

肺癌的ALK分子檢驗

曾嶽元

前言

ALK的全名是「回變性淋巴瘤激酶 (anaplastic lymphoma kinase)」，它最早是以致癌基因的面貌於九〇年代被發現。當年研究者在「回變性大細胞淋巴瘤 (anaplastic large-cell lymphoma)」中發現 *NPM-ALK* 融合基因^{1,2}。

在正常情況下，ALK只表現於神經系統的細胞膜上，它與神經的發育有關³。在其它組織中如肺臟，ALK是不表現的。ALK是一種穿膜的酪氨酸激酶受體 (tyrosine kinase receptor)，它屬於胰島生長因子受體的家族⁴。當ALK與其配合基結合後即可活化，其活性經由KRAS和PI3K途徑傳遞到細胞核，讓細胞得到抗凋亡和細胞增殖的訊息⁵。

ALK可因其基因的異常而活化，亦即不需配合基的刺激即可有活性。除了少數腫瘤如「神經母細胞瘤 (neuroblastoma)」是因為ALK基因擴增而活化外⁶，大多數的腫瘤其ALK活化是因為染色體重組 (rearrangement) 而造成，例如：「炎性肌纖維母細胞瘤 (inflammatory myofibroblastic

tumor)」⁷、「瀰漫性大型B細胞淋巴瘤 (diffuse large B-cell lymphoma; DLBCL)」⁸、「鱗狀細胞癌 (squamous cell carcinoma)」⁹、「非小細胞肺癌 (non-small cell lung cancer; NSCLC)」¹⁰。

染色體重組涉及ALK基因的斷裂。斷裂後，ALK之3'的部份和其它基因之5'的部份接在一起，形成一個融合的基因⁶。目前已知可和ALK融合的5'端基因如下：*NPM*¹、*TFG* (為TRK-fused gene的縮寫)¹¹、*CLTC*¹²、*ATIC*¹³、*CARS*¹⁴、*MSN*¹⁵、*TPM3*¹⁶、*EML4* (為echinoderm microtubule-associated protein-like 4的縮寫)¹⁷、*KIF5B* (為kinesin family member 5B的縮寫)¹⁸、*KLC1* (為kinesin light chain 1的縮寫)¹⁹、*C2orf44*²⁰。其中出現於「非小細胞肺癌」的有四個基因^{10,18,19,21}：*EML4*、*KIF5B*、*KLC1*、*TFG*。而以上這四個基因，最常出現於ALK陽性之肺癌病人身上的為*EML4-ALK*融合基因，至少佔八成以上。

如前所述，*EML4-ALK*融合蛋白的活性不需依賴配合基的刺激，融合蛋白的激酶區域始終都具有活性，此導致細胞的增殖、移行和存活²²。以老鼠

通訊作者：曾嶽元 教授

電話：886-2-2690-7965 ext 2518

傳真：886-2-2691-9800

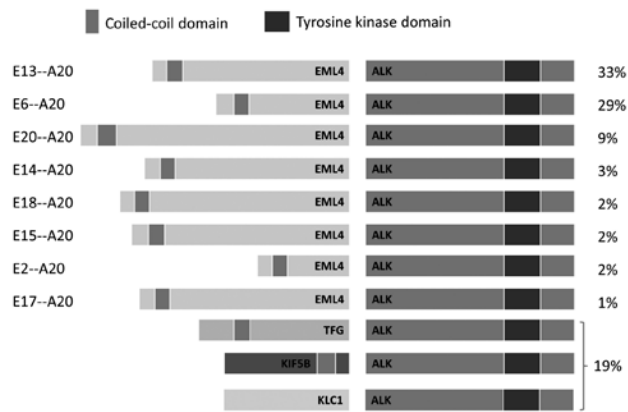
地址：106 台北市仁愛路四段280號 國泰綜合醫院 病理暨檢驗醫學部

電子郵件：jeffbucknell@gmail.com

模型來看，若將*EML4-ALK*表現於肺臟上皮細胞，則可使老鼠出生後長出數百顆的腺癌^{17,23}。此亦可證明「*EML4-ALK*融合基因」為肺癌的驅動突變（driver mutation）。

