HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	髄膜性腫瘍の分子遺伝学的マーカーと臨床病理学的因子との相関に関する研究
Author(s)	湯澤, 明夏
Description	配架番号：2258
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12360号
Issue Date	2016-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12360
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62554
Type	doctoral thesis
File Information	Sayaka_Yuzawa.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

髄膜性腫瘍の分子遺伝学的マーカーと臨床病理学的因子との相関に関する研究

(Studies of molecular and genetic markers with clinicopathological features of meningeal tumors)

2016 年 6 月

北 海 道 大 学

湯 澤　明 夏

学　位　論　文

髄膜性腫瘍の分子遺伝学的マーカーと臨床病理学的因子との相関に関する研究

(Studies of molecular and genetic markers with clinicopathological features of meningeal tumors)

2016 年 6 月

北 海 道 大 学

湯 澤　明 夏

目　次

発表論文目録および学会発表目録 ……1 頁

全体の緒言 ……3 頁

略語表 ……8 頁

第一章　：髄膜腫の遺伝子解析と臨床病理学的因子との相関に関する研究

1. 緒言 ……11 頁

2. 実験方法 ……17 頁

3. 実験結果 ……26 頁

4. 考察 ……47 頁

5. 総括および結論……54 頁

第二章　：髄膜発生孤在性線維性腫瘍/血管周皮腫の NAB2-STAT6 融合遺伝子と臨床病理学的因子との相関に関する研究

1. 緒言 ……56 頁

2. 実験方法 ……62 頁

3. 実験結果 ……66 頁

4. 考察 ……81 頁

5. 総括および結論 ……86 頁

全体の総括および結論……87 頁

謝辞 ……88 頁

引用文献 ……89 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Sayaka Yuzawa, Hiroshi Nishihara, Lei Wang, Masumi Tsuda, Taichi Kimura, Mishie Tanino, and Shinya Tanaka
   Analysis of NAB2-STAT6 gene fusion in 17 cases of meningeal solitary fibrous tumor/hemangiopericytoma: review of the literature
   The American Journal of Surgical Pathology, in press, 2016.

2. Sayaka Yuzawa, Hiroshi Nishihara, Shigeru Yamaguchi, Hiromi Mohri, Lei Wang, Taichi Kimura, Masumi Tsuda, Mishie Tanino, Hiroyuki Kobayashi, Shunsuke Terasaka, Kiyohiro Houkin, Norihiro Sato, and Shinya Tanaka
   Clinical impact of targeted amplicon sequencing for meningioma as a practical clinical sequencing system
   Modern Pathology, in press, 2016.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 湯澤 明夏、西原 広史、加藤 容崇、王 磊、木村 太一、津田 真寿美、谷野 美智枝、田中 伸哉
   血管周皮腫・孤在性線維性腫瘍の FFPE 検体を用いた NAB2-STAT6 融合遺伝子の検出
   第 104 回 日本病理学会総会、2015 年 4 月 30 日–5 月 2 日、名古屋

2. 湯澤 明夏、西原 広史、毛利 普美、加藤 容崇、王 磊、木村 太一、津田 真寿美、谷野 美智枝、山口 秀、田中 伸哉
   次世代シークエンサーによる髄膜腫の遺伝子変異プロファイル解析
   第 33 回 日本脳腫瘍病理学会、2015 年 5 月 29–30 日、高松

3. Sayaka Yuzawa, Hiroshi Nishihara, Hiromi Mouri, Lei Wang, Taichi Kimura, Masumi Tsuda, Mishie Tanino, Shigeru Yamaguchi, Hiroyuki Kobayashi, Shunsuke Terasaka, Norihiro Sato, and Shinya

Tanaka
Genotyping of meningioma by targeted amplicon sequencing using MiSeq
20th Annual Society for Neuro-Oncology Annual Scientific Meeting, 2015 年 11 月 19–22 日, San Antonio, USA

4. Sayaka Yuzawa, Hiroshi Nishihara, Lei Wang, Taichi Kimura, Masumi Tsuda, Mishie Tanino, and Shinya Tanaka
Analysis of NAB2-STAT6 gene fusion in 17 cases of meningeal solitary fibrous tumor/hemangiopericytoma
20th Annual Society for Neuro-Oncology Annual Scientific Meeting, 2015 年 11 月 19–22 日, San Antonio, USA

全体の緒言

中枢神経系腫瘍の疫学と組織学的分類

悪性新生物は日本の死因第一位であり、2014 年の悪性新生物による死亡数は 368,103 人であった[1]。臓器別では、肺癌が年間死亡数 73,396 人で最も多く、大腸癌、胃癌、膵癌と続く。中枢神経系腫瘍は第十六位で、日本における 2014 年の年間死亡数は 2,326 人、10 万人あたりの死亡数は 1.9 人[1]と死亡数は比較的少ない。しかし、20 歳以上の良性、悪性を含めた全腫瘍の年間罹患率は、前立腺、乳腺、肺、大腸、子宮、膀胱に続いて中枢神経系が第 7 位であり、比較的頻度の高い腫瘍である[2]。

中枢神経系腫瘍は非常に多彩な像を呈するが、世界保健機関（World Health Organization, WHO）による分類法が国際的に広く用いられており、現行の中枢神経系腫瘍 WHO 分類第 4 版（2007 年）では 132 種類の組織亜型が記載されている[3]。また、Zulch は脳腫瘍の治療後予後を基準に脳腫瘍を 4 段階に grading したが[4]、この流れを汲んで、WHO 分類の各々の組織型には WHO grade が付与されている[3]。脳腫瘍の組織分類法は中枢神経系の細胞発生に基づき、形態学的特徴が重視されてきたが、近年、最も多い脳腫瘍の一つである神経膠腫において isocitrate dehydrogenase (IDH) 1/2 や alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked (ATRX) などの遺伝子変異が発見され[5,6]、2016 年に改訂予定である中枢神経系腫瘍 WHO 分類には、これらの分子遺伝学的マーカーが組織学的分類に取り入れられる予定である[7]。

髄膜性腫瘍の分類の変遷

現行の中枢神経系腫瘍 WHO 分類第 4 版では、髄膜性腫瘍は大きく「髄膜腫」「その他の間葉系腫瘍」「血管周皮腫」「メラノサイト系腫瘍」「血管芽腫」に分類されている。さらに「髄膜腫以外の間葉系腫瘍」には「脂肪腫」「脂肪肉腫」「孤在性線維性腫瘍」「線維肉腫」「悪性線維性組織球腫」「平滑筋腫」「平滑筋肉腫」「横紋筋腫」「横紋筋肉腫」など多数の腫瘍が含まれる[3]。

髄膜腫は最も頻度の高い脳腫瘍の 1 つである[8]。脳脊髄のくも膜細胞から発生する境界明瞭な腫瘍で、渦巻き状構造や石灰化が特徴的であるが、硝子化血管が豊富な angiomatous meningioma、多数の空胞変性を示す microcystic meningioma、細胞質内腺腔を有し、Periodic acid-Schiff

(PAS) 陽性の小球状分泌物を入れる secretory meningioma、血管周囲の偽乳頭状構造を特徴とする papillary meningioma など、多彩な像を呈する[9]。

Bailey らは 1928 年、テント上髄膜腫のうち小脳に発生する血管芽腫に類似した組織型を示し、通常の髄膜腫とは異なる臨床経過を呈した 3 例を angioblastic meningioma として初めて報告した[10]。一方 Fisher らは 1958 年、軟部組織に発生する血管周皮腫（hemangiopericytoma, HPC）と同様の腫瘍が髄膜にも発生するとし、meningeal HPC として報告した[11]。これらの腫瘍の異同や細胞起源に関しては様々な議論がなされたが、中枢神経系腫瘍 WHO 分類第 1 版（1979 年）では haemangioblastic meningioma および haemangiopericytic meningioma という髄膜腫の亜型として収録された[12]。しかし、これら haemangioblastic meningioma や heamangiopericytic meningioma は再発率が高く、時に遠隔転移するなど、髄膜腫とは異なる生物学的特徴をもつことから[13,14]、髄膜腫とは異なる腫瘍として認識されるようになり、中枢神経系腫瘍 WHO 分類第 2 版（1993 年）からは HPC として再分類された[15]。

一方、孤在性線維性腫瘍（solitary fibrous tumor, SFT）は fibrous meningioma との鑑別を要する腫瘍として 1990 年代後半より報告されはじめ[16-18]、中枢神経系腫瘍 WHO 分類第 3 版（2000 年）に初めて登場した[19]。

肺胸膜や軟部組織など、髄膜以外を母地とする SFT と HPC は、臨床的、病理学的類似性が高いことから、肺・胸膜・胸腺・心臓腫瘍 WHO 分類第 4 版（2015 年）および骨軟部腫瘍 WHO 分類第 4 版（2013 年）では HPC は SFT に統一されている[20,21]。しかし、髄膜に発生する SFT と HPC は予後が大きく異なることから[22,23]、両者は未だに区別されている[3]。

これら髄膜腫、HPC、SFT は画像所見（図 1）や病理学的所見（図 2）に類似点が多く、時に鑑別が問題となる症例を経験する。そのため、これら髄膜性腫瘍の病理診断には特殊染色や免疫組織化学の併用が必要となっている。

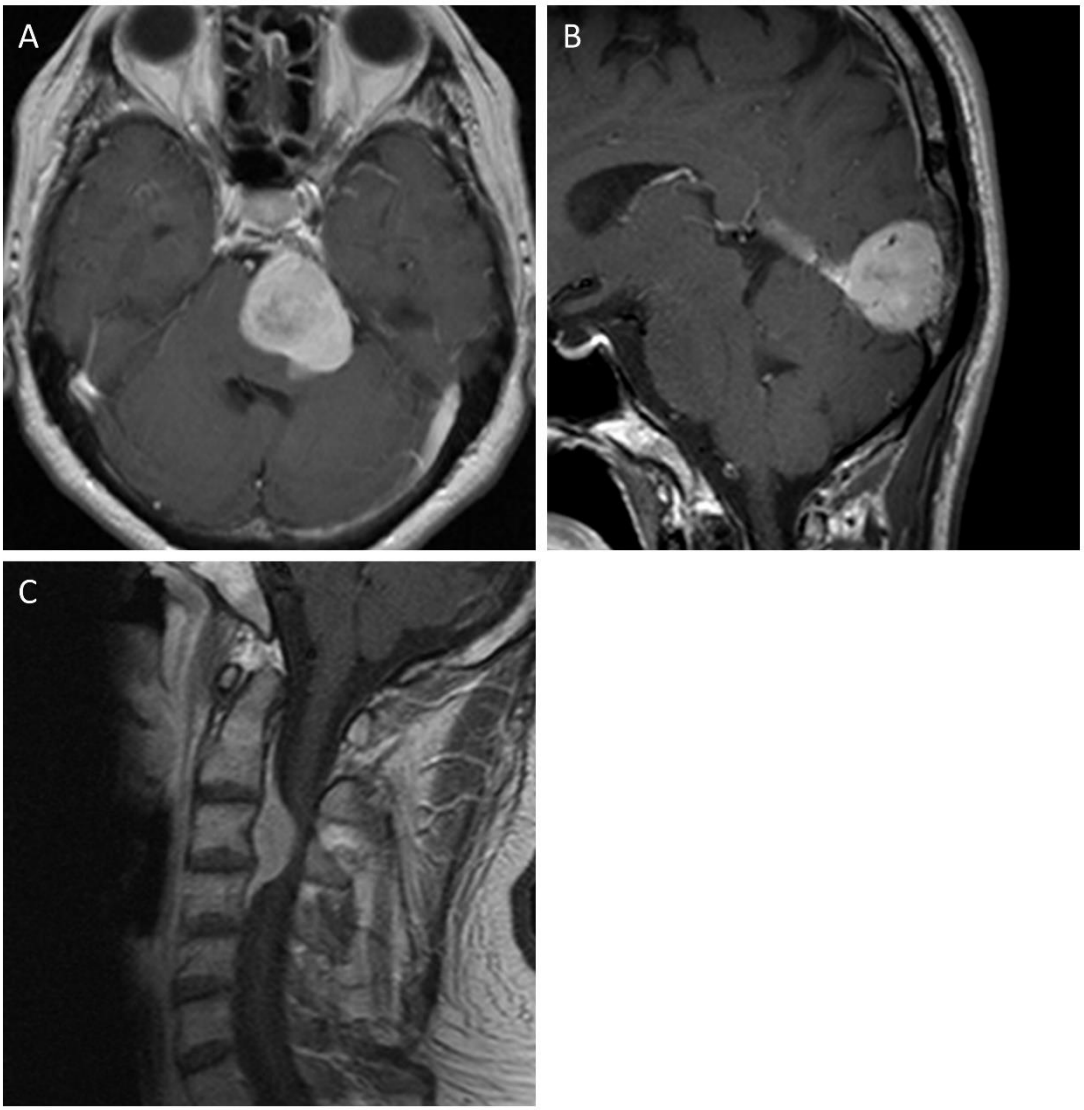


図 1　(A) 髄膜腫、(B) HPC、(C) SFT のガドリニウム造影 MRI 画像。
(A) 錐体斜台部にやや不均一に増強される境界明瞭な腫瘍を認める。(B) 大脳鎌から静脈洞交会付近にかけて、やや不均一に増強される類円形の境界明瞭な髄外腫瘍を認める。(C) C2/3 から C4 レベルの頸髄硬膜外に、ガドリニウムでほぼ均一に増強される腫瘍を認める。

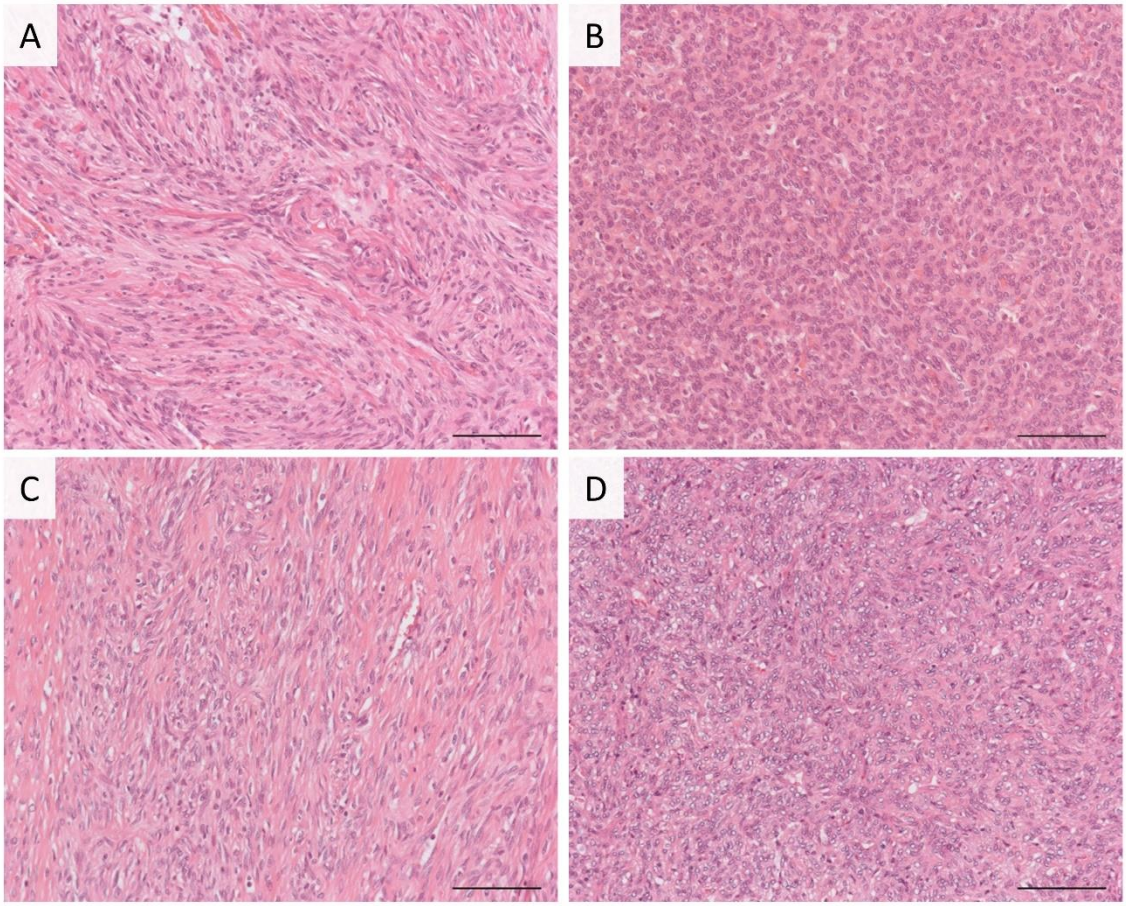


図 2　(A) Fibrous meningioma、(B) atypical meningioma、(C) SFT、(D) HPC の H&E 染色。(A) 紡錘形腫瘍細胞が膠原線維の沈着を伴いながら束状に増殖している。(B) 比較的核細胞質比の高い腫瘍細胞が特定の構造を示さず密に増殖している。 (C) 紡錘形腫瘍細胞が太い膠原線維の沈着を伴いながら束状、不規則に増殖している。(D) 短紡錘形から多角形の腫瘍細胞が密に増殖している。Scale bar: 100 μm。

脳腫瘍の病理診断と分子遺伝学的マーカー

近年、次世代シークエンサー（next-generation sequencer, NGS）の開発により、様々な腫瘍で責任遺伝子が同定されている。さらに Suzuki らは神経膠腫において、IDH1/2 変異や telomerase reverse transcriptase (TERT) プロモーター領域の変異、1p/19q 共欠失などによる分子遺伝学的分類が、組織学的分類よりも予後と強い相関を示すことを報告しており[24]、これらの分子遺伝学的マーカーを含めた病理診断の重要性が示唆されている。一方で、数多く発見される分子遺伝学的マーカーに対して、臨床

病理学的因子との相関が詳細に検討されていない腫瘍も多い。本研究では髄膜性腫瘍で鑑別が問題となる髄膜腫、HPC、SFT の分子遺伝学的マーカーと臨床病理学的因子との相関、および病理診断におけるこれら分子遺伝学的マーカー検索の有用性について検討した。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

AKT1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
ATRX	alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked
AUC	area under the curve
CGH	comparative genomic hybridization
CHD	chromodomain helicase DNA-binding protein
CI	confidence interval
CID	CHD4-interaction domain
CNA	copy number alteration
CT	computed tomography
CTGF	connective tissue growth factor
DBD	DNA binding domain
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR	epidermal growth factor receptor
EGR	early growth response
EMA	epithelial membrane antigen
ERBB2	erb-b2 receptor tyrosine kinase 2
FBS	fetal bovine serum
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded
FGF	fibroblast growth factor
FISH	fluorescence *in situ* hybridization
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H&E	hematoxylin & eosin
HPC	hemangiopericytoma
HR	hazard ratio
IDH	isocitrate dehydrogenase
IGF	insulin-like growth factor
IL	interleukin
indel	insertion/deletion
KIT	KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase

