Am J Surg Pathol 2018;42:1182–1189

Molecular Profiling of Hyalinizing Clear Cell Carcinomas Revealed a Subset of Tumors Harboring a Novel *EWSR1-CREM* Fusion

Report of 3 Cases

汇报人：付欣

指导老师：闫庆国教授

相关知识

1 透明细胞癌

2 与EWSR1基因整合相关的肿瘤

3 CREM

BACKGRUND:透明细胞癌

- **透明细胞癌**（clear cell carcinoma,CCC）是由单一形态的伴有水样透明胞质的上皮细胞组成的低度恶性上皮性肿瘤，无肌上皮分化的证据，是一种排他性诊断。

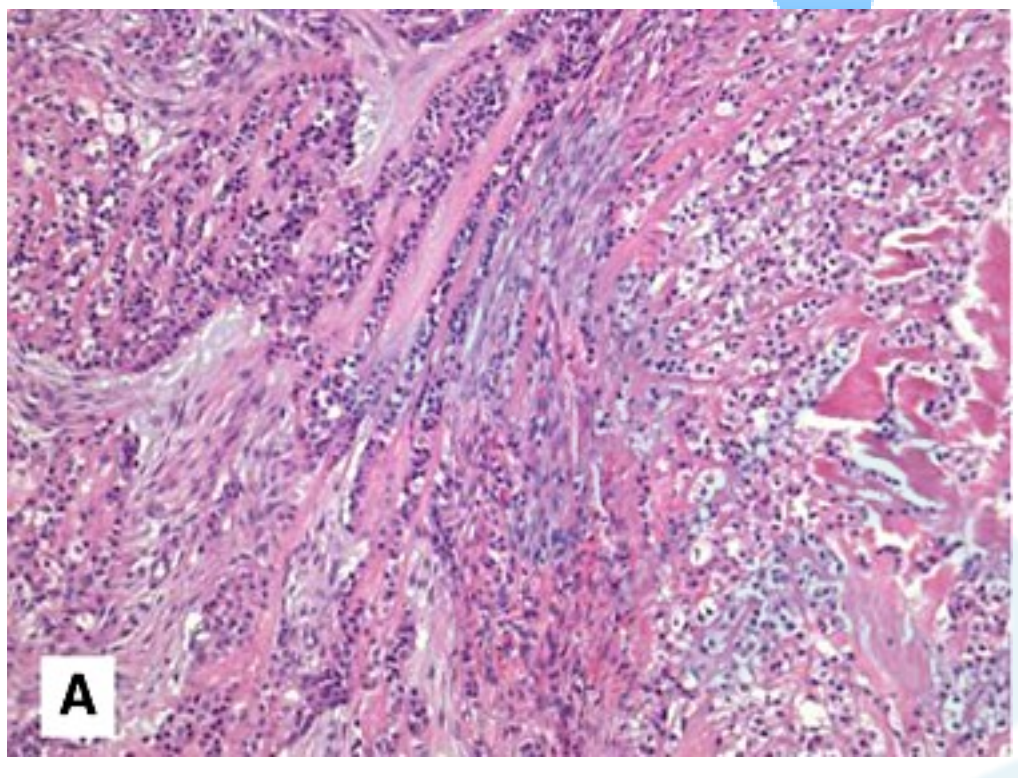
- CCC于1994年被Milchgrub 等人提出，因在其报道的这组肿瘤中，肿瘤间质大多存在明显的玻璃样变，故命名为伴玻璃样变的透明细胞癌。

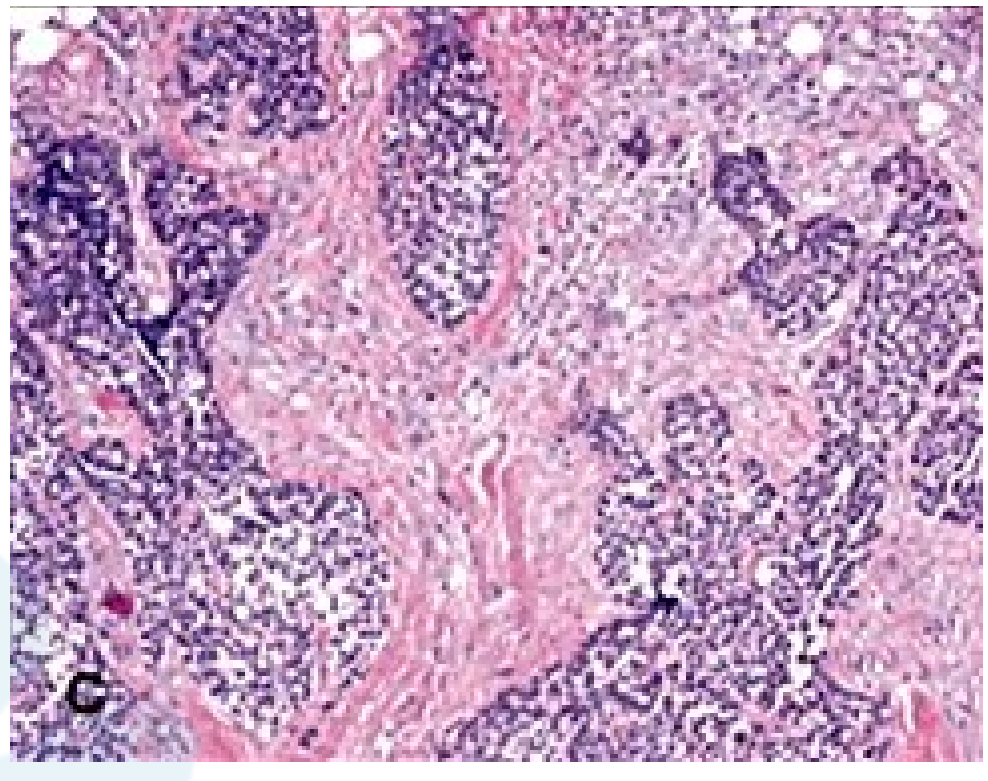
- 2005版WHO头颈部肿瘤分类中被命名为“透明细胞癌--非特殊类型”，将其列为WHO分类中新增加的一个肿瘤类型。

