

ORIGINAL ARTICLE

SRF-FOXO1 and *SRF-NCOA1* Fusion Genes Delineate a Distinctive Subset of Well-differentiated Rhabdomyosarcoma

Marie Karanian, MD,† Daniel Pissaloux, PhD,*† Anne Gomez-Bouchet, MD, PhD,‡
Carole Chevenet, MD,§ François Le Loarer, MD, PhD,|| Carla Fernandez, MD,¶
Veronique Minard, MD, PhD,# Nadege Corradini, MD,** Marie-Pierre Castex, MD,††
Adeline Duc-Gallet, MSc,† Jean-Yves Blay, MD, PhD,†‡‡ and Franck Tirede, PhD†*

汇报人：刘家艳

背景

◆ 横纹肌肉瘤RMS

- 是15岁以下婴幼儿和儿童最为常见的一种软组织恶性肿瘤，约占儿童恶性肿瘤的3%--4%。也是青少年常见的软组织肉瘤之一。
- RMS的各种亚型与年龄关系密切。
- 可发生于躯体任何部位，但主要的3个好发部位依次为头颈部、躯干（包括泌尿生殖道）和四肢。
- 是一种高度恶性的软组织肉瘤，预后差，应采取多学科综合治疗。

◆ 2013版WHO

- 心脏横纹肌瘤 8900/0
- 心脏外横纹肌瘤
 - 成人型 8904/0
 - 胎儿型 8903/0
 - 生殖道型 8905/0
- 横纹肌肉瘤
 - 胚胎性 8910/3
 - 腺泡状 8920/3
 - 多形性 8901/3
 - 梭形细胞/硬化性 8912/3

横纹肌肉瘤

	胚胎性RMS	腺泡状RMS	多形性RMS	梭形细胞/硬化性RMS		
				VGLL2/NCOA2 重排型	MyoD1 突变型	TFCP2 重排型
比例	最常见， 49%-60%	仅次于ERMS， 31%	少见，5%以下	少见，5-10%		
年龄	10岁以下婴幼儿和儿童，中位年龄8岁	10-25岁青少年，中位年龄16岁	45岁以上中老年，中位年龄50-56岁	均<5岁，大多<3岁，部分为先天性	2-94岁，青少年和成年均可发病	少，11-86岁，大多成年人
部位	好发于头颈部、泌尿生殖道和盆腔腹膜后	好发于四肢深部软组织，其次为头颈部，以及躯干、会阴等	多位于下肢，尤其是大腿，其次是躯干等	软组织	头颈部（1/3），躯干和四肢、其它	主要发生于骨，尤其颅面骨
形态	瘤细胞形态多样，重演了骨骼肌胚胎发育各阶段的细胞。可见分化较为原始的小圆形细胞，也可见各种形态的横纹肌母细胞	主要为形态单一的原始小圆细胞，部分显示骨骼肌分化，以形成腺泡状结构为特征	可见异型性明显的大圆形细胞、多边形细胞和梭形细胞，显示骨骼肌分化特征，但不含有ERMS或 ARMS的成分。	间质硬化、纤维化或富于细胞	纯硬化、梭形或混杂，可见原始未分化细胞	梭形和上皮样混杂或纯上皮样（1/3）
分子改变	11p15.5杂合性丢失	PAX3-FOXO1 PAX7-FOXO1	复杂 1p22/1p23等增加， 10q23等丢失	VGLL2-NCOA2 、 VGLL2-CITED2 、NCOA2-SRF 等	MyoD1 p.L122R 突变	TFCP2-EWSR1 TFCP2-FUS

- SRF（血清反应因子）位于6p21，编码MADS-box家族转录因子，参与细胞生长、迁移、细胞骨架和肌生成的调控。在骨骼肌、平滑肌和心肌分化中发挥作用。
- FOXO1，也称FOXO1A、FKH1或FKHR，位于13号染色体，属于Forkhead box蛋白O转录因子家族，在骨骼肌分化和纤维特化中起重要作用。
- NCOA1（核受体辅助活化因子1）位于2p23.3，编码SRC1（类固醇受体辅助活化因子1）蛋白，属于p160 SRC家族，参与染色质重塑，并对核受体转录调控起重要作用。

材料与amp;方法

- 3个病例
- 免疫组化 (Ki-67 , Desmin , Myogenin , Myod1)
- RNA测序(STAR-Fusion, FusionMap, FusionCatcherm, EricScript)
- FISH (NCOA1、SRF分离探针及FKHR双色分离探针；计数至少50个不重叠的完整细胞核中的FISH信号，如果大于20%的细胞核显示与重排一致的信号模式（橙色和绿色信号分开或单个橙色信号而没有相应的绿色信号），则认为阳性)
- 比较基因组杂交(CGH)
- Sanger 测序

结果

- 临床特征

TABLE 1. Clinical Features

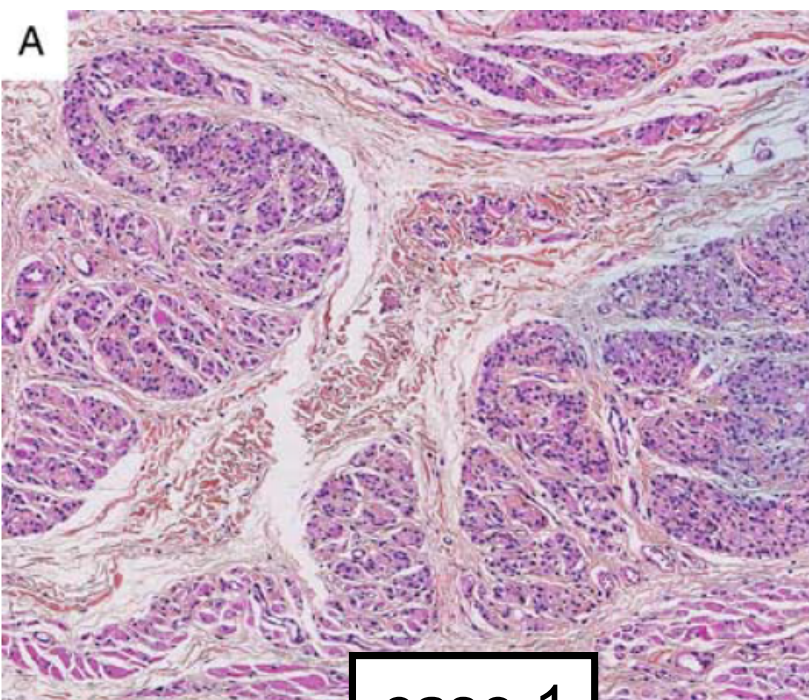
Tumor Sample	Age at Diagnosis	Sex	Location	Size (cm)	Treatment	Local Relapse and Treatment (mo)	Outcome	Follow-up (mo)
Case 1	1 y, but present at birth	Male	Paraspinal muscles	6	First incomplete resection Second complete resection Chemotherapy	No	AWOD	108
Case 2	10 mo, but present at birth	Female	Paraspinal muscles	6.5	Incomplete resection Chemotherapy and complete resection	No	AWOD	12
Case 3	3 y	Male	Paraspinal muscles	6	Incomplete resection Chemotherapy	Yes (6) Complete resection Radiotherapy	AWOD	18

AWOD indicates alive without disease.

