

Current Issues in Lung Cancer Pathology

Jin-Haeng Chung

Department of Pathology, Seoul National University College of Medicine, Bundang Hospital, Seongnam, Korea

Lung cancer is characterized by accumulation of oncogene activation, inactivation of tumor suppressor genes and alteration of epigenetic changes. Fortunately, the past decade has seen remarkable development in molecular pathogenesis and management of lung cancer, especially adenocarcinoma. The discovery of the biologic and therapeutic importance of acquired genetic alterations in 2 genes that encode pharmacologically targetable tyrosine kinases involved in growth factor receptor signaling, epidermal growth factor receptor (EGFR) and anaplastic lymphoma kinase (ALK), has raised hope that targeted therapy will improve survival and quality of life of patients with lung cancer. Therefore, molecular testing to detect these 2 mutated genes is more important than ever and has changed the management of the patients with lung cancer and the role of pathologists. Furthermore, as most lung cancer patients present with advanced-stage disease at the time of diagnosis, it is important to detect targetable mutations using small tissue samples or cytology specimens. Here, the author summarizes the practical impact of the molecular testing of lung cancer and introduces the current knowledge of lung cancer pathology.

Key Words: Lung Neoplasms; Pathology; Molecular Diagnostic Techniques

서 론

폐암은 다른 악성 종양과 마찬가지로 다양한 암유전자의 활성화, 종양억제 유전자의 비활성화 혹은 후생유전학적 변화 등 유전체 수준의 변화가 동반되어 일어나는 것이 특징이다. 최근 폐암에서는 종양 발생에 직접적 원인을 제공하고, 암세포의 성장, 침윤, 진행에 강력한 영향을 미칠 뿐 아니라 기타 세포 성장에 관여하는 다양한 신호전달체계를 교란시키는 암유전자가 발견되었고 이 암유전자를 표적 치료하였을 때 놀라운 치료 효과를 거듭으로써 진단과 치료원칙의 패러다임이 변화하게 되는 격변의 시기를 맞고 있다. 대표적 예로, 2004년 상피세포성장인자 수용체(epidermal growth factor receptor, EGFR) 유전자 변이가 있는 폐암 환자에서 특정 타이로신 키나아제 억제제(tyrosine kinase inhibitors; TKIs, gefitinib

or erlotinib)를 사용하였을 때 신속하고도 효과적인 종양 억제 효과가 있음이 밝혀졌다[1,2]. 2011년 보고된 3상 임상 시험 결과에 의하면, EGFR 변이가 있는 폐암 환자의 경우 platinum 제제에 기반한 고식적 일차 항암 요법에 비하여 gefitinib (Iressa®)(AstraZeneca Inc., UK)를 투여한 군에서 무병생존율의 연장을 보였다[3]. 이러한 사실들은, EGFR 변이를 갖는 폐선암종에서 악성 종양 세포의 특성을 유지, 보존할 수 있는 능력은 특정 “암유전자 변이”에 직접적으로 의존하는 것을 의미하며 이러한 현상을 암유전자 중독(oncogene addiction)으로 설명할 수 있다[4]. EGFR 이외에도 2007년 echinoderm microtubule-associated protein-like 4 (EML4)-anaplastic lymphoma kinase (ALK) 유전자 전위 현상이 특정 폐암 환자군에서 강력한 발암 인자로 밝혀졌고[5-7], ALK-TKI (PF-02341066, crizotinib)를 이용한 초기 임상 시험에서 현저한 종양 억제 효과를

Correspondence to: Jin-Haeng Chung
우463-707, 경기도 성남시 분당구 구미로
173번길 82, 분당서울대병원 병리학교실
Department of Pathology, Seoul National
University Bundang Hospital, 82 Gumi-ro
173 Beon-gil, Bundang-gu, Seongnam
463-707, Korea
Tel: +82-31-787-3379
Fax: +82-31-787-4012
E-mail: chungjh@snu.ac.kr