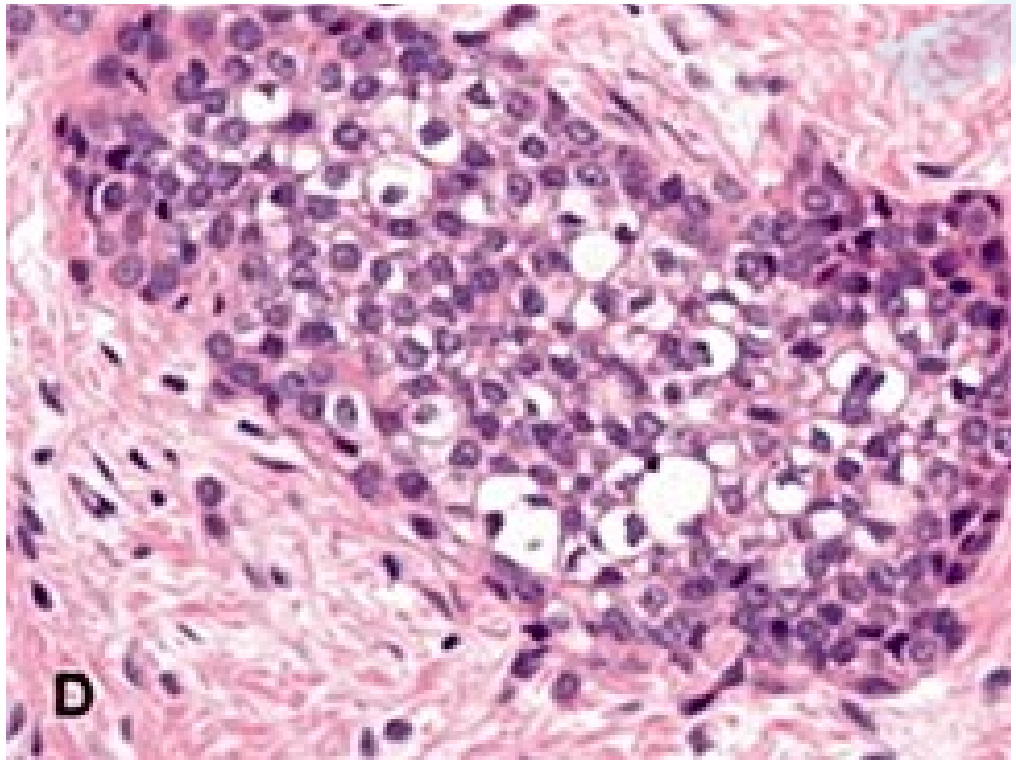
- 2017版WHO头颈部肿瘤分类中被简称为“透明细胞癌”。

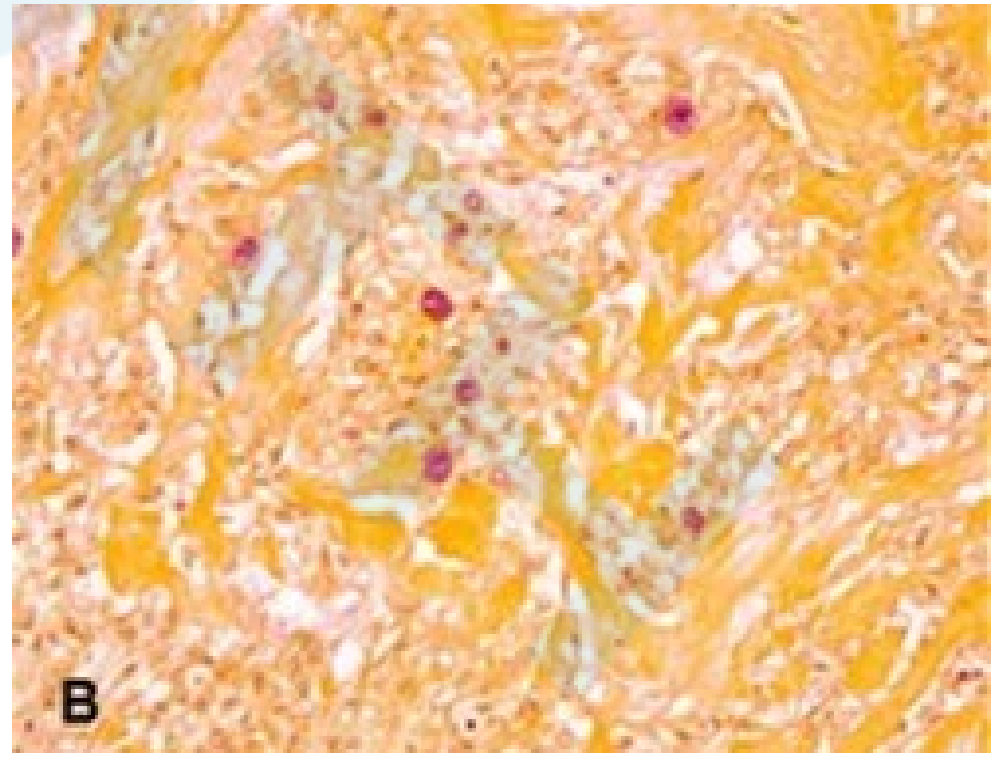
BACKGRUND:透明细胞癌

- 常发生于小涎腺， 尤其是腭部等处；
- 多见于40-70岁，平均55岁；
- 显微镜下瘤细胞形态大小相对较一致，呈圆形、卵圆形及多边形等，胞质丰富透明，细胞核的异型性较轻微，核分裂像少见；呈实性团块状、条索状、小梁状排列，间质可伴玻璃样变；
- 在肿瘤中透明细胞至少占所有瘤细胞成分的 50%；
- 肿瘤细胞胞浆 PAS 阳性，黏液染色阴性；
