体臂广泛的拷贝数改变 (图. 4A)。在 2 例 LGLS EC 复发病例里观察到 1q 获得 (病例 1 和 4)。在 1 例 LGLS EC 复发病例 (病例 2) 中观察

到 8p 缺失, 8q 获得, 18p 和 18q 获得。染色体臂 CNA 分析证实了这些改变,另外在 1 例无复发的 LGLS EC 中还显示了 19p 和 21q 的染色体臂改变 (病例 9)。在复发和未复发 LGLS EC 之间, CNA 负荷 (反映整个基因组的拷贝数获得和缺失水平) 相似 (图 4B)。当 CNA 负荷仅限于获得区域时,复发的 LGLS EC 的 CNA 负荷明显高于未复发的 LGLS EC (图 4C)。

Sanger 测序

Sanger 法测序证实了代表性病例中的一系列突变: 例 1 原发为 *PIK3CA*, 例 1 复发为 *FGFR2*, 例 2 原发为 *PTEN*, 在例 2 复发为 *TP53*, 例 4 原发为 *KRAS*, 而例 4 复发为 *MAX*, 例 5 为 *AKT1*。

讨论

尽管 LGLS EC 有 95% 的 5 年生存率,但这些复发患者预后不良,治疗选择有限^[5, 19, 36, 37]。不仅缺乏预示侵袭性行为的

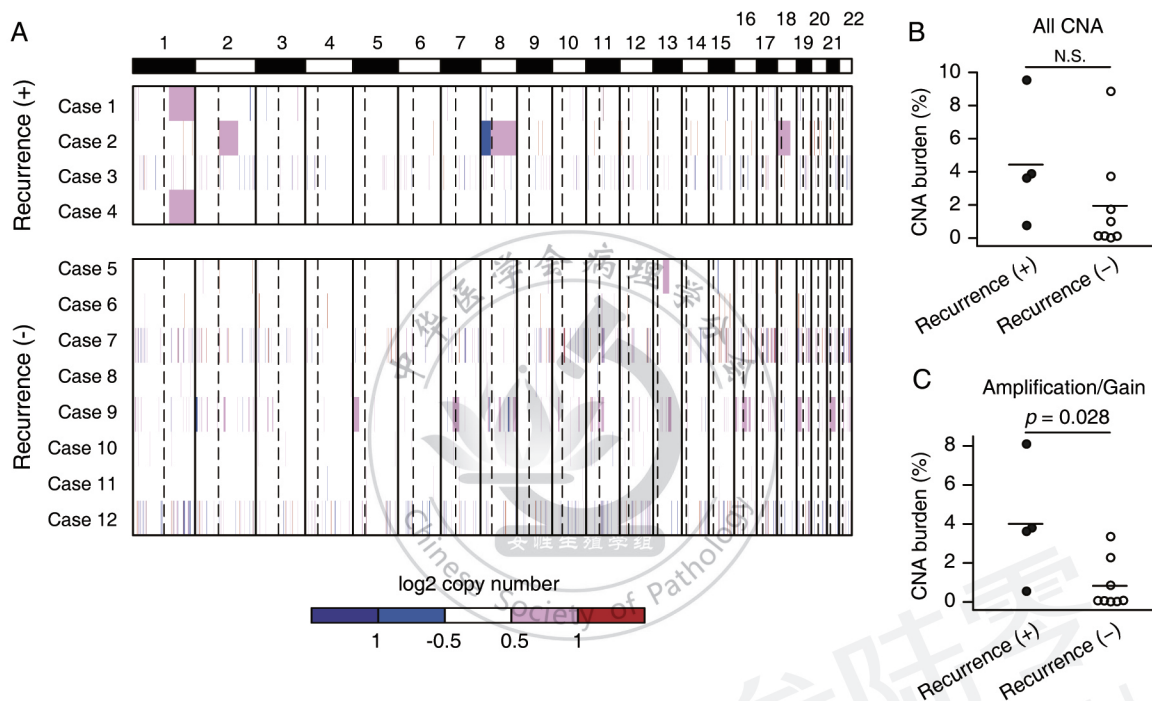


图4.有无复发肿瘤体细胞拷贝数改变 (SCNA) 的比较。(A) 基于全外显子组测序数据, 有无复发低级别低分期子宫内膜样癌 (LGLS EC) SCNA 的全貌; 深蓝色, 同源缺失; 浅蓝色, 异源缺失; 粉色, 获得; 红色, 扩增。每一行对应 1 个 LGLS EC。虚线表示每条染色体短臂和长臂之间的边界。(B) CNA 负荷比较。CNA 负荷表示拷贝数获得和缺失的水平。黑线代表每组得分的平均值。(C) CNA 负荷值的比较, 这仅限于拷贝数获得。黑线代表每组得分的平均值。CAN 表示拷贝数变化; NS, 无意义。