檢驗ALK融合基因的方法

臨床上，我們可利用三種方法來檢驗肺癌是否有*EML4-ALK*融合基因。較精確的方法是用PCR來偵測基因的融合，因為此法可清楚地指出兩基因的確切接點。然而，由於*EML4*有多種斷裂點（圖一），因此PCR的引子對必須足以多到涵蓋各種可能的接點，如此才不會漏掉可能的融合基因。也因此，PCR法較常用於研究而少用於臨床檢驗。



圖一、回變性淋巴瘤激酶（anaplastic lymphoma kinase; ALK）融合基因的概況。

ALK大多和echinoderm microtubule-associated protein-like 4 (*EML4*) 基因融合；少數情況下，與TRK-fused gene (*TFG*)、kinesin family member 5B (*KIF5B*)、kinesin light chain I (*KLC1*) 基因融合。

目前臨床上，最常用於檢驗ALK融合基因的方法是「螢光原位雜交法（fluorescence in situ

hybridization; FISH)」。其原理是在ALK的5'側以綠色螢光標示，而在3'側以紅色螢光標示。由於這兩處很接近，因此在螢光顯微鏡下，正常的細胞呈現緊緊相鄰的紅、綠點。當ALK之3'的部份和其它基因之5'的部份接在一起時，紅、綠點兩點就會遠遠分離，甚至只見紅點而已。當細胞的螢光點出現這種狀況時，就是ALK陽性了。理論上，當檢體由NCI-H3122或NCI-H2228腫瘤細胞株製成時，因所有的細胞都有ALK融合基因，所以用FISH檢驗應呈現100%的ALK陽性細胞。然而，由於檢驗本身無法避免的機率，我們還是可在這種全然為ALK陽性的腫瘤中看到ALK陰性的細胞。就是這個現象，讓我們在FISH下檢視ALK陽性腫瘤時，ALK陽性細胞的出現率從22%到87%都有²⁴。基於這個事實，專家們武斷地以15%為閾值。亦即，當ALK陽性細胞率為15%以上時，我們判定該腫瘤為ALK陽性²⁵。計算時要數50個細胞²⁶，宜有兩名人員分別計數以提高正確性。

由於正常的肺臟組織不表現ALK，因此肺癌出現ALK即代表有ALK融合基因。基於這個前提，免疫組織化學染色法（immunohistochemistry; IHC）即可用於檢驗細胞是否有ALK融合基因。由於正常的EML4為細胞質內的蛋白，因此EML4-ALK的融合蛋白會出現在細胞質中^{27,28}。在判讀ALK的免疫染色時，要注意染色陽性的細胞是否為腫瘤細胞，因為組織中的正常神經細胞是ALK陽性的。此外，也要確定該腫瘤為「非小細胞肺癌」，因為「神經內分泌癌（neuroendocrine carcinoma）」如「小細胞癌（small cell carcinoma）」為ALK染色陽性但卻沒有ALK融合基因。用於ALK IHC的抗體已發展多年，所以市售的抗體也有好幾款。然而，有些抗體之敏感性和特異性不佳，所以IHC的偽陽性及偽陰

性是個大問題。也因如此，有人建議IHC為ALK陽性者需以FISH檢驗確認結果²⁹。不過，現今的抗體品質及偵測方法已大為改善，如果採用此種抗體檢驗套組，是不需要再以FISH來確認結果的。當然，前提是IHC的品管必須夠水準才可。就此而言，備製IHC檢驗的檢體要遵守一些規定，譬如冷缺血時間（cold ischemia time; CIT）要少於6小時、固定液宜用10%的中性福馬林緩衝液（10% neutral buffered formalin）、固定時間要超過6小時、製做好的玻片要在三個月內使用完畢等。

以上三種方法中，美國FDA目前核准用於診斷ALK融合基因的「體外診斷醫療器材（In Vitro Diagnostic Device; IVD）」為FISH，不過這不表示「實驗室自行研發的檢驗（laboratory-developed test; LDT）」就無法用於檢驗ALK融合基因。其實在藥品及伴同性醫材的臨床試驗中即指出，136名以「Vysis ALK Break-Apart FISH Probe Kit」診斷的病人，其對crizotinib治療的整體療效率（overall response rate; ORR）為50%，有效期達41.9週；而119名以LDT所診斷的病人，其對crizotinib治療的ORR為61%，有效期達48.1週，顯然品管優良的LDT並不比IVD差。還有些實例證明，FISH並非ALK檢驗的黃金標準，譬如有些真正有ALK融合基因的腫瘤，以FISH檢驗時卻為陰性^{30,31,32}。以crizotinib治療FISH假陰性的案例可出現療效³³。假陰性的原因之一是：「臂內倒位（paracentric inversion）」雖可造成*EML4-ALK*的融合，但ALK之3'和5'的部份卻只約略地分開而已^{24,34}。相反地，有些沒有ALK融合基因的腫瘤，以FISH檢驗時卻為陽性。可能的原因包括：DNA被拉扯以致綠色和紅色螢光點假象地分離、細胞核在檢體備製時被切開以致失去綠色螢光點、探針異常雜交、判讀者的失誤。

