

Zunehmende Herausforderungen in der Diagnostik des NSCLC

Histologische Subklassifikation und molekulare Charakterisierung

Neue Therapieoptionen der medizinischen Onkologie für das nichtkleinzellige Lungenkarzinom (NSCLC) haben die Aufgaben der diagnostischen Pathologie erheblich erweitert. Exakte histologische Subklassifikation und umfangreiche molekularpathologische Analysen bilden die Grundlage der Therapie und sind Standard geworden.

JOACHIM DIEBOLD



Prof. Dr. med.
Joachim Diebold,
Chefarzt Pathologie,
Luzern

Kaum ein anderer Bereich in der Onkopathologie macht derzeit eine derartig stürmische Phase der Weiterentwicklung durch wie die Diagnostik des Lungenkarzinoms. War es noch vor wenigen Jahren ausschliesslich notwendig, kleinzellige (SCLC) von nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC) zu unterscheiden, ist die detaillierte histologische Subklassifikation und die molekulare Charakterisierung dieser Tumoren heute zwingend erforderlich, damit den betroffenen Patienten alle Therapieoptionen geboten werden können.

Histologische Charakterisierung des Lungenkarzinoms

Die differenzialdiagnostische Abgrenzung der Karzinome mit neuroendokriner Differenzierung ist nach wie vor der erste Schritt in der histologischen Analyse von Lungenkarzinomen. Hierzu zählen die häufigen kleinzelligen Lungenkarzinome und die (selteneren) grosszelligen neuroendokrinen Karzinome der Lunge. Für die Unterscheidung stehen verlässliche immunhistologische Marker wie CD56, Synaptophysin und Chromogranin zur Verfügung. Nach den Daten des Zentralschweizer Krebsregisters machen

kleinzellige Karzinome zirka 15% der Lungenkarzinome aus.

Die grosse Mehrheit der übrigen Lungenkarzinome verteilt sich auf die drei histologischen Hauptentitäten der Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome und grosszelligen Karzinome. Bei dieser Einteilung der WHO ist zu berücksichtigen, dass die Kriterien, die bei der Klassifikation anzuwenden sind, an Operationspräparaten erarbeitet wurden. Aufgrund des meistens fortgeschrittenen Tumorstadiums wird heute nur eine Minderzahl von Patienten mit nichtkleinzelligem Lungenkarzinom chirurgisch therapiert, in der Zentralschweiz zum Beispiel sind dies nur zirka 15%. Dies bedeutet, dass bei 85% der Patienten ausschliesslich bioptisches oder zytologisches Material für die Diagnose und Klassifikation des Tumors zur Verfügung steht. Da die Diagnose eines grosszelligen Lungenkarzinoms nur nach sicherem Ausschluss einer anderen Form, vor allem nach Ausschluss eines Plattenepithel- oder Adenokarzinoms, gestellt werden darf und für diesen Ausschluss die sorgfältige Analyse des gesamten Tumors am Operationspräparat notwendig ist, ergibt sich von selbst, dass diese Diagnose anhand einer Bronchusbiopsie nicht gestellt werden kann und auch nicht gestellt werden darf.

ABSTRACT

The increasing complexity in the pathological assessment of non-small cell lung cancer

New therapeutic options in medical oncology have increased the tasks of diagnostic pathology in lung cancer. Accurate histological subtyping and extensive molecular testing have become standard. The article describes the recent developments focussing on NSCLC and provides a diagnostic algorithm for the work-up of lung tumor biopsies.