- 免疫组化：HCK和P63阳性；肌上皮阴性（与黏液表皮样癌相似）；
- 80%以上的CCC有EWSR1-ATF1融合基因。









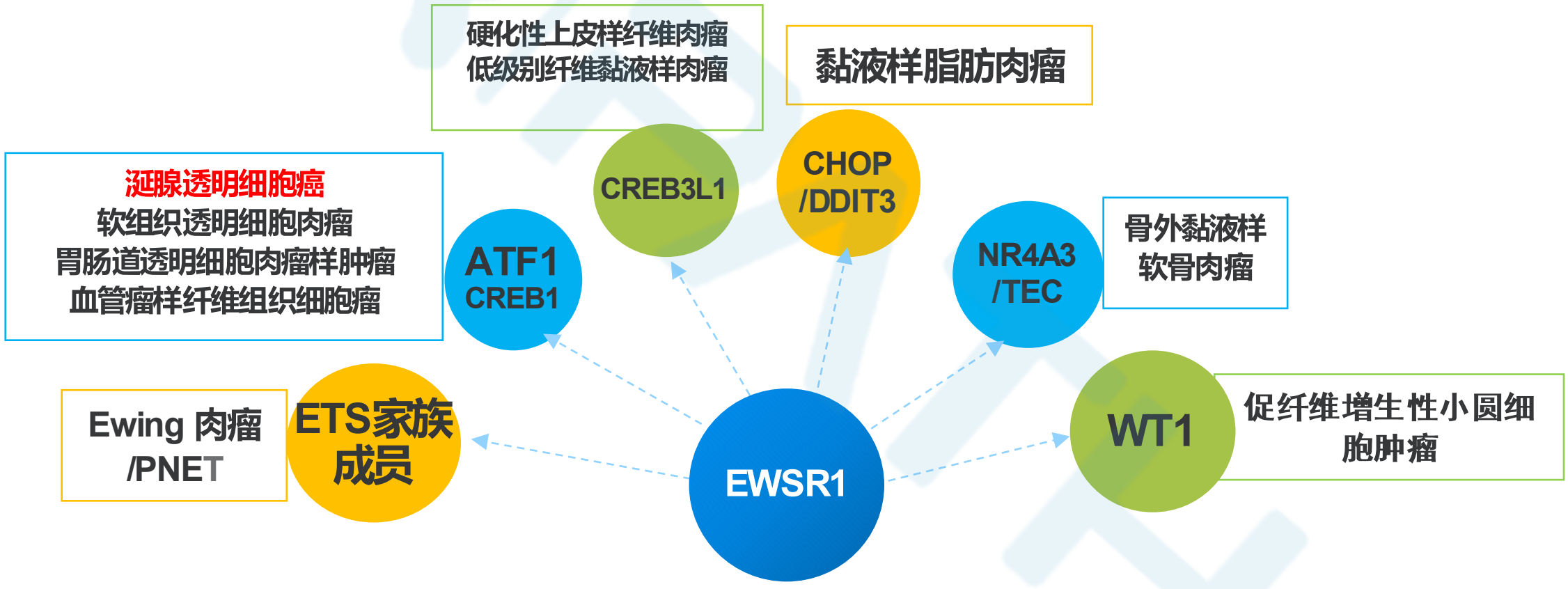
Head and Neck Pathol (2013) 7:S20–S29; GENES, CHROMOSOMES & CANCER (2011)50:559–570

涎腺可出现透明细胞的肿瘤

	原发	继发
良性	肌上皮瘤 嗜酸细胞瘤 皮脂腺瘤	
恶性	透明细胞癌 上皮－肌上皮癌 肌上皮癌 黏液表皮样癌 腺泡细胞癌 皮脂腺癌	肾癌 甲状腺癌 肺癌 前列腺癌 黑色素瘤