KLF4	krupple-like factor 4
LI	labeling index
MET	MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase
MRI	magnetic resonance imaging
NAB	NGFI-A binding protein 2
NCD	NAB conserved domain
NF2	neurofibromin 2
NGS	next-generation sequencer
NOC	not otherwise classified
NuRD	nucleosome remodeling and histone deacetylase
PAS	Periodic acid-Schiff
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet-derived growth factor
PFPE	PAXgene-fixed paraffin-embedded
PgR	progesterone receptor
PID	protein interaction domain
ROC	receiver operating characteristic
RT	reverse transcriptase
RTK	receptor tyrosin kinase
SFT	solitary fibrous tumor
SH	src-homology
SMA	smooth muscle actin
SMO	smoothened frizzled family receptor
SNV	single nucleotide variants
STAT6	signal transducer and activator of transcription 6
TAD	transcriptional activator domain
TERT	telomerase reverse transcriptase
TGF	transforming growth factor
TIMP1	tissue inhibitor of metalloproteinase 1
TRAF7	TNF receptor associated factor 7
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organization

第 一 章

髄膜腫の遺伝子解析と
臨床病理学的因子との相関に関する研究

【緒言】

髄膜腫の疫学と臨床所見

髄膜腫（meningioma）は脳脊髄のくも膜細胞から発生し、日本の原発性脳腫瘍の約 27%を占める最も多い脳腫瘍の 1 つである（図 3）[8]。年間発症率は 10 万人あたり 7.86 人、2015 年の新規罹患数は世界で推定 25,110 人とされる [2]。男女比は 1:2.5 と女性に多く、あらゆる年齢に発生するが、40-60 歳代に発症ピークがある [2]。

髄膜腫の大部分は、緩徐に進行する良性腫瘍で、頭蓋内圧上昇に伴う頭痛やけいれんで発症することが多いが、その他にも腫瘍の部位や大きさによって様々な症状を呈する [9]。大脳円蓋部、傍矢状部、蝶形骨縁、トルコ鞍周辺に発生することが多いが、脊髄や脳室内、眼窩内にも発生する [25]。

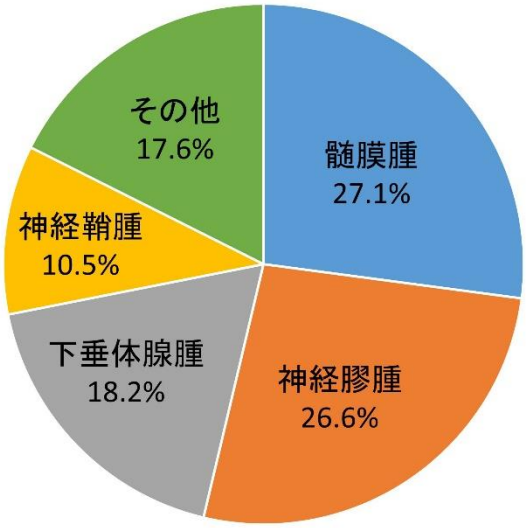


図 3　我が国における全年齢の原発性脳腫瘍の内訳

髄膜腫の組織学的分類

髄膜腫は組織形態と異型性の程度により、WHO grade I–III に相当する 16 の組織亜型に分類される（表 1）[3,8]。いくつかの組織亜型が混在することも多いが、最も広い領域を占める組織亜型を病理診断名とする。Atypical meningioma は、以下の 2 項目のいずれかを満たすものとされる [(1) 強拡大 10 視野あたり 4 個以上の核分裂像、もしくは (2) シート状増殖、細胞密度の上昇、核細胞質比の高い小型腫瘍細胞の出現、地図状壊死、明瞭な核小体の 5 項目中 3 項目以上を認めるもの]。また、anaplastic

meningioma は癌腫や悪性黒色腫、肉腫に相当するような明らかな悪性所見を示すもの、あるいは強拡大 10 視野あたり 20 個以上の核分裂像を認めるものと定義される。WHO grade II と III の髄膜腫は、髄膜腫全体の約 20%を占める [26]。

表 1　髄膜腫の組織学的分類

WHO 分類	脳腫瘍取扱い規約
WHO grade I	
Meningothelial meningioma	髄膜皮性髄膜腫
Fibrous meningioma	線維性髄膜腫
Transitional meningioma	移行性髄膜腫
Psammomatous meningioma	砂粒体性髄膜腫
Angiomatous meningioma	血管腫性髄膜腫
Microcystic meningioma	微小嚢胞性髄膜腫
Secretory meningioma	分泌性髄膜腫
Lymphoplasmacyte-rich meningioma	リンパ球形質細胞に富む髄膜腫
Metaplastic meningioma	化生性髄膜腫
WHO grade II	
Atypical meningioma	異型髄膜腫
Chordoid meningioma	脊索腫様髄膜腫
Clear cell meningioma	明細胞髄膜腫
Meningioma with brain invasion	髄膜腫の脳内浸潤
WHO grade III	
Anaplastic meningioma	退形成性髄膜腫
Papillary meningioma	乳頭状髄膜腫
Rhabdoid meningioma	ラブドイド髄膜腫

髄膜腫の治療と予後

髄膜腫の治療は一般的に外科切除が行われるが、脳神経や血管が豊富な頭蓋底に発生する髄膜腫は、全摘出が困難となることがある [27,28]。残存腫瘍や再発症例、切除困難例に対しては放射線治療も選択される [29,30]。外科切除、放射線治療に抵抗性を示す再発髄膜腫に対して、代謝拮抗剤であるヒドロキシカルバミド（ヒドロキシウレア）が選択されることもあるが、治療効果は限定的である [31,32]。

現在、大腸癌や肺癌、乳癌、リンパ腫など様々な腫瘍において、上皮成長因子受容体（epidermal growth factor receptor, EGFR）や erb-b2 receptor tyrosine kinase 2 (ERBB2)、MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase (MET) などを標的とした様々な分子標的治療薬が用いられている[33]。髄膜腫においては、大部分の症例で EGFR や血小板由来成長因子受容体（platelet-derived growth factor receptor, PDGFR）が高発現していることが以前より示されており[34-38]、EGFR 阻害剤である gefitinib や erlotinib、PDGFR や KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase (KIT) のチロシンキナーゼ阻害剤である imatinib を用いた第二相臨床試験が行われているが、いずれも腫瘍縮小効果は認められていない[39-41]。また、sunitinib や bevacizumab など様々なチロシンキナーゼ阻害剤が再発髄膜腫に用いられているが、一定の効果が得られた薬剤は現在のところない[42-44]。

WHO grade I の髄膜腫は組織学的に良性であるが、完全切除後の 10 年再発率は 15–20%に及ぶとされ[45]、術後定期的な MRI 撮像による経過観察が行われる。さらに、WHO grade II や III の髄膜腫はより再発率が高く、5 年再発率はそれぞれ 50%、80%とされる[46]。髄膜腫の摘出率には Simpson grade が用いられており、再発率との相関が示されている（表 2）[47]。再発を繰り返す髄膜腫は、外科的切除や放射線治療に抵抗性を示すようになり、腫瘍増大による症状や繰り返し行う治療による生活の質 (quality of life, QOL) の低下が問題となる[48]。そのため、初回手術時に臨床的・病理学的因子をあわせた再発リスクの正確な評価が望まれる。

表 2　Simpson grade

Grade	切除範囲	再発率
I	腫瘍の肉眼的全摘出に、硬膜付着部および異常骨の切除を加えたもの	9%
II	腫瘍の肉眼的全摘出に、硬膜付着部の電気凝固を加えたもの	19%
III	腫瘍は肉眼的全摘出を行うが、硬膜付着部除去や電気凝固しないか、硬膜外進展部に何の処置も加えなかったもの	29%
IV	腫瘍そのものの部分切除	44%
V	生検の有無にかかわらず、単に減圧術のみを行ったもの	

髄膜腫の分子遺伝学的特徴

1970 年代に、髄膜腫の染色体異常として 22 番染色体の欠失が報告された[49,50]。1990 年代には、多発性の髄膜腫や両側性の神経鞘腫を発症する常染色体優先遺伝性疾患である神経線維腫症 2 型（Neurofibromatosis type 2）が、22 番染色体長腕上の neurofibromin 2 (NF2) に胚細胞性変異を有することが報告された[51,52]。その後の検討で、髄膜腫の 40–60%にモノソミー22 を含めた NF2 異常があり、髄膜腫の腫瘍形成に重要な役割を果たしていることが示唆されている[53-58]。

一方で Clark らは 2013 年、NGS を用いて NF2 異常のない髄膜腫において、TNF receptor associated factor 7 (TRAF7)、v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 (AKT1)、krupple-like factor 4 (KLF4)、smoothened frizzled family receptor (SMO) に変異があることを明らかにした[59]。さらに、これらの遺伝子変異は腫瘍の発生部位や組織型と相関することを示した。すなわち、NF2 型髄膜腫は大脳半球や後頭蓋窩、小脳、脊髄に発生するのに対し、TRAF7、AKT1 、KLF4 変異は中頭蓋窩や前頭蓋窩に多く、SMO に変異のある症例は前頭蓋底正中に位置することを示した。また TRAF7 と KLF4 に変異のある症例は secretory meningioma の成分を有することを明らかにしたが、組織型と遺伝子変異との関連性については、Reuss らも同様の結果を報告している[60]。しかし、これらの遺伝子変異と予後との相関については現在までに報告がない。

NGS の臨床応用

現在 NGS は研究面で広く用いられており、多くの疾患において責任遺伝子の同定が進んでいる[61]。全ゲノムシークエンスや全エクソームシークエンスは検査にかかる費用や時間の面から臨床応用は限定的であったが、近年アンプリコンシークエンスやキャプチャーシークエンスで標的遺伝子を効率よく検索することができるようになり、臨床応用が可能となってきた[62]。肺癌や乳癌など、いくつかの腫瘍で、NGS を臨床応用しようという試みが行われているが[63-65]、髄膜腫の診断や治療に直結する遺伝子解析方法は現在のところ確立していない。

髄膜腫細胞株について

現在、髄膜腫の研究には、IOMM-Lee[66]、KT21-MG1[67]、HKBMM[68] など、WHO grade III 相当の悪性髄膜腫切除検体から樹立された細胞株が用いられている。WHO grade I の髄膜腫細胞株については、外科切除検体か

ら初代培養を行っても数回の継代にて senescence を起こすとされ、細胞株の樹立は困難であったが[67,69]、Puttmann らは、レトロウイルスを用いた TERT 遺伝子導入による良性髄膜腫細胞株の樹立方法を報告している[70]。一部の髄膜腫細胞株の核型に関しては G-band karyotyping や comparative genomic hybridization (CGH) で詳細な検討がなされているが（表 3）[66,70,71]、TRAF7、AKT1、KLF4、SMO に変異を有する髄膜腫細胞株は現在のところ報告されていない。異なる遺伝子背景を有しながら、類似する形態を示す髄膜腫の腫瘍形成メカニズムの解明のため、さらに、AKT1 と SMO の変異を有する髄膜腫に関してはそれぞれ AKT 阻害剤や hedgehog 阻害剤の有用性も示唆されており[72,73]、その治療効果を検証するために、TRAF7、AKT1、KLF4、SMO の変異を有する髄膜腫細胞株の樹立が望まれる。

表 3　現在までに報告されている主な髄膜腫細胞株

細胞株名	年齢/性別	WHO grade	腫瘍部位	染色体変化
IOMM-Lee	61 歳/男性	III	頭蓋骨内	X, -Y, -1, add(2)(p11.2), add(5)(p13), add(6)(p13), i(7)(p10)x2, add(9)(q21), add(12)(q21), -17, add(14)(q13), add(19), add(20), +2-4mar[p20]
KT21-MG1	47 歳/女性	III	大脳鎌	-22、c-myc 増幅、その他複雑核形(詳細不明)
HKBMM	52 歳/女性	III	前頭葉	不明
CH-157MN	41 歳/女性	不明	不明	X, add(X)(p11.2), -X, add(1)(q21), add(1)(p13), +2, +3, +5, -1, i(8)(q10)x2, +8, add(11)(p11.2), +11, +12, add(14)(p11.2), -15, i(15)(q10), -16, +16, -17, -18, +20, -22, +4-9mar[cp10]
Ben-Men-1	68 歳/女性	I	大脳鎌	-22

本研究の目的と概要

本研究は、ターゲットアンプリコンシークエンスを用いた髄膜腫の遺伝

子解析系を確立すること、また、アンプリコンシークエンスによって得られた結果から、分子遺伝学マーカーと予後を含めた臨床病理学的因子との関連性を調べることを目的とした。また、髄膜腫における分子標的治療の対象となる遺伝子変異、遺伝子増幅/欠失の有無を調べること、さらに、髄膜腫不死化細胞株を樹立し、その遺伝子プロファイルを明らかにすることを目的とした。

本研究では、髄膜腫 103 例の凍結検体を用いて、アンプリコンシークエンスを行い、NF2、TRAF7、AKT1、KLF4、SMO、KIT、ERBB2、MET の遺伝子変異およびコピー数変化（copy number alteration, CNA）を検討した。その結果、81 例（79%）において、NF2 の欠失/変異、もしくは TRAF7、AKT1、KLF4、SMO の少なくとも 1 つに変異が認められた。HER2、KIT、MET に遺伝子変異や有意な遺伝子増幅/欠失は認められなかった。これらの分子遺伝学的マーカーと臨床病理学的因子との相関を調べるため、NF2、TRAF7、AKT1、KLF4、SMO の変異、CNA の有無により、髄膜腫を NF2 type、TRAKLS type、”not otherwise classified (NOC)” type の 3 つの genotype に分類した。NF2 type は NF2 の欠失と変異の少なくとも 1 つを有するもの、TRAKLS type は TRAF7、AKT1、KLF4、SMO の 1 つ以上に変異があるもの、NOC type は上記のいずれもないものと定義した。NF2 type と TRAKLS type は相互排他的な関係であった。この genotype は、腫瘍径、周囲骨変化やガドリニウムによる不均一な増強効果などの MRI 所見、および組織型との相関が見られた。さらに多変量解析により、genotype は腫瘍切除率や WHO grade などとは独立した予後因子であることを明らかにした。また、2 例の髄膜腫切除検体よりそれぞれ不死化培養細胞株の樹立に成功し、うち 1 例で NF2 欠失を認めたものの、TRAKLS type に分類される髄膜腫細胞株は得られなかった。

【実験方法】

1）対象症例

北海道大学病院脳神経外科および関連病院にて 1988 年から 2015 年までに切除された髄膜腫のうち、凍結検体が保存されている 106 例をアンプリコンシークエンスによる遺伝子解析の対象とした。また、10 例の髄膜腫外科切除検体を、不死化細胞株の樹立に用いた。10 例のうち 7 例は、アンプリコンシークエンスによる遺伝子解析の対象症例と重複していた。本実験は北海道大学大学院医学研究科医の倫理委員会による承認のもと行われた(承認番号：医 14-071)。

2）臨床所見の検討

凍結検体が得られた 106 例について、MRI もしくは CT 画像で腫瘍発生部位を確認した。また、初発症例 82 例のうち、72 例の MRI 画像について、腫瘍内石灰化、周囲骨変化、腫瘍周囲嚢胞形成、腫瘍周囲浮腫、ガドリニウム造影剤に対する不均一な増強効果の有無を検討した。106 例中 90 例について、予後解析を行った。

3）病理組織学的検討

凍結検体［大きさ中央値 7 mm (範囲 2.5–12 mm)］を PAXgene Tissue System (PreAnalytiX, Hombrechtikon, Switzerland）で固定後、パラフィン包埋して PAXgene 固定パラフィン包埋（PAXgene-fixed paraffin-embedded, PFPE）組織を作製した。PFPE 組織を 4 μm に薄切して切片を作製後、hematoxylin & eosin (H&E) 染色および Ki-67 の免疫組織化学を施行した。免疫組織化学は、切片をキシレンで脱パラフィン化し、エタノールで再水和し、pH 9.0 のエチレンジアミン四酢酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA）緩衝液中で抗原を賦活化した。一次抗体として抗 Ki-67 抗体（100 倍希釈) (clone MIB-1, M7240, DAKO, Glostrup, Denmark）を用いて、自動免疫染色装置（Ventana Medical System, Inc., Tucson, AZ, USA）でポリマー法にて行った。Secretory meningioma が疑われる症例には PAS 染色を追加した。

H&E 標本を 2 人の病理医が再検討し、現行の中枢神経系腫瘍 WHO 分類第 4 版に基づき組織型を決定した。手術時の病理診断と異なる症例に関しては、ホルマリン固定パラフィン包埋（formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE）組織から作製された H&E 標本および免疫組織化学を

併せて再検討し、組織型を再決定した。

4) Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 解析

35 症例の FFPE 組織について、NF2/CEN22q FISH probe (FG0003, Abnova Corporation, Taiwan) を用いて間期細胞 200 個の NF2 および CEN22q のシグナルをカウントし、NF2 の欠失を評価した。

5) 髄膜腫外科切除検体からの不死化細胞株の樹立

本実験は北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規定に従って実施した(承認番号：第 22(59)号)。

(i) 髄膜腫の初代培養

髄膜腫外科切除検体を、滅菌カッターで細切後、200 µl のコラゲナーゼおよびヒアルロニダーゼを含む 20 ml の培養液を加え、37 °C で 30 分間静置した。組織液を 70 µm Cell Strainer (Corning, Corning, NY, USA) に通し、1,500 rpm で 3 分間遠心した。上清を取り除き、沈殿物を培養液 10 ml で再懸濁し、10 cm dish に播種して培養した。髄膜腫培養細胞の培養液としては、非動化した 15%ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS)、100 U/ml ペニシリンおよび 100 µg/ml ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を添加した Nutrient mixture F-12 HAM (Sigma-Aldrich) を使用し、37 °C、5% CO_2 の条件下で維持した。

(ii) インフェクションによる不死化細胞株の樹立

ウイルスパッケージング細胞である 293T 細胞を 10% FBS、2 mM L-グルタミン、100 U/ml ペニシリンおよび 100 U/ml ストレプトマイシンを含む Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (Sigma-Aldrich) にて 6 cm dish で 4 枚培養した。細胞密度が 80 %程度となったところで、エッペンドルフチューブに Opti-MEM I Reduced-Serum Medium (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) 200 µl、FuGeneHD (Promega, Madison, WI, USA) 48 µl を加え、タッピングにより穏やかに混和したのち、室温にて 5 分静置した。別のエッペンドルフチューブに Opti-MEM I Reduced-Serum Medium 200 µl、pGP DNA 4 µg、pEampho DNA 4 µg、pEcoVR DNA 8µg を混和した。2 つの溶液を混合し、タッピングにより穏やかに混和したのち、室温にて 15 分間静置した。293T 細胞の培養液に混和液を滴下し、37 °C、5% CO_2 で 6 時間培養後、培養液を髄膜腫培養細胞

