

# 肺癌的液態活檢

楊福雄 湯旭南

國軍高雄總醫院左營分院 內科部

## 摘要

肺癌 (lung cancer) 是全球相關癌症致死的主要原因之一，大約佔了癌症相關死亡人數的四分之一。推究主要原因是發現時大部分都是晚期，就算目前推行的低劑量胸部電腦斷層檢查能降低相關肺癌致死率 20%，但是高的偽陽性導致不必要的侵入性組織切片檢查。隨著分子醫學技術的發展，目前針對癌症的檢查已經從傳統的病理檢驗擴展到基因分子醫學的領域，了解到越來越多的疾病，包括癌症也是異質性的疾病 (tumor heterogeneity)，所以單一次的組織病理切片檢查不能表達整個腫瘤的樣貌；液態活檢 (liquid biopsy) 可以補充組織病理檢驗提供非侵入性、即時性、重複性的檢查，本文中將介紹相關的生物標記：循環腫瘤去氧核糖核酸 (circulating tumor DNA, ctDNA)、循環腫瘤細胞 (circulating tumor cell, CTC)、腫瘤化血小板 (tumor educated platelets, TEP) 及胞外泌體 (exosomes)，最後再探討液態活檢在肺癌的臨床相關運用。

關鍵詞：肺癌 (Lung cancer)

腫瘤的異質性 (Tumor heterogeneity)

液態活檢 (Liquid biopsy)

循環腫瘤去氧核糖核酸 (Circulating tumor DNA, ctDNA)

循環腫瘤細胞 (Circulating tumor cell, CTC)

腫瘤化血小板 (Tumor educated platelets, TEP)

胞外泌體 (Exosomes)

## 前言

肺癌是全球相關癌症致死的主要原因之一，大約佔了癌症相關死亡人數的四分之一<sup>1</sup>。2017 年在美國預計有 222,500 人診斷為肺癌，其中將會有 155,870 人死於肺癌<sup>1</sup>；儘管近二十年癌症治療的進步，但是肺癌的五年存活率只有 18%<sup>1,2</sup>，最主要原因就是大部分發現時都已經是晚期肺癌。大型的肺癌篩檢計畫 (national lung screening trial, NLST) 針對高危險族群 (抽

菸每天一包達 30 年及年紀 55 歲以上) 使用低劑量的電腦斷層檢查比起傳統的胸部 X 光檢查可以降低 20% 的肺癌相關死亡率<sup>3</sup>，但是相對的偽陽性率也很高而導致不必要的切片檢查。

隨著基因分子檢測技術的進步，越來越多疾病發現有異質性的特徵，癌症就是高度異質性的疾病，不僅是每個人之間就算有同樣的腫瘤病理分類也是不相同的基因分子分型 (intertumor heterogeneity)，同一個腫瘤內也包含了不同的基因分子亞型，而其相關的細胞型

態、基因組成、代謝、生長速度、轉移特性都不盡相同 (intratumor heterogeneity)<sup>4,5,6</sup>(圖一)。Zhang 和 De Bruin 等學者研究發現越晚期的肺癌隨著腫瘤細胞的基因突變演化有越多的基因亞型出現<sup>7,8</sup>，所以單一次的組織切片檢查不能代表整個肺癌的樣貌，只能代表這個時間點上肺癌部分基因亞型的狀況；隨著肺癌治療的抗藥性產生，往往需要重複的組織病理切片檢查，但臨床上因為患者的病況或者腫瘤的位置都大大增加臨床上實行的困難度，而且有高達四分之一的患者因檢體量不足而無法做基因分子的檢測<sup>9</sup>，所以液態活檢可以彌補組織切片檢查表達即時的腫瘤細胞的基因突變演化、監測治療的效果及較早偵測抗藥性基因突變的產生。

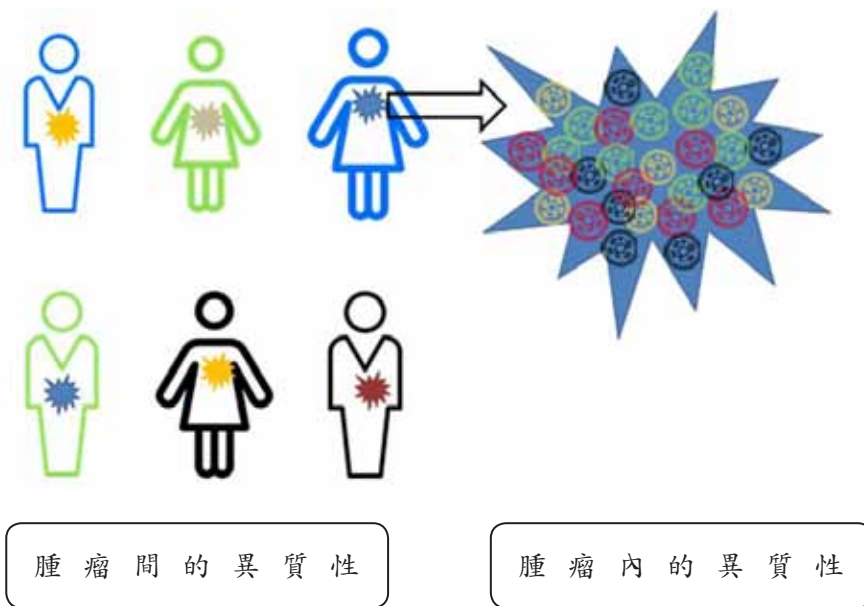
### 液態活檢的生物標記

腫瘤的微環境在腫瘤的惡化、轉移扮演一個重要的角色<sup>10,11</sup>，其中的交互作用包括細胞激素、循環腫瘤去氧核糖核酸 (circulating tumor deoxyribonucleic acid, ctDNA)、循環腫瘤細胞 (circulating tumor cell, CTC) 的釋放，也會誘導正常細胞表現型的改變，例如腫瘤化血小板 (tumor educated platelets, TEP) 的形成及分泌 exosomes，這些過程都是為了促使腫瘤的生