	常见部位	显微镜下	基因改变
透明细胞癌	小涎腺，尤其腭部	形态单一的透明细胞；间质内可见大量玻璃样变性物质沉积；	EWSR1-ATF1 PRKD1 突变
黏液表皮样癌	大涎腺	三种细胞：表皮样细胞、黏液细胞、中间型细胞； 当黏液表皮样癌中出现大量透明细胞，甚至以透明细胞为主时，称透明细胞型黏液表皮样癌； 肿瘤细胞巢外周可见少量表皮样细胞和中间细胞。	CRTC1-MAML2 CRTC3-MAML2 CDKN2A 缺失
肌上皮瘤	腮腺	肿瘤中存在4种基本的肿瘤性肌上皮细胞形态：梭形细胞、上皮样细胞、浆细胞样细胞、透明细胞样细胞； 当肿瘤以透明细胞型肌上皮细胞为主时，称透明细胞型肌上皮瘤； 免疫组化S-100及肌上皮标记阳性。	文献报道少数病例有TP53突变
腺泡细胞癌	腮腺的浅叶	腺泡样瘤细胞排列成腺泡状、结节状及条索状； 可见微囊形成及滤泡样结构； 若出现透明细胞，仅为局灶性。	
皮脂腺癌	腮腺	主要由分化程度不等的皮脂腺细胞所构成，瘤细胞异型性大，核分裂像较多见； 排列成大的巢状、团块状、小叶状；小叶的中央常为分化较好的皮脂腺细胞，在瘤细胞巢、团块及小叶的周边部常为基底样瘤细胞；	

BACKGRUND:与EWSR1基因整合相关的肿瘤



BACKGRUND:CREM

- **CREM（环磷酸腺苷反应元件调节因子）：**是cAMP反应元件结合蛋白（CREB）转录因子家族的成员之一；

- **CREB**家族有3个成员：CREB、CREM、ATF-1（转录活化因子1），它们组成一个CREB的亚群，都属于含碱性亮氨酸拉链结构(bZIPs)的转录因子家族，主要与cAMP等信号发生应答反应。

MATERIALS AND METHODS

- 收集3例具有异常形态，但最初被诊断为黏液表皮样癌（MEC）的病例，且这3例均通过RT-PCR和FISH进行了EWSR1-ATF1 和CRTC1/3-MAML2的检测；