Received 25 November 2013

Revised 21 January 2014

Accepted 29 January 2014

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

보여 EGFR 이후 폐암 치료에 있어서 효과가 검증된 유력한 생물표지자(biomarker)로 떠올랐다[8,9]. 그 외 K-ras, B-raf, c-erbB2, MET 등의 유전자 변이가 폐암 발생에 관여하는 것으로 알려져 있다[10]. 이러한 지식의 축적과 임상적 경험이 폐암을 진단하는 병리학 분야에 미치는 영향은 직접적이고도 현실적이라 할 수 있다. 즉, 병리 진단에 따라 치료 방침과 치료 약제의 선택이 결정될 뿐만 아니라, 특정 조직학적 유형의 폐암은 특정 치료제를 사용하였을 때 치명적 출혈 등의 부작용을 보이므로, 숙련된 병리의사가 전문적 지식을 동원하여 세분화된 조직학적 진단을 할 필요성이 그 어느 때보다도 높아졌다. 따라서 필자는 최근에 급격한 변화를 겪고 있는 폐암 분야의 병리학적 이슈들을 정리하고, 작은 생검 조직으로 병리의사에게 의뢰되는 폐암 환자들을 보다 정확한 진단의 바탕으로 적절한 치료를 받을 수 있기 위하여 실제 진료 현장에서 적용할 점이 무엇인지 토의하고자 한다.

본 론

1. 폐암의 병리학적 진단에 있어서 문제점

1) 비소세포암종에서 세분화된 진단의 필요성

전통적으로 폐암은 크게 소세포암종과 비소세포암종으로 분류되어 왔는데, 이는 소세포암종은 수술보다는 전신 항암치료를 먼저 고려하는 반면, 비소세포암종의 경우 가능하면 외과적 절제를 시행하는 것이 치료 원칙이었기 때문이다. 또한, 수술이 불가능한 진행된 병기의 비소세포암종 환자들에게 약물 치료를 하는 경우 조직학적 아형과 무관하게 platinum 기반의 고식적 항암치료제가 공통적으로 쓰여졌기 때문이다. 그러나, 최근 새로운 약제들이 개발되고 임상 시험을 거치면서, 특정 항암 치료약물을 사용하였을 때, 폐암의 병리조직학적 유형에 따라 임상적 반응이 유의하게 차이가 있음이 알려지게 되었다. 예를 들어, pemetrexed의 경우 선암종에는 중앙 성장의 억제 효과를 보이지만, 편평상피세포암종 환자에 투여하였을 경우 기존의 항암 치료약물에 비하여 우수성이 입증되지 않았고, anti-VEGF인자인 bevacizumab의 경우 편평상피세포암종에서는 치명적 출혈을 일으키는 것이 알려져 금기 대상이 되었다[11,12]. 즉, 이전에 분화가 좋지 않은 폐암을 비소세포암종으로 통칭하여 진단하던 것이 더 이상 유효하지 않게 된 것이다. 병리의사의 역할이 폐암 환자의 조직학적 진단을 하는 데 국한되지 않고 치료 전략을 수립하는 데에도 영향을 미치게 되어, 개인맞춤화 의료시대를 맞이하여 정확하고 세분화된 병리조직학적 분류를 시행하는 것이 더욱 필요하다.

2) 생검조직이나 세침 흡인 검체에서 어떻게 보다 정확한 폐암의 세부 분류를 할 것인가?

폐암환자의 80% 가량은 진단 당시 이미 암이 진행된 상태로 수

술이 불가능하므로, 작은 생검 조직을 이용하여 병리의사가 진단하는 조직학적 분류 및 치료와 관련된 생물표지자 발현 검사 결과를 바탕으로 향후 치료 방침이 정해지게 된다. 기관지 내시경이나 침생검을 통하여 얻은 작은 생검 조직이 전체 종양을 얼마나 대표할 것인가 하는 의문이 있음에도 불구하고, 병리의사는 생검을 통하여 얻은 소량의 암조직을 바탕으로 최대한 유용한 정보를 제공할 필요가 있다. 이를 위하여 여러 가지의 예후 관련 생물표지자 발현 혹은 분자생물학적 검사를 고려할 때, 환자의 치료와 예후에 연관성이 높은 위주로 우선 순위를 정할 필요가 있다.

(1) 2004 WHO 폐암분류에 의거한 세부 진단

일단, 분화가 나쁜 암종에서 비소세포암종이라는 일반적 진단명을 가능하면 피하기를 권장하고, 암세포의 형태학적 특성과 분화 방향을 면밀히 관찰하여 최대한 세분화된 조직학적 분류를 하는 것이 필요하다. 다른 장기와 달리, 공기주머니로 이루어져 빈 공간이 많은 폐장의 특성은 암세포가 성장할 때 다양한 모양을 획득할 수 있게 하여 선암종과 편평상피세포암종의 구분조차 어려울 때가 있는 것이 현실이다. 일단 통상적 조직 검사에서 2004 WHO 폐암 분류에서 권고한 바와 같이 선암종, 편평상피세포암종, 대세포암종 등으로 분류하기를 권장한다[13].