组织学或临床证据, 而且某些肿瘤复发的根本原因也尚未阐明。我们的数据表明, 从遗传学上 LGLS EC 的一个亚组可能易于复发。在这项初步研究中, 4 例复发病例中的 3 例显示拷贝数获得或扩增; 除了 1 例具有极高肿瘤突变率和 *POLE* 突变 (801 个非同义突变, 病例 10) 外, MSI sensor 评分显著高于非复发。同样除了病例 10, 复发比非复发也显示出更高的 TMB 负荷。所有复发也显示 *PIK3CA* 突变 (图 1), 而 8 例对照中只有 3 例存在此突变。此外, 3 例复发病例中的 2 例获得了与遗传不稳定性相关的突变 (*TP53* 和 *POLE*), 而 1 例发生了 *DDR2* 突变, 该基因编码的受体酪氨酸激酶是潜在的治疗靶点, 这些结果可能具有重要的临床意义。先前的体内研究表明, *DDR2* 突变是肺鳞癌的潜在治疗靶点^[33]。最近一项研究表明, 靶向 *DDR2* 激酶提高了抗 PD-L1 的疗效^[38]。

TCGA 显示 25% 的高级别子宫内膜样肿瘤和有限比例的低级别 (1 级和 2 级) 子宫内膜样肿瘤 (<5%) 具有广泛的拷贝数改变。通过 WES 分析, 我们研究的复发病例中, 其原发癌比对照组具有更高水平的拷贝数获得。这一发现具有临床意义, 因

为之前的一份报道表明, 高 SCNA 负荷是 TCGA 队列的一个预后因素, 包括 EC^[36]。这些发现的意义需要在更大的队列中进一步证实, 以筛选出具有更高复发风险和需要改变治疗策略的患者。

SCNA 分析也证明了在复发的 LGLS 中富含 1q 获得, 但其变化趋势没有达到统计学意义。在多发性骨髓瘤、尤文氏肉瘤、儿童肿瘤包括肾母细胞瘤和神经母细胞瘤, 多种脑肿瘤包括室管膜瘤和高级别胶质瘤中, 1q 获得与较差的预后相关^[39-43]。据我们所知, 在文献中关于子宫内膜癌中 1q 获得的报道少见。Depreeuw 等^[44]报道, 1q32.1 扩增与较差的无复发生存率显著相关, 而在 EC 的非特异性分子谱亚群中, *MDM4* 是一个潜在的致癌驱动因子。值得注意的是, 通过 WES 检测在 4 例复发 LGLS EC 中有 2 例 *MDM4* 获得 (图 3A)。Sever 等^[45]也报道了 1q 获得对 EC 患者的生存有负面影响。此外, 畸变的 1q 也见于中肾类型的苗勒氏肿瘤, 虽然我们的病例没有这种组织学类型, 但病例 4 也包含 *KRAS* 突变, 文献报道此突变在中肾癌中占有很高的比例^[46-48]。

复发肿瘤突变负荷较低 (图.3C; 非同义突变的平均总数=118vs.130), 但没有统计学意义。

TMB 密度也同样如此 (3.19vs.3.5mut/Mb)。当校正非复发病例 10 (TMB=118vs.33, $P=0.024$, 两两比较; TMB 密度=3.19 vs.0.9mut/Mb, $P=0.024$) 后, TMB 密度间的差异被逆转。与其余对照病例相比, 病例 10 的总突变数 (801) 和 TMB 密度 (21.7mut/Mb) 呈现明显增高。

重要的是, 该病例在 WES 上显示有 *POLE* 改变, 这解释了高 TMB 对预后没有相关影响。该患者在最后的随访中无复发, 这与 *POLE* 突变肿瘤的预后相一致^[49-52]。目前尚不清楚在病例 10 (p.Ser1380Leu) 中 *POLE* 突变是否具有致病性, 因为该突变不在外切酶结构域。然而, 在 TCGA 的 EC 队列中, 有 1 个超突变的肿瘤存在与病例 10^[13] 相同的 *POLE* 突变, 这表明 *POLE* 突变可能导致广泛的体细胞突变。