長及增加轉移的能力<sup>12</sup>。所以液態活檢的生物標記就是指表達腫瘤相關訊息的標記，以下就 CTC、ctDNA、TEP、exosomes 做分別的探討。

#### 一、CTC

從原發性腫瘤脫離出來的腫瘤細胞經由血液或淋巴循環系統到達轉移的目標，而早在西元 1869 年就從屍體解剖被發現<sup>13</sup>。在越晚期的肺癌或小細胞肺癌，CTC 的數目會來的更高，所以 CTC 的出現代表不好的預後<sup>14,15</sup>；但是每毫升的血液當中含有  $10^6$ - $10^7$  顆的白血球，但只有 1-10 顆的 CTC，而早期的肺癌 CTC 的數目會更少<sup>16</sup>；由於 CTC 的低濃度，所以需要先有濃縮的方法來偵測 CTC，目前濃縮 CTC 的方法主要利用生化特性或物理特性去篩選，生化特性方面，CTC 表皮帶有表皮細胞黏著分子 (epithelial cell adhesion molecule, EpCAM) 而白血球帶有 CD45(leukocyte common antigen)<sup>17,18</sup>，而半自動化的 CellSearch 系統是目前美國藥物食品監督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 認可用於檢測轉移性的乳癌、大腸癌或前列腺癌但不用於肺癌檢測，況且如果 CTC 正在經歷上皮間質轉化 (epithelial-mesenchymal transition)，而此種檢測方法可能檢測不到；目



圖一：腫瘤的異質性。每個個體就算同樣的腫瘤病理分類都是不一樣的基因分子分型 (intertumor heterogeneity)，在同一個腫瘤中也包含不相同的基因分子亞型 (intratumor heterogeneity)。

前還發展有微晶片可以更有效率的濃縮 CTC<sup>19</sup>。物理特性方面，一般 CTC 大小介於 7.2mm-15mm<sup>20</sup>，ISET(isolation by size of epithelial tumor cells) 是目前較常用的檢測方法<sup>21</sup>，Kerb 學者針對第三、四期的非小細胞肺癌的病患，比較 ISET 和 CellSearch 發現 ISET 有 80% 的檢測率，而 CellSearch 只有 23% 的檢測率<sup>22</sup>，其他還有利用 CTC 的密度<sup>23</sup>、電極<sup>24</sup> 的檢測方法。

CTC 相對於 ctDNA 可以提供病理的免疫組織化學染色和體外移植實驗，除了檢測 EGFR 突變外，和 ctDNA 相比，CTC 更容易檢測像 RET(RET proto-oncogene)、肉瘤致癌因子(C-ROS oncogene 1, ROS1)、異變性淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, ALK) 等基因融合<sup>25</sup>，但是比起 ctDNA，CTC 在肺癌的臨床應用較少，因為在不同的腫瘤，CTC 數目都不相同，所以還有待更多研究來標準化各個癌症的 CTC 數目。

## 二、TEP

在腫瘤的生長過程中，腫瘤細胞能將突變的核糖核酸植入血小板<sup>12</sup>；Best 學者可以利用血小板的核糖核酸定序分析來區分患有肺癌、乳癌、肝癌、膠質母細胞瘤、大腸癌及胰臟癌的癌症患者及健康者，準確率達 96%，也能區分六種原發腫瘤類型，其準確度達 71%，也可進一步分析突變的基因<sup>26</sup>。

Nilsson 學者在 77 位非小細胞肺癌的患者，其中 32 位帶有棘皮動物微管相關蛋白 - 異變淋巴瘤激酶(echinoderm microtubule associated protein like 4- anaplastic lymphoma kinase, EML4-ALK) 的基因融合突變，利用反轉錄聚合酶連鎖反應(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 檢測患者當中的血小板核糖核酸，檢測的敏感度有 65%、專一度有 100%<sup>27</sup>，其中發現在使用標靶藥物治療後帶有 EML4-ALK 的患者會轉陰，而其中一位在追蹤治療超過 30 個月後，從血小板檢測到抗藥性的產生比用正子攝影結合電腦斷層的影像檢查發現惡化早了兩個月。表示 TEP 可以當作腫瘤的液態活檢中一個重要的生物標記。

## 三、Exosomes

經由次級核內體(late endosome)的胞吐作用釋放出來，在電子顯微鏡下是直徑大約 30-100nm 的球狀囊泡<sup>28</sup>，在正常的生理或病理狀況都可能經由細胞的胞吐作用釋放出來，且廣泛存在於體液中，例如尿液、唾液、血液<sup>29,30</sup>。Exosomes 內含單股核糖核酸、長鏈非編碼核糖核酸(long non-coding ribonucleic acid, lncRNA)、微核糖核酸(microRNA, miRNA)、脂質及蛋白質，近來發現也有 DNA 的存在，可以作為反應原始腫瘤基因突變的存在<sup>31</sup>。