- 但RT-PCR检测均阴性，FISH检测仅有EWSR1的融合，ATF1却是阴性的。

- 对这3个病例重新进行AMP分析、RT-PCR 、 Sanger 测序和FISH检测。

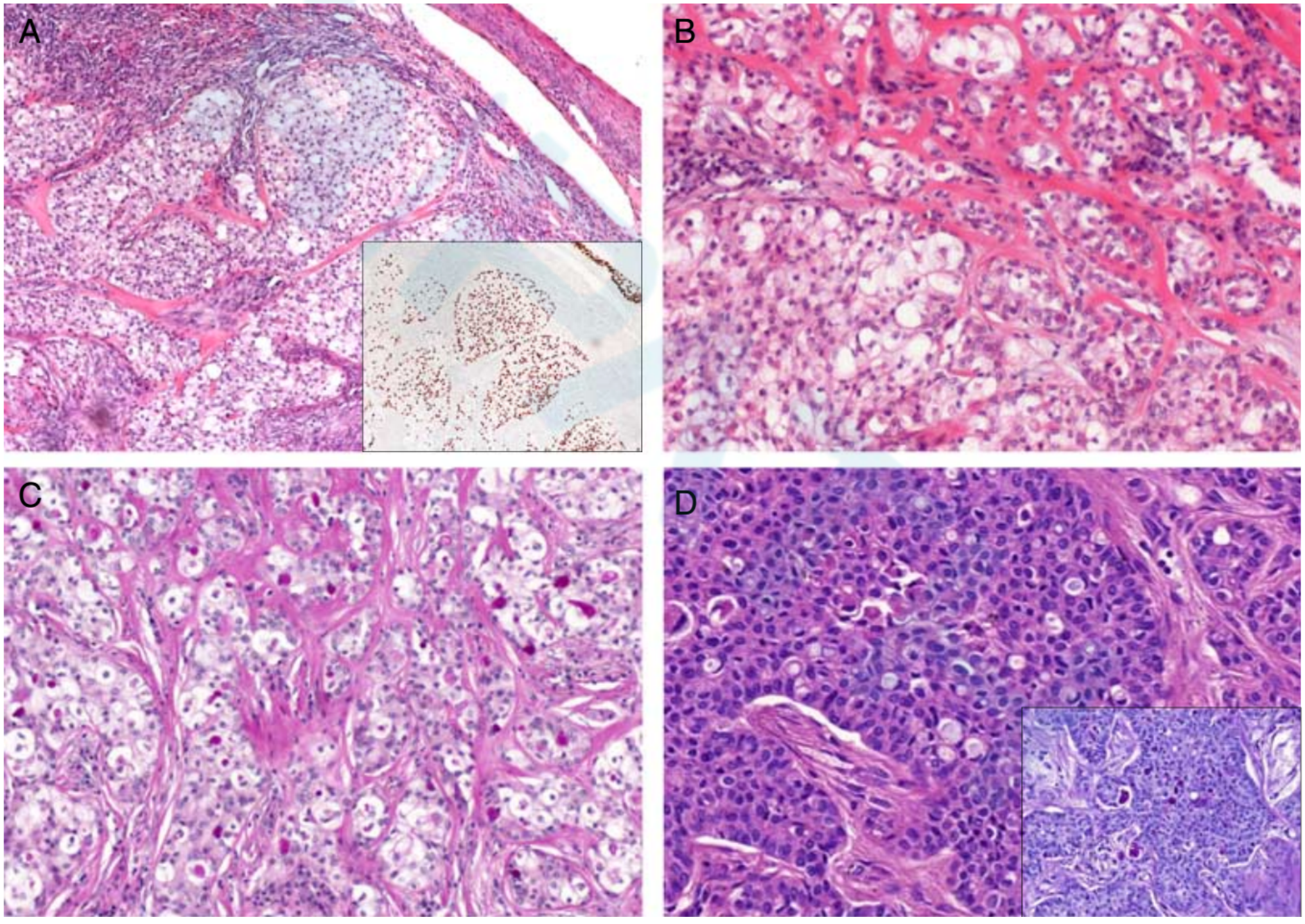
RESULTS

TABLE 1. Clinical and Pathologic Characteristics

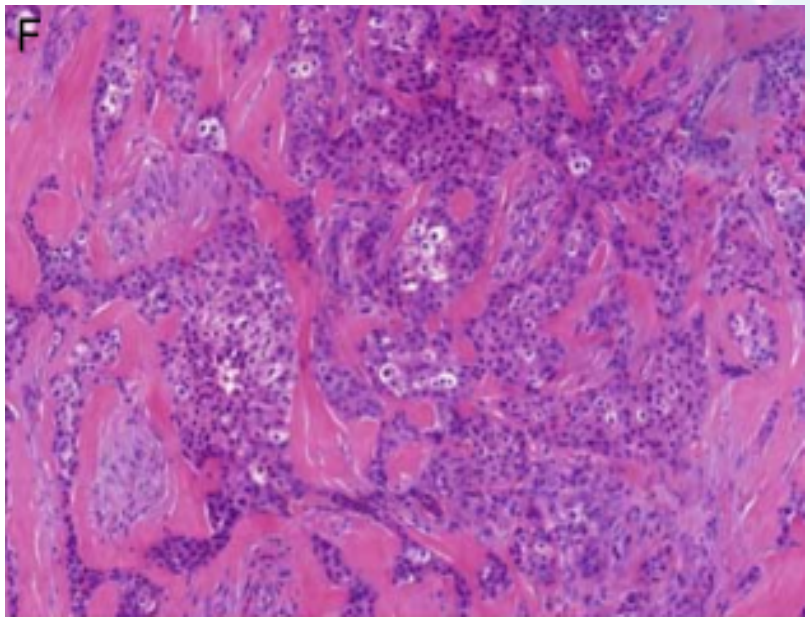
	Case 1	Case 2	Case 3
Age (y)/sex	68/F	75/F	62/M
Tumor location	Left base of tongue	Lower lobe of lung	Nasopharynx
Tumor size (mm)	30	9	10
Initial treatment	Excisional biopsy with positive margins	Resection of the lower lobe of lung, with clear margins	Excisional biopsy with positive margins
Original diagnosis of submitting pathologist	Mucoepidermoid carcinoma	Mucoepidermoid carcinoma	Mucoepidermoid carcinoma
Histochemistry	Focal positive for PAS-D	Focal positive for PAS-D	Focal positive for PAS-D
Immunohistochemistry	CK5, p63 positive (S-100, SMA negative)	CK7, p63, CK14 positive (S-100, SOX10, DOG1 negative)	CK7, p63, CK14 positive (S-100, SOX10 negative)
Initial FISH	*MAML2* break negative *EWSR1* rearrangement, *ATF1* intact	*MAML2* break negative *EWSR1* rearrangement	*MAML2* break negative *EWSR1* rearrangement
Initial RT-PCR	*CRTC1-MAML2*$^{-}$ *CRTC3-MAML2*$^{-}$	*CRTC1-MAML2*$^{-}$ *CRTC3-MAML2*$^{-}$	*CRTC1-MAML2*$^{-}$ *CRTC3-MAML2*$^{-}$
Follow-up	Transoral robotic surgery tumor bed reexcision and left level II-III lymph node dissection, all negative for residual tumor; no evidence of disease at 18 mo postsurgery	No evidence of disease at 8 mo postsurgery	No evidence of disease at 5 mo postsurgery