(2) 면역조직화학검사 및 mucin 염색을 통한 보조 진단법의 활용

통상적 H&E 염색만으로 세부 진단이 여의치 않은 경우 CK5/6, CK7, TTF-1, p63 등의 진단 마커 패널을 이용하여 면역조직화학검사법을 추가할 수 있다. CK7과 TTF-1은 선암종에 보다 흔히 발현되며, CK5/6, p63은 편평상피세포암종에서 발현이 잘 되지만, 절대적이지는 않다[14]. 대개 병리의사가 암종에 대한 형태학적 지식을 모두 동원하여도 진단이 애매한 증례는 면역조직화학검사법으로 단백 발현을 추가 검사하더라도 명확히 구분되지 않는 경우가 드물지 않다.

3) 소량의 생검 조직에서 조직 소모를 최소화하는 생물표지자 탐색 전략

폐암에서 예후 및 치료제 연관 예측 인자로 검증된 생물표지자는 EGFR 변이와 ALK 전위를 들 수 있다. 그 외에 항암치료제 반응을 예측할 수 있다고 알려진 생물표지자로는 excision repair cross complementing gene 1 (ERCC1), ribonucleotide reductase M1 (RRM1), thymidylate synthase 발현 등이 알려져 있다[15].

소량의 생검 조직으로 이 모든 것을 그때그때 필요하다고 생각되어 시행하다 보면, 검사를 시행할 만한 조직이 남지 않게 되고, 생물표지자 검사를 위하여 또 다시 환자에게 침습적 생검을 시행하기란 쉽지 않다. 그러므로, 수술이 불가능하여 암조직의 채취가 어려운 환자의 경우 환자의 치료에 가장 필요하고, 임상적 특성을 종합하

여 가장 의심되는 생물표지자를 우선적으로 선택하여 시행하는 전략적 접근이 필수적이며, 이는 내과-영상의학과-병리과-흉부외과의 다학제간 협력이 전제가 되어야 한다. 필자가 근무하고 있는 분당서울대병원에서는 수술이 불가능한 비소세포폐암, 특히 선암종 환자에서는 우선적으로 3 μm 두께의 조직절편 2장을 제작하여 ALK 단백발현에 대한 면역조직화학염색을 시행하고, 혹시 시행하게 될지 모를 ALK FISH test를 대비하여 unstained section 1장을 남겨둔다. 그 후, 비교적 절편이 많이 필요한 EGFR 변이 검사용 unstained section (10 μm 두께의 section 8장 정도)은 그 다음에 파라핀 블록을 절단하도록 하고 있다. 이 절차대로 하면, EGFR 변이 검사 시행 후 음성으로 나와서 추가로 ALK 검사 등을 시행하려 할 때 조직이 모두 소모되어 검사를 시행할 수 없는 상황을 최소화할 수 있다. 면역조직화학염색의 결과는 대개 1-2일 이내로 결과가 나오므로, 그 결과를 바탕으로 추가적으로 꼭 필요한 분자 진단 검사 절차를 시행할 수 있다. 이는 병리의사에 의하여 검증되고 표준화한 생물표지자 결과를 활용할 때, 치료 방침 수립에 필요한 시간을 절약할 뿐만 아니라, 고가의 FISH 검사 등을 무작위로 하기 보다는 선별된 환자를 대상으로 시행함으로써 의료비 절감에도 도움이 된다(Fig. 1)[16,17].

2. EGFR 변이 테스트를 시행함에 있어서 주의할 점

1) 한국인 남성, 흡연자, 폐선암종의 29.4%가 EGFR 변이 양성

폐의 선암종이 특히 주목 받고 있는 이유는 비흡연자에서 가장 흔히 발생하는 폐암이며, 상대적으로 암유전자 변이와 강한 연관성을 가지고 있기 때문이다. 서론에서 간략히 소개한 바와 같이 폐암에서 EGFR 유전자 변이에 대한 경험은 폐암의 발생 기전에 대한 분자생물학적 지식의 진보와 더불어 진단과 치료 전략의 수립에 지대한 영향을 끼쳤다. 이에 대해서는 아래에서 다시 자세히 소개하겠