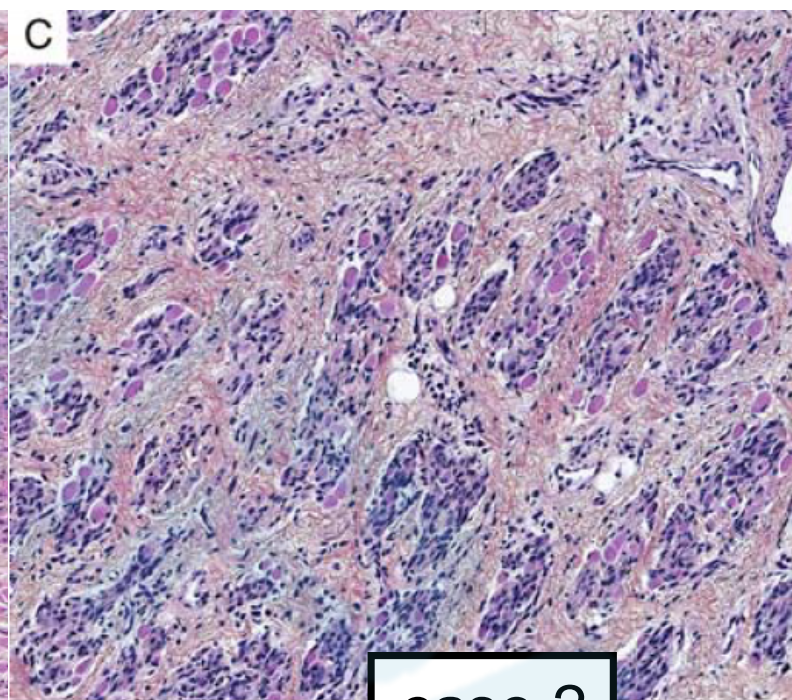
- **病理特征**

- 3例均表现为以高分化的成肌细胞/横纹肌母细胞为主，因此主要考虑的鉴别诊断为高分化RMS和胎儿型横纹肌瘤。但因浸润性的边界和核异型性，最终诊断为RMS。
- 3例呈现出相同的特征性的生长模式：外周可见中度异型的成肌细胞，在纤维间质中形成小束状；中心可见大面积的成肌细胞，梭形或横纹肌样，异型性显著。

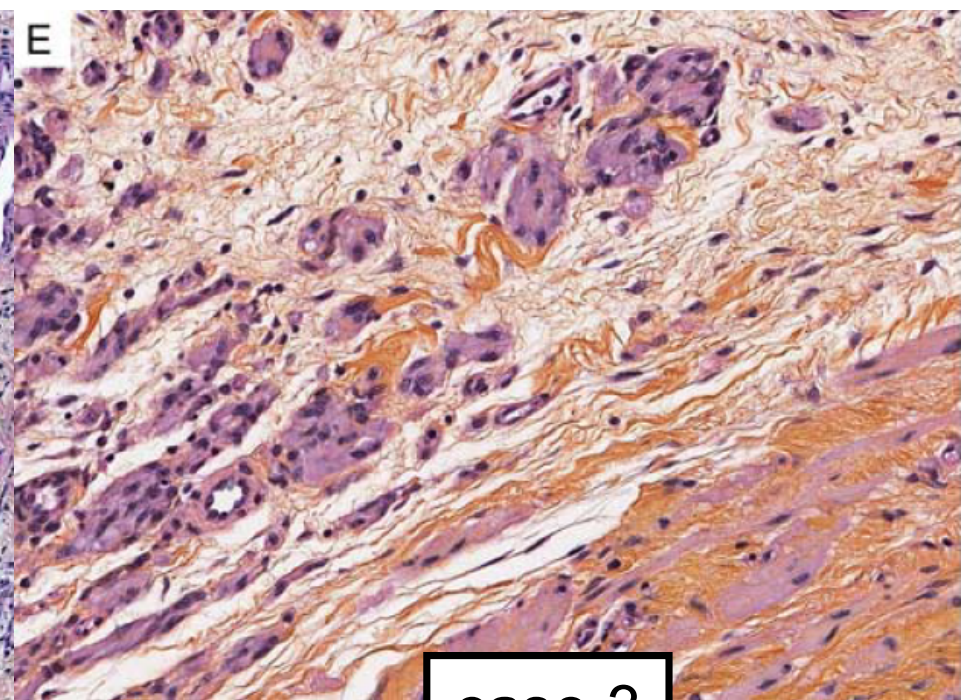
- 病例1中，中心由梭形和横纹肌样细胞呈长束状、交错排列，细胞质丰富、嗜酸性，细胞核大、有非典型性，染色质致密、颗粒状。未见有丝分裂和坏死。
- 病例2中，中心可见梭形细胞为主的区域、横纹肌样细胞为主的区域，以及两种细胞混合的区域。细胞核异型性明显，可见数个核分裂。
- 病例3中，两种成肌细胞均可见，但以球状的、嗜酸性细胞质和偏位的、圆形细胞核为主。细胞核有不典型性，核大，核仁明显，但没有核分裂。
- 免疫组化染色，3例desmin均弥漫阳性，myogenin和myoD1不同程度阳性，Ki-67增殖指数分别为5%、20%和10%。