Exosomes 主要經由胞吞作用(endocytosis)、目標細胞及 exosomes 的胞膜融合或配體、受體的結合<sup>32</sup>，類似經由內分泌的作用來調控目標細胞的行為，而主要在腫瘤的生長、發育、轉移及抗藥性的產生扮演多方面的角色。Al-Nedawi 學者證明在 exosomes 中帶有表皮生長因子受器(epidermal growth factor receptor, EGFR) 能和內皮細胞作用，導致血管內皮生長因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 的過度表現進而促使腫瘤血管的新生<sup>33</sup>；在非小細胞肺癌中發現 miRNA 和腫瘤的形成或演化都有關係<sup>34</sup>，例如 Rolfo 學者發現 miRNA-30b、miRNA-30c 和 EGFR 路徑的活化有關<sup>35</sup>，Adi 學者發現 miRNA-373、miRNA-512 有抑制腫瘤生長及轉移且會加強鉑類化療藥物(cisplatin) 的化療效果<sup>36</sup>。lncRNA 目前較少被研究，目前 HOTAIR 是相對被較多研究的 lncRNA，發現 HOTAIR 經由抑制周期蛋白依賴性激酶抑制因子-p21 和 cisplatin 的抗藥性、癌症的增生及轉移有關<sup>37,38</sup>。雖然 exosomes 能提供更多關於腫瘤如何轉移及抗藥性的訊息，目前還需要更多的努力來標準化 exosomes 的分離、分析，以期待能應用在臨床工作上。

## 四、ctDNA

### (一) 起源

Mandel 和 Metais 在西元 1948 年在人類血液中發現無細胞去氧核糖核酸的存在(cell free DNA, cfDNA)<sup>39</sup>，cfDNA 在健康者的血漿中的濃度約 1-10 ng/mL<sup>40,41</sup>，在西元 1977 年在癌症

患者的血清中發現 cfDNA 有升高的情形<sup>42</sup>，若在急性外傷、腦中風、感染症或運動的情況下 cfDNA 的濃度也會升高；Stroum 等研究團隊在西元 1989 年提出了在癌症患者血漿中的某些部分 cfDNA 是來自於腫瘤細胞<sup>43</sup>；Sidransky 等研究團隊在西元 1991 年從膀胱癌患者的尿液當中發現帶有轉錄抑癌蛋白基因 -p53 的突變 DNA 存在<sup>44</sup>；在西元 1994 年從胰臟癌患者的血漿中第一次發現致癌基因 -KRAS (v-Ki-ras 2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)<sup>45</sup>，且從每位胰臟癌患者血漿中帶有的 KRAS 突變，也在原發的腫瘤組織發現它的存在，從此發現了 ctDNA 的存在。

## (二) 生物特性

ctDNA 主要從腫瘤細胞凋亡 (apoptosis)、壞死 (necrosis) 或主動分泌<sup>46,47</sup> 而來，存在於血液和其他體液中，例如尿液、唾液、脊髓液或胸膜液等…。一般 ctDNA 比 cfDNA 短，從動物異體移植實驗發現 ctDNA 大小約 134-144bp (base pair)<sup>48</sup>，若從 necrosis 或經由主動分泌形成胞泌體的 ctDNA 大小 >1,000bp<sup>46</sup>，其半衰期約 16 分鐘到 2.5 小時，所以可以即時的反應癌症目前的狀況<sup>49</sup>，其中一部分由核酸酶裂解經由尿液排出或經由肝、脾吸收，然後由巨噬細胞吞噬。有研究發現 cfDNA 可以當作類鐸受體 (Toll-like receptor 9, TLR9) 的配體進而調控免疫反應<sup>50</sup>，另外在體外實驗發現 cfDNA 可以將基因訊息傳遞到目標細胞進而控制其行為<sup>51</sup>。

## (三) 檢測方法

ctDNA 占 cfDNA 的比率從 < 0.1% 到 > 30%，和腫瘤的期別、大小、負荷、代謝率、血行性轉移及病理組織差異都有相關性<sup>52</sup>，在低負荷或早期的癌症，ctDNA 的濃度很低，所以檢體的處理非常重要，在處理檢體應考慮以下步驟：檢體應收集在乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) 的溶劑中、採集的血樣最好在兩個小時內離心避免血球細胞溶解釋放出 DNA 而干擾 ctDNA 的檢測、血漿優於血清做 ctDNA 檢測，因為血清檢體也會因非

腫瘤細胞溶解釋放出 DNA 而干擾 ctDNA 檢測<sup>53</sup>，檢測範圍從單一的核苷酸突變到整個基因組的分析，以下介紹常見檢測 ctDNA 的方法。

### 1. 等位基因特異性聚合酶連鎖反應 (allele-specific PCR)

利用設計好的帶有專一特殊基因序列並結合螢光的探針和標的基因做反應，但是只能偵測已知突變的基因刪除、插入或單核苷酸突變，例如一項研究利用此檢測方法偵測 EGFR 中外顯子 19 的刪除 (EGFR exon 19 deletion) 或 EGFR 中外顯子 21 密碼子 858 位置的氨基酸改變 (由亮氨酸 -Leucine 轉變為精氨酸 -Arginine, EGFR exon 21-L858R)，敏感度最高可達到 90%，但偵測 EGFR 中外顯子 20 密碼子 790 位置的氨基酸改變 (由蘇氨酸 -Threonine 轉變為甲硫氨酸 -Methionine, EGFR exon 20-T790M) 敏感度只有 40%<sup>54</sup>，Cobas allele-specific PCR 是目前美國 FDA 認可用於檢測 liquid biopsy 中 EGFR 的基因突變<sup>55</sup>。