Keywords: NSCLC, histological subtyping, molecular testing

Hintergründe für Subklassifikationen

Die Subklassifikation der nichtkleinzelligen Lungenkarzinome hat erst in den letzten fünf Jahren klinische Relevanz gewonnen. Hintergrund ist zum einen die Tatsache, dass das Medikament Pemetrexed nur bei NSCLC, die keine plattenepitheliale Differenzierung erkennen lassen, wirksam ist (1), und zum anderen, dass die Diagnose eines Plattenepithelkarzinoms den Einsatz des Anti-VEGF-Medikaments Bevacizu-

maß aufgrund des erhöhten Risikos von Blutungskomplikationen aus praktischen Gründen verbietet. Zudem finden sich die molekularen Veränderungen, die Angriffspunkte für eine sogenannte «targeted therapy» darstellen, ebenfalls vor allem in Adenokarzinomen.

Eine sichere Bestimmung einer drüsigen oder plattenepithelialen Differenzierung in einem gering differenzierten Lungenkarzinom ist nicht immer anhand der konventionellen histologischen Färbungen allein möglich, da zum Beispiel eindeutige Charakteristika wie Verhornung oder Ausbildung von Interzellularbrücken, mit denen ein Plattenepithelkarzinom bewiesen werden kann, häufig nur fokal erkennbar sind. Immunhistologisch lassen sich mit einem Panel von vier Antikörpern, welche von der Schweizer Arbeitsgruppe für Lungenpathologie empfohlen werden, Zusatzargumente für die beiden Hauptdifferenzierungsrichtungen erheben. So sind eine Expression von Cytokeratin 5/6 und p63 ein Hinweis auf eine plattenepitheliale Differenzierung, wohingegen der Nachweis des Cytokeratins 7 und vor allem des Markers TTF1 (Thyroid Transkriptionsfaktor 1), der hoch charakteristisch für Karzinome der Lunge und der Schilddrüse ist, Argumente für ein Adenokarzinom der Lunge darstellen (Abbildung 1). Unter Berücksichtigung von konventioneller Morphologie und Immunhistologie lassen sich ungefähr die Hälfte der Lungenkarzinomfälle als Adenokarzinom oder «Karzinom, vereinbar mit Adenokarzinom» klassifizieren. 15 bis 20% der Karzinome sind weder in der Biopsie noch durch die Zytologie sicher einzuordnen, sodass die abschliessende Diagnose «nichtkleinzelliges Karzinom, nicht sicher subklassifizieren» lautet.

Das Bestreben, eine definitive Subklassifikation des Lungenkarzinoms zu erreichen, darf nicht dazu führen, dass das Biopsiematerial in dem Arbeitsprozess weitgehend oder vollkommen verbraucht wird. Ein solches Vorgehen ist zum Nachteil des Patienten, da das restliche Zell- und Gewebematerial die kostbare Grundlage für alle weiteren molekularen Analysen darstellt.

Molekulare Charakterisierung des NSCLC

Art und Umfang der molekularen Analysen in der Pathologie wurden in den letzten Jahren weitgehend von den Ergebnissen der jeweils neusten klinischen Studien bestimmt. Nach eigener Erfahrung muss das Testpanel in der Pathologie jeweils nach dem jährlichen ASCO-Kongress neu angepasst werden.

EGFR

Nach anfänglich breitem Einsatz hat sich in den letzten Jahren gezeigt, dass die Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) Erlotinib und Gefitinib ihre grösste Wirksamkeit bei Patienten mit Lungenkarzinomen entfal-