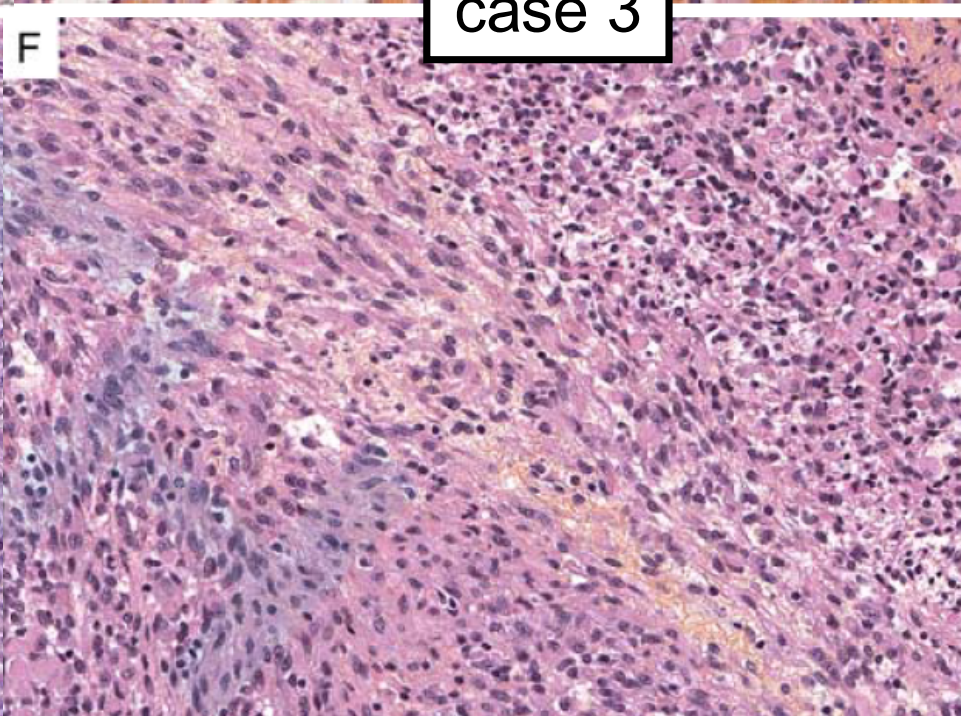
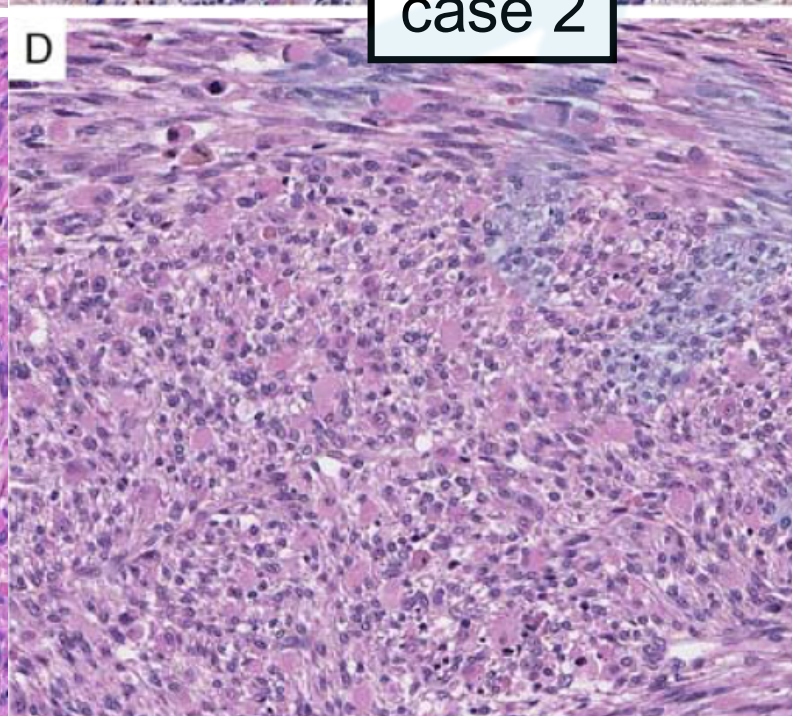
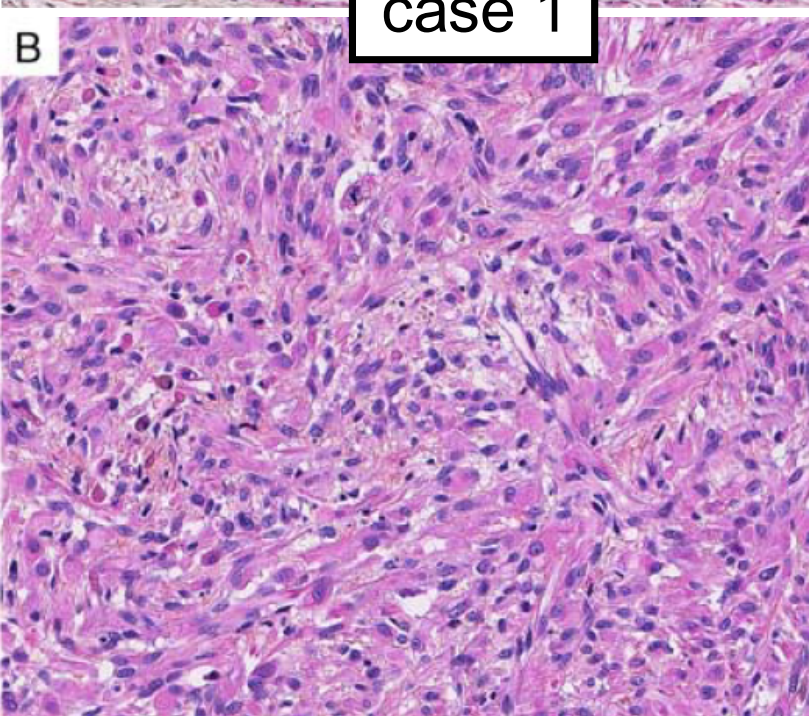
case 1