### 2. 數字 PCR (digital PCR, dPCR)

將待測的 ctDNA 分配到數萬個反應單元中結合成液滴，經由 PCR 擴增後再以螢光標記檢測<sup>56</sup>，雖然 dPCR 比 allele-specific PCR 大大的增加檢測的敏感度，但 dPCR 只能偵測已知的熱點突變無法檢測複雜的基因突變，例如基因融合 (ALK、ROS1 rearrangement)。

### 3. 次世代基因序列分析 (next-generation sequencing, NGS)

和 Sanger 定序方法相同原理，使用 DNA 聚合酶催化帶有螢光標記的核苷酸結合到切成片段的待測基因上，不像 Sanger 定序法一次只能檢測一個基因片段，NGS 是一次檢測多個基因片段<sup>57</sup>，隨著 NGS 檢測技術的進步，目前檢測的敏感度相當於 dPCR，NGS 不儘可以偵測熱點的基因突變，它也可以檢測整個腫瘤基因組發現新的突變基因及像 ALK、ROS1 的基因融合。將上敘的檢測方法及運用於肺癌突變基因的檢測整理在表一、表二。

## 液態活檢在肺癌的臨床相關運用

液態活檢中的生物標記以 CTC 最早被應用，隨著次世代基因序列分析的進展，ctDNA 在臨床的應用越來越廣泛，以下主要以 ctDNA 探討在臨床的應用。

### 一、液態活檢在肺癌的早期診斷

有些研究發現早在診斷腫瘤的兩年之前就在血液和唾液中發現突變基因的存在<sup>68</sup>，但矛盾的是在健康者身上也有發現致癌突變基因的存在，代表目前單靠液態活檢還不能達到早期診斷癌症的可能性。我們應該更需要從中了解

表一：Circulating tumor DNA (ctDNA) 的檢測技術

檢測方法	檢測原理	可檢測的突變
等位基因特異性聚合酶連鎖反應 (allele specific PCR)	使用針對突變專一性的引子並增幅突變的變異	基因刪除、基因插入、單核苷酸點突變
數字聚合酶連鎖反應 (dPCR)	利用表面活性劑將標的基因劃分為成千上萬個以液滴狀存在的基因再以 PCR 擴增	基因刪除、基因插入、單核苷酸點突變
擴增子式次世代基因序列分析 (amplicon-based NGS)	利用序列專一性 PCR 引子並且對感興趣的基因部位擴增去檢測廣泛基因區域的變異	基因刪除、基因插入、單核苷酸點突變、拷貝數增加
捕獲式次世代基因序列分析 (capture-based NGS)	使用對標的基因互補的 DNA 寡核苷酸去做雜交來檢測廣泛基因區域的變異	基因刪除、基因插入、單核苷酸點突變、拷貝數增加、基因融合

參考資料：Dagogo-Jack I, Saltos A, Shaw AT. Pathology Issues in Thoracic Oncology: Histologic Characterization and Tissue/Plasma Genotyping May Resolve Diagnostic Dilemmas. Am Soc Clin Oncol Educ Book. 2017; 37: 619-629.

表二：在已發表文獻中非小細胞肺癌的血漿與組織基因分型的一致性

基因突變	檢測原理	敏感度 (%)	專一度 (%)	參考文獻
<b>Allele specific PCR</b>				
EGFR T790M	Allele specific PCR	41	100	54
EGFR L858R, exon 19 deletion	Allele specific PCR	46-90	97-100	54,58-60
<b>Digital PCR</b>				
EGFR T790M	BEAMing	70-71	67-69	54,61
EGFR L858R, exon 19 deletion	BEAMing	82.3-100	96.5-100	54,61
EGFR T790M	ddPCR	77	63	62
EGFR L858R, exon 19 deletion	ddPCR	74-82	100	62
KRAS G12X	ddPCR	64	100	62
<b>NGS</b>				
EGFR mutations	Amplicon-based	87-100	94-100	63
Multiple(no fusions)	Amplicon-based	58	87	64
ALK rearrangement	Capture-based	79.2	100	65
Multiple	Capture-based	72-85	96-100	66,67

BEAM：磁珠乳液擴增，結合 dPCR 和流式細胞術的基因檢測技術；

ddPCR：digital droplet PCR.

參考資料：Dagogo-Jack I, Saltos A, Shaw AT. Pathology Issues in Thoracic Oncology: Histologic Characterization and Tissue/Plasma Genotyping May Resolve Diagnostic Dilemmas. Am Soc Clin Oncol Educ Book. 2017; 37: 619-629.