檢驗的策略

「非小細胞肺癌」發生ALK基因重組的機率不高，有研究者報告ALK陽性率為273例中有3例³⁵、594例中有7例³⁶、305例中有8例³⁷、75例中有5例¹⁰，以及527例中有41例³⁸。由於FISH檢驗所費不貲，而且只有1%至8%的「非小細胞肺癌」有ALK的基因重組，因此有不少專家建議，如何挑選病例以增加陽性率。基本上，他們採取三種策略：挑選有特定病史的病人、有特殊病理形態的檢體和採用驅動突變（driver mutation）相斥的原理。

就病史而言，我們知道發生ALK基因重組多出現在年齡較低者²⁵。更仔細地比較，可見ALK陽性和ALK陰性族群的平均年齡分別為52.9±16.1歲和64.5±11.5歲（ $p < 0.0001$ ）³²。因此，挑選年齡較低者較容易發現ALK基因的重組。此外，不抽煙或少抽煙者（亦即一年抽不超過10包或戒煙1年以上者）也有較高的比率出現ALK基因重組^{10,25,37}。Mayo Clinic的一項研究中發現，無抽煙史之肺腺癌患者幾乎10%為ALK陽性³⁰。不過也有研究者發現有無抽煙，對ALK的陽性率影響不大，因為他們發現不抽煙者6.25%（11/176）為ALK陽性，而抽煙者5.1%（8/157）為ALK陽性，兩者無顯著差異（ $p = 0.65$ ）³²。至於性別和人種對ALK陽性率的影響則未有定論，不過有研究者認為女性和亞洲人的ALK陽性率較高。

就病理而言，專家觀察到發生ALK基因重組之「非小細胞肺癌」常出現「戒指環細胞（signet-ring cell）」或「黏液篩狀（mucinous cribriform）」形態的腺癌³⁹。因此，有研究指出挑選10%以上腫瘤

細胞為戒指環細胞形態之肺癌做檢驗時，46%的病例為ALK陽性^{30,32}。

由於驅動突變彼此之間很少同時出現，因此絕大多數的ALK陽性病例不會同時出現其它的驅動突變。反過來說，當某「非小細胞肺癌」無已知的驅動突變時，它出現ALK陽性的機會就增加了。譬如有研究指出，「非小細胞肺癌」約3%為ALK陽性，但剔除EGFR突變、KRAS突變、HER2突變和TP53突變後，則受檢者之ALK陽性率可上升到10%³¹。

雖然挑選「有特定病史的病人」及「有特殊病理形態的檢體」可提高ALK的陽性率，但目前檢驗規範卻不同意如此做，原因是某些病人可能因此而喪失了治療機會。不過專家們認為神經內分泌癌和單純的鱗狀細胞癌可排除，不必做ALK檢驗（也不必做EGFR檢驗）。其實讓病人失去客製化治療的最大原因是沒做檢驗。取消檢驗（test cancellation）的原因主要是檢體不足⁴⁰，這會產生嚴重的問題，所以只有熟悉分子檢驗的病理醫師才有資格取消檢驗。亦即必須熟悉檢體量的需求、檢驗的流程和每項檢驗的敏感性和特異性，才能作此判斷。

一旦收到檢驗要求，ALK檢驗的完成時間應在二星期內（即10個工作天），檢體傳送時間為一天（院內）到三天（院外）。由於「非小細胞肺癌」的客製化治療常需多項分子檢驗，如果臨床醫師每次開立一項檢驗，等收到報告書後再申請另一項檢驗，那麼完成整套檢驗所耗的時間就相當長了，這是沒必要的拖延。此外，由於肺癌檢體常常很小，通常經不起多項且分次的檢驗耗損，因此經常做到後面的檢驗時，已無足夠檢體可用。