case 2



case 3



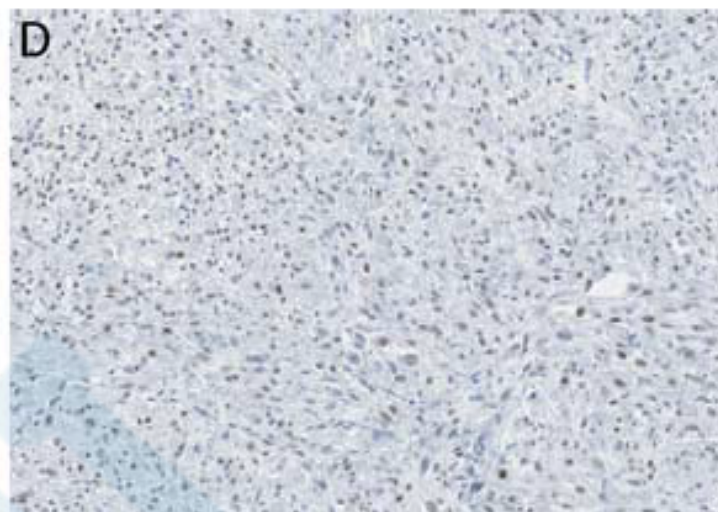
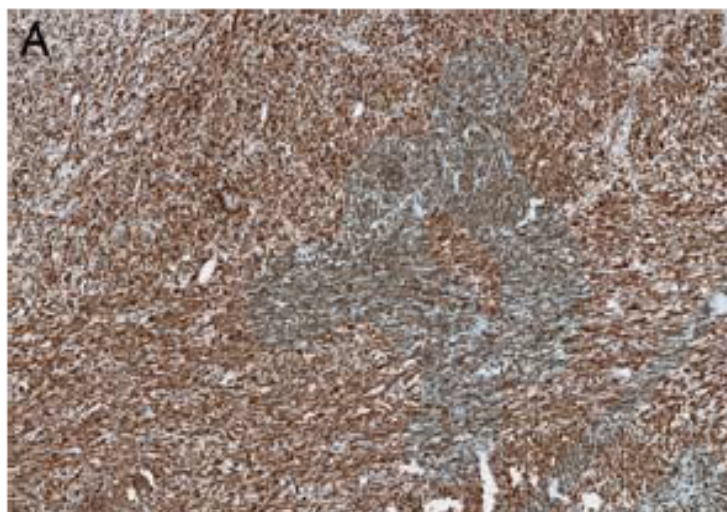
Desmin

MyoD1

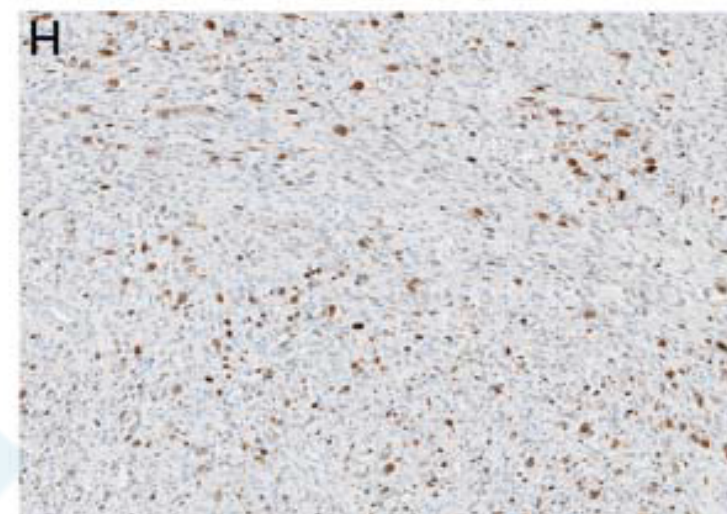
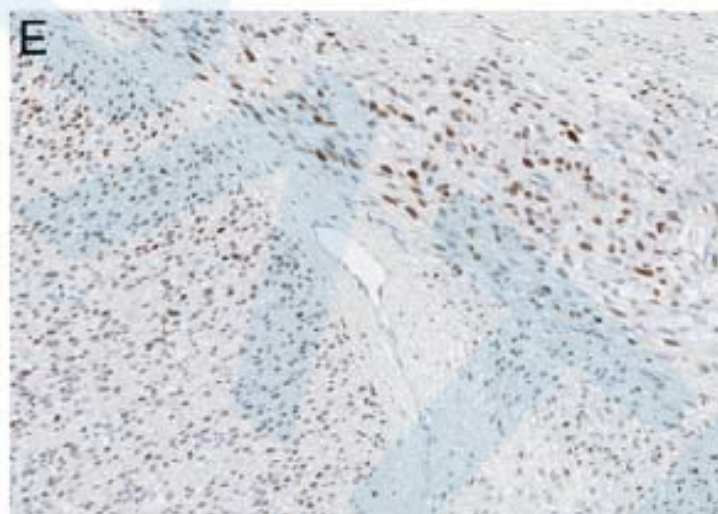
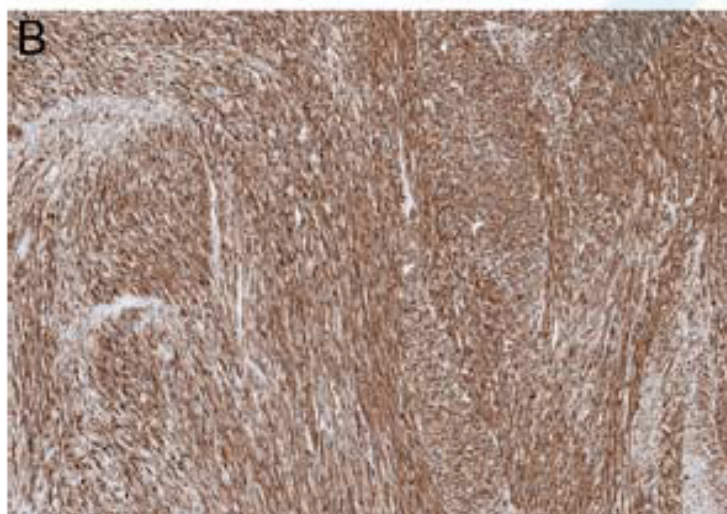
Ki-67