這代表的真實意義並更加知道隨著時間它如何的變化導致腫瘤的產生，就像目前美國正在實施的癌症登月計畫<sup>69</sup>中的一部分計畫正試圖從癌症病患和健康者的血液活檢中去建構龐大的基因圖譜並找出其中的差別來了解血液活檢的可能性或侷限性。

## 二、分析腫瘤的異質性

自從了解腫瘤的異質性以來，了解到單一次的腫瘤組織切片檢查不能代表整個腫瘤的狀況也可能誤導治療的選擇，而在液態活檢中可以發現主要的突變 (stem mutation) 會比其他亞型的私有突變 (private mutation) 所占的比率來的高<sup>70</sup>，所以可以避免治療選擇的偏差。

## 三、監測治療的反應和抗藥性的產生

因為 ctDNA 很短的半衰期及相對較不侵入的檢查方式，所以液態活檢可以即時的反應癌症的治療狀況並且可以根據 ctDNA 的變化來追蹤治療的反應及監測是否有抗藥性的產生，抗藥性的產生可能是產生新的突變機制，或先前就存在的突變機轉在藥物治療的選擇下又開始活躍起來，例如針對帶有 EGFR T790M 突變的肺癌病患，在使用第三代標靶藥物 (Osimertinib) 約治療 9.6 個月後，經由一系列的 ctDNA 分析發現抗藥性的產生，像 EGFR C797S mutation 和失去 T790M 的突變<sup>71</sup>，另外也有發現先前就存在的 MET (mesenchymal-epithelial transition) amplication 在第三代標靶藥物的治療選擇下開始活躍起來<sup>72</sup>。

一些研究發現液態活檢中生物標記的增加會比臨床或影像上的惡化提早幾周到幾個月出現<sup>73</sup>，目前只有一些小型的研究指出根據液態活檢中生物標記的變化而變更藥物治療可以得到治療的反應<sup>62</sup>，由於尚未有力的證據證實依據液態活檢中生物標記的變化因而變更治療可以替肺癌患者帶來好處，所以目前還是根據臨床或影像上的惡化來變更治療的藥物。

## 四、早期腫瘤術後的復發監測

術後液態活檢的追蹤發現生物標記的出

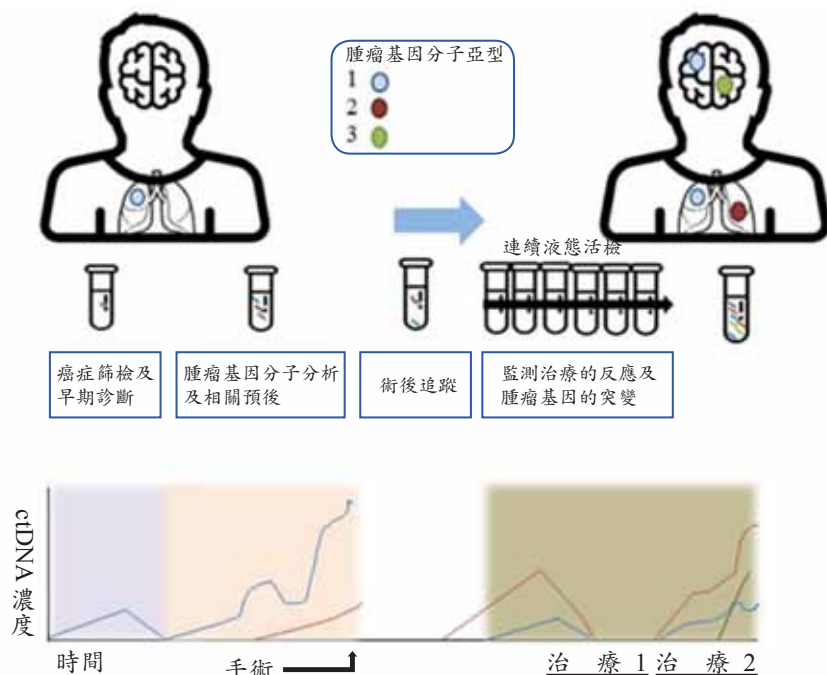
現代表腫瘤的可能復發，而且觀察發現生物標記的出現比臨床上的惡化提早了平均 7.9-11 個月<sup>74</sup>，另外可以監測腫瘤基因突變的變化；上述的液態活檢應用在腫瘤處理以圖二表示。

## 五、組織切片檢查和液態活檢結果的不一致

目前組織病理的基因分型檢查還是標準的檢查方法，若在液態活檢結果陰性的狀況下會根據組織病理的檢查採取適當的治療。隨著液態活檢在臨床運用越來越多的情況下，發現越來越多組織病理的基因分型和液態活檢不一致的臨床情況下，發現治療的反應可能會較不顯著，例如在一個研究發現 Osimertinib 在只有液態活檢表達 EGFR T790M 突變的治療療效比組織病理、液態活檢都表達 EGFR T790M 突變的狀況下還要差<sup>61</sup>，幾項研究也發現液態活檢下突變量的多寡和治療的療效有關<sup>61,72,75</sup>，但目前缺乏大型的研究證實，所以目前的共識是當只有液態活檢的檢查而缺乏組織切片檢查時，根據液態活檢的檢查結果採取合適的治療；若液態活檢沒有結果而組織切片檢查可行時建議做組織切片檢查，若不可行時建議化療或免疫治療 (表三)。

## 結 論

隨著近年提出的癌症精準醫療，癌症的基因檢測扮演重要的角色，隨著基因分子檢測技術的進步了解到癌症是異質性的疾病且隨著時間會不斷的進行變化，因為連續活體組織切片的檢查在臨床實用上的限制，上述的肺癌液態活檢強調其在肺癌基因分型的潛在用途提供了臨床上可行的方法，越來越多的臨床實驗將液態活檢納入診斷、提供治療決策及追蹤治療的工具，也可以利用液態活檢檢測到新的抗藥性基因提供新的藥物發展；雖然癌症是基因的疾病，但是腫瘤細胞及微環境之間的複雜傳遞路徑及牽涉的範圍廣泛，必須結合基因體學、蛋白質體學及代謝體學等面向，才能全面評估癌症達到精準醫療的目標。



參考資料：Lovly CM, Salama AK, Salgia R. Tumor Heterogeneity and Therapeutic Resistance. Am Soc Clin Oncol Educ Book. 2016; 35: e585-93.