目前對於肺癌該做哪些檢驗，而且檢驗各項目的前後次序也已相當清楚，所以有專家認為應採用「反射」動作來完成所有該做的檢驗。譬如，對於肺腺癌的檢體就先做EGFR檢驗，如果是陰性的話，就接著自動做其它的突變分析，如ALK等。此檢驗流程謂之「反射檢驗（reflex testing）」。

然而，目前大多數的實驗室沒採取「反射檢驗」，主要的原因是給付問題。當然實驗室若無法提供後續檢驗的技術，或者病人因身體情況不允許進一步治療，自然也就不會採用反射檢驗。

結語

癌症標靶療法不只在藥品的研發上掀起了革命，在醫學檢驗的設計上也揭開了新的一頁，那就是「伴同性體外診斷醫療器材（in vitro companion diagnostic devices）」的問世。在許多實例中，「非小細胞肺癌」的客製化治療，無疑地是熱門的議題，其中許多觀念值得我們學習。

引用文獻

1. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, Look AT. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 1994;263:1281-1284.
2. Shiota M, Fujimoto J, Semba T, Satoh H, Yamamoto T, Mori S. Hyperphosphorylation of a novel 80 kDa protein-tyrosine kinase similar to Ltk in a human Ki-1 lymphoma cell line, AMS3. *Oncogene* 1994;9:1567-74.
3. 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* 1997;14:439-449.
4. Kutok JL, Aster JC. Molecular biology of anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large-cell lymphoma. *J Clin Onc* 2002;20:3691-3702.
5. Stoica GE, Kuo A, Aigner A, Sunitha I, Souttou B, Malerczyk