用の培養液に置換し、48 時間培養した。293T 細胞の培養上清（ウイルス液）を 2 枚分回収し、0.45 μm Minisart Syringe Filter (Sartorius, Göttingen, German）にてろ過し、Nutrient mixture F-12 HAM を計 10 ml となるように加え、Polybrene 4 μg/ml を添加した。1–2 回継代した初代培養細胞の培養液とウイルス液を置換して 3 時間培養後、通常培養液へ戻し、37 °C、5% CO_2 下で 1 日培養した。翌日、293T 細胞の培養上清 2 枚分から同様にウイルス液を回収し、同様に感染させた。また、同時に Opti-MEM I Reduced-Serum Medium 400 μl、pGP DNA 4 μg、pEco DNA 4 μg、pCX4-hTERT DNA 8 μg で同様にウイルス液を作製した。初代培養細胞への 2 回目の pEcoVR の導入から 2 日後、培養液を pCX4-hTERT のウイルス液に置換し、翌日も同様に感染操作を行った。24 時間後、hTERT 遺伝子を導入した髄膜腫細胞を G418 disulfate salt solution (Sigma-Aldrich) 50 μg/ml にて 14 日間薬剤選択し、不死化細胞株を樹立した。なお、pCX4-hTERT の過剰発現プラスミドは、探索病理学講座の王磊特任助教より分与を受けた。

6) 培養細胞の cell block 作製と免疫組織化学

培養細胞をリン酸緩衝生理食塩水（phosphate-buffered saline, PBS）で 2 回洗浄後、0.25%トリプシンおよび 0.02% EDTA を含む PBS (pH 7.4) にて dish より剥離し、培養液でエッペンドルフチューブに回収した。1,500 rpm で 3 分遠心し、上清を除去後、4%ホルムアルデヒド水溶液を静かに注入し、24 時間静置して固定した。1,500 rpm で 3 分遠心後、静かにホルマリンを吸引し、ペレットをエッペンドルフチューブから取り出し、パラフィン包埋して FFPE cell block を作製した。

FFPE cell block を 4 μm に薄切して切片を作製後、H&E 染色および免疫組織化学を施行した。免疫組織化学は、一次抗体として抗 epithelial membrane antigen (EMA) 抗体（400 倍希釈) (clone E29, DAKO)、抗 progesterone receptor (PgR) 抗体（200 倍希釈) (clone 16, Leica Biosystems, Vetzlar, Germany)、抗 smooth muscle actin (SMA) 抗体 (400 倍) (clone 1A4, Dako)、抗 desmin 抗体（200 倍) (clone D33, Dako)、抗 vimentin 抗体（20 倍希釈) (V9, Nichirei, Tokyo, Japan)、抗 S-100 protein 抗体（希釈済み) (polyclonal, DAKO)、抗 Ki-67 抗体（100 倍希釈) (clone MIB-1, DAKO）を用いて、前述と同様の方法で自動免疫染色装置にて行った。

7) NGS による遺伝子解析

(i) DNA 抽出

上記の通り凍結組織より得られた PFPE 組織を 8 μm で 5 枚薄切し、PAXgene Tissue DNA Kit (PreAnalytiX) を用いてゲノム DNA を抽出した。髄膜腫不死化細胞株は PBS で 2 回洗浄後、0.25%トリプシンおよび 0.02% EDTA を含む PBS (pH 7.4) にて dish より剥離し、培養液で回収後、1,500 rpm で 3 分間遠心し、上清を除去後、細胞ペレットより QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いてゲノム DNA を抽出した。CNA の基準とするため、健常ボランティア 3 名より血液を採取し、QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) を用いてゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA の濃度は Qubit dsDNA BR assay kit と Qubit fluorometer 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)、および GeneRead DNA QuantiMIZE Assay Kit (Qiagen) にて測定した。

(ii) ターゲットアンプリコンシークエンスの設計

NF2、AKT1、SMO、KIT、ERBB2、MET の 6 遺伝子の全エクソンを標的としたアンプリコンシークエンスパネルを GeneRead Mix-n-Match panel (181905 MNGHS-00062X-296, Qiagen) で作製し、TRAF7 の全エクソンと KLF4 の変異ホットスポット (K409Q) を標的としたアンプリコンシークエンスパネルを GeneRead Custom panel (181902 CNGHS-00120X-44, Qiagen) で作製した (図 4)。

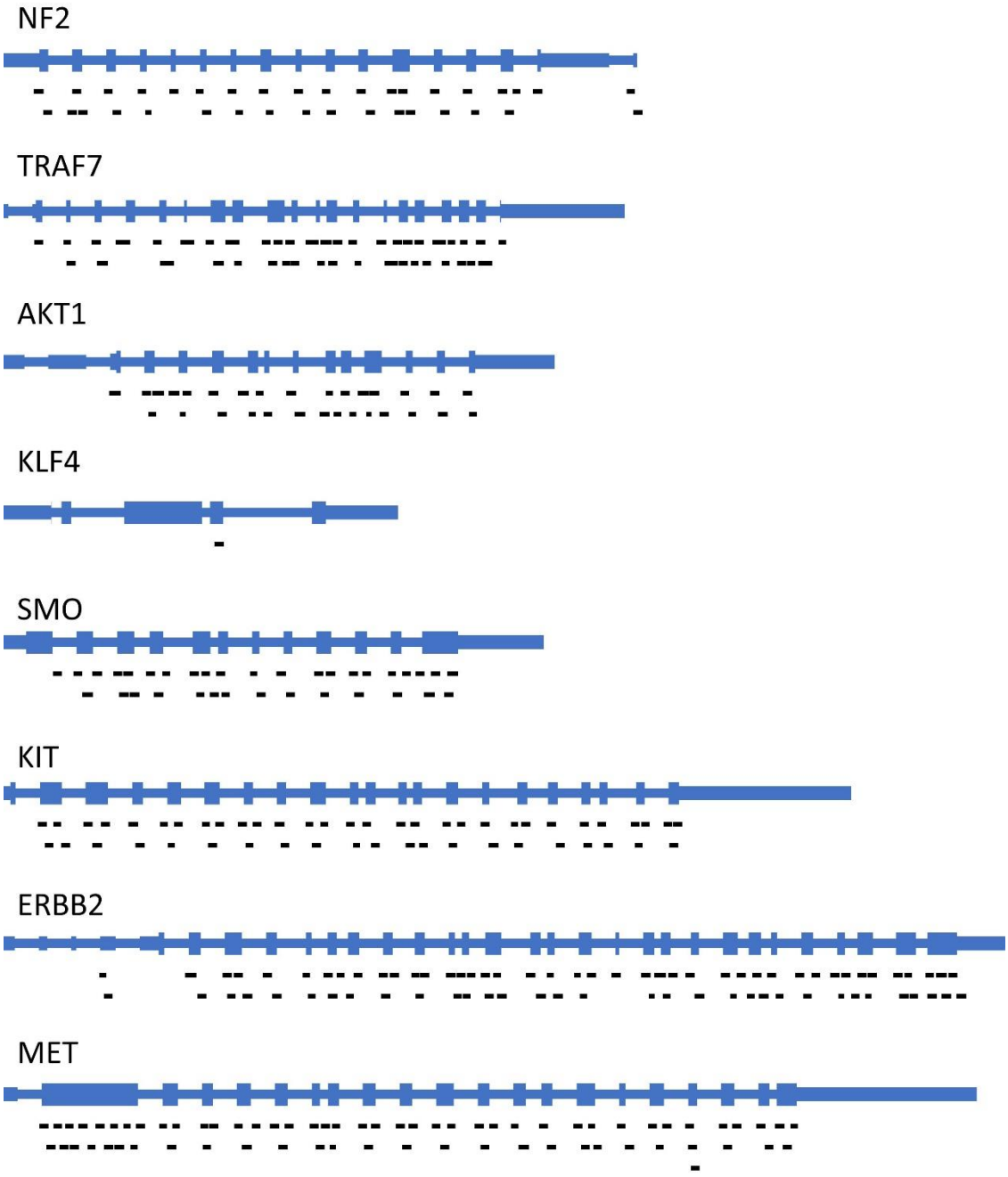


図 4　ターゲットアンプリコンシークエンスのパネル模式図。各遺伝子（青）のエクソンを太線、イントロンを細線で示す。イントロンは一部短縮して表示している。両端には非翻訳領域が存在する。アンプリコンを黒線で示す。

(iii) ライブラリ作製

GeneRead DNA QuantiMIZE Assay Kit の結果に従い、ゲノム DNA 22–510 ng を滅菌蒸留水で 16 µl に希釈し、GeneRead DNAseq Panel

PCR Reagent V2 (Qiagen) を用いて polymerase chain reaction (PCR) 法にて標的遺伝子を増幅した。PCR サイクル数は 2 つの panel ともに 23 サイクルを基準としたが、DNA 濃度が十分得られなかった症例に関しては GeneRead DNA QuantiMIZE Assay Kit の結果に従いサイクル数を増やした。パネルごとに PCR 産物を混和し、Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) を 72 µl 添加し、磁性ビーズに結合させた。96 well plate に加えて 1,800 rpm で 1 分混和した後、室温で 5 分静置した。96 well plate を磁性ラック上に 5 分静置し、溶液が透明になったことを確認後、140 µl の上清を別の well に移し、Agencourt AMPure XP を 128 µl 加え、1,800 rpm で 1 分混和した後、室温で 5 分静置した。96 well plate を磁性ラック上に 5 分静置し、溶液が透明になったことを確認した後、ビーズを乱さないように上清を除去した。磁性ラック上で 80%エタノールを 400 µl 加え、室温で 30 秒静置した後、上清を除去し、これを 2 回繰り返した。ラック上に 96 well plate を 15 分間静置し、ビーズを完全に乾燥させた後、滅菌蒸留水を 28 µl 加えて 1,800 rpm で 2 分混和し、DNA を溶出させた。96 well plate を磁性ラック上に静置して溶液が透明になった後、25 µl の上清を新しいエッペンドルフチューブに移した。Agilent 2100 bioanalyzer と Agilent DNA 1000 Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) で DNA 濃度を測定し、GeneRead Mix-n-Match panel の PCR 産物 130.6 ng と GeneRead Custom panel の PCR 産物 19.4 ng を滅菌蒸留水で 20.5 µl に希釈し、GeneRead DNA Library I Core kit (Qiagen) を用いて末端修復、A 付加、アダプターライゲーションを行った。GeneRead Size Selection kit (Qiagen) を用いて DNA を精製し、精製 DNA 90 µl に Agencourt AMPure XP を 72 µl 添加し、磁性ビーズに結合させた。96 well plate に加えて 1,800 rpm で 1 分混和した後、室温で 5 分静置した。96 well plate を磁性ラック上に 5 分静置し、溶液が透明になったことを確認後、155 µl の上清を別の well に移し、Agencourt AMPure XP を 36 µl 加え、1,800 rpm で 1 分混和した後、室温で 5 分静置した。96 well plate を磁性ラック上に 5 分静置し、溶液が透明になったことを確認した後、ビーズを乱さないように上清を除去した。磁性ラック上で 80%エタノールを 400 µl 加え、室温で 30 秒静置した後、上清を除去し、これを 2 回繰り返した。ラック上に 96 well plate を 15 分間静置し、ビーズを完全に乾燥させた後、滅菌蒸留水を 19 µl 加えて 1,800 rpm で 2 分混和し、DNA を溶出させた。96 well plate を磁性ラック上に静置して溶液が透明になった後、17 µl の上清を新しいエッペンドルフチューブに移し

た。精製したライブラリを GeneRead DNA I Amp kit (Qiagen) で PCR 増幅させ、MinElute PCR Purification kit (Qiagen) で精製した。ライブラリの最終濃度を Agilent 2100 bioanalyzer と Agilent DNA 1000 Kit (Agilent)、および GeneRead Library Quant Kit (Qiagen) で測定した。ライブラリを滅菌蒸留水で 4 nM に希釈し、1 検体あたり 5 µl ずつ、12 検体のライブラリと 0.2N 水酸化ナトリウム 60 µl を混和した後、室温で 5 分静置してライブラリを変性させた。変性ライブラリ 6 µl を氷冷 HT1 (Hybridization Buffer) (Illumina, San Diego, CA, USA) 994 µl で希釈し、ライブラリ希釈液 792 µl に 12.5 pM PhiX (Illumin) を混和した。ライブラリ希釈液を MiSeq V2 Reagent kit (Illumina) の試薬カートリッジに 600 µl 添加し、MiSeq (Illumina) でシークエンスした。

(iv) データ解析

アンプリコンシークエンスにより MiSeq から得られた FastQ ファイルを GeneRead より提供されている解析サーバー、GeneRead DNAseq Variant Calling Service (http://ngsdataanalysis.sabiosciences.com/NGS2/) で解析し、変異および CNA を検出した。CNA のレファレンスとして健常ボランティア 3 名のライブラリより得られた解析データを用いた。また、GeneRead DNAseq Variant Calling Service から得られた BAM ファイルを、BioReT System (Amelieff, Tokyo, Japna) で解析し、変異検出を行った。BioReT System では、BAM ファイルを GATK (Genome Analysis Toolkit) (version 1.6.13) の RealignerTargetCreator、IndelRealigner、CountCovariates および TableRecalibration を用いて realignment および recalibration した。GATK UnifiedGenotyper と GATK VariantFiltration を用いて一塩基多型(single nucleotide variants, SNV) と塩基の挿入/欠失 (insertion/deletion, indel) を検出した。Indel の検出のための GATK UnifiedGenotyper の minIndelFrac parameter を 0.05 に設定したが、それ以外の GATK のパラメーターは規定のものを使用した。変異検出後、SnpEff genetic variant annotation and effect prediction toolbox (version 4.0)を用いて VCF ファイルを作成し、Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC) database (version 72) と IntOGen (version 1412) の情報を SnpEff のパッケージツール、SnpSift で付加した。SNV はリード数 100 以上、変異陽性率 10%以上のアミノ酸置換を起こす変異に限定した。NF2 以外の胚細胞性変異は変異陽性率および dbSNP と Human

Genetic Variation Database (HGVD) を参考に除外した。NGS による遺伝子解析のワークフローを図 5 に示す。

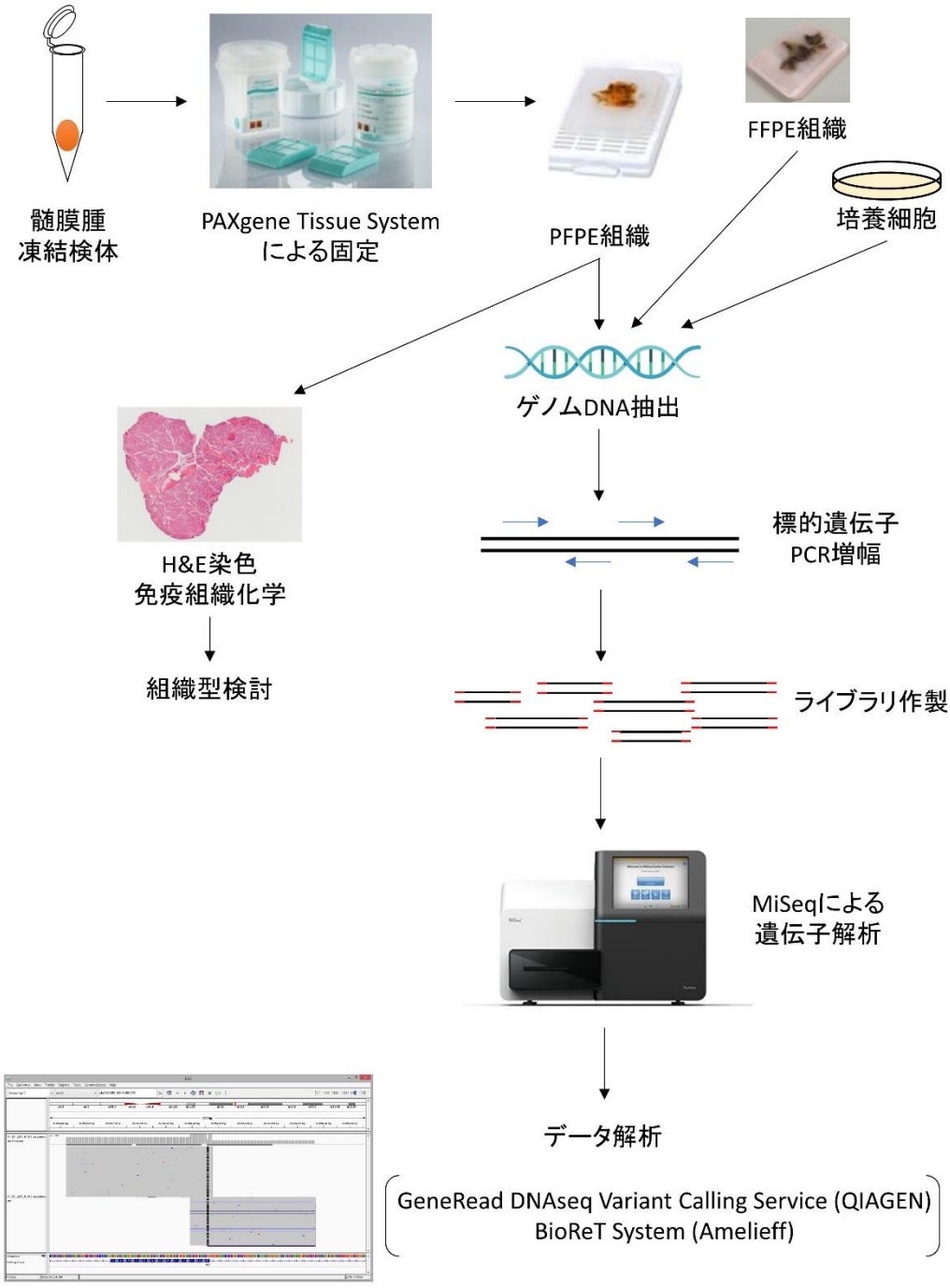


図 5　ターゲットアンプリコンシークエンスによる遺伝子解析のワークフロー。

8) 統計解析

統計解析には、JMP® version 11.2 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) およびエクセル統計 version 1.03 (株式会社社会情報サービス、Tokyo, Japan) を用いた。Genotype と臨床病理学的所見の比較には、Fisher の正確確率検定、χ^2 検定、一元配置分散分析、Kruskal–Wallis 検定を使用し、post hoc test として Steel–Dwass test を用いた。予後解析には Kaplan–Meier 法と log-rank test、Cox 比例ハザードモデルを用いた。P 値は 0.05 未満を統計学的に有意差ありと判定した。