지만, 일단 예후인자로 검증된 EGFR 변이 검사는 반드시 시행하기를 권장한다. 분당서울대병원 단일 기관의 경험에 의하면, 여성, 비흡연자, 선암종에서 papillary 혹은 lepidic (bronchioloalveolar) pattern을 보이는 환자군의 70%에서 EGFR 변이가 진단되어 기존에 보고된 빈도보다 상당히 높은 소견을 보였다. 그 뿐만 아니라, 남자 폐선암 환자의 34%, 흡연한 남자 선암종 환자의 29.4%에서 EGFR 변이가 진단되었다[17]. EGFR TKI 치료 효과는 성별, 흡연 여부 혹은 조직학적 진단명보다 EGFR 변이 여부에 더욱 연관성이 높다. 그러므로, 임상적 특성만으로 EGFR 변이 여부를 판단하기보다는 실제 폐암 조직에서 EGFR 변이 검사를 시행하여 확인하는 것이 필요하다.

2) EGFR 변이 검사 방법의 표준화 및 가이드라인 수립의 필요성

폐암 조직검사서 EGFR 변이가 확진된 환자는 EGFR TKI 치료 대상이 될 뿐만 아니라, gefitinib의 경우 2011년 4월부터 국내에서도 일차항암치료제로 급여 인정이 되고 있다. 그러므로, 이제 폐암, 특히 선암종의 진단과 치료방침의 수립에 있어서 병리의사가 폐암 조직에서 암세포를 선별하여 DNA를 추출하고 EGFR 변이를 얼마나 신속, 정확하게 진단하는가와 더불어, EGFR 변이 검사의 민감도 및 특이도에 영향을 주는 요소를 꼼꼼하게 정도 관리하는 것이 중요한 과제가 될 전망이다. EGFR 변이는 발암과정의 초기에 관여하는 주요 발암유전자로 간주되므로 중앙 세포내부의 이질적 분포는 없는 것으로 추측된다[18]. 그러나, 암종의 경우 주변의 간질세포, 염증 세포, 혈관세포 등 정상 세포와 섞여 있고 암세포만 순수하게 채취해 내는 것이 어려우므로 EGFR 변이를 가지는 암세포와 EGFR 정상 세포의 혼재로 인하여 변이 시그널이 약하게 나타날 가능성이 있다. 특히 EGFR TKI에 반응이 좋은 exon 21번 L858R 돌연변이 시그널은 돌연 변이가 있는 중앙 세포가 얼마나 밀도가 높은가에 따라서 시그널과 노이즈를 구분하기 어려운 경우가 있다. 그러므로 EGFR 변이 테스트를 할 때, 조직을 어떻게 다룰 것이며, 어떤 방법을 쓸 것인가 하는 것이 주요한 이슈이다. 2013년 세계폐암학회, 미국병리학회, 미국분자병리학회에서는 폐암에서 분자병리검사를 어떻게 시행하는 것이 이상적인지 합의를 이룬 가이드라인을 제시하였다[19]. 현재 우리 나라에서는 염기서열분석법을 이용한 EGFR 검사만이 비급여 수가 인정되고 있으나, 외국에서는 실시간 유전자 증폭, PNA/LNA clamp, pyrosequencing, cycleave 방법 등이 다양하게 이용되고 있다[20-23]. 직접염기서열분석법의 경우 알려지지 않은 유전자 변이를 찾아낼 수 있는 장점이 있는데 비하여, 중앙 세포의 비율이 25% 이상일 때 돌연변이를 찾아 낼 수 있다고 알려져 비교적 민감도가 낮은 것이 단점이다. 그러므로 DNA 추출 시 중앙 세포의 순도를 높이는 과정이 필수적이며, 이는 중앙 세포의 선택적 절제술 등을 통하여 중앙 세포를 선별해내는 과정이 동반되어야만 위음성 결과가 낮아짐을 의미하므로, 현실적으로

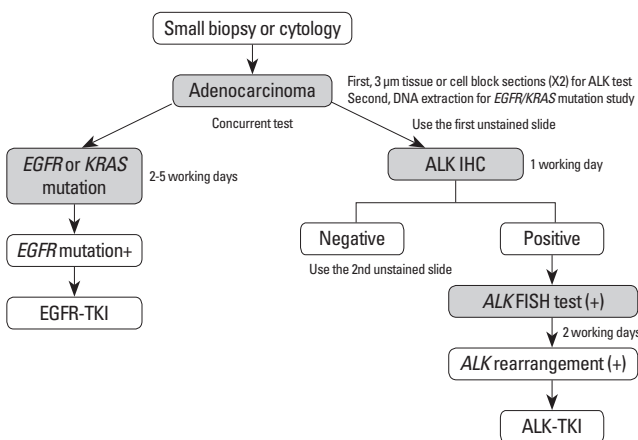


Fig. 1. Molecular testing guideline in pulmonary adenocarcinoma using small biopsy or cytology. Ref. 16 with permission from Elsevier.