- C, Caughey DJ, Wen D, Karavanov A, Riegel AT, Wellstein A. Identification of anaplastic lymphoma kinase as a receptor for the growth factor pleiotrophin. *J Biological Chemistry* 2001;276:16772-16779.
6. Mano H. Non-solid oncogenes in solid tumors: EML4-ALK fusion genes in lung cancer. *Cancer Sci* 2008;99:2349-2355.
 7. Griffin CA, Hawkins AL, Dvorak C, Henkle C, Ellingham T, Perlman EJ. Recurrent involvement of 2p23 in inflammatory myofibroblastic tumors. *Cancer Res* 1999;59:2776-2780.
 8. Gascoyne RD, Lamant L, Martin-Subero JI, Lestou VS, Harris NL, Müller-Hermelink HK, Seymour JF, Campbell LJ, Horsman DE, Auvigne I, Espinos E, Siebert R, Delsol G. ALK-positive diffuse large B-cell lymphoma is associated with Clathrin-ALK rearrangements: report of 6 cases. *Blood* 2003;102:2568-2573.
 9. Jazii FR, Najafi Z, Malekzadeh R, Conrads TP, Ziaee AA, Abnet C, Yazdznbod M, Karkhane AA, Salekdeh GH. Identification of squamous cell carcinoma associated proteins by proteomics and loss of beta tropomyosin expression in esophageal cancer. *World J. Gastroenterol* 2006;12:7104-7112.
 10. Soda M, Choi YL, 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* 2007;448:561-566.
 11. Hernández L, Pinyol M, Hernández S, Beà S, Pulford K, Rosenwald A, Lamant L, Falini B, Ott G, Mason DY, Delsol G, Campo E. TRK-fused gene (TFG) is a new partner of ALK in anaplastic large cell lymphoma producing two structurally different TFG-ALK translocations. *Blood* 1999;94:3265-3268.
 12. Touriol C, Greenland C, Lamant L, Pulford K, Bernard F, Rousset T, Mason DY, Delsol G. Further demonstration of the diversity of chromosomal changes involving 2p23 in ALK-positive lymphoma: 2 cases expressing ALK kinase fused to CLTCL (clathrin chain polypeptide-like). *Blood* 2000;95:3204-3207.
 13. Ma Z, Cools J, Marynen P, Cui X, Siebert R, Gesk S, Schlegelberger B, Peeters B, De Wolf-Peeters C, Wlodarska I, Morris SW. Inv(2)(p23q35) in anaplastic large-cell lymphoma induces constitutive anaplastic lymphoma kinase (ALK) tyrosine kinase activation by fusion to ATIC, an enzyme involved in purine nucleotide biosynthesis. *Blood* 2000;95:2144-2149.
 14. Cools J, Wlodarska I, Somers R, Mentens N, Pedoutour F, Maes B, De Wolf-Peeters C, Pauwels P, Hagemeijer A, Marynen P. Identification of novel fusion partners of ALK, the anaplastic lymphoma kinase, in anaplastic large-cell lymphoma and inflammatory myofibroblastic tumor. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;34:354-362.
 15. Tort F, Campo E, Pohlman B, Hsi E. Heterogeneity of genomic breakpoints in MSN-ALK translocations in anaplastic large cell lymphoma. *Hum Pathol* 2004;35:1038-1041.
 16. Armstrong F, Lamant L, Hieblot C, Delsol G, Touriol C. TPM3-ALK expression induces changes in cytoskeleton organisation and confers higher metastatic capacities than other ALK fusion proteins. *Eur J Cancer* 2007;43:640-646.
 17. Soda M, Takada S, Takeuchi K, Choi YL, Enomoto M, Ueno T, Haruta H, Hamada T, Yamashita Y, Ishikawa Y, Sugiyama Y, Mano H. A mouse model for EML4-ALK-positive lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:19893-19897.
 18. Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, Soda M, Hatano S, Inamura K, Takada S, Ueno T, Yamashita Y, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Ishikawa Y, Mano H. KIF5B-ALK, a novel fusion onco-kinase identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:3143-3149.
 19. Togashi Y, Soda M, Sakata S, Sugawara E, Hatano S, Asaka R, Nakajima T, Mano H, Takeuchi K. KLC1-ALK: a novel fusion in lung cancer identified using a formalin-fixed paraffin-embedded tissue only. *Plos One* 2012;7:e31323.
 20. Lipson D, Capelletti M, Yelensky R, Otto G, Parker A, Jarosz M, Curran JA, Balasubramanian S, Bloom T, Brennan KW, Donahue A, Downing SR, Frampton GM, Garcia L, Juhn F, Mitchell KC, White E, White J, Zwirko Z, Peretz T, Nechushtan H, Soussan-Gutman L, Kim J, Sasaki H, Kim HR, Park SI, Ercan D, Sheehan CE, Ross JS, Cronin MT, Jänne PA, Stephens PJ. Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. *Nat Med* 2012;18:382-384.
 21. Rikova K, Guo A, Zeng Q, Possemato A, Yu J, Haack H, Nardone J, Lee K, Reeves C, Li Y, Hu Y, Tan Z, Stokes M, Sullivan L, Mitchell J, Wetzell R, Macneill J, Ren JM, Yuan J, Bakalarski CE, Villen J, Kornhauser JM, Smith B, Li D, Zhou X, Gygi SP, Gu TL, Polakiewicz RD, Rush J, Comb MJ. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* 2007;131:1190-1203.
 22. Chiarle R, Voena C, Ambrogio C, Piva R, Inghirami G. The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8:11-23.
 23. Choi YL, Takeuchi K, Soda M, Inamura K, Togashi Y, Hatano S, Enomoto M, Hamada T, Haruta H, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Ueno T, Takada S, Yamashita Y, Sugiyama Y, Ishikawa Y, Mano H. Identification of novel