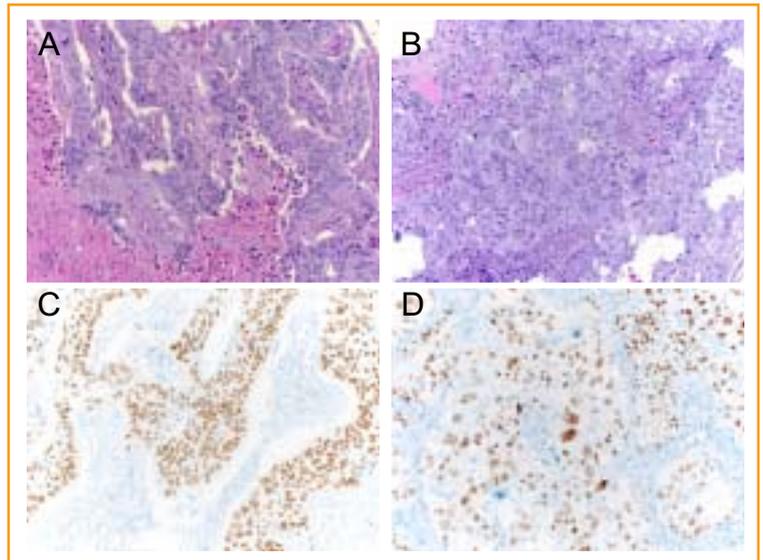


Abbildung 1: Histologische Subklassifikation von gering differenzierten nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen durch immunhistologische Zusatzuntersuchungen.

A, C: Gering differenziertes Lungenkarzinom mit immunhistologischem Nachweis einer p63-Expression, somit vereinbar mit einem gering differenzierten Plattenepithelkarzinom.

B, D: Gering differenziertes Lungenkarzinom mit immunhistologischem Nachweis einer TTF1-Expression, somit vereinbar mit einem gering differenzierten Adenokarzinom.

ten, welche eine Mutation im Gen für den Epidermal-Growth-Factor-Receptor (EGFR-Gen) aufweisen. In Adenokarzinomen von weiblichen Patienten und Nichtrauchern findet sich diese Veränderung am häufigsten; Geschlecht und Raucheranamnese erlauben jedoch keine sichere Vorhersage des Vorliegens einer Mutation. Daher sollte die EGFR-Analyse bei allen NSCLC durchgeführt werden. Lediglich Plattenepithelkarzinome werden derzeit ausgenommen.

Nach der Publikation der Biomarkeranalyse der kanadischen BR.21-Studie sah es im Jahr 2008 zunächst so aus, als ob der sicherste Weg zur Identifizierung dieser Patienten in einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung-(FISH-)Analyse besteht, mit der sich eine Vermehrung der Kopienzahl des EGFR-Gens im Zellkern darstellen lässt (2). Die Auswertung der FISH-Präparate folgte den von der University of Colorado erarbeiteten Kriterien. Die im darauffolgenden Jahr (2009) auf dem ASCO-Jahreskongress präsentierten Biomarkerdaten der SATURN-Studie (3) wie auch weitere Folgestudien wiesen jedoch nach, dass eine Mutationsanalyse vor allem von EGFR-Exon 19 und 21 der FISH-Analyse überlegen ist. Deletionen im Exon 19 und Punktmutationen im Exon 21 (Abbildung 2A) sind am eindeutigsten mit einem Ansprechen auf TKI assoziiert und machen zusammen etwa 85 bis 90% aller EGFR-Mutationen aus. Da auch in den Exonen 18 und 20 aktivierende Mutationen vorkommen und zudem Exon 20 der wichtigste Sitz von Resistenzmutationen darstellt, werden heute in allen grossen Pathologie-Instituten der Schweiz regelmäs-