는 보다 민감도가 높은 방법을 병용할 필요가 있다 하겠다.

3. 폐암에서 ALK 유전자 전위

2007년 폐암에서 EML4-ALK 유전자전위가 강력한 발암인자임이 Mano 그룹에 의해 밝혀지고, 특정 표적치료제에 중앙 치료 효과가 입증되면서 ALK 유전자에 대하여 많은 연구가 집중되고 있다 [5-9]. 현재 ALK 양성 폐암환자군의 특성은 EGFR 변이를 보이는 환자군과 상당부분 겹치고 있는데, 선암종, 비흡연자, 젊은 연령층이며, 성별은 여성이 조금 많은 경향을 보이나, 선암종내에서는 남녀 차이는 뚜렷하지 않다 [16,24]. ALK 양성 폐암환자군은 전체 폐암환자의 4-7%가 ALK 유전자 전위 양성으로 밝혀지고 있는데, 현재 ALK 유전자 전위를 진단하는 기준은 FISH 방법이다. 그러나, FISH 방법은 고가의 검사(비급여, 30-40만원)일 뿐만 아니라, 암실에서 형광현미경을 이용하여 고배율(1,000배) 시야에서 100개 이상의 중앙 세포를 찾고, ALK TK domain 양쪽에 붙인 작은 시그널 2개가 서로 분리되어 있는지 여부(2 signal size distance 이상 분리된 경우 ALK FISH+세포로 간주)를 찾아내야 하는 노동집약적 과정을 거쳐야 한다. 이 방법의 단점은 형광현미경하에서 중앙 세포와 주변에 포함된 정상 세포를 명확히 가려내기가 어렵고, ALK 유전자가 흔히 inversion을 일으키는 EML4 유전자의 위치가 매우 근접하여(2p23; 2p21) 시그널 분리를 정확히 측정하기가 대단히 어렵다는 점이라 하겠다. 백 등이 제안한 ALK 유전자 전위 선별법은 ALK 단백 발현을 면역조직화학검사법으로 찾아내는 것으로 민감도 100%, 특이도 96.2%에 이르는 우수한 성적을 보여 임상적으로 유용하게 활용하고 있다 [16,25,26].

결 론

폐선암종에서 강력한 발암유전자의 발견 및 표적치료제의 개발은 암조직을 다루고 진단하는 병리의사에게 새로운 화두를 던지고 있다. 환자의 조직에서 세분화된 병리학적 분류와 더불어 정확하고 표준화된 암유전자 및 치료 예측 인자 관련 정보를 제공함으로써 생물표지자 기반의 치료전략 수립의 토대를 만들 수 있는데, 이는 상호 협조적인 다학제 협진이 전제되어야 한다.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by grants from the Korea Healthcare technology R&D project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (A111405) and the Basic Science Research Program through.

The National Research Foundation of Korea (NRF), which is funded by the government of Korea (2013-59757).