【実験結果】

1) アンプリコンシークエンス対象症例の臨床所見と組織型の検討

凍結検体が得られた 106 例中、1 例は鼻粘膜のみの検体であり、腫瘍細胞は含まれていなかった。1 例は組織型が非典型的で髄膜腫の確定診断に至らなかった。また 1 例は組織型再検討により HPC と判断され、第二章髄膜発生孤在性線維性腫瘍/血管周皮腫の NAB2-STAT6 融合遺伝子と臨床病理学的因子との相関に関する研究に用いることとした。以上より、103 例を検討対象とした。

103 症例中、男性 31 例（30%)、女性 72 例（70%）であり、手術時の年齢中央値は 55 歳（範囲 15–87 歳）であった。神経線維腫症 2 型が 2 例、別疾患に対する放射線治療後に発生した放射線誘発性髄膜腫が 3 例含まれていた。腫瘍発生部位は、頭蓋冠 48 例、前頭蓋底 11 例、中頭蓋底 23 例、後頭蓋底 19 例、脳室内 2 例であった。Simpson grade は grade I が 18 例、grade II が 34 例、grade III が 11 例、grade IV が 19 例、grade V が 1 例であった。組織学的悪性度は、WHO grade I が 80 例（78%)、grade II が 18 例（17%)、grade III が 5 例（5%）であった。各 WHO grade の内訳を表 4 に示す。

表 4　髄膜腫の組織型の内訳

組織型	症例数 (%)
WHO grade I	80 (78)
Fibrous meningioma	22 (21)
Transitional meningioma	21 (20)
Meningothelial meningioma	20 (19)
Angiomatous meningioma	7 (7)
Psammomatous meningioma	5 (5)
Microcystic meningioma	3 (3)
Secretory meningioma	2 (2)
WHO grade II	18 (17)
Atypical meningioma	16 (16)
Fibrous meningioma with brain invasion	1 (1)
Chordoid meningioma	1 (1)
WHO grade III	5 (5)
Anaplastic meningioma	5 (5)

2) 22 番染色体の FISH 解析

FISH 解析を行った 35 例中 34 例は良好な解析結果が得られたが、1 例は検体が古く解析不能であった。34 例中 19 例（56%）は二倍体であった(図 6A)。13 例（38%）はモノソミー22 を示した（図 6B)。2 例（6%）は 22 番染色体のセントロメアは保存されているものの、NF2 領域が欠失している del(22q）であった（図 6C)。

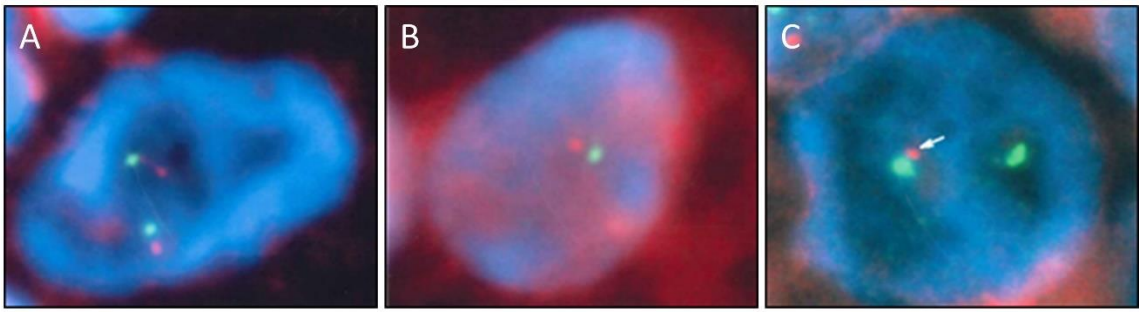


図 6　FISH の代表写真。(A) 二倍体、(B) モノソミー22、(C) del(22q)。緑は 22 番染色体セントロメア、赤は NF2 を標識している。

3) アンプリコンシークエンスによる CNA 解析

NF2 に関して、過去の文献[74]で CNA の閾値とされた score $Q \geqq 50$ を示した症例は 103 例中 71 例（69%）であった。うち 1 例は両アレル欠失を示した（図 7C)。

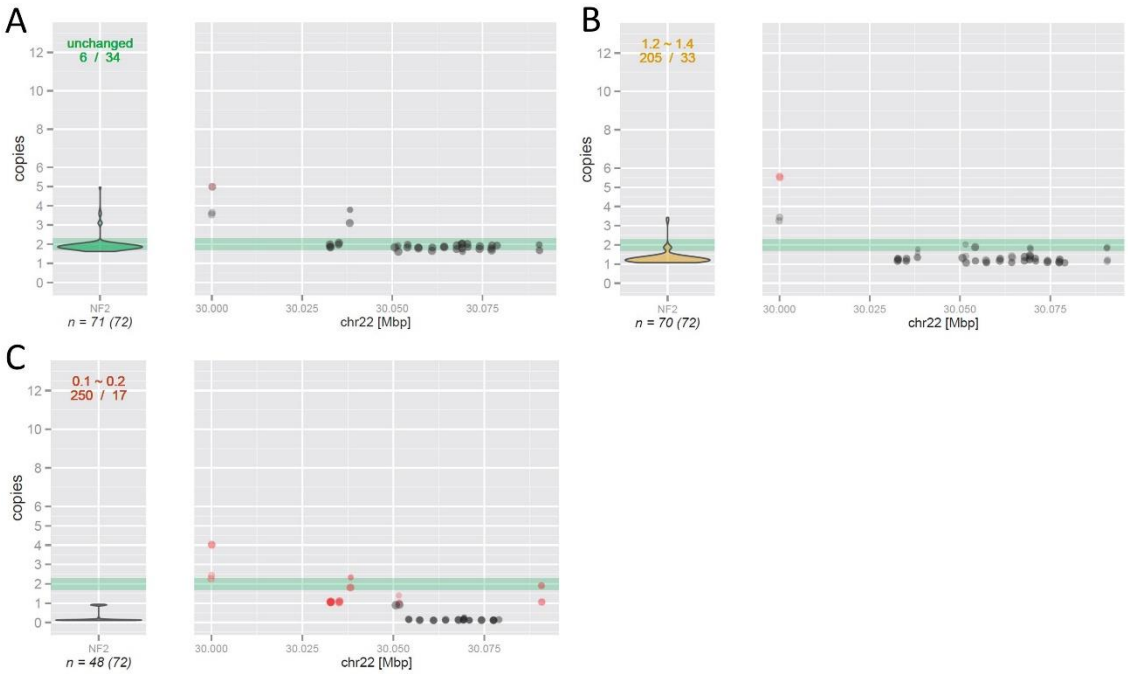


図 7　アンプリコンシークエンスによる NF2 CNA 解析の代表的結果。(A) 欠失なし、(B) 欠失あり、(C) 両アレル欠失あり。

4) FISH とアンプリコンシークエンスの CNA 解析結果の比較

FISH で良好な解析結果が得られた 34 例の FISH と CNA 解析による受信者動作特性（receiver operating characteristic, ROC）曲線を図 8 に示す。ROC 曲線下面積（area under the curve, AUC）は 0.783 であった。最大 Youden index は Score $Q = 79$ の時で、感度、特異度、的中率はそれぞれ 86.7%、73.7%、79.4%であった（表 5)。以降、Score $Q = 79$ を CNA 解析のカットオフ値に用いることとした。

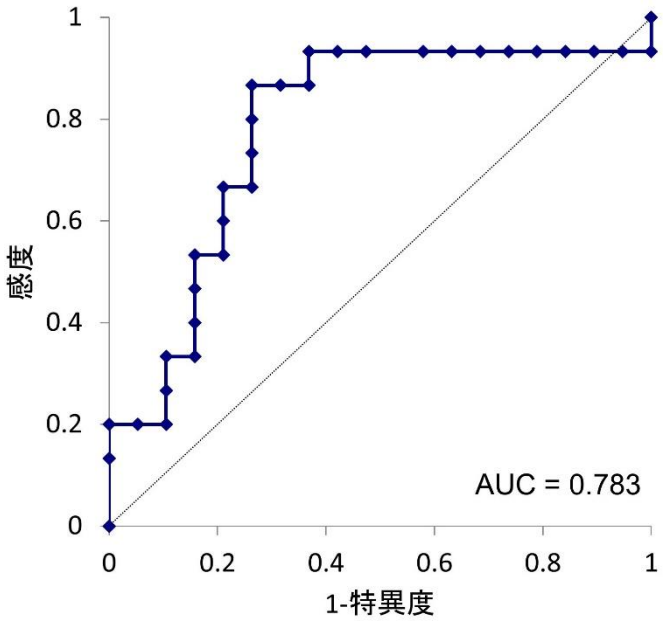


図 8　NF2 の FISH と CNA 解析による ROC 曲線。

表 5　FISH および CNA 解析による NF2 欠失の有無

症例数（%）		CNA 解析	
		欠失あり	欠失なし
FISH	モノソミー22、del(22q)	13 (38%)	2 (6%)
	二倍体	5 (15%)	14 (41%)

Score Q = 79 をカットオフ値とした時の、103 例における各遺伝子の CNA 解析結果を表 6 に示す。KLF4 はホットスポットのみのシークエンスであったため、CNA 解析は行えなかった。KIT、ERBB2、MET に遺伝子増幅が見られた 8 例はコピー数がいずれも 3 以下であり（図 9)、真の遺伝子増幅とは異なると考えられた。

表 6　各遺伝子の CNA 解析結果

	欠失	増幅
NF2	62 (60%)	0 (0%)
AKT1	4 (4%)	0 (0%)
SMO	5 (5%)	0 (0%)
TRAF7	0 (0%)	0 (0%)
KIT	4 (4%)	3 (3%)
ERBB2	0 (0%)	1 (1%)
MET	5 (5%)	4 (4%)

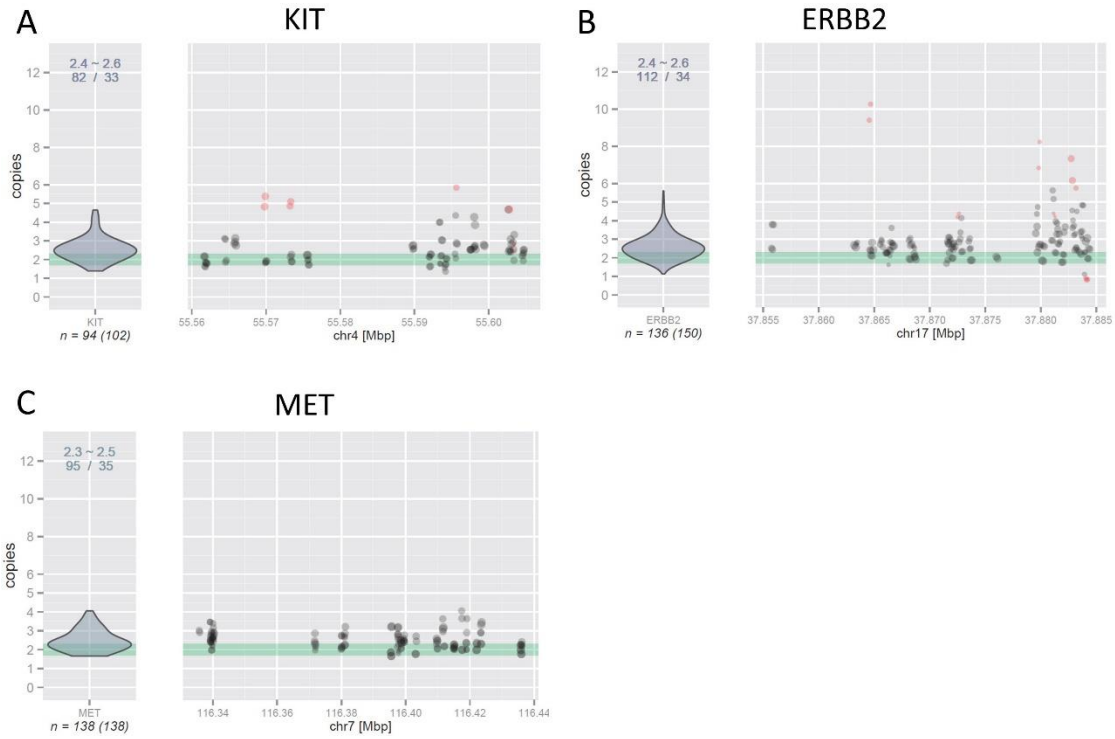


図 9　アンプリコンシークエンスの CNA 解析で遺伝子増幅を示した代表症例。(A) KIT、(B) ERBB2、(C) MET。いずれもコピー数は 3 以下であった。

5) PFPE 組織のアンプリコンシークエンスによる変異検出

103 例中 57 例（55%）に合計 71 個のアミノ酸置換を伴う変異が検出された。NF2 変異は 39 例にみられ、うち 1 例は 2 つの異なるフレームシフト変異を有していた。NF2 の変異の種類は、19 例がフレームシフト変異、10 例がスプライス領域の変異、9 例がナンセンス変異、1 例がインフ

レーム欠失であった。CNA 解析で NF2 欠失の見られた 62 例中 38 例 (61%) は NF2 の変異を有していたが、NF2 の欠失のない 41 例中 NF2 変異を有していたのは 1 例 (2%) のみで、有意に少なかった ($P < 0.0001$、Fisher の正確確率検定)。TRAF7、AKT1、KLF4、SMO のミスセンス変異はそれぞれ 16 例、8 例、5 例、1 例に認められ、これらはいずれも NF2 異常は認められなかった。KLF4 変異は全て K409Q であり、全例 TRAF7 に変異を有していた。AKT1 変異は全て E17K であり、AKT1 変異のある 5 例中 4 例は TRAF7 変異を同時に有していた。KIT、ERBB2、MET に変異のある症例はなかった。

これらの分子遺伝学的マーカーと臨床病理学的因子との相関を検討するため、髄膜腫症例を NF2 type、TRAKLS type、"not otherwise classified" (NOC) type の 3 つの genotype に分類した。NF2 type は NF2 に変異か欠失の少なくとも一方を有する症例、TRAKLS type は TRAF7、AKT1、KLF4、SMO の少なくとも 1 つに変異がある症例、上記のいずれもないものを NOC type と定義した。各遺伝子変化の割合を図 10 に示す。

これらの遺伝子変異解析および CNA 解析は検体を PAXgene で固定開始してから 7 日以内に完了できた。

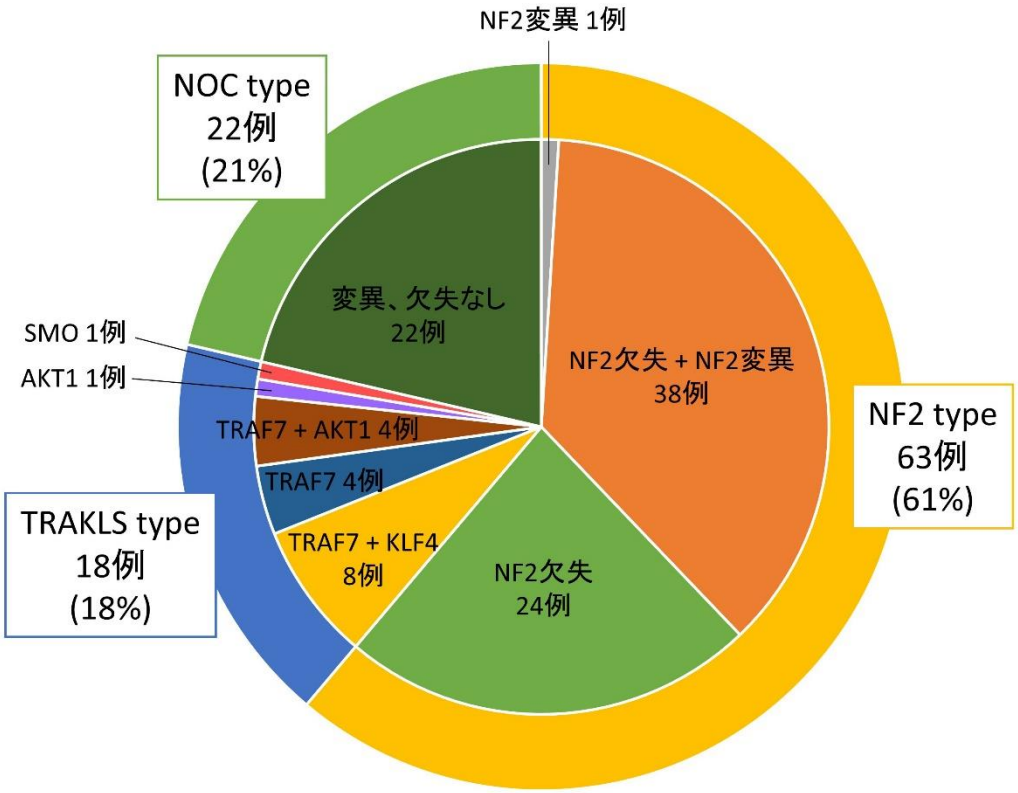


図 10　103 例の genotype の内訳。NF2 type は NF2 の欠失か変異の少なくとも一方をもつ症例、TRAKLS type は TRAF7、AKT1、KLF4、SMO に変異のある症例を示す。

6) Genotype と臨床病理学的因子との相関

NF2 type、TRAKLS type、NOC type の 3 群による genotype と年齢、性別、腫瘍部位、組織型との相関を表 7 に示す。神経線維腫症の 2 例と、放射線誘発髄膜腫の 3 例中 2 例は NF2 type であった。放射線誘発髄膜腫の残り 1 例は NOC type であった。

Genotype と年齢、性別に有意差は見られなかった。腫瘍部位と genotype には相関が見られ、頭蓋冠に発生した髄膜腫のうち 79%は NF2 type である一方、TRAKLS type は頭蓋底に多く認められた（図 11)。腫瘍径は NF2 type が TRAKLS type より大きく（腫瘍径中央値 50.3 ml vs. 14.2 ml、$P < 0.001$、Kruskal–Wallis 検定)、頭蓋底髄膜腫に限定しても、NF2 type は TRAKLS type より腫瘍径が大きかった（53.9 ml vs. 13.0 ml、$P < 0.001$) (図 12)。また、NF2 type の髄膜腫は腫瘍内石灰化や腫瘍周囲骨変化、不均一なガドリニウム増強効果など、特徴的な MRI 所見を示した（図 13)。