case

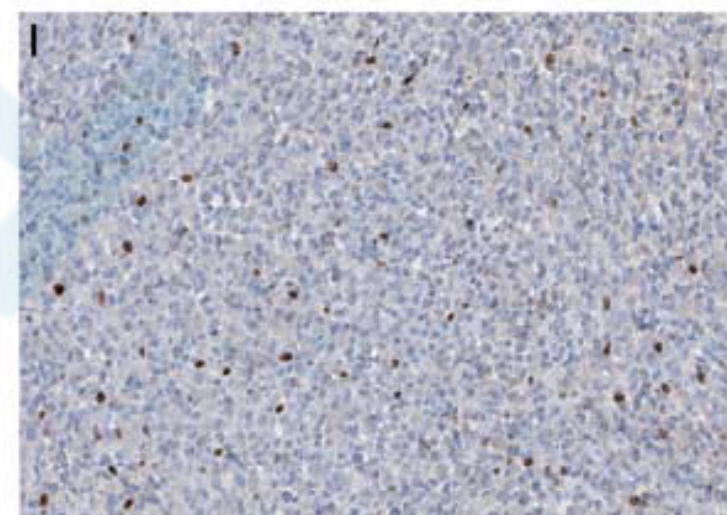
1



case 2



case 3



- 分子改变

- 融合基因检测

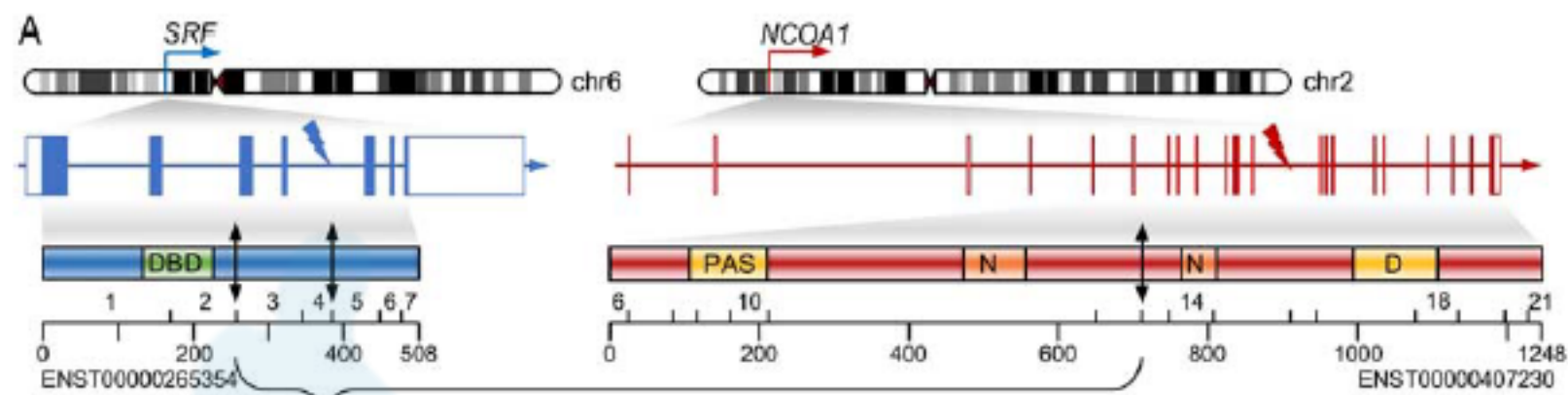
- ✓ 对3个病例均行RNA测序，并用RT-PCR及Sanger测序验证。
- ✓ 3例均检测到涉及SRF基因的融合基因。
- ✓ 病例1和3检测到SRF-NCOA1融合，包括由SRF外显子2 (ENST00000265354)与NCOA1外显子13 (ENST00000407230)产生的移码突变，以及SRF外显子4和NCOA1外显子13产生的框内异构体。
- ✓ 病例2检测到SRF-FOXO1融合，连接SRF外显子6(ENST00000265354)和FOXO1外显子2(ENST00000379561)。

TABLE 2. RNA-sequencing Fusion Gene Detection and Sanger Validation

Tumor Sample	Mapped Reads	FM	SF*	ES*	FC*	Frame Prediction	Fusion_Transcripts	Sanger Validation
Case 1	11,904,575	NF	1/1	3/4	NF	Frameshift	SRF_ENST00000265354_(e2)— NCOA1_ENST00000407230_(e13)	NA
		NF	NF	NF	NF	In-frame	SRF_ENST00000265354_(e4)— NCOA1_ENST00000407230_(e13)	Yes
Case 2	14,345,532	7	19/20	28/24	18/10	In-frame	SRF_ENST00000265354_(e6)— FOXO1_ENST00000379561_(e2)	Yes
Case 3	102,086,271	7	10/46	NF	7/45	Frameshift	SRF_ENST00000265354_(e2)— NCOA1_ENST00000407230_(e13)	NA
		35	53/46	115/101	21/45	In-frame	SRF_ENST00000265354_(e4)— NCOA1_ENST00000407230_(e13)	Yes

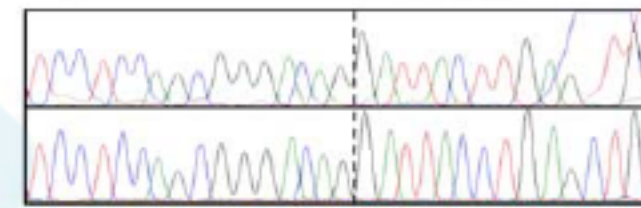
*The first number is the number of split reads and the second number is the number of span reads.

ES indicates ERICScript; FC, FusionCatcher; FM, FusionMap; NA, not assayed; NF, not found; SF, STAR-Fusion.



Case 1

Case 3

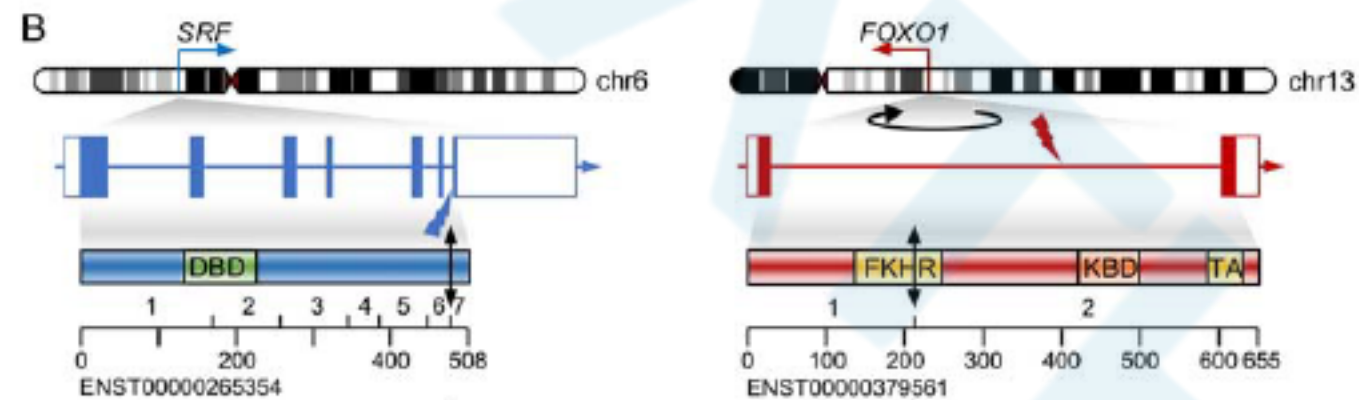


TCCTCCAGCGGGACAGGATTACCTGAGCTG

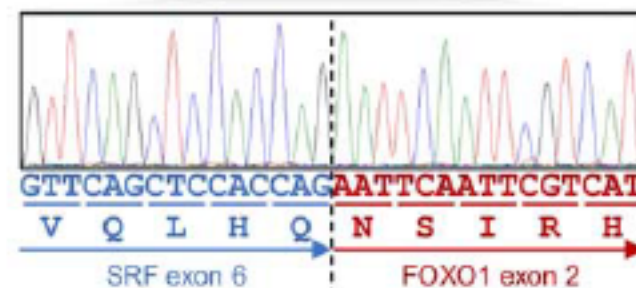
S S S G T G L P E L

SRF exon 4

NCOA1 exon 13



Case 2



➤ 基因分析

- ✓ 对SRF、FOXO1和NCOA1基因进行FISH检测验证重排结果。
- ✓ 3个样本80%到90%的细胞中发现了SRF的重排(图4A)，病例1和3中70%的细胞出现NCOA1重排(图4B)，病例2中80%的细胞出现FOXO1重排(图4C)。