在我们的数据中一个明显的特点是缺乏 *CTNNB1* 突变, 该突变已被证明与子宫内膜样癌的侵袭性、高的复发率和低生存率相关^[19, 21, 22]。Kurnit 等发现 26% 的 LGLS 子宫内膜样癌患者存在 *CTNNB1* 突变, 尽管这些肿瘤被确定为 1-2 级和 1-2 期; 而 Moroney 等发现总共 60% 的 LGLS (1 级、1 期) 存在 *CTNNB1* 突变 (对照组为 28%)。在我们的研究中, 4 例复发中没有一例显示 *CTNNB1* 改变, 而 8 例非复发中有 2 例显示 *CTNNB1* 改变。本研究的样本量较少, 这可能是造成这种差异的原因。此外, 考虑到 LGLS 的肿瘤异质性^[53], 取样可能会引起一定影响, 尽管在所有 4 例中发生这种情况并不常见。

虽然有伴 *TP53* 突变的低、中级别子宫内膜样癌和相关生存期降低的报道^[21, 25], 但这些肿瘤似乎相当罕见, 尤其是对于 1 级肿瘤。有趣的是, 在复发病例 2 (图 1e) 中我们确定了一个 *TP53* 突变 (p.Gly245Asp)。Kurnit 等研究表明, 将肿瘤分为 1 级和 2 级时, *TP53* 突变的发生率为 8.8%, 而 TCGA 数据显示, 在 1 级和 2 级肿瘤中^[21, 49], *TP53* 突变的发生率分别为 0% 和 11.8%。当子宫内膜样癌出现 *TP53* 突变时, 毫无疑问与更高级别的形态学相关^[16]。此外, 发生 *TP53* 突变可能与其他遗传不稳定标记物 (*MMR/POLE*) 相关, 尽管准确分类仍然是一个挑战, 但这些“过客突变”对临床的影响可能不大。人们普遍认为, 在低级别肿瘤中 *TP53* 突变的发生率非常低, 这在本研究中也得到了证实, 包括复发的病例。

在非复发病例中, 8 例中有 3 例发生 *KIT* 突变, 4 例复发中有 1 例出现 (图 3A)。近年来, 在妇科恶性肿瘤中, *KIT* 突变主要聚焦在子宫肉瘤或 MMMT^[54-56]。虽然关于其他 EC 亚

型的数据有限, 但一些研究已经观察到子宫内膜样 EC 中 *KIT* 突变或表达的发生率, 从 0% (免疫组化和分子)^[57] 到 25% 至 60% (仅免疫组化)^[58, 59]。Slomovitz 等发现 8 例复发的子宫内膜样癌中有 2 例 c-kit 染色呈阳性, 而 33 例非复发病例无一例阳性。其他研究人员发现, 免疫组化 C-KIT 表达的 EC 病例易发生转移并且无病生存期较短^[59]。尽管如此, 这些研究大多关注免疫组化表达, 而不是测序数据。Kafshdooz 等提出^[60], 不同分期肿瘤之间的 *KIT* 突变的模式和频率不同, 但他们没有对具体发病率进行评论。因此, 关于子宫内膜癌中 *KIT* 突变的数据仍然有限。进行测序检测的 3 例复发肿瘤均显示与原有相同的突变。两个获得的与遗传不稳定性相关的突变 (分别是 *TP53* 和 *POLE*, 病例 2 和 4); 病例 4 也获得了 *DDR2* 激酶的突变, 这是一个潜在的治疗靶点。在病例 1 的中没有附加突变, 也缺乏在原发肿瘤中常见的 *MYC* 突变 (图 3A)。很少有研究 EC 从原发病变到转移性病变进展的相关突变谱。Gibson 等用 WES 分析子宫内膜复杂性非典型增生, 包括子宫内膜样和非子宫内膜样的 EC 原发性肿瘤及相对应的盆腹腔转灶, 发现所有分期之间存在异质性, 在转移性病变和原发肿瘤之间只有大约 50% 的突变共享。此外, 没有发现复发、转移的特异性突变。由于 LGLS EC 本身是一个异质性亚群, 因此需要单独研究这一群体, 以更好地描述与肿瘤进展相关的分子事件。