表 7　臨床病理学的因子と genotype

	NF2 type	TRAKLS type	NOC type	*P*値
症例数 (%)	63 (61)	18 (18)	22 (21)	
性別				1.000
男性	19 (30)	5 (28)	7 (32)	
女性	44 (70)	13 (72)	15 (68)	
年齢				0.422
平均	55	55	50	
標準偏差	16.7	14.1	15.2	
腫瘍部位				**0.026**
頭蓋冠	38 (60)	3 (17)	7 (32)	
前頭蓋底	5 (8)	3 (17)	3 (14)	
中頭蓋底	13 (21)	5 (28)	5 (23)	
後頭蓋底	6 (10)	7 (39)	6 (27)	
脳室内	1 (2)	0 (0)	1 (5)	
組織型				0.326
Grade I	45 (71)	17 (94)	18 (82)	
Fibrous meningioma	22 (35)	0 (0)	0 (0)	
Transitional meningioma	10 (16)	3 (17)	8 (36)	
Meningothelial meningioma	6 (10)	9 (50)	5 (23)	
Angiomatous meningioma	3 (5)	1 (6)	3 (14)	
Psammomatous meningioma	3 (5)	2 (11)	0 (0)	
Microcystic meningioma	1 (2)	0 (0)	2 (9)	
Secretory meningioma	0 (0)	2 (11)	0 (0)	
Grade II	14 (22)	1 (6)	3 (14)	
Atypical meningioma	13 (21)	0 (0)	3 (14)	
Fibrous meningioma with brain invasion	1 (2)	0 (0)	0 (0)	
Chordoid meningioma	0 (0)	1 (6)	0 (0)	
Grade III	4 (6)	0 (0)	1 (5)	
Anaplastic meningioma	4 (6)	0 (0)	1 (5)	

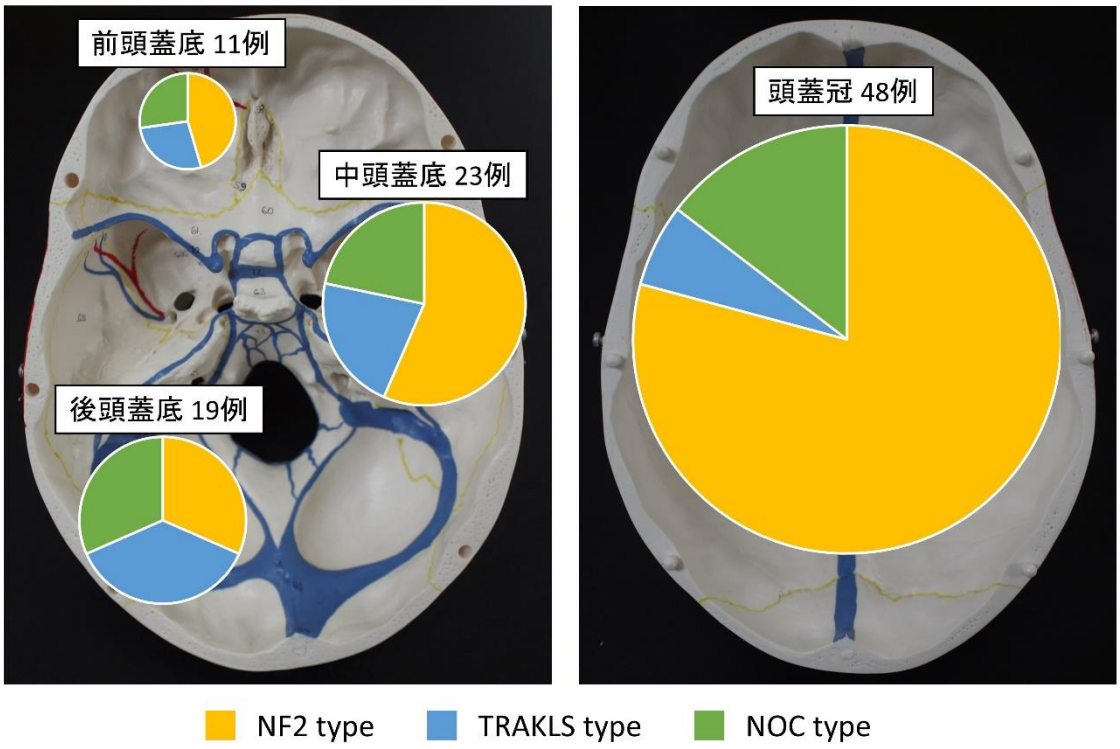


図 11 髄膜腫発生部位ごとの genotype の内訳。円グラフの大きさは症例数に対応する。

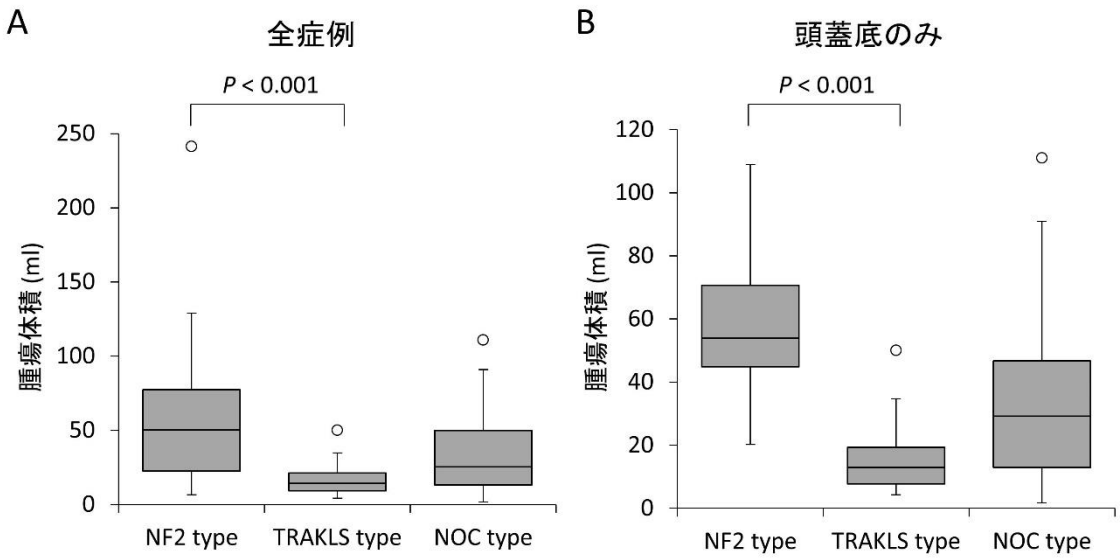


図 12　Genotype 別腫瘍径。(A) 全症例、(B) 頭蓋底髄膜腫のみ。

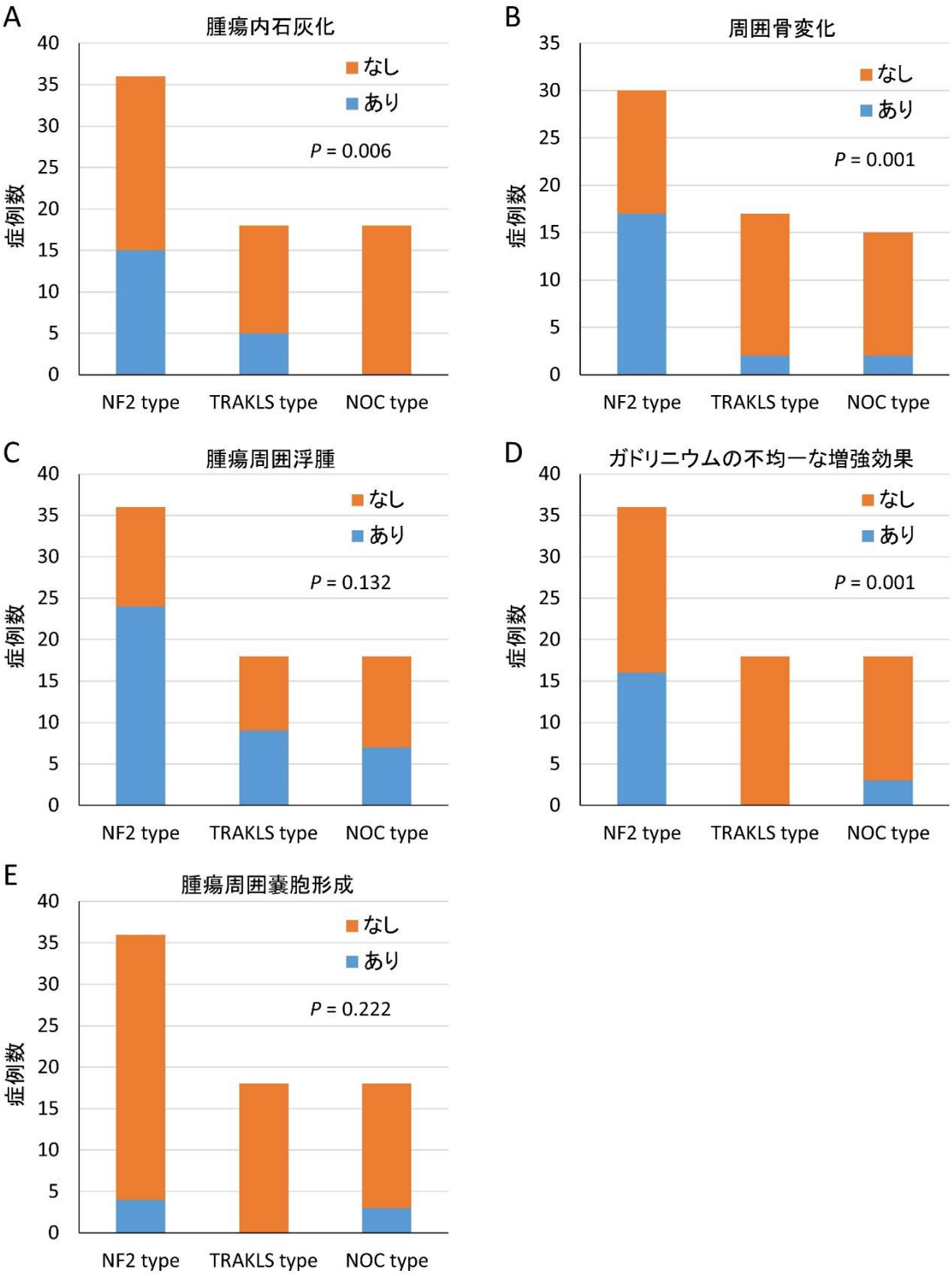


図 13　Genotype ごとの MRI 所見。(A) 腫瘍内石灰化、(B) 腫瘍周囲骨変化、(C) 腫瘍周囲浮腫、(D) ガドリニウムの不均一な増強効果、(E) 腫瘍周囲嚢胞形成。

Genotype と組織型との相関も認められた（図 14）。Fibrous meningioma は全例 NF2 type であった。PAS 陽性の分泌物をもつ secretory meningioma 成分が 103 例中 7 例に認められたが、全 7 症例に TRAF7 と KLF4 の変異の両方が認められた。微小嚢胞性変化（microcystic change）は TRAKLS type では認められなかった。Ki-67 labeling index（LI）は NF2 type が TRAKLS type より有意に高かった（P = 0.002, Kruskal–Wallis test）（図 15A）。NF2 type は他の 2 者より WHO grade II と grade III が多かったが、統計学的有意差は見られなかった（P = 0.103, χ^2 検定）（図 15B）。

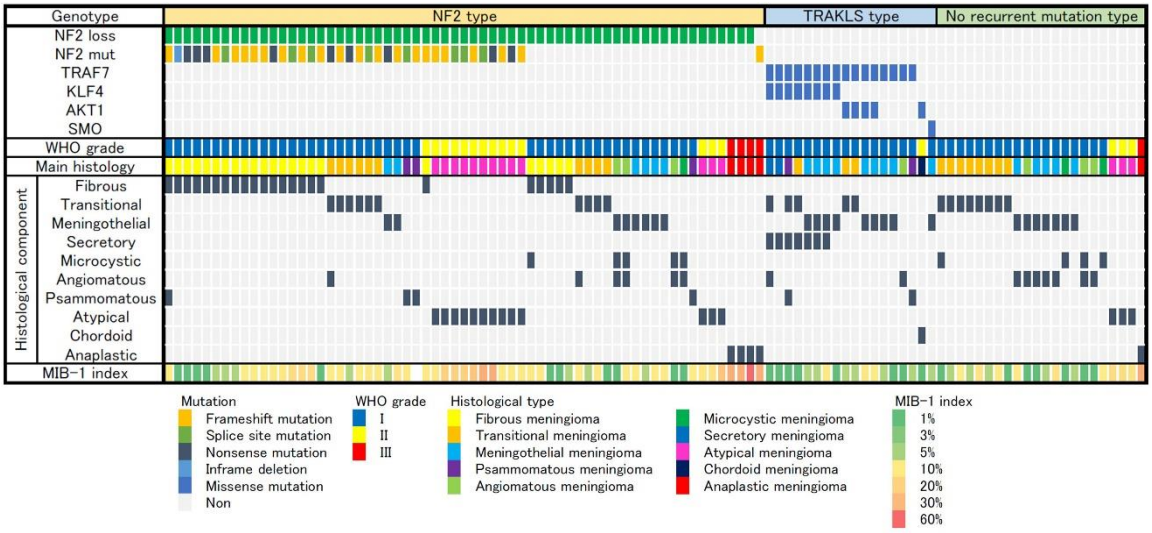


図 14　Genotype と組織型。上部に遺伝子変化、下部に組織学的所見を示す。

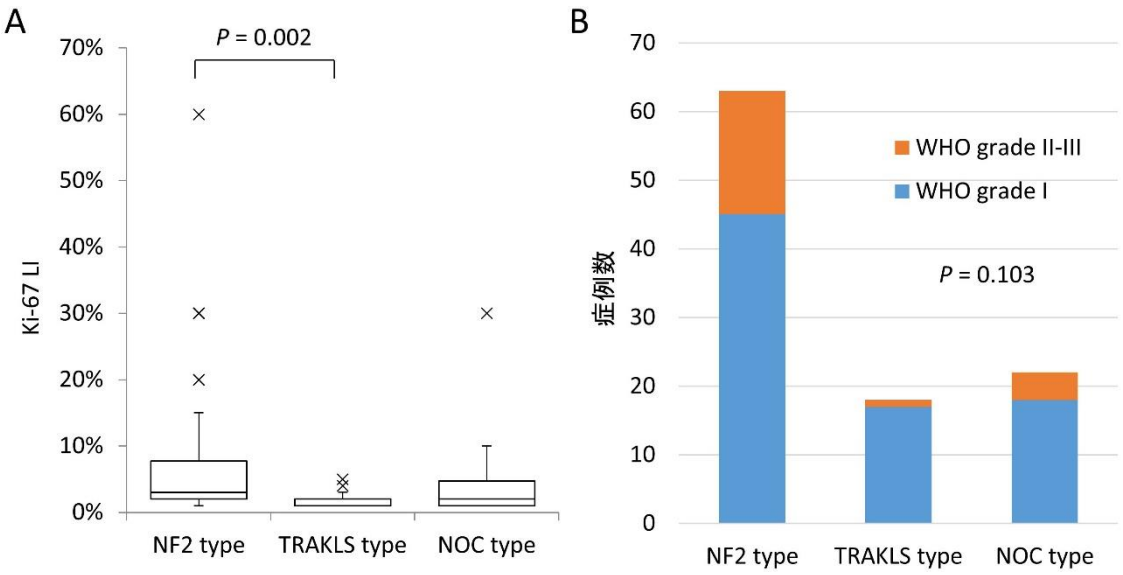


図 15　Genotype と組織学的悪性度。(A) Genotype 別の Ki-67 LI。(B) Genotype 別 WHO grade の内訳。

7）予後解析

予後追跡可能であった 90 例において、経過観察期間中央値は 25.1 ヶ月（範囲 1–310 ヶ月）であった。90 例中 30 例（33%）が再発し、再発期間中央値は 38.3 ヶ月（範囲 2.5–272 ヶ月）であった。再発症例の内訳は NF2 type 25/52 例（48%）、TRAKLS type 0/18 例（0%）、NOC type 5/20 例（25%）であった。NF2 type の 8 例と NOC type の 1 例が腫瘍死した。

年齢、性別、Simpson grade、Ki-67 LI、WHO grade、genotype のうち、単変量解析では Simpson grade [ハザード比（Hazard ratio, HR）= 4.48、95%信頼区間（confidence interval, CI）= 1.77–12.81、P = 0.002]、WHO grade（HR = 4.07、95%CI = 1.89–8.95、P < 0.001）が予後因子であるとともに、genotype では TRAKLS type に比して NF2 type、NOC type が有意に予後不良であった（それぞれ P = 0.003、0.036）。また、頭蓋底髄膜腫に限定した場合、有意差は認めないものの、TRAKLS type は NF2 type と NOC type より予後良好の傾向を示した。Kaplan–Meier 曲線を図 16 に示す。

さらに多変量解析では、genotype は Simpson grade や Ki-67 LI、WHO grade とは独立した予後因子であった（表 8）。

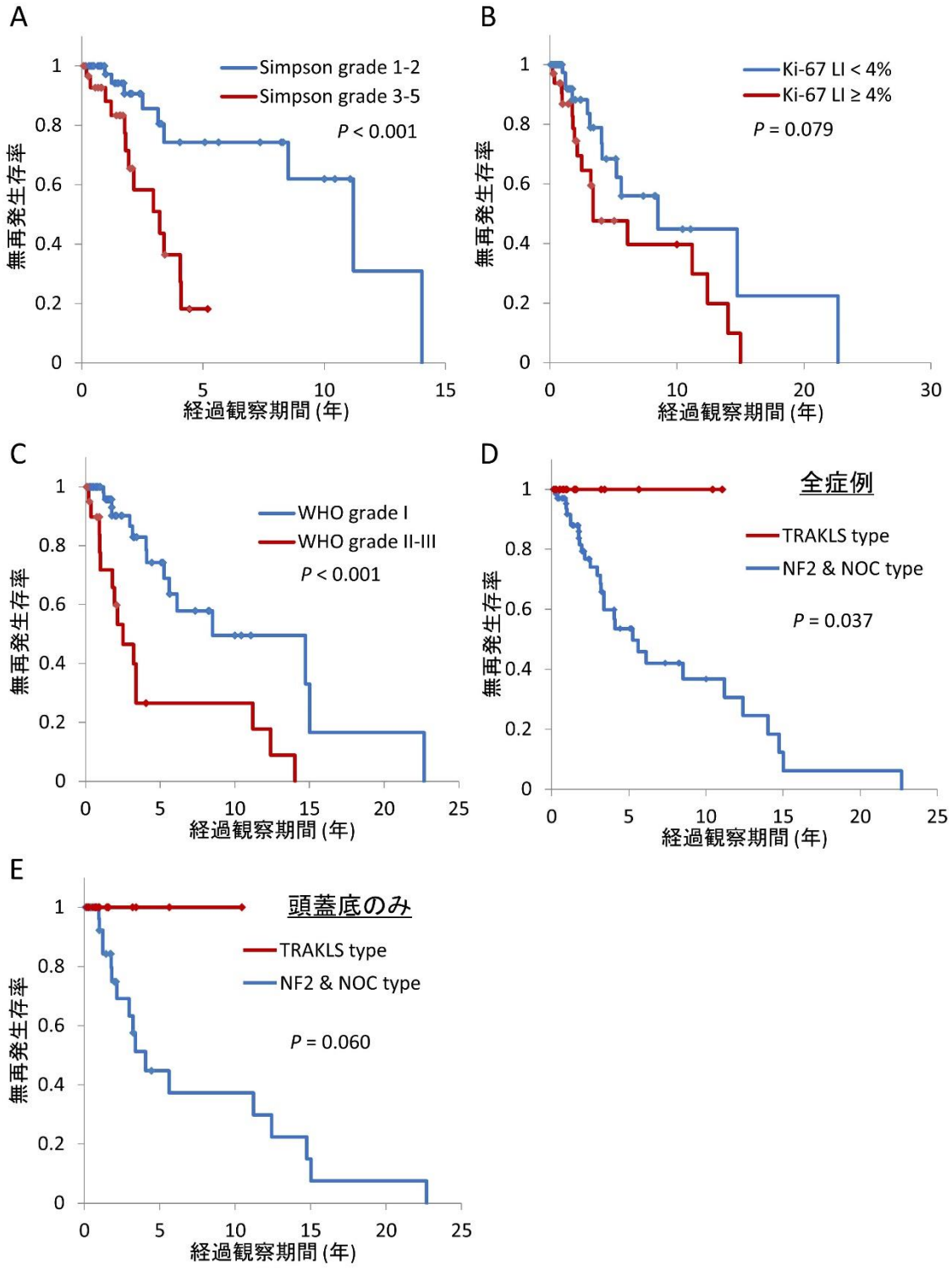


図 16　Kaplan–Meier 曲線。(A) Simpson grade、(B) Ki-67 LI、(C) WHO grade、(D)(E)(F) Genotype による無再発生存率。(D) は頭蓋冠と頭蓋底いずれも含み、(E) は頭蓋底髄膜腫のみの検討である。