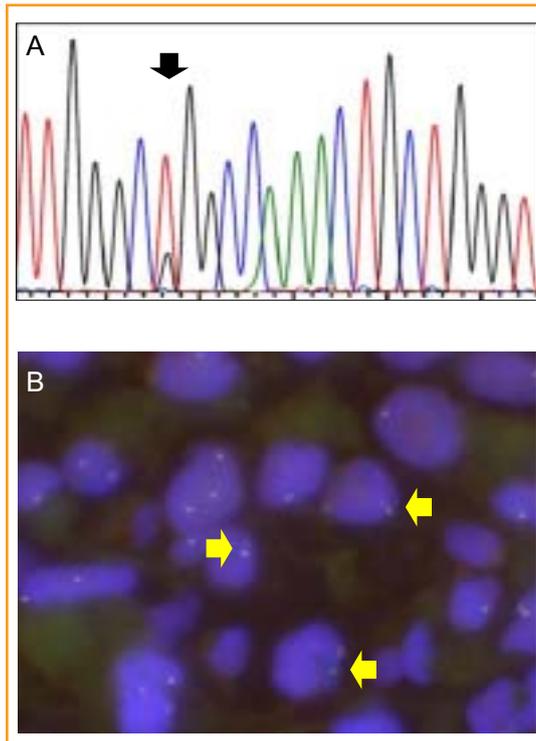


Abbildung 2: Molekularpathologische Analysen beim nichtkleinzelligen Lungenkarzinom – Beispiele: A: Nachweis der Punktmutation p.L858R im Exon 21 des EGFR-Gens durch direkte DNA-Sequenzierung. B: Nachweis eines ALK-Rearrangements durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (Zellkerne mit Trennung des rot-grünen Doppelsignals als Ausdruck eines Bruchs im ALK-Gen).

sie die Exone 18 bis 21 des EGFR-Gens auf Mutationen getestet.

Die exakte Bestimmung des Mutationsstatus ist keine triviale Angelegenheit (4). Die Interpretation von Deletionen kann eine Herausforderung darstellen, und es ist zwingend geboten, dass alle nachgewiesenen Mutationen in unabhängigen Zweitanalysen reproduziert werden, um Fehler der Taq-Polymerase bei der PCR als Ursache auszuschliessen. Pathologie-Institute, die diesen Qualitätsstandards folgen, sind daran zu erkennen, dass sie erfolgreich an externen Ringversuchen teilgenommen haben und/oder von der SAS (Schweizerische Akkreditierungsstelle, Bern) geprüft sind.

ALK

Im Jahr 2007 wurde erstmals in NSCLC ein Rearrangement des ALK-Gens beschrieben, das durch Inversion meistens mit dem EML4-Gen fusioniert, welches ebenfalls auf Chromosom 2 lokalisiert ist. Durch diese Umlagerung wird die ALK-Tyrosinkinase dauerhaft aktiviert. Nur zwei Jahre später (2009) lagen die Ergebnisse einer klinischen Studie vor, die ein bemerkenswertes Ansprechen dieser Tumoren auf den Inhibitor Crizotinib zeigten (5). Seit 2011 ist diese Substanz auch für Patienten in der Schweiz zugäng-

lich. Umgehend wurde daher in den letzten Monaten in allen grossen Pathologie-Instituten des Landes der notwendige diagnostische Test etabliert.

Ein ALK-Rearrangement liegt in 3 bis 5% der NSCLC vor. Betrachtet man nur die Adenokarzinome von Nichtrauchern, in denen zusätzlich auch keine EGFR- oder KRAS-Mutation nachweisbar ist, steigt der Anteil auf zirka 45%.

Als Nachweisverfahren wird die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung verwendet. Der Bruch des ALK-Gens im Rahmen des Rearrangements lässt sich bei Verwendung sogenannter «Break-apart-Sonden» als räumliche Trennung eines rot-grünen Doppelsignals erkennen (ca. 70% der Fälle, *Abbildung 2B*). Im Falle einer zusätzlichen Deletion von interstitieller DNA des Chromosoms 2 (in ca. 30%) kommt es zum Verlust eines grünen Hybridisierungssignals. Für einen positiven Befund wird gefordert, dass bei mindestens 15% der Tumorzellkerne diese Kriterien erfüllt sind (6). Für die Auswertung von ALK-FISH-Präparaten bedarf es technischer Erfahrung. Die Analyse ist anspruchsvoller als zum Beispiel die HER2-FISH-Analyse beim Mammakarzinom. Zudem ist es ausserordentlich hilfreich, wenn für die Auswertung ein Fluoreszenzmikroskop verwendet wird, das mit einer hochauflösenden Digitalkamera ausgerüstet ist und digitale Bilder aus Z-Stapeln erstellen kann.