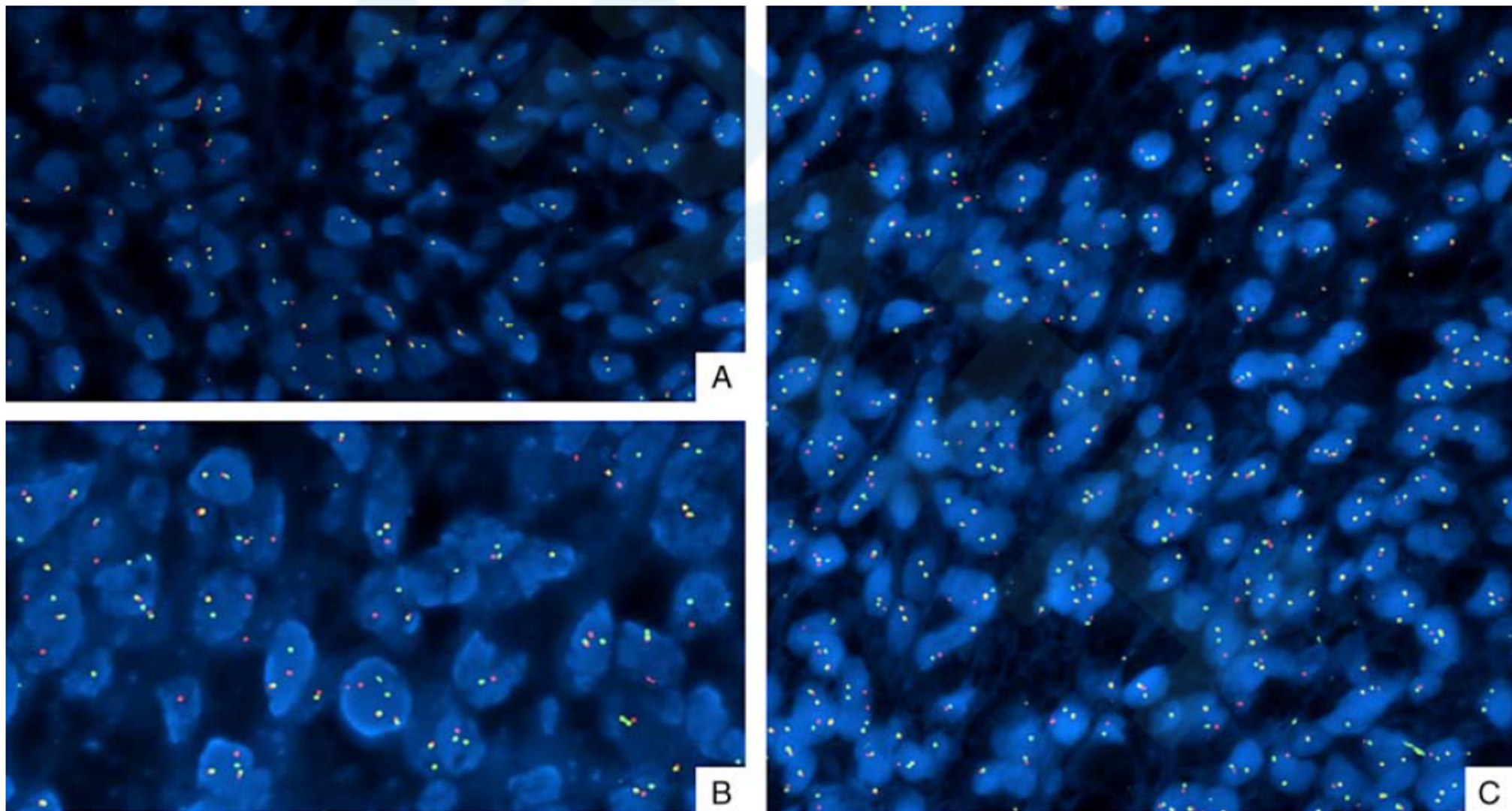


FIGURE 4. FISH analysis. Nuclei showing *SRF* rearrangement case 1 (A), nuclei showing *NCOA1* rearrangement in case 3 (B), and *FOXO1* rearrangement in case 2 (C).

- CGH检测发现除了11号染色体在所有样本中都有增加外，3个样本的拷贝数变异谱各不相同。
- 2例SRF-NCOA1阳性病例(病例1，3)均显示出整个X染色体的增加，病例1中染色体1、2、6部分失衡，病例3中16q部分丢失。
- SRF-FOXO1阳性病例(病例2)表现出更复杂的基因组改变，3、8、11、17、20号染色体和X染色体增加，以及6p25.3-21.1和13q14.11-q31.3(FOXO1位点)的局部增加。
- 病例1和2中检测到6p21(SRF位点)断裂。
- 3例均未出现PTCH1位点缺失（PTCH1突变与胎儿型横纹肌瘤相关）。