表 8　臨床病理学的因子と予後との相関

変数	症例数(%)	単変量解析			多変量解析		
		HR	95% CI	P 値	HR	95% CI	P 値
年齢							
≦55 歳	44 (46%)	1.0					
> 55 歳	46 (51%)	0.87	0.41-1.88	0.727			
性別							
男性	29 (32%)	1.0					
女性	61 (68%)	0.52	0.24-1.18	0.114			
Simpson grade							
I–II	52 (63%)	1.0			1.0		
III–V	30 (37%)	4.48	1.77-12.81	**0.002**	3.94	1.49-11.65	**0.005**
Ki-67 LI							
< 4%	57 (63%)	1.0			1.0		
≧4%	33 (37%)	1.92	0.92-4.17	0.082	2.96	0.53-18.65	0.228
WHO grade							
I	69 (77%)	1.0			1.0		
II–III	21 (23%)	4.07	1.89-8.95	**<0.001**	4.94	0.89-32.65	0.070
Genotype							
TRAKLS	18 (20%)	1.0			1.0		
NF2	52 (58%)	2.0×10^{9}	2.45-*	**0.003**	2.6×10^{9}	2.05-*	**0.008**
NOC	20 (22%)	1.1×10^{9}	1.18-*	**0.036**	8.0×10^{8}	0.50-*	0.113

***は算出不能**

8) 不死化培養細胞株の樹立と外科切除 FFPE 組織との比較検討

(i) 不死化培養細胞株樹立対象症例の臨床病理学的所見と遺伝学的背景

髄膜腫外科切除生検体が得られた 10 例の臨床病理学的所見と genotype を表 9 に示す。男性 2 例、女性 8 例で、年齢中央値 62 歳（範囲 24–91 歳）であった。WHO grade は 8 例が grade I、2 例が grade II であった。10 例中 7 例は PFPE 組織からアンプリコンシークエンスを行っており、NF2 type が 4 例、TRAKLS type が 2 例、NOC type が 1 例であった。

表 9　不死化細胞株の樹立に用いた症例の臨床病理学的因子と、対応する PFPE 組織のアンプリコンシークエンス解析結果

検体名	年齢/性別	腫瘍部位	病理診断	Genotype
WY-01	59 歳/女性	海綿静脈洞	Atypical meningioma	NF2 type
WY-02	68 歳/女性	鞍結節部	Meningothelial meningioma	-
WY-03	24 歳/女性	島実質内	Fibrous meningioma	NOC type
WY-04	84 歳/男性	円蓋部	Atypical meningioma	NF2 type
WY-05	38 歳/女性	錐体部	Fibrous meningioma	NF2 type
WY-06	63 歳/女性	錐体斜台部	Meningothelial meningioma	TRAKLS type
WY-07	74 歳/女性	嗅溝	Meningothelial meningioma	TRAKLS type
WY-08	61 歳/女性	後頭蓋窩	Meningioma, WHO grade I	-
WY-09	91 歳/男性	大脳鎌	Fibrous meningioma	-
WY-10	48 歳/女性	蝶形骨縁	Meningothelial meningioma	NF2 type

(ii) 初代培養と不死化培養細胞株の樹立

10 例の髄膜腫外科切除検体の初代培養を行った結果、WY-01、WY-02、WY-04、WY-09 の 4 例において TERT 遺伝子導入を行うのに十分量の細胞が得られたが、残り 6 例は初代培養にて十分な増殖が得られないまま数回の継代にて senescence を起こした（図 17)。さらに TERT 遺伝子導入により、安定的な増殖が得られた細胞株は WY-01 と WY-02 の 2 例のみであった。WY-01 は不死化後 10 回、WY-02 は不死化後 16 回の継代に成功した。

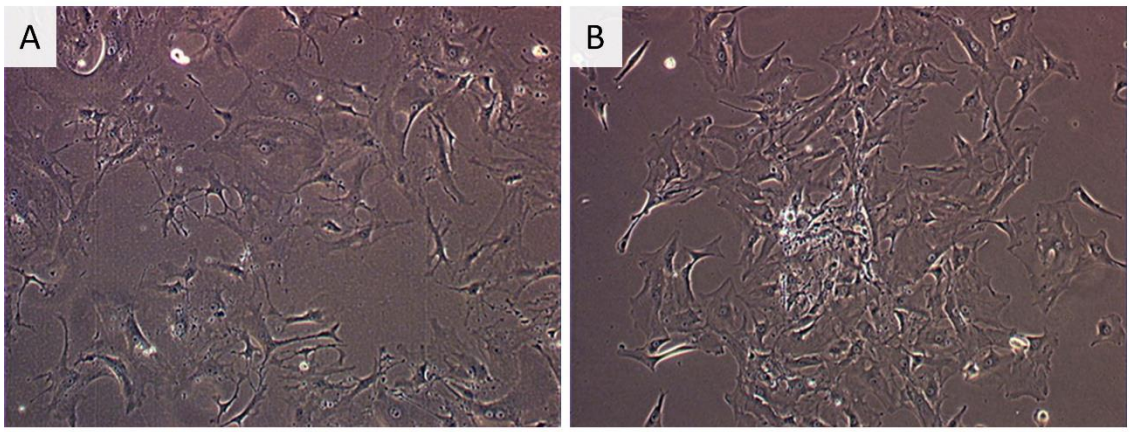


図 17　初代培養細胞の位相差顕微鏡写真。(A) WY-05、(B) WY-06。

(iii) 培養細胞株と外科切除検体の形態学的検討

不死化培養細胞株が得られた 2 例のうち、WY-01 は頭蓋底髄膜腫で 2 回の手術摘出後、海綿静脈洞内の残存腫瘍に対して放射線治療が行われており、初発から 15 年後の再発検体であった。鼻腔粘膜下まで浸潤する腫瘍で、一部腫瘍細胞の小型化や核小体の明瞭化が見られ、核分裂像が散見される atypical meningioma の像であった（図 18A、B)。WY-02 は初回手術 22 年後に再発した鞍結節部髄膜腫で、紡錘形腫瘍細胞が渦巻状に増殖する meningothelial meningioma の像であった（図 18E、F)。それぞれの検体において、初代培養細胞と不死化培養細胞株で形態に大きな変化はなく、WY-01 は細胞間の結合性がやや弱い一方（図 18C、D)、WY-02 は流れ状に増殖していた（図 18G、H)。

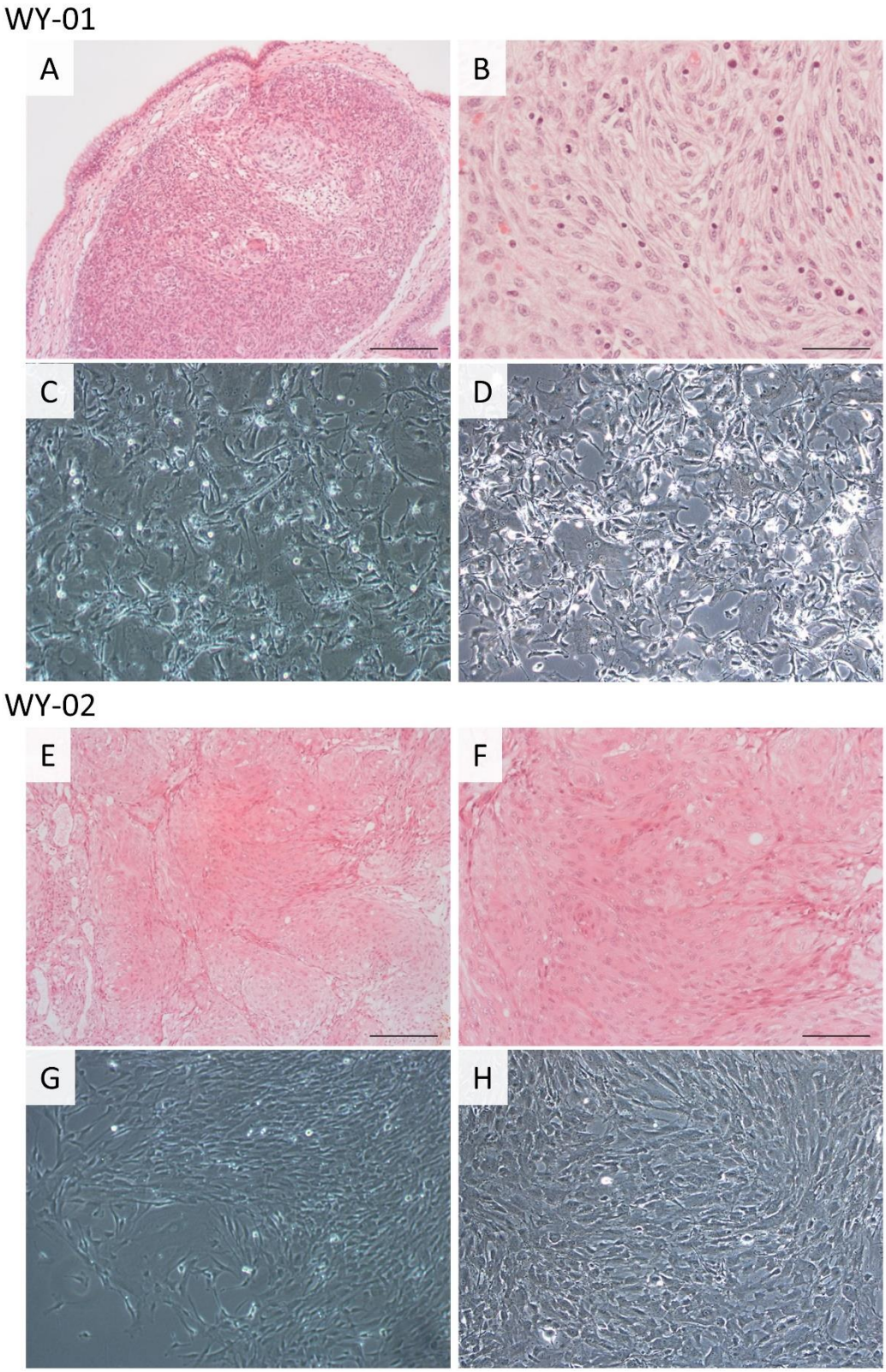


図 18　(A)(B)(E)(F) 手術検体の H&E 染色、(C)(G) 初代培養細胞の位相差顕微鏡写真、(D)(H) 不死化培養細胞株の位相差顕微鏡写真。Scale bar: (A)(E) 200 μm、(B) 50 μm、(F) 100 μm。

(iiiv) 培養細胞株と外科切除検体の免疫組織化学的検討

WY-01、WY-02 の手術検体、初代培養細胞、不死化培養細胞株の免疫組織化学の結果を表 10 に示す。EMA (図 19A–C)、PgR (図 19D–F) で手術検体と培養細胞の免疫形質に違いが見られた。また、培養細胞間でも不死化前後において、SMA (図 19G–I) と vimentin (図 19J–L) の染色性に違いが認められた。

表 10　手術検体と培養細胞の免疫組織化学の比較

	WY-01			WY-02		
	手術検体	初代培養細胞	不死化細胞株	手術検体	初代培養細胞	不死化細胞株
EMA	一部＋	—	一部＋	一部＋	—	—
PgR	一部＋	—	—	大部分＋	—	—
SMA	一部＋	一部＋	一部＋	一部＋	一部＋	＋
Desmin	—	—	—	—	—	—
S-100	—	—	—	—	—	—
Vimentin	＋	一部＋	＋	＋	一部＋	＋
Ki-67 LI	20%	10%	20%	3%	5%	2%

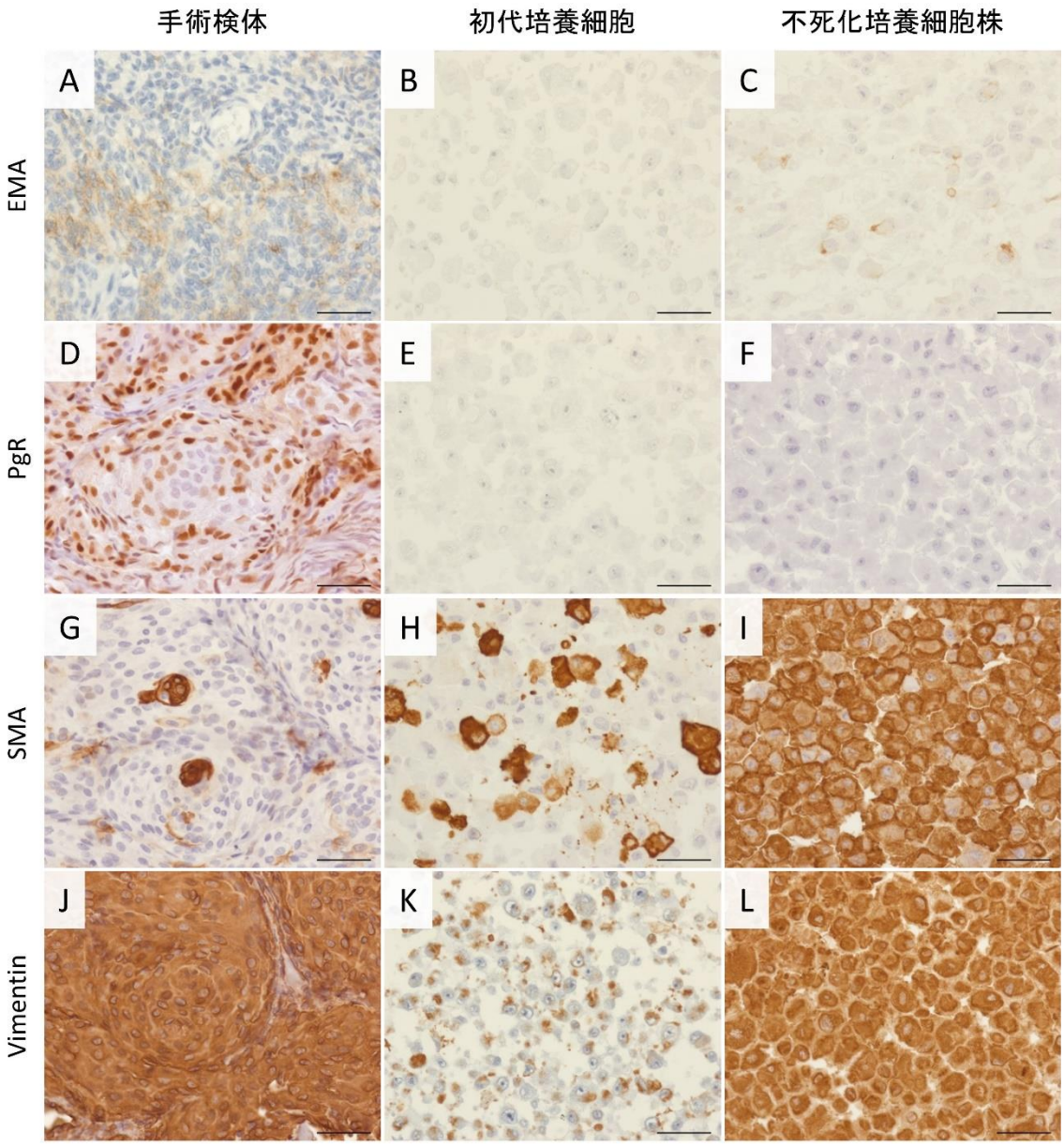


図 19　手術検体と培養細胞の免疫組織化学。(A)–(C) EMA (WY-01)、(D)–(F) PgR (WY-02)、(G)–(I) SMA (WY-02)、(J)–(L) Vimentin (WY-02)。Scale bar: 50 μm。

(iii) 分子遺伝学的検討

WY-01 および WY-02 の手術検体、不死化培養細胞株からそれぞれゲノム DNA を抽出し、アンプリコンシークエンスにより CNA および変異を検出した。WY-01 は手術検体、不死化培養細胞株いずれにおいても NF2 の欠失が認められたが（図 20A、B)、その他の遺伝子に CNA や体細胞性変異は認めなかった。WY-02 は手術検体、不死化培養細胞いずれも NF2 欠失や体細胞性変異は認められなかったが、手術検体で AKT1 の欠失が見られた（図 20C)。一方、不死化培養細胞株には AKT1 の欠失は認められなかった（図 20D)。胚細胞性変異は WY-01、WY-02 いずれも保たれており、不死化培養細胞株において標的遺伝子内に新規の変異は認められなかった(表 11)。