Wang JC, Massie C, Rosenfeld N. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumor DNA. Nat Rev Cancer. 2017; 17: 223-238.

圖二：ctDNA 的臨床相關運用。液態活檢在初期腫瘤的診斷，歷經手術切除後、追蹤，復發後開始實施藥物治療，追蹤治療的反應，最後遠端轉移及抗藥性腫瘤基因亞型的出現，不同的腫瘤基因亞型以不同顏色的圓點表示。

表三：液態活檢和組織切片活檢在臨床相關性的應用

	液態活檢陽性	液態活檢陰性
組織切片陽性	基於檢測的基因分型結果開始治療	基於檢測的基因分型結果開始治療
組織切片陰性	基於檢測的基因分型結果開始治療	基於病理結果和 PD-L1 狀況開始化療、免疫治療
組織切片不足	基於檢測的基因分型結果開始治療	如果可行，重複組織切片檢查；若不可行，基於病理結果和 PD-L1 狀況開始化療、免疫治療

PD-L1(programmed death-ligand 1)：計畫性死亡配體 1，連接到 T 淋巴細胞上的計畫性死亡受體 1 而抑制免疫系統的活化  
 參考資料：Dagogo-Jack I, Saltos A, Shaw AT. Pathology Issues in Thoracic Oncology: Histologic Characterization and Tissue/Plasma Genotyping May Resolve Diagnostic Dilemmas. Am Soc Clin Oncol Educ Book. 2017; 37: 619-629.

### 參考文獻

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017. CA Cancer J Clin 2017;67:7-30.
2. Groome PA, Bolejack V, Crowley JJ, et al. IASLC International Staging Committee; Cancer Research and Biostatistics; Observers to the Committee; Participating Institutions. The IASLC Lung Cancer Staging Project: validation of the proposals for revision of the T, N, and M descriptors and consequent stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of malignant tumours. J Thorac Oncol 2007;2:694-705.
3. Aberle DR, Adams AM, Berg CD, et al. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. N Engl J Med 2011;365:395-409.
4. Holzel M, Bovier A, Tuting T. Plasticity of tumour and immune cells: a source of heterogeneity and a cause for therapy resistance? Nat Rev Cancer 2013;13:365-76.
5. Michor F, Polyak K. The origins and implications of intratumor heterogeneity. Cancer Prev Res (Phila) 2010;3:1361-4.
6. Zellmer VR, Zhang S. Evolving concepts of tumor heterogeneity. Cell Biosci 2014;4:69.
7. Zhang J, Fujimoto J, Zhang J, et al. Intratumor heterogeneity in localized lung adenocarcinomas delineated by multiregion sequencing. Science 2014;346:256-9.