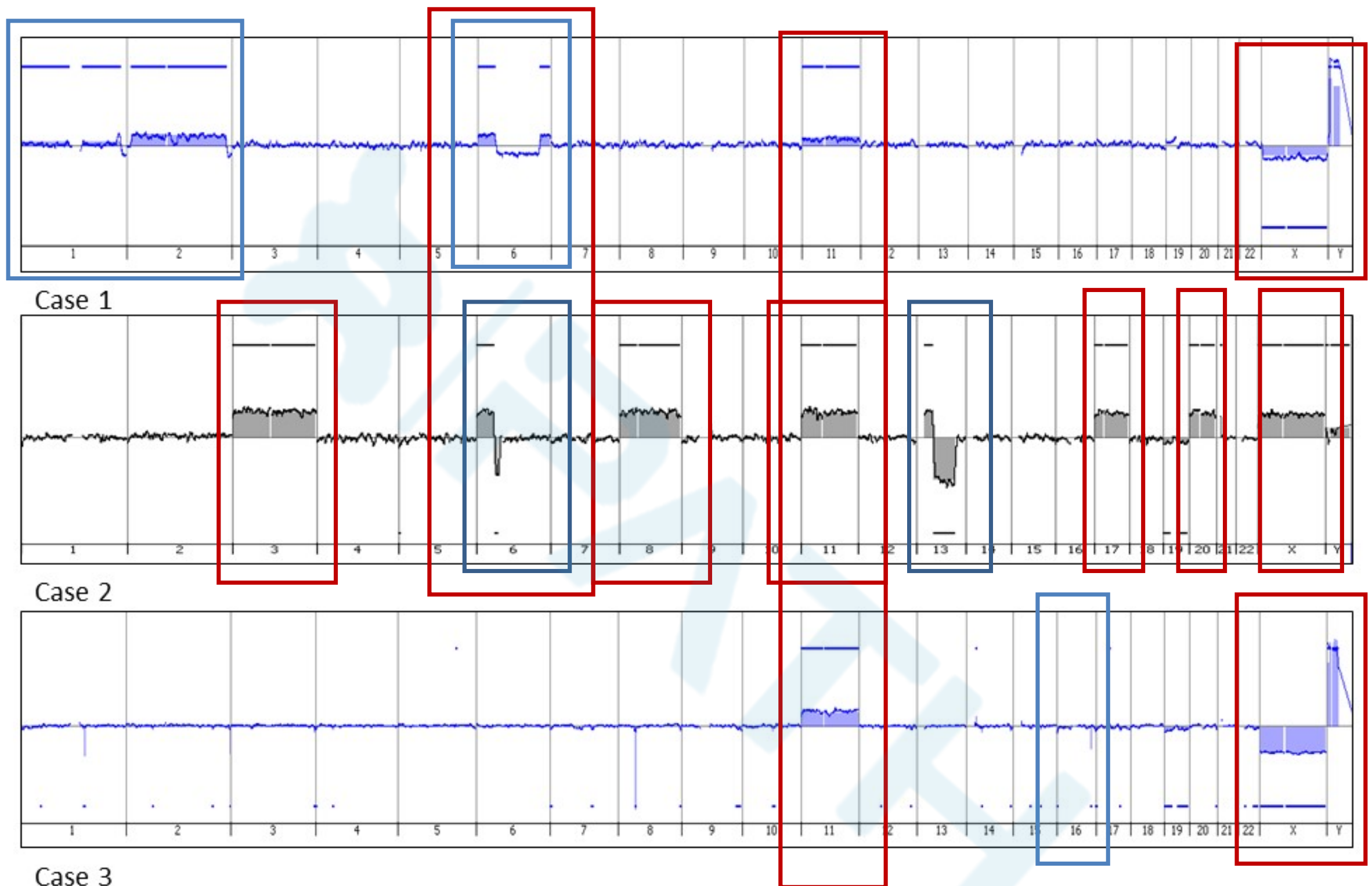


Figure S: Array comparative genomic hybridization showed a recurrent gain of the whole chromosome 11.

➤ 基因表达分析

- ✓ 对不同类型RMSs组成的更大的群体进行一致性聚类分析。

3例SRF融合性RMS

6例经典型胚胎性RMS

4例伴VGLL2/TEAD1-NCOA2/CITED2重排的梭形细胞RMS

8例腺泡状RMS

3例无基因改变的梭形细胞RMS

3例MYOD1p.L122R突变RMS

7例EWSR1/FUS-TFCP2融合性上皮样和梭形细胞RMS

2例PTCH1缺失性横纹肌瘤

- ✓ 结果显示，除了梭形细胞RMS外，其他不同类型的RMS分别形成了一致的转录组。
- ✓ 并且，本文的3例高分化RMS聚集在一起，形成一个与其他类型骨骼肌肿瘤明显分离的群体。
- ✓ 将SRF融合性RMS与其他类型RMS进行比较，发现与肌肉分化和功能相关的上调基因高度富集，同时，与细胞周期/增殖途径相关基因下调。
- ✓ 携带SRF结合位点的基因也上调，这与融合基因中存在SRF-DNA结合位点相一致。
- ✓ 血栓反应蛋白ADAMTS8基因在SRF融合性RMS中的表达比其他类型RMS高30倍。