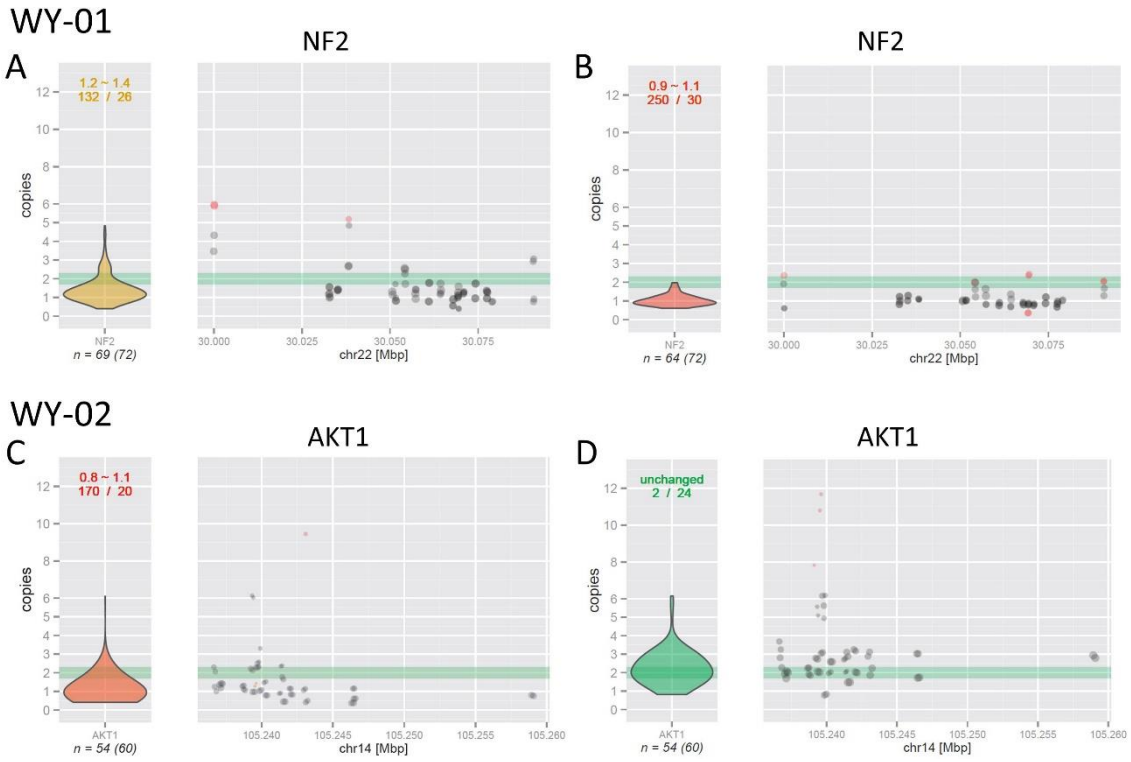


図 20　(A)(B) WY-01 の NF2 CNA 解析結果、(C)(D) WY-02 の AKT1 CNA 解析結果。(A)(C) 外科切除検体 (FFPE 組織)、(B)(D) 不死化培養細胞株。

表 11　手術検体と不死化培養細胞株の胚細胞性変異の比較

遺伝子名	遺伝子座 (GRCh37)	塩基変化	アミノ酸変化	変異陽性率	
				手術検体	細胞株
WY-01					
AKT1	105239894	c.726G>A	intron	0.994	0.996
AKT1	105242966	T>C	intron	0.997	0.999
AKT1	105243220	G>A	intron	0.996	0.995
AKT1	105246325	T>A	intron	0.995	0.998
AKT1	105246407	G>A	intron	0.416	0.497
SMO	128845702	C>T	intron	0.452	0.561
SMO	128846328	c.1164G>C	p.G388	0.493	0.492
KIT	55599436	T>C	intron	0.999	0.999
ERBB2	37868715	C>T	intron	0.997	0.997
ERBB2	37879588	c.1963A>G	p.I655V	0.494	0.498
ERBB2	37879762	G>A	intron	0.886	0.905
ERBB2	37884037	c.3508C>G	p.P1170A	0.963	0.964
WY-02					
NF2	30069350	c.1215T>G	p.A405	0.461	0.465
TRAF7	2225158	G>A	intron	0.505	0.570
AKT1	105239894	c.726G>A	p.E242	0.489	0.472
AKT1	105242966	T>C	intron	0.523	0.492
AKT1	105243220	G>A	intron	0.425	0.487
AKT1	105246325	T>A	intron	0.49	0.516
AKT1	105258972	c.9C>T	p.D3	0.476	0.482
SMO	128845018	C>T	intron	0.996	0.999
SMO	128845277	G>C	intron	0.985	0.988
SMO	128845325	G>A	intron	0.982	0.994
SMO	128845702	C>T	intron	0.999	0.986
SMO	128846328	c.1164G>C	p.G388	0.992	1.000
KIT	55599436	T>C	intron	0.997	1.000
ERBB2	37868715	C>T	intron	0.493	0.511
ERBB2	37879762	G>A	intron	0.419	0.397
ERBB2	37884037	c.3508C>G	p.P1170A	0.494	0.400
MET	116397572	c.1944A>G	p.Q648	0.567	0.551

【考察】

本検討では、髄膜腫 103 例のアンプリコンシークエンスを行い、81 例(79%) において NF2 の欠失、もしくは NF2、TRAF7、AKT1、KLF4、SMO のいずれか 1 つ以上に変異が認められた。さらに、これらの遺伝子変化に規定される genotype は、腫瘍径、腫瘍部位、MRI 所見、組織型、Ki-67 LI、予後と有意に相関することが明らかとなった。また、ERBB2、KIT、MET に分子標的治療の適応となる増幅や変異は見い出せなかった。さらに、手術検体より髄膜腫細胞株の樹立を行い、NF2 type と NOC type に相当する不死化培養細胞株が得られたが、TRAKLS type の髄膜腫細胞株は樹立できなかった。

アンプリコンシークエンスでは CNA の検出が困難であるとされてきたが、Reinecke らは 2015 年、アンプリコンシークエンスから CNA を算出する方法を見出した[74]。今回我々はアンプリコンシークエンスとともに FISH を併用して NF2 の CNA を評価したところ、60%の症例で NF2 の欠失が認められた。以前より神経線維腫症 2 型を有さない孤発性髄膜腫の 40–60%に NF2 の欠失があると報告されており[49,75,76]、アンプリコンシークエンスによる NF2 欠失の評価の妥当性が示された。しかし、FISH の結果が得られた 34 例のうち 6 例でアンプリコンシークエンスと FISH の結果に相違が見られた。このうち 5 例はアンプリコンシークエンスで NF2 欠失があるものの、FISH で欠失が認められなかったが、うち 4 例は NF2 にアミノ酸置換のある変異が見られた。NF2 変異のある髄膜腫はほぼ全例 NF2 の欠失を有すると報告されており[55,56,77-80]、これら 4 例においては、FISH が偽陰性であった可能性が考えられ、アンプリコンシークエンスの CNA の高い検出率が示唆された。

NF2 欠失は孤在性髄膜腫の腫瘍発生初期に起きるとされているが[9,26]、NF2 欠失の有無と無再発生存期間に有意な相関は示されていない[81,82]。一方、本研究において TRAKLS type とした TRAF7、AKT1、KLF4、SMO の変異と予後との相関に関しては現在まで調べられていなかった。我々は今回、髄膜腫を NF2 type、TRAKLS type、NOC type の 3 群に分類した場合、genotype が予後因子として知られる腫瘍摘出率 (Simpson grade) や組織学的悪性度 (Ki-67 LI、WHO grade)[47,83-85] とは独立した予後因子でり、TRAKLS type が最も予後良好であることを示した。適切な治療を行うために、NF2 異常の有無を調べるだけでなく、non-NF2 type の中から予後良好群である TRAKLS type を同定することの重要性が示唆され

た。近年、atypical meningioma に対して、外科切除後の早期放射線治療の有効性が報告されており[86,87]、現在無作為化比較試験が行われている[88]。NF2 type や NOC type は再発率が高く、術後放射線治療の適応の可能性も示唆され、今回用いた解析システムは、術後 7 日間で genotype が判明することから、genotype に基づいたスムーズな術後治療が期待される。ただし、実際の術後治療への応用には、他の臨床病理学的因子を含めた総合的な判断が望まれる。また、近年 PIK3CA の変異が non-NF2 髄膜腫において報告されており[89]、本検討で NOC type とした症例にも PIK3CA 変異を有するものが含まれている可能性がある。さらに、TERT 遺伝子のプロモーター領域の変異が、髄膜腫の再発や悪性化に関与しているとの報告もあり[90,91]、今後はこれら PIK3CA や TERT プロモーター領域の変異を含めた検討が望まれる。

頭蓋底髄膜腫において、TRAKLS type は NF2 type や NOC type と比べて予後良好の傾向を示した。Mansouri らは、頭蓋底髄膜腫と頭蓋冠髄膜腫の再発率を比較し、頭蓋底髄膜腫では一定の期間を経過すると再発率がプラトーに達すると報告している[92]。また、Ohba らも頭蓋底髄膜腫において、部分切除後の放射線治療の有無で再発率が異なる群と、再発率が変化しない群があることを明らかにしている[93]。このように、頭蓋底髄膜腫は特徴的な再発形式を示しているが、これは genotype、特に TRAKLS type が予後良好であることに起因していることが予想され、genotype の検索の重要性が示唆される。頭蓋底髄膜腫は、解剖学的に脳神経や血管が豊富で、全摘出が困難な場合があり、そのような症例では、部分切除検体で genotype を検索し、TRAKLS type の場合には放射線治療などの積極的な治療をせず、慎重な経過観察が可能と考えられる。さらに、TRAKLS type のうち、AKT1 と SMO の変異は、それぞれ下流シグナル経路を活性化させることが報告されており、それぞれ AKT 阻害剤や hedgehog 阻害剤の有用性も示唆されている[72,73]。これらの変異を有する症例に対しては、再発時や不完全切除で症状が残存している場合などに、AKT 阻害剤や hedgehog 阻害剤が有用である可能性があり、その点においても、genotype の検索は重要であると考える。

Genotype は腫瘍径や MRI 所見とも相関した。NF2 type は TRAKLS type と比べて有意に腫瘍径が大きかったが、これは NF2 の増殖能の高さによるものと考えられた。実際、NF2 type は TRAKLS type よりも高い Ki-67 LI を示しており、これは NF2 の欠失と高い増殖能を示した過去の報告と矛盾しないものであった[94,95]。NF2 type は腫瘍内石灰化、周囲骨

変化、ガドリニウムによる不均一な増強効果など特徴的な MRI 所見を示しており、腫瘍部位や腫瘍径とこれらの所見をあわせて、術前に genotype を予想することも可能であると考えられる。

NF2 type は以前より、fibrous meningioma や transitional meningioma が多いとされている[54,96]。本症例においても、fibrous meningioma は全例 NF2 type であった。また、secretory meningioma の成分を有する 7 例は全例 TRAF7 と KLF4 の変異を有しており、以前の報告と一致するものであった[60]。しかし、secretory meningioma の成分は一部の症例ではごく限局しており、注意深い観察が必要であった。最も広い領域を占める組織型を病理診断としているが、予後との相関を鑑みると、わずかな領域を占める組織型も重要と考えられ、genotype を参考にした組織型の決定が、今後の病理診断に必要となってくる可能性がある。また、本検討では当初の病理診断が atypical meningioma であったために遺伝子解析が行われたものの、その後の組織型再検討により HPC であることが判明した一例が含まれていた。この一例は検討対象外としているが、NF2 異常や、TRAF7、AKT1、KLF4、SMO の変異は認められなかった。NOC type に分類される、髄膜腫に特徴的な遺伝子背景を有さない腫瘍の場合、髄膜腫に非常に類似した形態を示す別の腫瘍である可能性も否定できないと考えられる。従って、genotype を参考にした組織型の注意深い再確認により、正確な病理診断が可能になると考える。本研究に用いた遺伝子解析システムの髄膜腫診断および治療への応用アルゴリズムを図 21 に示す。

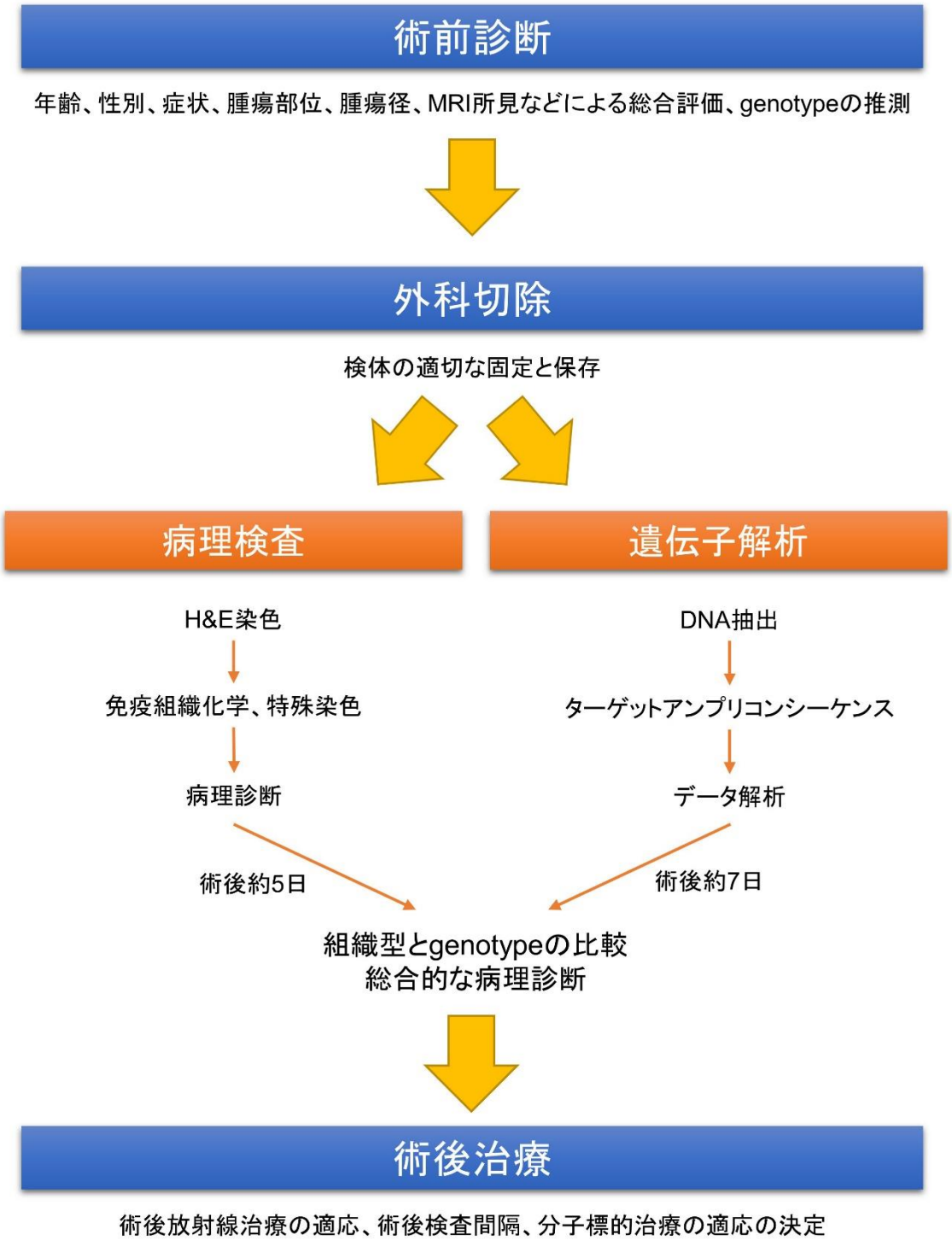


図 21　アンプリコンシークエンスを併用した病理診断と治療方針の策定。

様々な腫瘍で大規模な遺伝子解析が行われた結果、異なる臓器に発生した異なる組織型を示す腫瘍間でも、同じ遺伝子異常が同定されており、そのような腫瘍に対しては同一の分子標的治療薬が有効である可能性がある[97]。髄膜腫では EGFR や PDGFR など、種々の受容体型チロシンキナーゼ(receptor tyrosine kinase, RTK) が高発現しており[34-36,98]、分子標的治療の可能性が示唆されている。Saini らは、髄膜腫の約 20%で KIT の発現が見られたと報告しているが[99]、髄膜腫における KIT の変異の有無は調べられていない。消化管間質腫瘍 (Gastrointestinal stromal tumor, GIST) では大部分の症例が KIT に変異を有し、チロシンキナーゼ阻害剤である imatinib に感受性を示すとともに、imatinib 抵抗性を示す変異も報告されている[100,101]。また、悪性黒色腫においても KIT の変異を有する症例があり、imatinib に対する感受性が示唆されている一方で、KIT の遺伝子増幅による imatinib 抵抗性も示されている[102]。髄膜腫において imatinib を用いた第二相臨床試験が行われているが、その有効性は示されておらず[39]、その原因として KIT の imatinib 抵抗性変異や遺伝子増幅の可能性が考えられたが、本研究では 103 例の髄膜腫において KIT に変異や有意な遺伝子増幅を有する症例は認められなかった。また、ERBB2 の遺伝子増幅を有する乳癌や胃癌に対し trastuzumab などが適応となっており、良好な治療効果が得られている[103,104]。高悪性度髄膜腫や再発性髄膜腫において、ERBB2 の遺伝子増幅やタンパク発現が報告されており[105,106]、治療標的となる可能性が考えられたが、本検討では ERBB2 の有意な遺伝子増幅を示した症例は認められなかった。さらに、胃癌や食道癌などの一部の症例で、MET の遺伝子増幅とタンパク発現亢進が見られる他[107]、EGFR 阻害剤である gefitinib や erlotinib の獲得耐性因子として MET の遺伝子増幅が知られている[108]。現在複数の腫瘍において MET 阻害剤を用いた臨床試験が行われており[109-111]、gefitinib や erlotinib が無効とされる髄膜腫においても MET 遺伝子の増幅の評価が望まれたが、本検討において、MET 遺伝子の有意な増幅を示した症例はなく、gefitinib や erlotinib に対する治療抵抗性の原因や MET 阻害剤の適応となる症例を示すことはできなかった。

本研究では、10 例の髄膜腫切除検体から初代培養を行い、うち 2 例で不死化培養細胞株の樹立に成功した。免疫組織化学では、WY-02 の不死化培養細胞株では EMA、PgR の発現消失と SMA の発現亢進がみられ、外科切除検体とは異なる結果を示した。EMA と PgR は髄膜腫の免疫組織学的マーカーとして知られているが、部分的な陽性像にとどまったり、悪性度の