8. de Bruin EC, McGranahan N, Mitter R, et al. Spatial and temporal diversity in genomic instability processes defines lung cancer evolution. *Science* 2014;346:251-6.
9. Sholl LM, Aisner DL, Varella-Garcia M, et al. LCMC Investigators. Multi-institutional oncogenic driver mutation analysis in lung adenocarcinoma: the lung cancer mutation consortium experienced. *J Thorac Oncol* 2015;10:768-77.
10. Pietras K, Ostman A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res* 2010;316:1324-31.
11. Azmi AS, Bao B, Sarkar FH. Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review. *Cancer Metastasis Rev* 2013;32:623-42.
12. McAllister SS, Weinberg RA. The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis. *Nat Cell Biol* 2014;16:717-27.
13. Ashworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death. *Aus Med J* 1869;14:146-9.
14. Hou JM, Krebs MG, Lancashire L, et al. Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2012;30:525-32.
15. Tanaka F, Yoneda K, Kondo N, et al. Circulating tumor cell as a diagnostic marker in primary lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:6980-6.
16. O'Flaherty JD, Gray S, Richard D, et al. Circulating tumour cells, their role in metastasis and their clinical utility in lung cancer. *Lung Cancer* 2012;76:19-25.
17. Pantel K, Alix-Panabières C. Functional Studies on Viable Circulating Tumor Cells. *Clin Chem* 2016;62:328-34.
18. Zhang Z, Ramnath N, Nagrath S. Current Status of CTCs as Liquid Biopsy in Lung Cancer and Future Directions. *Front Oncol* 2015;5:209.
19. Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* 2007;450:1235-9.
20. Vollmer RT. The effect of cell size on the pathologic diagnosis of small and large cell carcinomas of the lung. *Cancer* 1982;50:1380-3.
21. Vona G, Sabile A, Louha M, et al. Isolation by size of epithelial tumor cells: a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am J Pathol* 2000;156:57-63.
22. Krebs MG, Hou JM, Sloane R, et al. Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker-dependent and -independent approaches. *J Thorac Oncol* 2012;7:306-15.
23. Low WS, Wan Abas WA. Benchtop technologies for circulating tumor cells separation based on biophysical properties. *Biomed Res Int* 2015;2015:239362.
24. Gagnon ZR. Cellular dielectrophoresis: applications to the characterization, manipulation, separation and patterning of cells. *Electrophoresis* 2011;32:2466-87.
25. Ilie M, Hofman V, Long E, et al. Current challenges for detection of circulating tumor cells and cell-free circulating nucleic acids, and their characterization in non-small cell lung carcinoma patients. What is the best blood substrate for personalized medicine? *Ann Transl Med* 2014;2:107.
26. Best MG, Sol N, Kooi I, et al. RNA-Seq of Tumor-Educated Platelets Enables Blood-Based Pan-Cancer, Multiclass, and Molecular Pathway Cancer Diagnostics. *Cancer Cell* 2015;28:666-76.
27. Nilsson RJ, Balaj L, Hulleman E, et al. Blood platelets contain tumor-derived RNA biomarkers. *Blood* 2011;118:3680-3.
28. Kalra H, Simpson RJ, Ji H, et al. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol* 2012;10:e1001450.
29. Conde-Vancells J, Rodriguez-Suarez E, Embade N, et al. Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. *J Proteome Res* 2008;7:5157-66.
30. Mathivanan S, Simpson RJ. ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics* 2009;9:4997-5000.
31. Thakur BK, Zhang H, Becker A, et al. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res* 2014;24:766-9.
32. Mittelbrunn M, Sánchez-Madrid F. Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13:328-35.
33. Al-Nedawi K, Meehan B, Kerbel RS, et al. Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:3794-9.
34. Giallombardo M, Chacártégui Borrás J, Castiglia M, et al. Exosomal miRNA Analysis in Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) Patients' Plasma Through qPCR: A Feasible Liquid Biopsy Tool. *J Vis Exp* 2016;(111).
35. Rolfo C, Chacartegui J, Giallombardo M, et al. 71P Exosomes isolated in plasma of non-small cell lung cancer patients contain microRNA related to the EGFR pathway: Proof of concept. *J Thorac Oncol* 2016;11:S85.
36. Adi Harel S, Bossel Ben-Moshe N, Aylon Y, et al. Reactivation of epigenetically silenced miR-512 and miR-373 sensitizes lung cancer cells to cisplatin and restricts tumor growth. *Cell Death Differ* 2015;22:1328-40.
37. Ono H, Motoi N, Nagano H, et al. Long noncoding RNA HOTAIR is relevant to cellular proliferation, invasiveness, and clinical relapse in small-cell lung cancer. *Cancer Med* 2014;3:632-42.
38. Liu Z, Sun M, Lu K, et al. The long noncoding RNA HOTAIR contributes to cisplatin resistance of human lung adenocarcinoma cells via downregulation of p21(WAF1/CIP1) expression. *PLoS One* 2013;8:e77293.
39. Mandel P, Métais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil* 1948;142:241-3.
40. Moulriere F, El Messaoudi S, Pang D, et al. Multi-marker analysis of circulating cell-free DNA toward personalized medicine for colorectal cancer. *Mol Oncol* 2014;8:927-41.
41. Moulriere F, Robert B, Amau Peyrotte E, et al. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PLoS One* 2011;6: e23418.
42. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer*