目前尚不清楚病例 4 复发肿瘤中, *POLE* 和 *DDR2* 突变是否促进肿瘤复发。*POLE* 超突变 ECs 的定义是在 *POLE* 基因的外切酶结构域存在体细胞突变^[62]。检测到的无义突变不会导致外切酶结构域的氨基酸变化, 这表明 *POLE* 的校正活性还存在。此外, 靶向测序在病例 4 (6 个非同义突变) 的复发肿瘤中并没有显示出非常高的突变频率。另一方面, 通过预测氨基酸变化可能产生效果的计算工具, 来预测 *DDR2* 突变具有功能受损。虽然使用肿瘤细胞系进行的体外研究已经证明, *DDR2* 蛋白通过促进细胞增殖、迁移和转移发挥致癌作用^[63], 但 *DDR2* 突变在 EC 中的致癌作用尚不清楚。为了阐明 *DDR2* 突变是否促进了 EC 的恶性进展, 还需要进一步的功能研究。

不但缺乏预示 LGLS ECs 侵袭性行为的组织学或临床证据, 而且对某些复发病例的根本原因也不清楚。在进一步探究这些肿瘤方面, 越来越多的分子研究取得了显著的进展。随着分子检测在实践中变得越来越普遍, 我们必须继续寻找有复发风险的分子标记, 因为尚不清楚如何预先识别有复发风险和通常无法治疗的患者。虽然这是一项基于 WES 的小规模靶向测序研究, 但其分子差异可能会确定复发和未复发的 LGLS EC。

参考文献

1. Miller KD, Nogueira L, Mariotto AB, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 2019;69: 363–85.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136:E359–86.
3. Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, et al. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the united states. *Cancer Res* 2014;74:2913–21.
4. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 2016;66:7–30.
5. McAlpine JN, Temkin SM, Mackay HJ. Endometrial cancer: not your grandmother's cancer. *Cancer* 2016;122:2787–98.
6. Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1983;15:10–7.
7. Creutzberg CL, Van Putten WLJ, Koper PCM, et al. Surgery and postoperative radiotherapy versus surgery alone for patients with stage-1 endometrial carcinoma: multicentre randomised trial. *Lancet* 2000;355:1404–11.
8. Keys HM, Roberts JA, Brunetto VL, et al. A phase III trial of surgery with or without adjunctive external pelvic radiation therapy in intermediate risk endometrial adenocarcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 2004;92: 744–51.
9. Colombo N, Creutzberg C, Amant F, et al. ESMOES-GO-ESTRO consensus conference on endometrial cancer: diagnosis, treatment and follow-up. *Radiother Oncol* 2015;117: 559–81.
10. Todo Y, Kato H, Kaneuchi M, et al. Survival effect of paraaortic lymphadenectomy in endometrial cancer (SEPAL study): a retrospective cohort analysis. *Lancet* 2010;375:1165–72.
11. Bendifallah S, Canlorbe G, Collinet P, et al. Just how accurate are the major risk stratification systems for early-stage endometrial cancer? *Br J Cancer* 2015;112:793–801.
12. Liu Y, Broaddus RR, Zhang W. Identifying aggressive forms of endometrioid-type endometrial cancer: new insights into molecular subtyping. *Expert Rev Anticancer Ther* 2014; 15:1–3.
13. Getz G, Gabriel SB, Cibulskis K, et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* 2013;497:67–73.
14. Talhouk A, McConchey MK, Leung S, et al. A clinically applicable molecular-based classification for endometrial cancers. *Br J Cancer* 2015;113:299–310.
15. Talhouk A, McAlpine JN. New classification of endometrial cancers: the development and potential applications of genomic-based classification in research and clinical care. *Gynecol Oncol Res Pract* 2016;3:14.
16. Talhouk A, McConchey MK, Leung S, et al. Confirmation of ProMise: a simple, genomics-based clinical classifier for endometrial cancer. *Cancer* 2017;123:802–13.
17. Stelloo E, Nout RA, Osse EM, et al. Biology of human tumors improved risk assessment by integrating molecular and clinicopathological factors in early-stage endometrial cancer—combined analysis of the PORTEC Cohorts. *Clin Cancer Res* 2016;22:4215–24.
18. Talhouk A, Derocher H, Schmidt P, et al. Molecular subtype not immune response drives outcomes in endometrial carcinoma. *Clin Cancer Res* 2019;25:2537–48.
19. Moroney MR, Davies KD, Wilberger AC, et al. Molecular markers in recurrent stage I, grade 1 endometrioid endometrial cancers. *Gynecol Oncol* 2019;153:517–20.
20. Myers A, Barry WT, Hirsch MS, et al. β -Catenin mutations in recurrent FIGO IA grade I endometrioid endometrial cancers. *Gynecol Oncol* 2014;134:426–7.
21. Kurnit KC, Kim GN, Fellman BM, et al. CTNNB1 (beta-catenin) mutation identifies low grade, early stage endometrial cancer patients at increased risk of recurrence. *Mod Pathol* 2017;30:1032–41.
22. Liu Y, Patel L, Mills GB, et al. Clinical significance of CTNNB1 mutation and Wnt pathway activation in endometrioid endometrial carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2014;106:dju245.
23. Cicchillitti L, Corrado G, Carosi M, et al. Prognostic role of NF-YA splicing isoforms and Lamin A status in low