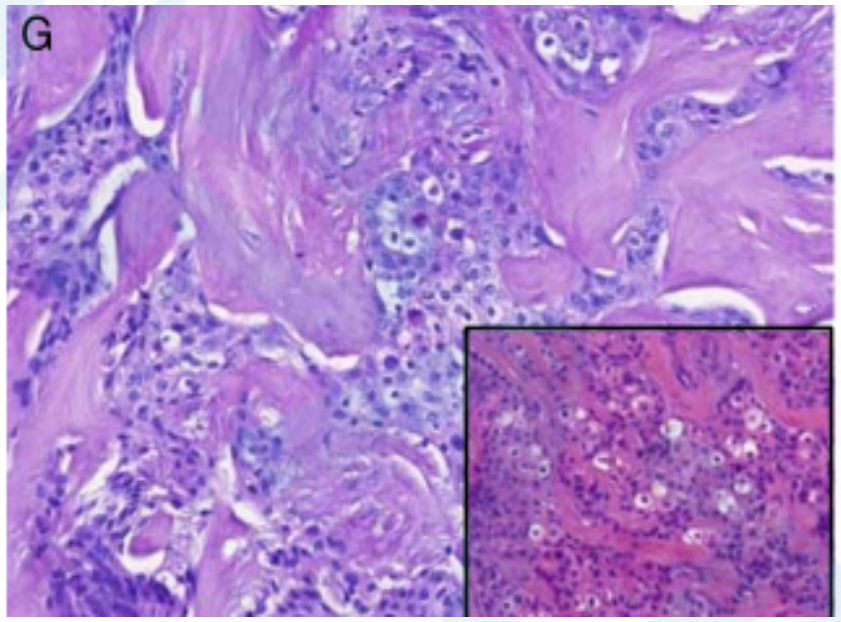
F indicates female; M, male; PAS-D, Periodic-acid-Schiff/Diastase.