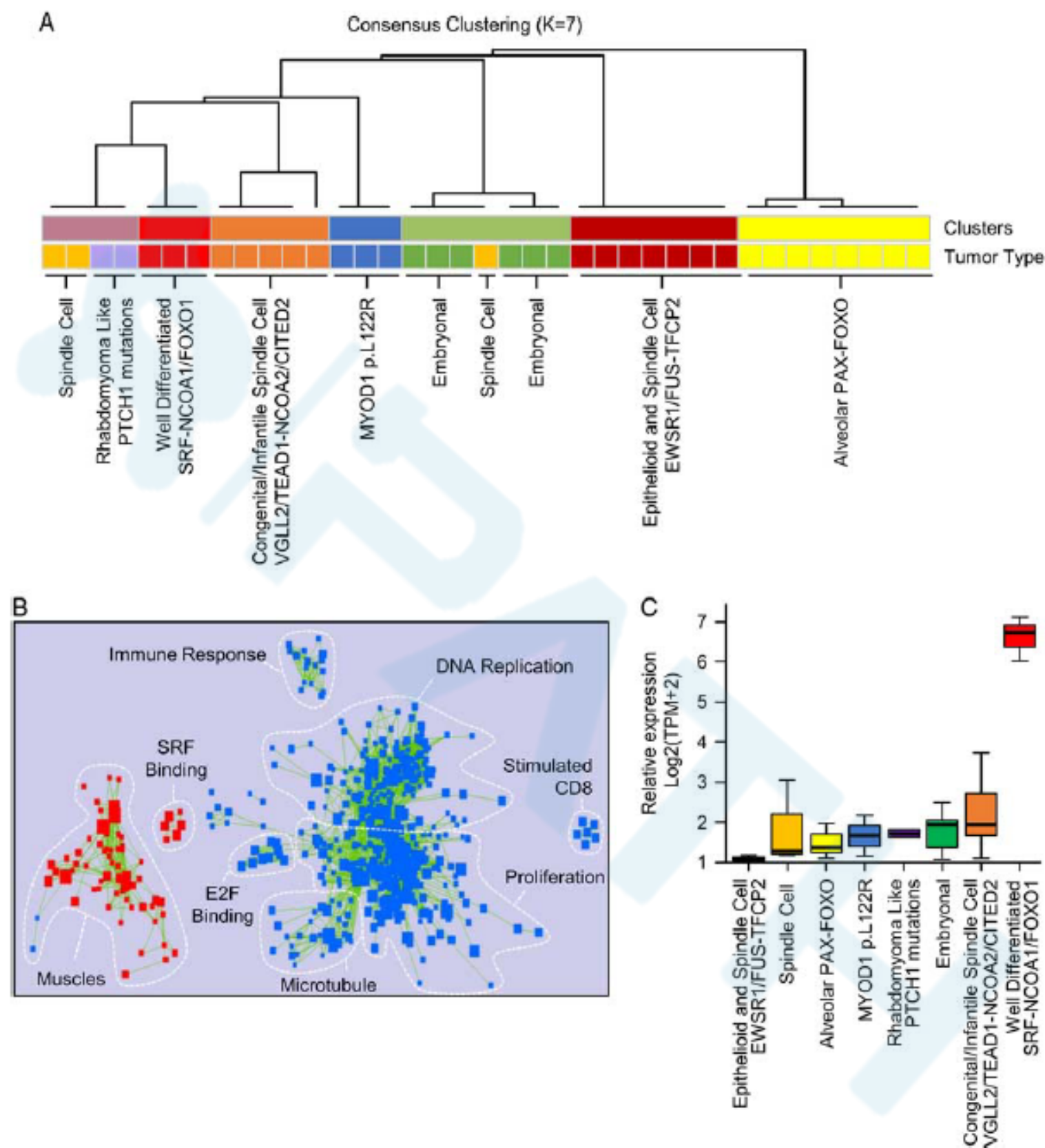


FIGURE 5. Specific expression signature assessed by RNA-sequencing. A, Unsupervised clustering analyses of skeletal muscle tumors. Consensus clustering was performed with 1000 permutations of 20% of the genes and 20% of the samples. B, Map of the significant GSEA gene sets either enriched (red) or depleted (blue) in *SRF*-fused RMSs compared with the other types of skeletal muscle tumors. C, *SRF*-fused tumors present a high expression level of the *ADAMTS8* transcript. TPM indicates transcript per million.

讨论

- 本文描述了一组SRF基因特异性易位的高分化RMS。
- 临床特征：这些肿瘤位于**深部椎旁肌肉**，发生于**新生儿至幼儿时期**。
- 组织学：这3例具有一致性的组织结构特征：**(i) 浸润性的边界，(ii) 高分化横纹肌母细胞样的不典型细胞，(iii) 排列模式，周边呈小结节状，中央为大片富于细胞区。**
- 浸润性的边界和细胞非典型性排除了胎儿型横纹肌瘤的诊断。
- 形态特征及其分子改变与目前RMS的分类均不符合。

- 最近报道的一组具有VGLL2-NCOA2融合的梭形细胞RMS包含SRF-NCOA2融合，因此，作者将本文的3例高分化RMS的组织学表现与VGLL2融合性RMS进行比较。
- **细胞形态不同：**仅1例TEAD1-NCOA2融合性病例发现罕见的散在细胞呈横纹肌母细胞样形态；VGLL2融合性RMS表现为长束状的未分化梭形细胞，胞质稀少；而所有SRF融合性RMS均显示出明显的肌肉分化，并且含有丰富的嗜酸性细胞质。
- **排列模式不同：**VGLL2-NCOA2融合性梭形细胞RMS表现为瘤细胞在纤维间质内呈长束状排列；而SRF融合性RMS则呈特殊的分区模式，其特征是边缘呈纤维间质内的小束状，中央为富含细胞的长束状。
- 因此，SRF融合性RMS的组织学形态与VGLL2融合性RMS极为不同，并由基因表达谱进一步支持。

- SRF融合性RMS的基因谱也不同于胚胎性RMS、腺泡状RMS、梭形细胞RMS、EWSR1/TFCP2融合性RMS和PTCH1缺失性横纹肌瘤。
- SRF融合性RMS的特征是少数整条染色体或染色体一部分的增多，杂合性丢失很少；而通常胚胎性RMS包含多量的染色体增多和丢失，腺泡状RMS主要以基因组扩增和易位为特征。
- 总之，组织学和基因谱改变都表明，SRF融合性RMS是骨骼肌肿瘤的一种新的特定亚型。但这组肿瘤的预后需要进行更大规模的评估。
- 本文3个病例中都发现ADAMTS8过表达，这是一种拮抗MAPK通路的蛋白质，许多肿瘤中发现DNA甲基化导致ADAMTS8沉默，但其过表达未见报道。因此，ADAMTS8是否在高分化RMS中发挥作用尚不清楚，但它可能是该实体的一个特殊的生物学标志物。

结论

- 总之，本文描述了3例高分化RMS，涉及2个新的融合基因：SRF-NCOA1和SRF-FOXO1。
- 这组病例形成了一个独特的临床、组织学和转录实体，并且这组新的骨骼肌肿瘤应改进RMS的分类。

谢谢

SRF-FOXO1和SRF-NCOA1融合基因显示出高分化横纹肌肉瘤的一个独特亚型

1. SRF-NCOA1 和 SRF-FOXO1融合性横纹肌肉瘤的主要特征**不包括**：
- A. 发生于新生儿至幼儿时期
 - B. 以分化较好的成肌细胞/横纹肌母细胞为主
 - C. 外周区域可见异型性明显的梭形和横纹肌样成肌细胞；中心区域成肌细胞呈中度核异型，在纤维间质中形成小束状
 - D. 无或罕见有丝分裂和坏死。

答案：C

- 2.与11p15.5杂合性丢失、PAX3-FOXO1、VGLL2-NCOA2相关的横纹肌肉瘤的亚型分别为
- A.胚胎性横纹肌肉瘤、腺泡状横纹肌肉瘤、梭形细胞横纹肌肉瘤
 - B.腺泡状横纹肌肉瘤、梭形细胞横纹肌肉瘤、胚胎性横纹肌肉瘤
 - C.多形性横纹肌肉瘤、腺泡状横纹肌肉瘤、梭形细胞横纹肌肉瘤
 - D.胚胎性横纹肌肉瘤、腺泡状横纹肌肉瘤、多形性横纹肌肉瘤

答案：A