- grade endometrial cancer. *Oncotarget* 2017;8:7935–45.
24. Fannes T, Berg HF, Bredholt T, et al. Asparaginase-like protein 1 is an independent prognostic marker in primary endometrial cancer, and is frequently lost in metastatic lesions. *Gynecol Oncol* 2018;148:197–203.
 25. Fadare O, Parkash V. p53 aberrations in low grade endometrioid carcinoma of the endometrium with nodal metastases: possible insights on pathogenesis discerned from immunohistochemistry. *Diagn Pathol* 2017;12:81.
 26. Beltran H, Eng K, Mosquera JM, et al. Whole-exome sequencing of metastatic cancer and biomarkers of treatment response. *JAMA Oncol* 2015;1:466–74.
 27. Rennert H, Eng K, Zhang T, et al. Development and validation of a whole-exome sequencing test for simultaneous detection of point mutations, indels and copy-number alterations for precision cancer care. *NPJ Genomic Med* 2016;1:16019.
 28. Sailer V, Eng KW, Zhang T, et al. Integrative molecular analysis of patients with advanced and metastatic cancer. *JCO Precis Oncol* 2019;3:PO.19.00047.
 29. Niu B, Ye K, Zhang Q, et al. MSIsensor: microsatellite instability detection using paired tumor-normal sequence data. *Bioinformatics* 2014;30:1015–6.
 30. Ginter PS, McIntire PJ, Kurtis B, et al. Adenomyoepithelial tumors of the breast: molecular underpinnings of a rare entity. *Mod Pathol* 2020;33:1764–72.
 31. Jiang Y, Redmond D, Nie K, et al. Deep sequencing reveals clonal evolution patterns and mutation events associated with relapse in B-cell lymphomas. *Genome Biol* 2014;15:432.
 32. Olshen AB, Venkatraman ES, Lucito R, et al. Circular binary segmentation for the analysis of array-based DNA copy number data. *Biostatistics* 2004;5:557–72.
 33. Hammerman PS, Sos ML, Ramos AH, et al. Mutations in the DDR2 kinase gene identify a novel therapeutic target in squamous cell lung cancer. *Cancer Discov* 2011;1: 78–89.
 34. Prandi D, Baca SC, Romanel A, et al. Unraveling the clonal hierarchy of somatic genomic aberrations. *Genome Biol* 2014; 15:439.
 35. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 2010;7:248–9.
 36. Hieronymus H, Schultz N, Gopalan A, et al. Copy number alteration burden predicts prostate cancer relapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:11139–44.
 37. Creasman WT, Odicino F, Maisonneuve P, et al. Carcinoma of the Corpus Uteri. *Int J Gynaecol Obstet* 2006;95(suppl 1): S105–S143.
 38. Tu MM, Lee FYF, Jones RT, et al. Targeting DDR2 enhances tumor response to anti-PD-1 immunotherapy. *Sci Adv* 2019;5: eaav2437.
 39. Rajeshwari M, Sharma MC, Kakkar A, et al. Evaluation of chromosome 1q gain in intracranial ependymomas. *J Neurooncol* 2016;127:271–8.
 40. Shah GL, Landau H, Londono D, et al. Gain of chromosome 1q portends worse prognosis in multiple myeloma despite novel agent-based induction regimens and autologous transplantation. *Leuk Lymphoma* 2017;58:1823–31.
 41. Schmidt TM, Barwick BG, Joseph N, et al. Gain of chromosome 1q is associated with early progression in multiple myeloma patients treated with lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone. *Blood Cancer J* 2019;9:1–13.
 42. Warwick AB, Dome JS. *Lanzkowsky's Manual of Pediatric Hematology and Oncology*, 6th Edition. London, UK: Academic press; 2016;25:491–504.
 43. Puri L, Saba J. Getting a clue from 1q: gain of chromosome 1q in cancer. *J Cancer Biol Res* 2014;2:1053.
 44. Depreeuw J, Stelloo E, Osse EM, et al. Amplification of 1q32.1 refines the molecular classification of endometrial carcinoma. *Clin Cancer Res* 2017;23:7232–41.
 45. Sever E, Doğer E, Çakıroğlu Y, et al. The effect of first chromosome long arm duplication on survival of endometrial carcinoma. *Turk J Obstet Gynecol* 2014;11:207–10.
 46. Montalvo N, Redrobán L, Galarza D. Mesonephric adenocarcinoma of the cervix: a case report with a