Weitere molekularpathologische Analysen

25 bis 30% der Adenokarzinome der Lunge besitzen Punktmutationen im Exon 2 des KRAS-Gens. Obwohl derzeit keine Medikamente zur Verfügung stehen, die spezifisch gegen diese Veränderung gerichtet sind, ist eine KRAS-Analyse sinnvoll. KRAS-Mutationen, die häufiger bei Patienten mit Raucheranamnese gefunden werden, sind mit aggressiverem Verhalten des Lungenkarzinoms assoziiert worden. Zudem ist bekannt, dass die meisten onkogenen Mutationen im Lungenkarzinom sich weitgehend gegenseitig ausschliessen. Daher fungiert der Nachweis einer KRAS-Mutation zusätzlich als eine interne Qualitätskontrolle und belegt, dass die molekularpathologische Analyse valide ist.

Die Liste der Mutationen, die bisher in Adenokarzinomen und Plattenepithelkarzinomen der Lunge nachgewiesen wurden, ist lang. Neben denen von EGFR, ALK und KRAS sind bei den Adenokarzinomen unter anderem Mutationen von BRAF, HER2, TP53, AKT1, MEK, NRAS, PIK3CA, CTTNB1, MET zu erwähnen. Bei den Plattenepithelkarzinomen sind Mutationen von FGFR1 und DDR2 beschrieben (7). Potenziell relevant sind derzeit vor allem Mutationen von HER2 und BRAF, für die spezifische Medikamente (Trastuzumab und Vemurafenib) existieren. Diese sind zwar nicht offiziell für das Lungenkarzinom zugelassen, ihre Wirksamkeit wurde jedoch auch für diese Tumoren in Einzelfällen gezeigt.

Praktische Vorgehensweise

Am Beispiel der Vorgehensweise des Luzerner Kantonsspitals soll im Folgenden vorgestellt werden, wie die diagnostische Abklärung bei Patienten mit Lungenkarzinomen gegenwärtig ablaufen kann.

Jeder Patient wird obligat im Rahmen des wöchentlichen Tumorboards vorgestellt. Dieses findet unter Beteiligung der Pneumologie, Thoraxchirurgie, Radiologie, medizinischen Onkologie, Radioonkologie und Pathologie statt. Die Information, welches klinische Tumorstadium vorliegt und ob eine Therapie zum Beispiel mit Tyrosinkinase-Inhibitoren überhaupt in Betracht kommt, wird hier ebenso präsentiert wie die Einschätzung des Pathologen, ob das diagnostische Zell- und Gewebematerial der Biopsie oder Zytologie für molekulare Analysen ausreichend ist. Aufgrund der Tragweite der molekularen Ergebnisse wird – wenn notwendig – eine erneute Biopsie oder Punktion angeregt und durchgeführt. Dies kommt bei allen NSCLC infrage, die als Adenokarzinome der Lunge oder als «Karzinom, vereinbar mit Adenokarzinom» respektive «Karzinom, nicht weiter zu klassifizieren» eingeordnet werden. Da auch zytologische Präparate aufgrund des exzellenten Erhaltungszustandes der Tumor-DNA für die molekularen Tests gut geeignet sind und in Luzern in fast der Hälfte der Fälle verwendet werden, lassen sich die Analysen insgesamt bei mehr als 95% der Patienten erfolgreich durchführen.

Das Testpanel der Pathologie wird in Absprache mit den medizinischen Onkologen des Luzerner Kantonsspitals kontinuierlich weiterentwickelt und umfasst derzeit (Januar 2012) eine Mutationsanalyse von

- ▲ KRAS (Exon 2)
- ▲ EGFR (Exon 18, 19, 20 und 21)
- ▲ HER2 (Exon 19 und 20)
- ▲ BRAF (Exon 15)

mittels PCR und direkter Sequenzierung.