- isoforms of the EML4-ALK transforming gene in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2008;68:4971-4976
24. Camidge DR, Kono SA, Flacco A, Tan AC, Doebele RC, Zhou Q, Crino L, Franklin WA, Varella-Garcia M. Optimizing the detection of lung cancer patients harboring anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangements potentially suitable for ALK inhibitor treatment. *Clin Cancer Res* 2010;16:5581-5590.
 25. Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, Digumarthy SR, Costa DB, Heist RS, Solomon B, Stubbs H, Admane S, McDermott U, Settleman J, Kobayashi S, Mark EJ, Rodig SJ, Chirieac LR, Kwak EL, Lynch TJ, Iafrate AJ. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol.* 2009;27:4247-4253.
 26. Yi ES, Boland JM, Maleszewski JJ, Roden AC, Oliveira AM, Aubry MC, Erickson-Johnson MR, Caron BL, Li Y, Tang H, Stoddard S, Wampfler J, Kulig K, Yang P. Correlation of IHC and FISH for ALK gene rearrangement in non-small cell lung carcinoma: IHC score algorithm for FISH. *J Thorac Oncol* 2011;6:459-465.
 27. Eudy JD, Ma-Edmonds M, Yao SF, Talmadge CB, Kelley PM, Weston MD, Kimberling WJ, Sumegi J. Isolation of a novel human homologue of the gene coding for echinoderm microtubule-associated protein (EMAP) from the Usher syndrome type 1a locus at 14q32. *Genomics* 1997;43:104-106.
 28. Pollmann M, Parwaresch R, Adam-Klages S, Kruse ML, Buck F, Heidebrecht HJ. Human EML4, a novel member of the EMAP family, is essential for microtubule formation. *Exp Cell Res* 2006;312:3241-3251.
 29. Paik JH, Choi CM, Kim H, Jang SJ, Choe G, Kim DK, Kim HJ, Yoon H, Lee CT, Jheon S, Choë JY, Chung JH. Clinicopathologic implication of ALK rearrangement in surgically resected lung cancer: a proposal of diagnostic algorithm for ALK-rearranged adenocarcinoma. *Lung Cancer* 2012;76:403-409.
 30. Rodig SJ, Mino-Kenudson M, Dacic S, Yeap BY, Shaw A, Barletta JA, Stubbs H, Law K, Lindeman N, Mark E, Janne PA, Lynch T, Johnson BE, Iafrate AJ, Chirieac LR. Unique clinicopathologic features characterize ALK-rearranged lung adenocarcinoma in the western population. *Clin Cancer Res* 2009;15:5216-5223.
 31. Murakami Y, Mitsudomi T, Yatabe Y. A Screening Method for the ALK Fusion Gene in NSCLC. *Front Oncol* 2012;2:24.
 32. To KF, Tong JH, Yeung KS, Lung RW, Law PP, Chau SL, Kang W, Tong CY, Chow C, Chan AW, Leung LK, Mok TS. Detection of ALK rearrangement by immunohistochemistry in lung adenocarcinoma and the identification of a novel EML4-ALK variant. *J Thorac Oncol* 2013;8: 883-891.
 33. Peled N, Palmer G, Hirsch FR, Wynes MW, et al. Next-generation sequencing identifies and immunohistochemistry confirms a novel crizotinib-sensitive ALK rearrangement in a patient with metastatic non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2012;7:e14-e16.
 34. Palmer RH, Vernersson E, Grabbe C, Hallberg B. Anaplastic lymphoma kinase: signalling in development and disease. *Biochem J* 2009;420:345-361.
 35. Conklin CM, Craddock KJ, Have C, Laskin J, et al. Immunohistochemistry is a reliable screening tool for identification of ALK rearrangement in non-small-cell lung carcinoma and is antibody dependent. *J Thorac Oncol* 2013;8:45-51.
 36. Selinger CI, Rogers TM, Russell PA, O'Toole S, et al. Testing for ALK rearrangement in lung adenocarcinoma: a multicenter comparison of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol* 2013;26:1545-53.
 37. Koivunen JP, Mermel C, Zejnullahu K, Murphy C, Lifshits E, Holmes AJ, Choi HG, Kim J, Chiang D, Thomas R, Lee J, Richards WG, Sugarbaker DJ, Ducko C, Lindeman N, Marcoux JP, Engelman JA, Gray NS, Lee C, Meyerson M, Jänne PA. EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:4275-4283.
 38. Li Y, Pan Y, Wang R, Sun Y, Hu H, Shen X, Lu Y, Shen L, Zhu X, Chen H. ALK-rearranged lung cancer in Chinese: a comprehensive assessment of clinicopathology, IHC, FISH and RT-PCR. *PLoS ONE* 2013;8:e69016.
 39. Yoshida A, Tsuta K, Nakamura H, Kohno T, Takahashi F, Asamura H, Sekine I, Fukayama M, Shibata T, Furuta K, Tsuda H. Comprehensive histologic analysis of ALK-rearranged lung carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2011;35:1226-1234.
 40. Travis WD, Rekhtman N. Pathological diagnosis and classification of lung cancer in small biopsies and cytology: strategic management of tissue for molecular testing. *Semin Respir Crit Care Med* 2011;32:22-31.