- three-year follow-up, lung metastases, and next-generation sequencing analysis. *Diagn Pathol* 2019;14:71.
47. Cavalcanti MS, Schultheis AM, Ho C, et al. Mixed mesonephric adenocarcinoma and high-grade neuroendocrine carcinoma of the uterine cervix: case description of a previously unreported entity with insights into its molecular pathogenesis. *Int J Gynecol Pathol* 2017;36:76–89.
 48. Mirkovic J, Sholl LM, Garcia E, et al. Targeted genomic profiling reveals recurrent KRAS mutations and gain of chromosome 1q in mesonephric carcinomas of the female genital tract. *Mod Pathol* 2015;28:1504–14.
 49. Levine D, The Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* 2013;497:67–73.
 50. Stelloo E, Bosse T, Nout RA, et al. Refining prognosis and identifying targetable pathways for high-risk endometrial cancer; a TransPORTEC initiative. *Mod Pathol* 2015;28: 836–44.
 51. Church DN, Stelloo E, Nout RA, et al. Prognostic significance of POLE proofreading mutations in endometrial cancer. *J Natl Cancer Inst* 2014;107:402. doi: 10.1093/jnci/dju402.
 52. van Gool IC, Eggink FA, Freeman-Mills L, et al. POLE proofreading mutations elicit an antitumor immune response in endometrial cancer. *Clin Cancer Res* 2015;21:3347–55.
 53. Lazo de la Vega L, Samaha MC, Hu K, et al. Multiclonality and marked branched evolution of low-grade endometrioid endometrial carcinoma. *Mol Cancer Res* 2019;17: 731–40.
 54. Rushing RS, Shajahan S, Chendil D, et al. Uterine sarcomas express KIT protein but lack mutation(s) in exon 11 or 17 of c-KIT. *Gynecol Oncol* 2003;91:9–14.
 55. Raspollini MR, Pinzani P, Simi L, et al. Uterine leiomyosarcomas express KIT protein but lack mutation(s) in exon 9 of c-KIT. *Gynecol Oncol* 2005;98:334–5.
 56. Lee CH, Hoang LN, Yip S, et al. Frequent expression of KIT in endometrial stromal sarcoma with YWHAE genetic rearrangement. *Mod Pathol* 2014;27:751–7.
 57. Vandenput I, Debiec-Rychter M, Capoen A, et al. Kit gene in endometrial carcinoma: an immunohistochemical and mutational analysis. *Int J Gynecol Cancer* 2011;21:203–5.
 58. Slomovitz BM, Broaddus RR, Schmandt R, et al. Expression of imatinib mesylate-targeted kinases in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004;95:32–6.
 59. Scobie JV, Acs G, Bandera CA, et al. C-kit immunoreactivity in endometrial adenocarcinomas and its clinicopathologic significance. *Int J Gynecol Pathol* 2003;22:149–55.
 60. Kafshdooz T, Ardabili SMM, Kafshdooz L, et al. C-kit mutations in endometrial cancer: Correlation with tumor histologic type. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2015;16:7449–52.
 61. Gibson WJ, Hoivik EA, Halle MK, et al. The genomic landscape and evolution of endometrial carcinoma progression and abdominopelvic metastasis. *Nat Genet* 2016;48:848–55.
 62. Rayner E, van Gool IC, Palles C, et al. A panoply of errors: polymerase proofreading domain mutations in cancer. *Nat Rev Cancer* 2016;16:71–81.
 63. Valiathan RR, Marco M, Leitinger B, et al. Discoidin domain receptor tyrosine kinases: new players in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 2012;31:295–321.

(郑洪 翻译 张廷国 审校)