Ferner erfolgt eine FISH-Analyse zum Nachweis einer ALK-Translokation oder HER2-Amplifikation. Diese Analysen werden nicht sequenziell, sondern simultan durchgeführt, da am Luzerner Kantonsspital sowohl für EGFR als auch für ALK im Rahmen von Studien Medikamente in der ersten Therapielinie zur Verfügung stehen (SAKK19/09 und BELIEF respektive PROFILE1014). Was die PCR-Tests betrifft, spart die simultane Analyse zudem Personalkosten. Durch diese Vorgehensweise können den medizinischen Onkologen die Ergebnisse innerhalb von 5 bis 7 Arbeitstagen mitgeteilt werden.

Es ist zu erwarten, dass auch die NSCLC mit plattenepithelialer Differenzierung einer regelmässigen Testung unterzogen werden, sobald Medikamente dafür zur Verfügung stehen werden. Bei Patienten mit Adenokarzinomen, die sich primär durch Metastasen und ohne pulmonalen Tumor manifestieren, kann eine Testung ebenfalls sinnvoll sein. Am Luzerner

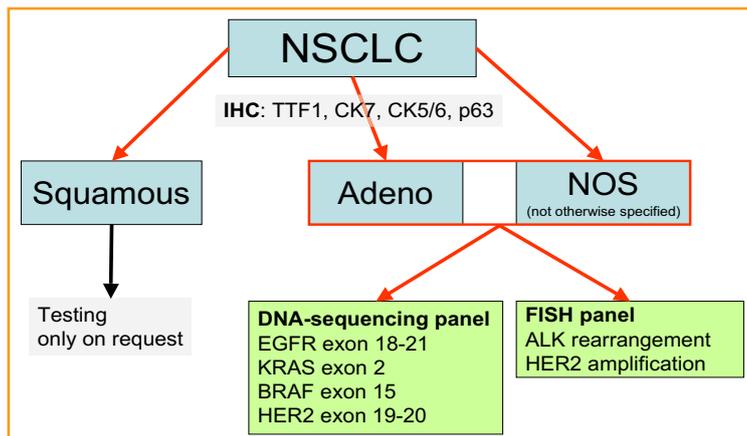


Abbildung 3: Diagnostischer Algorithmus der Luzerner Pathologie für nichtkleinzellige Lungenkarzinome in Absprache mit der medizinischen Onkologie des Luzerner Kantonsspitals (Stand: Januar 2012). NSCLC NOS = nichtkleinzelliges Lungenkarzinom, nicht sicher subzuklassifizieren.

Kantonsspital konnten wir bei zwei Patienten mit «CUP-Syndrom» eine EGFR- respektive ALK-Mutation darstellen, was nicht nur diagnostisch, sondern natürlich auch therapeutisch relevant war.

Der aktuelle diagnostische Algorithmus der Luzerner Pathologie beim NSCLC ist in *Abbildung 3* dargestellt.

Zusammenfassung und Ausblick

Die molekulare Diagnostik des NSCLC in der Pathologie ist ein Paradebeispiel für eine moderne Tumordiagnostik, die versucht, jedem Patienten die Möglichkeiten der zielgerichteten Therapie zugänglich zu machen. Nachdem dieser Ansatz seine Tauglichkeit zunächst beim Mammakarzinom (Analyse des HER2-Gens) und dem seltenen gastrointestinalen Stromatumor (GIST) (Mutationsanalyse von KIT und PDGFRA) unter Beweis gestellt hat, sind mit dem NSCLC, dem Dickdarmkarzinom (Test für KRAS-Mutationen) und neu auch dem malignen Melanom (BRAF-Mutation) inzwischen auch weitere häufige Malignome Gegenstand routinemässiger molekularpathologischer Analysen.