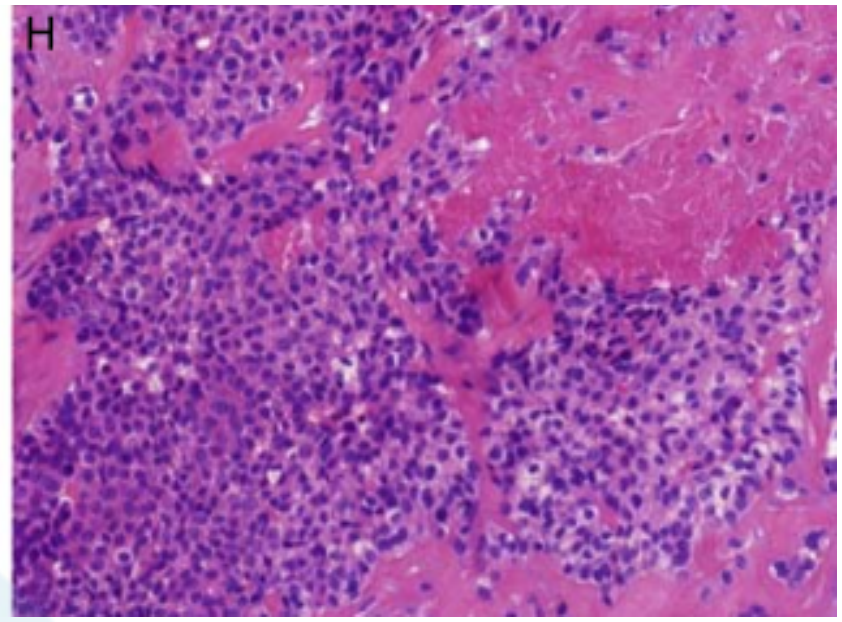
RESULTS



RESULTS







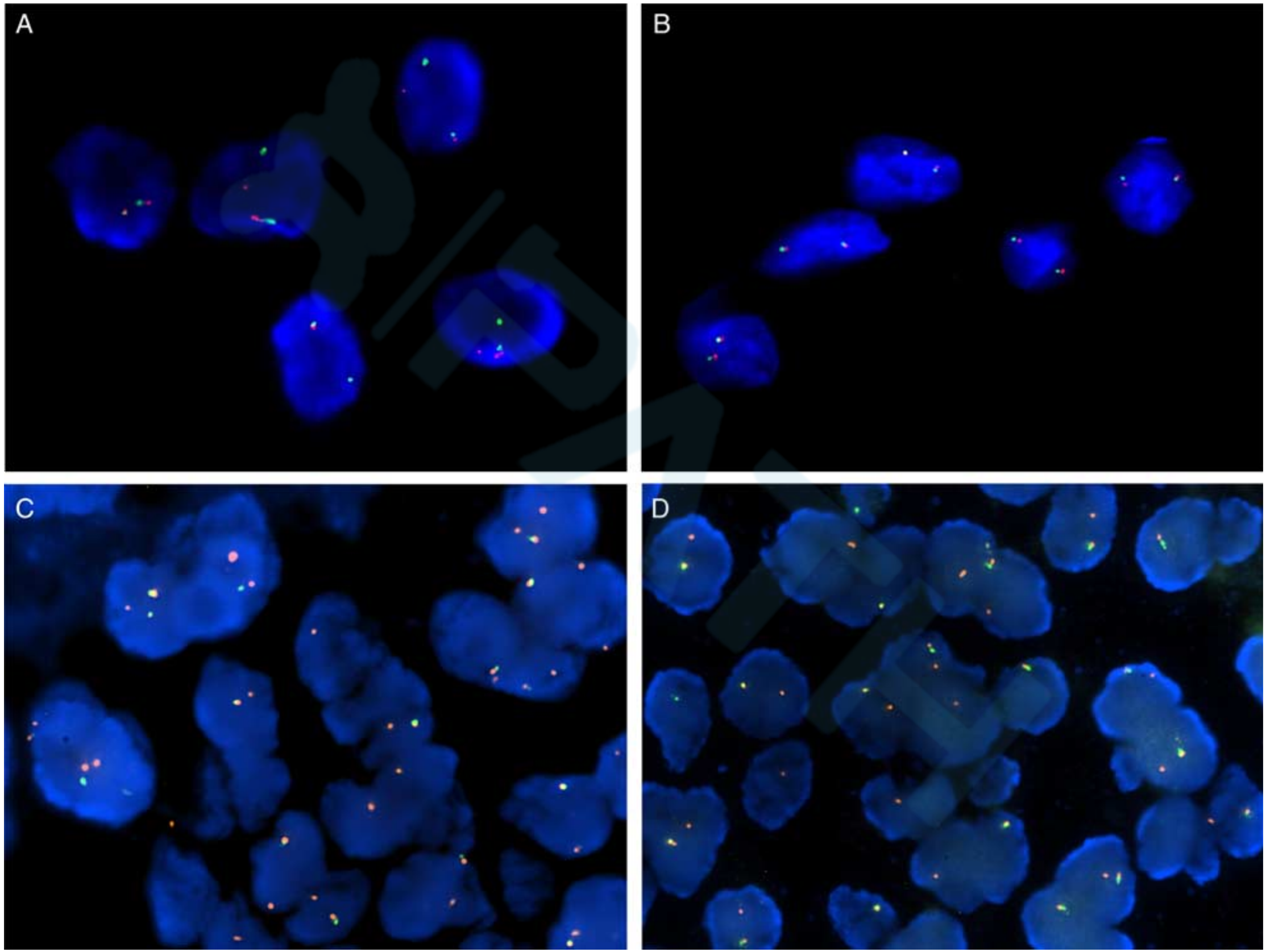
RESULTS：FISH

- Cases 1：EWSR1探针表现为两种异常模式：

在62%的细胞核中，有典型的EWSR1重排模式（在EWSR1的3′和 5′各一个信号）；

另有11%的细胞核显示：EWSR1的3′有融合信号；而5′的信号却丢失了，然而ATF1重排检测却是阴性；

- Cases 2 和case 3：EWSR1和CREM分离探针检测均阳性；


A
B
C
D

RESULTS: AMP Assay, RT-PCR and Sanger Sequencing

- AMP Assay:

  每个病例AMP的分析都证实有EWSR1和CREM的整合；

  Case 1：显示EWSR1的14号外显子与CREM 6号和5号外显子的融合；

  Case 2：显示EWSR1的14号外显子与CREM 6号外显子的融合；

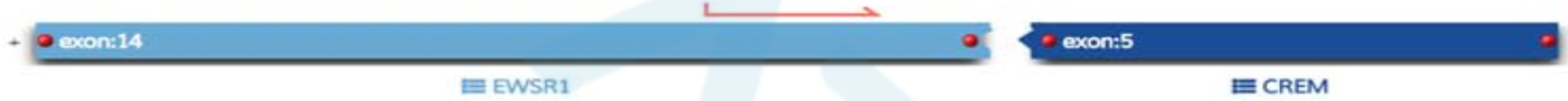
  Case 3：显示EWSR1的11号外显子与CREM 6号外显子的融合；

RESULTS: AMP Assay

A

GSP2s	Filters	Reads (#/%)	Start Sites
EWSR1_E_f_013_5_F_0_GSP2		9 / 7.7	7

GSP2s	Filters	Reads (#/%)	Start Sites
EWSR1_E_f_013_5_F_0_GSP2		9 / 7.4	8



B

GSP2s	Filters	Reads (#/%)	Start Sites
EWSR1_E_f_013_71_F_0_GSP2		22 / 5.5	17

C

GSP2s	Filters	Reads (#/%)	Start Sites
EWSR1_E_f_010_4_F_0_GSP2 EWSR1_E_f_009_53_F_0_GSP2 EWSR1_E_f_008_1_F_0_GSP2		476 / 23.7	81

RESULTS: AMP Assay, RT-PCR and Sanger Sequencing

- AMP Assay:

  每个病例AMP的分析都证实有EWSR1和CREM的整合；

  Case 1：显示EWSR1的14号外显子与CREM 6号和5号外显子的融合；

  Case 2：显示EWSR1的14号外显子与CREM 6号外显子的融合；

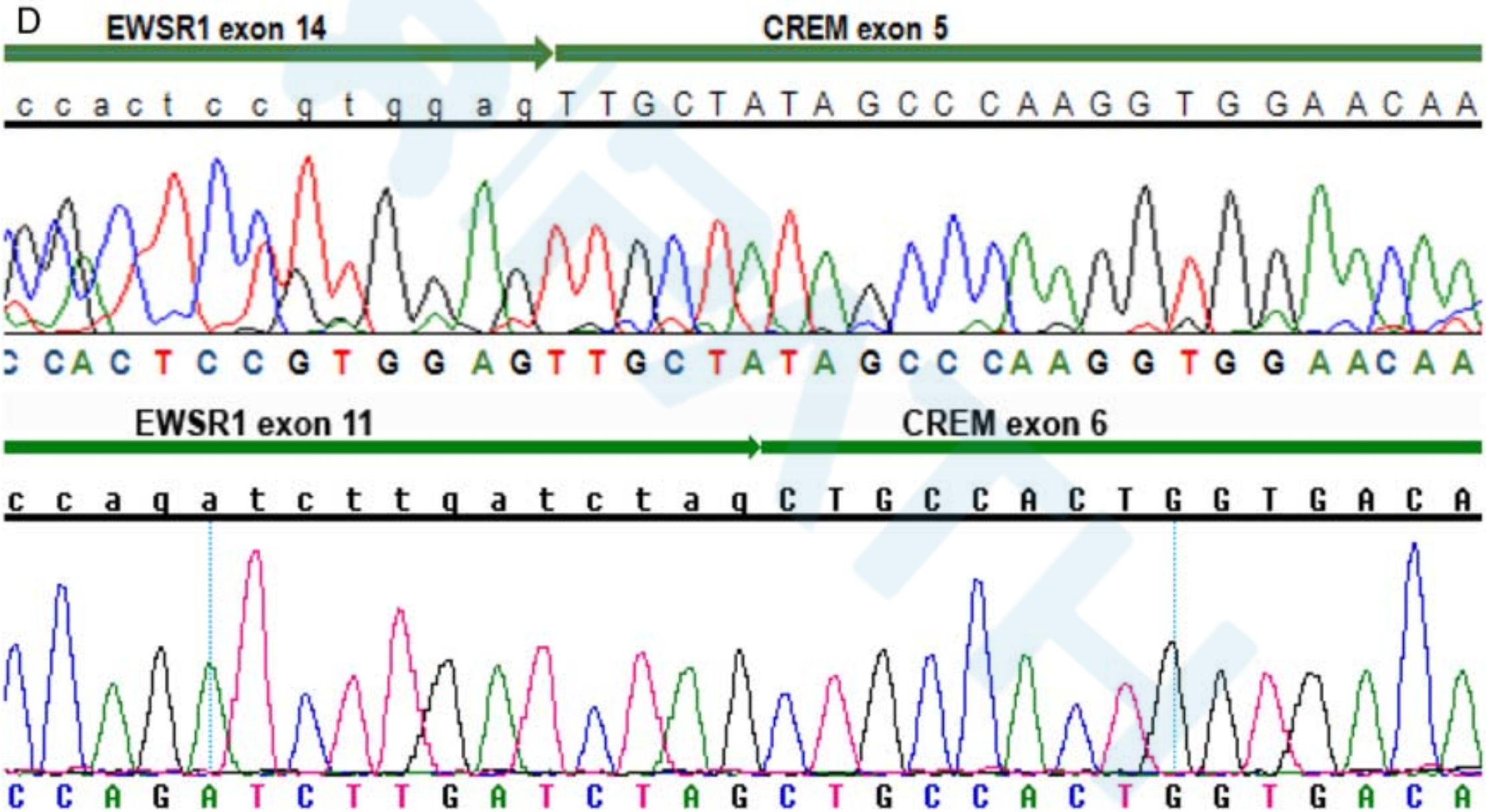
  Case 3：显示EWSR1的11号外显子与CREM 6号外显子的融合；

- RT-PCR and Sanger Sequencing：

  Case 1：显示EWSR1的14号外显子末端与CREM 5号外显子初始端融合；

  Case 3：显示EWSR1的11号外显子末端与CREM 6号外显子初始端融合；

RESULTS：Sanger Sequencing



DISCUSSION

- 迄今为止，EWSR1-ATF1是所有报道中唯一能鉴别涎腺CCC与其它肿瘤的融合基因；

- 本文对3例经RT-PCR法检测CRTC1-MAML2/CRTC3-MAML2融合蛋白和ATF1重排阴性的CCC进行了AMP检测，发现这3例涎腺的CCC中存在一种新的基因融合---EWSR1-CREM融合基因，且这个结果经至少另一种或两种不同的方法证实；

DISCUSSION

- 目前关于EWSR1-CREM融合基因的报道相对较少：
- Gareton A等报道了3例ESWR1-CREM融合的颅内粘液样肿瘤；
- 最近描述了一组直肠周围伴有EWSR1和CREB家族融合的黏液样间质肿瘤也显示了ESWR1-CREM融合；
- CCC之所以可能被误诊为MEC，是因为它们都具有相似的临床表现、结构、透明细胞、存在粘液以及免疫表型，但两者的预后和治疗却差别很大，因此EWSR1-CREM的融合可能会成为其关键的鉴别点；

DISCUSSION

- 目前最常用于基因融合相关的鉴别诊断的分子检测方法主要为FISH 或RT-PCR，但这些方法只能用于检测已知的融合基因，而若出现新的基因融合位点，这些检测结果可能为阴性，从而导致误诊或进一步治疗的机会；

- AMP是一种二代测序技术，它可以检测与肿瘤相关的融合基因，而不需要知道与其融合的另一种基因或断裂位点，因此，可以发现新的或非常见的融合基因类型。

SUMMARY

- 虽然，EWSR1-ATF1是CCC最常见的融合基因，但本文通过AMP的方法证实了3例EWSR1-CREM基因融合的CCC；

- AMP具有发现传统的FISH或RT-PCR可能无法识别的新基因融合的能力。

THANKS