REFERENCES

1. Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004;304:1497-500.
2. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004;350:2129-39.
3. Fukuoka M, Wu YL, Thongprasert S, Sunpaweravong P, Leong SS, Sriuranpong V, et al. Biomarker analyses and final overall survival results from a phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung cancer in Asia (IPASS). *J Clin Oncol* 2011;29:2866-74.
4. Weinstein IB. Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science* 2002;297:63-4.
5. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 2007;448:561-6.
6. Palmer RH, Vernersson E, Grabbe C, Hallberg B. Anaplastic lymphoma kinase: signalling in development and disease. *Biochem J* 2009;420:345-61.
7. Wong DW, Leung EL, So KK, Tam IY, Sihoe AD, Cheng LC, et al. The EML4-ALK fusion gene is involved in various histologic types of lung cancers from nonsmokers with wild-type EGFR and KRAS. *Cancer* 2009;115:1723-33.
8. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2010;363:1693-703.
9. Camidge DR, Christensen J, Bang YJ, Shaw AT, Costa DB, Salgia R, et al. Addressing right drug/right target/right patient in phase I studies to accelerate bench to clinical benefit time: ALK gene rearrangements and the development of PF-02341066 in NSCLC. *J Thorac Oncol* 2010;5:S233.
10. Ladanyi M, Pao W. Lung adenocarcinoma: guiding EGFR-targeted therapy and beyond. *Mod Pathol* 2008;21 Suppl 2:S16-22.
11. Paz-Ares LG, Altug S, Vauray AT, Jaime JC, Russo F, Visseren-Grul C. Treatment rationale and study design for a phase III, double-blind, placebo-controlled study of maintenance pemetrexed plus best supportive care versus best supportive care immediately following induction treatment with pemetrexed plus cisplatin for advanced nonsquamous non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 2010;10:85.
12. Di Costanzo F, Mazzoni F, Micol Mela M, Antonuzzo L, Checcacci D, Saggese M, et al. Bevacizumab in non-small cell lung cancer. *Drugs* 2008;68:737-46.
13. Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris CC. Pathology and genetics: tumours of the lung, pleura, thymus, and heart. Lyon: IARC Press; 2004. Chapter 1, Tumours of the lung: 9-124.
14. Loo PS, Thomas SC, Nicolson MC, Fyfe MN, Kerr KM. Subtyping of undifferentiated non-small cell carcinomas in bronchial biopsy specimens. *J Thorac Oncol* 2010;5:442-7.
15. Coate LE, John T, Tsao MS, Shepherd FA. Molecular predictive and prognostic markers in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* 2009;10:1001-10.
16. Paik JH, Choi CM, Kim H, Jang SJ, Choe G, Kim DK, et al. Clinicopathologic implication of ALK rearrangement in surgically resected lung cancer: a proposal of diagnostic algorithm for ALK-rearranged adenocarcinoma. *Lung Cancer* 2012;76:403-9.
17. Sun PL, Seol H, Lee HJ, Yoo SB, Kim H, Xu X, et al. High incidence of

- EGFR mutations in Korean men smokers with no intratumoral heterogeneity of lung adenocarcinomas: correlation with histologic subtypes, EGFR/TTF-1 expressions, and clinical features. *J Thorac Oncol* 2012;7:323-30.
18. Yatabe Y, Matsuo K, Mitsudomi T. Heterogeneous distribution of EGFR mutations is extremely rare in lung adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2011;29:2972-7.
 19. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, Chitale DA, Dacic S, Giaccone G, et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol* 2013;8:823-59.
 20. Pao W, Ladanyi M. Epidermal growth factor receptor mutation testing in lung cancer: searching for the ideal method. *Clin Cancer Res* 2007;13:4954-5.
 21. Tanaka T, Nagai Y, Miyazawa H, Koyama N, Matsuoka S, Sutani A, et al. Reliability of the peptide nucleic acid-locked nucleic acid polymerase chain reaction clamp-based test for epidermal growth factor receptor mutations integrated into the clinical practice for non-small cell lung cancers. *Cancer Sci* 2007;98:246-52.
 22. Kawada I, Soejima K, Watanabe H, Nakachi I, Yasuda H, Naoki K, et al. An alternative method for screening EGFR mutation using RFLP in non-small cell lung cancer patients. *J Thorac Oncol* 2008;3:1096-103.
 23. Kimura H, Fujiwara Y, Sone T, Kunitoh H, Tamura T, Kasahara K, et al. High sensitivity detection of epidermal growth factor receptor mutations in the pleural effusion of non-small cell lung cancer patients. *Cancer Sci* 2006;97:642-8.
 24. Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, Digumarthy SR, Costa DB, Heist RS, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol* 2009;27:4247-53.
 25. Paik JH, Choe G, Kim H, Choe JY, Lee HJ, Lee CT, et al. Screening of anaplastic lymphoma kinase rearrangement by immunohistochemistry in non-small cell lung cancer: correlation with fluorescence in situ hybridization. *J Thorac Oncol* 2011;6:466-72.
 26. Kim H, Jang SJ, Chung DH, Yoo SB, Sun P, Jin Y, et al. A comprehensive comparative analysis of the histomorphological features of ALK-rearranged lung adenocarcinoma based on driver oncogene mutations: frequent expression of epithelial-mesenchymal transition markers than other genotype. *PLoS One* 2013;8:e76999.