- Res 1977;37:646-50.
43. Stroun M, Anker P, Maurice P, et al. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* 1989;46:318-22.
  44. Sidransky D, Von Eschenbach, Tsai YC, et al. Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science* 1991;252:706-9.
  45. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, et al. Soluble normal and mutated DNA-sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994;3:67-71.
  46. Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001;61:1659-65.
  47. Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, et al. About the possible origin and mechanism of circulating DNA: apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta* 2001;313:139-42.
  48. Underhill HR, Kitzman JO, Hellwig S, et al. Fragment length of circulating tumor DNA. *PLoS Genet* 2016;12:e1006162.
  49. Wang Y, Chen M, Xiao N, et al. Evaluation and comparison of in vitro degradation kinetics of DNA in serum, urine and saliva: a qualitative study. *Gene* 2016;590:142-8.
  50. Kostiuik SV, Malinovskaia EM, Ermakov AV, et al. Cell-free DNA fragments increase transcription in human mesenchymal stem cells, activate TLR-dependent signal pathway and suppress apoptosis. *Biomed Khim* 2012;58:673-83.
  51. Dvoráková M, Karafiat V, Pajer P, et al. DNA released by leukemic cells contributes to the disruption of the bone marrow microenvironment. *Oncogene* 2013;32:5201-9.
  52. Haber DA, Velculescu VE. Blood-based analyses of cancer: circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Cancer Discov* 2014;4:650-61.
  53. El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, et al. Circulating cell free DNA: preanalytical considerations. *Clin Chim Acta* 2013;424:222-30.
  54. Thress KS, Brant R, Carr TH, et al. EGFR mutation detection in ctDNA from NSCLC patient plasma: a cross-platform comparison of leading technologies to support the clinical development of AZD9291. *Lung Cancer* 2015;90:509-15.
  55. U.S. Food and Drug Administration. FDA approves first blood test to detect gene mutation associated with non-small cell lung cancer. <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/>.
  56. ucm504488.htm. Accessed March 14, 2017.
  57. Yung TK, Chan KC, Mok TS, et al. Single-molecule detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by microfluidics digital PCR in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2009;15:2076-84.
  58. Kinde I, Wu J, Papadopoulos N, et al. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:9530-5.
  59. Marchetti A, Palma JF, Felicioni L, et al. Early prediction of response to tyrosine kinase inhibitors by quantification of EGFR mutations in plasma of NSCLC patients. *J Thorac Oncol* 2015;10:1437-43.
  60. Reck M, Hagiwara K, Han B, et al. ctDNA determination of EGFR mutation status in European and Japanese patients with advanced NSCLC: the ASSESS study. *J Thorac Oncol* 2016;11:1682-9.
  61. Karachaliou N, Mayo-de las Casas C, Queralt C, et al. Association of EGFR L858R mutation in circulating free DNA with survival in the EURTAC trial. *JAMA Oncol* 2015;1:149-57.
  62. Oxnard GR, Thress KS, Alden RS, et al. Association between plasma genotyping and outcomes of treatment with osimertinib (AZD9291) in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2016;34:3375-82.
  63. Sacher AG, Paweletz C, Dahlberg SE, et al. Prospective validation of rapid plasma genotyping for detection of EGFR and KRAS mutations in advanced lung cancer. *JAMA Oncol* 2016;2:1014-22.
  64. Reckamp KL, Melnikova VO, Karlovich C, et al. A highly sensitive and quantitative test platform for detection of NSCLC EGFR mutations in urine and plasma. *J Thorac Oncol* 2016;11:1690-700.
  65. Couraud S, Vaca-Paniagua F, Villar S, et al. Noninvasive diagnosis of actionable mutations by deep sequencing of circulating free DNA in lung cancer from never-smokers: a proof-of-concept study from BioCAST/IFCT-1002. *Clin Cancer Res* 2014;20:4613-24.
  66. Wang Y, Tian PW, Wang WY, et al. Noninvasive genotyping and monitoring of anaplastic lymphoma kinase (ALK) rearranged nonsmall cell lung cancer by capture-based next-generation sequencing. *Oncotarget* 2016;7:65208-17.
  67. Paweletz CP, Sacher AG, Raymond CK, et al. Bias-corrected targeted next-generation sequencing for rapid, multiplexed detection of actionable alterations in cell-free DNA from advanced lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2016;22:915-22.
  68. Newman AM, Bratman SV, To J, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med* 2014;20:548-54.
  69. Gormally E, Vineis P, Matullo G, et al. TP53 and KRAS2 mutations in plasma DNA of healthy subjects and subsequent cancer occurrence: a prospective study. *Cancer Res* 2006;66:6871-6.
  70. Blood Profiling Atlas in Cancer. Part of the U.S. Cancer Moonshot initiative. Available online: <https://medium.com/cancer-moonshot/blood-profiling-atlas-in-cancer-21261949bafef#g45qbm919>.
  71. Jamal-Hanjani M, Wilson GA, Horswell S, et al. Detection of ubiquitous and heterogeneous mutations in cell-free DNA from patients with early-stage non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2016;27:862-7.
  72. Thress KS, Paweletz CP, Felip E, et al. Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nat Med* 2015;21:560-2.
  73. Chabon JJ, Simmons AD, Lovejoy AF, et al. Circulating tumour DNA profiling reveals heterogeneity of EGFR inhibitor resistance mechanisms in lung cancer patients. *Nat Commun* 2016;7:11815.

74. Zheng D, Ye X, Zhang MZ, et al. Plasma EGFR T790M ctDNA status is associated with clinical outcome in advanced NSCLC patients with acquired EGFR-TKI resistance. *Sci Rep* 2016;6:20913.
75. Reinert T, Scholer LV, Thomsen R, et al. Analysis of circulating tumour DNA to monitor disease burden following colorectal cancer surgery. *Gut* 2016;65:625-34.
76. Karlovich C, Goldman JW, Sun JM, et al. Assessment of EGFR mutation status in matched plasma and tumor tissue of NSCLC patients from a phase I study of rociletinib (CO-1686). *Clin Cancer Res* 2016;22:2386-95.

## Liquid Biopsy in Lung Cancer

Fu-Hsiung Yang, and Shiu-Nan Tang

*Department of Internal Medicine, Zuoying Branch of Kaohsiung Armed Forces General Hospital, Kaohsiung, Taiwan*

Lung cancer is the leading cause of deaths from cancer worldwide, accounting for almost one-quarter of fatalities. The overwhelming majority of these victims die due to a late diagnosis. Despite the powerful tool with low-dose computed tomography (LDCT) reduces the risk of death by 20%, the false positive finding of LDCT or overdiagnosis could lead to unnecessary invasive tissue biopsy and harmful management. With the advancement in the identification of molecular and protein-based tumor biomarkers, the current cancer screen has been extended from traditional pathological examination to genomics in order to understand more and more pathogenesis of the heterogenous characteristic in cancer. A single tissue biopsy can't represent the appearance of the entire tumor. However, liquid biopsy can complement the histopathological examination to provide a noninvasive, immediate and reproducible specimen. In this paper, we introduce the relevant biomarkers in liquid biopsy: circulating tumor DNA, circulating tumor cell, tumor educated platelets, and exosomes. Finally, we discuss the incorporation of liquid biopsy and clinical practice of lung cancer. (*J Intern Med Taiwan* 2017; 28: 334-343)