Paradigmenwechsel

In der Diagnostik des Lungenkarzinoms bahnt sich damit ein Paradigmenwechsel in der personalisierten Medizin an. Bei der Suche nach molekularen Veränderungen, die als Angriffspunkte für eine gezielte medikamentöse Therapie dienen können, werden nicht nur solche Gene analysiert, für die klinische Studien bereits die Relevanz beim Lungenkarzinom belegen konnten. Es wird auch nach Mutationen gesucht, für die bei anderen Tumoren gezeigt werden konnte, dass mit verfügbaren Medikamenten das Tumorstadium gehemmt werden kann. Zu erwarten ist, dass sich diese Vorgehensweise in Zukunft auch bei anderen soliden Tumoren etablieren wird.

Für die Onkopathologie bedeutet dies, dass Testplattformen aufgebaut werden müssen, die eine simultane Analyse einer Vielzahl von Genen ermöglichen, ohne dass die Kosten in astronomische Bereiche steigen. Derartige «Multiplex-Tests» sind bereits an US-amerikanischen Krebszentren im Einsatz und werden sich auch an grossen Pathologie-Instituten wie dem Luzerner Institut etablieren lassen (8). Wenn die methodischen Fortschritte des «whole genome sequencing» in die Routinopathologie Einzug halten, wird die Bestimmung des «molekularen Profils» zu einem Standardaspekt in der Charakterisierung eines Tumors werden – so wie heute die exakte histologische Klassifikation und die Bestimmung des Tumorstadiums. Zudem werden diese Techniken es erlauben, auch das Problem der Therapieresistenz, die sich praktisch unweigerlich unter den vorgestellten medikamentösen Ansätzen entwickelt, ganz neu zu verstehen und alternative Therapiewege zu finden. ▲

Prof. Dr. med. Joachim Diebold
Chefarzt Pathologie
Luzerner Kantonsspital (LUKS)
6000 Luzern 16
E-Mail: joachim.diebold@luks.ch

Interessenkonflikte: Teilnahme an Advisory Boards der Firmen Roche, AstraZeneca, Pfizer.

Quellen:

1. Scagliotti G, Brodowicz T et al.: Treatment-by-histology interaction analyses in three phase III trials show superiority of pemetrexed in nonsquamous non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2011; 6: 64–70.
2. Zhu CQ, da Cunha Santos G, Ding K, et al.: Role of KRAS and EGFR as biomarkers of response to erlotinib in National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.21. *J Clin Oncol.* 2008; 26: 4268–75.
3. Cappuzzo F, Ciuleanu T, Stelmakh L, et al. (SATURN investigators): Erlotinib as maintenance treatment in advanced non-small-cell lung cancer: a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2010; 11: 521–29.
4. Janku F, Stewart DJ, Kurzrock R.: Targeted therapy in non-small-cell lung cancer – is it becoming a reality? *Nat Rev Clin Oncol.* 2010; 7: 401–14.
5. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, et al.: Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2010; 363: 1693–703.
6. Camidge DR, Kono SA, Flacco A, et al.: Optimizing the detection of lung cancer patients harboring anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangements potentially suitable for ALK inhibitor treatment. *Clin Cancer Res.* 2010; 16: 5581–90.
7. Pao W, Girard N.: New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol.* 2011; 12: 175–80.
8. Sequist LV, Heist RS, et al.: Implementing multiplexed genotyping of non-small-cell lung cancers into routine clinical practice. *Ann Oncol.* 2011; 22: 2616–24.

Merkpunkte

- ▲ **Die Subklassifikation der NSCLC** (Plattenepithel- versus Adenokarzinome) ist von therapeutischer Relevanz und in den meisten Fällen unter Einsatz der Immunhistologie mit ausreichender Sicherheit möglich.
- ▲ **Alle molekularpathologischen Untersuchungen** können mit grosser Verlässlichkeit an Biopsien und Zytologien durchgeführt werden.
- ▲ **Tests für EGFR-Mutationen und ALK-Rearrangements** sind Standard für alle nicht plattenepithelial differenzierten, fortgeschrittenen NSCLC geworden.
- ▲ **Für die Zukunft** ist eine erhebliche Ausweitung der molekularpathologischen Tests beim Lungenkarzinom zu erwarten.