高い髄膜腫では発現が低下するとされる[26,112,113]。WY-02 の手術検体も、EMA および PgR が陰性の腫瘍細胞も混じていた。一方、平滑筋マーカーとして知られる SMA は、手術検体では渦巻き形成部分の中心部で陽性を示す傾向が見られた。Tsuchida らは、髄膜腫 65 例の免疫組織化学を検討し、17 例で SMA 陽性細胞が散在性に、もしくは渦巻き形成部分に一致して認められたとしており[114]、合致する結果であった。WY-02 の初代培養細胞は、SMA が一部陽性であり、手術検体と同様、腫瘍の heterogeneity を表すものと考えられた。その不死化細胞株は、SMA にびまん性陽性を示しており、形態とあわせて SMA 陽性、PgR 陰性の渦巻き中心部分が monoclonal に増殖したと考えられる。遺伝子解析の結果、WY-01 は手術検体、不死化培養細胞株ともに NF2 の欠失があり、NF2 type に相当すると考えられた。一方で WY-02 は手術検体（FFPE 組織）で AKT1 の欠失が認められたものの、不死化培養細胞株には AKT1 欠失は認められなかった。原因として、手術検体が FFPE 組織であったことから、AKT1 の欠失が偽陽性であった可能性、もしくは腫瘍内に含まれる血管内皮細胞や周囲の平滑筋細胞などの正常細胞が不死化、増殖した可能性が考えられる。形態と免疫組織化学の結果、また後述するホルマリンによる DNA 分解の影響を考慮すると、手術検体の AKT1 欠失が偽陽性であったと考えられるが、不死化細胞が髄膜腫細胞株であることを確認するには、不死化培養細胞株の異種移植などで、髄膜腫に特徴的な形態や電子顕微鏡所見を示すか検証が必要である。

本検討では、不死化培養細胞株の樹立は 10 例中 2 例にとどまり、TRAKLS type に相当する初代培養細胞は数回の継代で senescence を起こし、不死化培養細胞株は得られなかった。Ishiwata らは、WHO grade I の髄膜腫切除検体 11 例の初代培養を行ったものの、安定した細胞株の樹立はできなかったと報告している[68]。髄膜腫外科切除検体をマウスの皮下に異種移植する方法も簡便な髄膜腫動物モデルとして用いられているが、その成功率は 60%程度と高くはない[71]。Ragel らは、2 種類の髄膜腫細胞株（IOMM-Lee と CH-157MN）と 9 例の髄膜腫外科切除検体を用いて初代培養とヌードマウスへの異種移植を行い、複雑核型を示す細胞株や外科切除検体では、in vitro や動物モデルでの腫瘍の増殖能力が高かったのに対し、正常核型や単一の染色体欠失のみの核型を示した外科切除検体では増殖能が低く、異種移植で腫瘍増大がみられなかったとしており[71]、髄膜腫の初代培養や動物モデル作製において染色体不安定性の有無が重要であることが示唆される。実際、現在用いられている髄膜腫細胞株は複雑核型を

示すものが多い (表 3)。一方で、Goutagny らは、NF2 変異のある髄膜腫は染色体不安定性が亢進しているのに対し、NF2 が正常の髄膜腫では染色体は比較的安定していると報告しており [115]、NF2 異常のない TRAKLS type の髄膜腫は、TERT 遺伝子導入や異種移植など、現在までに行われている方法での細胞株樹立は困難であることが予想され、新規の培養細胞株樹立方法の開発が望まれる。

NGS 解析には良質な DNA が必要である。本検討では、主に PFPE 組織を用いたが、PFPE 組織は良質な DNA が得られるとともに、H&E 染色や免疫組織化学も可能であるという利点がある [116-118]。一方で、通常の病理診断に用いられている FFPE 組織ではホルマリンによる DNA 断片化が起こるとされる [119,120]。不死化培養細胞株との比較のため、FFPE 組織 2 検体から抽出した DNA でアンプリコンシークエンスを行ったが、変異に関しては培養細胞株とほぼ同様の結果が得られた。一方で、WY-01 の FFPE 組織では培養細胞株より NF2 の score Q が低く、コピー数のばらつきも大きかった。原因として、リンパ球や血管内皮細胞などの腫瘍内正常細胞の混入とともに、ホルマリン固定による核酸の分解の影響が考えられた。本システムにおいて FFPE 組織を用いる場合、変異の検出は PFPE 組織と遜色なく行えるが、CNA 解析には検体の適切な保存と結果の慎重な解釈が必要である。長時間のホルマリン固定を避け、また術後早期に解析を行って DNA 断片化を避けること、また score Q の閾値の微調整が必要と考えられた。

【総括および結論】

本研究において得られた新知見は、以下の通りである。

1) 髄膜腫の 79%は NF2 の欠失/変異もしくは TRAF7、AKT1、KLF4、SMO の 1 つ以上に変異を有しており、これらの遺伝子変化から、NF2 type、TRAKLS type、NOC type の 3 群に分類することができる。
2) 上記により分類した genotype は、腫瘍発生部位、腫瘍径、MRI 所見、組織型、予後と密接に関連している。
3) TRAKLS type は予後良好であり、腫瘍部分切除に留まっても、経過観察が可能となり得る。
4) 髄膜腫において、KIT、ERBB2、MET に分子標的治療の対象となり得る遺伝子変異や有意な遺伝子増幅は見られない。
5) TRAKLS type の髄膜腫不死化培養細胞株の樹立は TERT 遺伝子導入では困難である。

以上の知見をもとに、髄膜腫の診断において、適切な検体の保存のもと、アンプリコンシークエンスによる遺伝子解析を併用して病理診断を行うことで、より正確な病理診断と適切な術後治療が行えるものと考えられる。TRAKLS type の手術検体からの髄膜腫細胞株の樹立は困難であり、くも膜細胞への遺伝子変異導入など、異なる手法による細胞株、動物モデルの確立が必要であると考えられる。また、NOC type に分類される髄膜腫の責任遺伝子の同定や、再発・悪性化の原因解明には、同一患者からの複数の手術検体と、より多くの遺伝子を含むパネルを用いた遺伝子解析が必要であると考えられる。

第 二 章

髄膜発生孤在性線維性腫瘍/血管周皮腫の
NAB2-STAT6 融合遺伝子と
臨床病理学的因子との相関に関する研究

【緒言】

髄膜発生孤在性線維性腫瘍と血管周皮腫の疫学

孤在性線維性腫瘍（solitary fibrous tumor, SFT）は、胸腔内や軟部組織、その他全身あらゆる部位に発生する間葉系腫瘍であるが、髄膜発生SFTは1996年にCarneiroらによりはじめて報告された[16]。脳腫瘍全体における頻度は不明であるが[121]、後述するsignal transducer and activator of transcription 6 (STAT6) の免疫組織化学の普及により、今後SFTと診断される症例は増えることが予想される。SFTはあらゆる年齢に起こるが(11–75歳)、平均年齢は40–50歳台とされ、性差はない[121,122]。後頭蓋窩や脊髄に多く、画像所見および手術所見が髄膜腫と類似しており[121,123]、髄膜腫として手術されたものの、病理診断にてはじめてSFTと判明する症例も経験される[22]。

一方で血管周皮腫（hemangiopericytoma, HPC）は、軟部組織に発生する血管が豊富な腫瘍として1942年にStoutらにより初めて報告され[124]、髄膜に発生するHPCは1993年の中枢神経系腫瘍WHO分類第2版より初めて髄膜腫から独立した疾患として確立した[15]。HPCは脳腫瘍の1%以下、髄膜性腫瘍の2–4%とまれであり[125,126]、男女比は1:1～1.5:1で、あらゆる年齢に起こるが（19–80歳)、平均年齢は40歳代とされる[126,127]。

髄膜以外を発生母地とするHPCは、臨床病理学的にSFTとの類似点が多く、胸膜や軟部組織を原発とするHPCはSFTに統一されている[20,21]。しかし、髄膜発生のSFTとHPCでは予後が異なることから[22]、現行の中枢神経系腫瘍WHO分類第4版では未だに異なる疾患に分類されている[3]。実際、SFTは再発や転移はまれとされる一方で[128]、HPCは局所再発率が高く、1年、5年、15年再発率はそれぞれ3.5%、46%、92%とされる[127]。さらに、髄腔内播種や遠隔転移を起こし、死亡した症例も多数報告されており[125-127]、完全切除後も長期間の経過観察が望まれる腫瘍である。

SFTとHPCの病理組織像

SFTは単形性の紡錘形細胞が、線維性間質を背景に束状や不規則、花むしろ状に増殖する間葉系腫瘍である（図2C)。硝子化した膠原線維の増生が特徴的とされるが、細胞密度や膠原線維の量は症例により様々である[122]。HPCで見られる鹿の角状の血管（staghorn vessels）が見られることもある[22,121]。免疫組織化学にて、腫瘍細胞はびまん性にCD34およびvimentinに陽性を示し、またBcl-2に陽性を示すことが多い。S-100

protein および EMA に陰性を示す[18,22,121,123,129,130]。SFT には WHO grade がついておらず、前述の通り一般的には良性腫瘍と考えられているが、長期間の経過観察後に遠隔転移する症例も報告されている[131,132]。また、細胞密度の上昇や核分裂像の増加（高倍率 10 視野あたり 5 個以上)、細胞異型、壊死、浸潤性増殖などを示す malignant SFT や、典型的な SFT 内に退形成性成分を混じる dedifferentiated SFT も報告されている[133,134]。

一方、HPC は類円形から多角形の腫瘍細胞が、鹿の角状の血管を伴いながら密に増殖する腫瘍である（図 2D)。以下に示す 2 項目をともに満たす HPC は anaplastic HPC とされる［(1) 核分裂像の増加（高倍率 10 視野あたり 5 個以上）もしくは壊死、(2) 出血、核異型、細胞密度の上昇のうち 2 つ以上]。HPC は WHO grade II、anaplastic HPC は WHO grade III に分類されている[3]。HPC は vimentin 陽性で、CD34 は限局的かつ弱陽性を示すとされる[130]。

SFT は以前より fibrous meningioma との鑑別を要する腫瘍として報告されているが[16-18]、その他にも神経鞘腫、神経線維腫、線維肉腫など、鑑別疾患は多岐に渡り[122,135]、特に malignant SFT や dedifferentiated SFT では特徴的な組織像を欠くことがあり、診断に苦慮する。Fibrous meningioma との鑑別点として、髄膜腫は比較的豊富な細胞質を有する長紡錘形の腫瘍細胞で、束状、渦巻状に増殖し、免疫組織化学にて EMA に陽性を示す一方、SFT では EMA 陰性となるとされるが[16,130]、EMA に陽性を示す SFT も報告されている[133,134]。また、CD34 のびまん性陽性所見は SFT に特徴的とされるが、CD34 にびまん性陽性を示す髄膜腫が報告されているほか、神経線維腫でも陽性になり、特異性は高くない[18,136,137]。HPC も以前は髄膜腫の一亜型と考えられていた通り、髄膜腫との鑑別が問題となるほか、時に悪性末梢神経鞘腫瘍や滑膜肉腫も類似の形態をとることがある[138,139]。

また、SFT と HPC は境界明瞭で、鹿の角状の血管を伴いながら腫瘍細胞が増殖するという共通点があるが、SFT では高度の膠原線維沈着と硝子化領域が比較的広範囲に見られること、CD34 がびまん性に陽性であること、核分裂像がまれであることなどの鑑別点があげられており、両者は区別されてきた[22,23,121]。一方で、胸腔内や軟部組織に発生する SFT と同様に、髄膜発生の SFT と HPC が同一の腫瘍スペクトラムであるとの報告もなされてきた[140,141]。実際、SFT 内に HPC 様の腫瘍細胞の密な増殖が見られる領域が混在する症例も多く[16]、髄膜発生の SFT と HPC の異同につ

いては議論がなされてきた。

NGFI-A binding protein 2 (NAB2)と STAT6 の機能

NGFI-A binding protein 2 (NAB2) と STAT6 はいずれも 12 番染色体長腕上に反対方向にコードされている。そのコード領域は非常に近接しており、1,852 塩基対しか離れていない (図 22A) [142]。

NAB2 は、zinc-finger 転写因子である early growth response (EGR) 1、EGR2 の転写リプレッサーである。NAB2 は 2 つの保存ドメイン、NAB conserved domain (NCD) 1 と NCD2 をもち (図 22B)、NCD1 は EGR1 との相互作用に重要である [143]。NCD2 は転写抑制作用を有するとともに、NAB2 の C 末端には chromodomain helicase DNA-binding protein 4 (CHD4)-interaction domain (CID) があり、ATP 依存性クロマチンリモデリング複合体である nucleosome remodeling and histone deacetylase (NuRD) 複合体の CHD3 や CHD4 と結合して転写抑制作用を示す (図 22D) [144-146]。

EGR1 はサイトカイン、transforming growth factor-β (TGF-β) をはじめとする増殖因子、ホルモン、機械的刺激、紫外線、低酸素など、様々な刺激によって発現が誘導され [147]、その標的遺伝子として TGF-β、platelet-derived growth factor (PDGF)、vascular endothelial growth factor (VEGF)、connective tissue growth factor (CTGF)、tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1)、NAB2 など多数報告されている (図 22C) [147-149]。NAB2 は、EGR1 により発現が誘導されるが、EGR1 と結合して EGR1 の標的遺伝子の発現を抑制し、負のフィードバックループを形成している (図 22D) [150]。

STAT6 は DNA 結合ドメイン (DNA-binding domain, DBD)、src-homology 2 (SH2) ドメイン、転写活性ドメイン (transcriptional activation domain, TAD) などを有し (図 22B)、SH2 ドメインを介して interleukin-4 (IL-4) や IL-13 などのレセプターに結合し、リン酸化されて二量体を形成し、核に移行して転写因子として機能する [151]。

前立腺癌や肺癌において、NAB2 の発現が低下していることが報告されており [152,153]、またホジキンリンパ腫や皮膚 T 細胞性リンパ腫、前立腺癌などで STAT6 の活性化が亢進していることが知られている [154-156]。

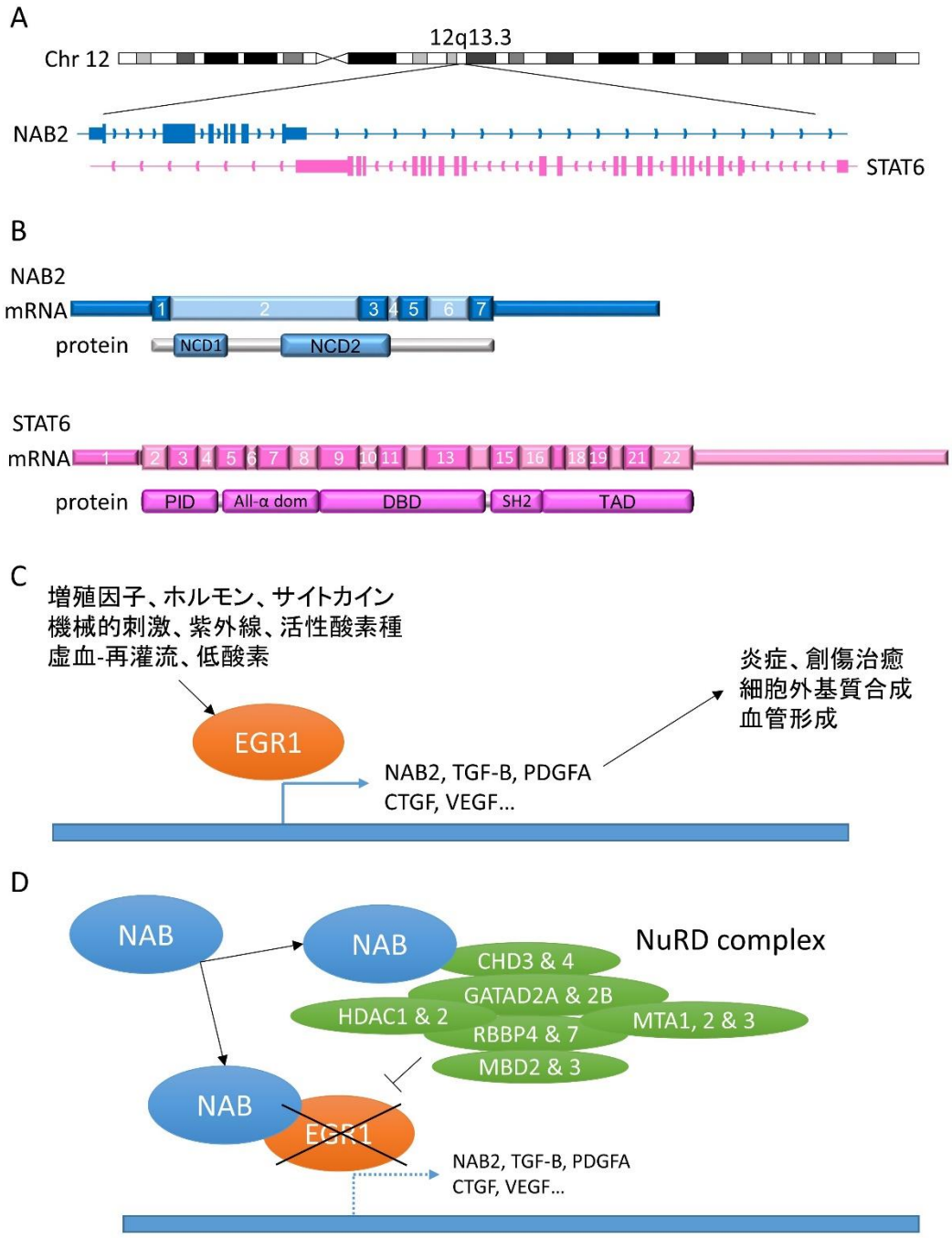


図 22　NAB2、STAT6 の構造と機能。(A) 12 番染色体長腕にコードされている NAB2 (青) と STAT6 (ピンク) の遺伝子模式図。(B) NAB2 (青) と STAT6 (ピンク) の mRAN およびタンパクの模式図。(C) EGR1 は様々な刺激により誘導され、NAB2、TGF-β、PDGF など種々の遺伝子発現を亢進させることで、炎症、創傷治癒などに関与する。(D) EGR1 により発現が誘導される NAB2 は EGR1 と結合して、もしくは NuRD complex の CHD3、CHD4 に結合して EGR1 の転写活性を抑制する。

SFT における NAB2-STAT6 融合遺伝子の発見

2013 年、Chmielecki らと Robinson らはそれぞれ、全身の SFT において逆位による NAB2 と STAT6 の融合遺伝子を発見した[157,158]。Chmielecki らは SFT 48 例中 25 例（52%）で NAB2-STAT6 融合遺伝子を同定したが、Robinson らは 51 例中 51 例（100%）で融合遺伝子を同定し、その陽性率は両者で異なっていた。

その後、Schweizer らは髄膜発生 HPC において SFT と同様に NAB2-STAT6 融合遺伝子が認められることを示し、髄膜発生 HPC も SFT と同一の疾患スペクトラムにあることを示した[159]。さらに Schweizer らは、NAB2-STAT6 の遺伝子融合の結果、STAT6 が核へ移行すること、STAT6 の免疫組織化学における核陽性像は NAB2-STAT6 融合遺伝子を予測できること、また STAT6 の免疫組織化学は SFT/HPC に対して感度、特異度ともに 97%であり、SFT/HPC の病理診断に有用であることを示した[159]。その後も全身の SFT における NAB2-STAT6 融合遺伝子の検出が行われているが、髄膜発生 SFT/HPC に着目した文献は Schweizer らの 1 編のみであり、数例ずつの報告はあるものの、髄膜発生 SFT/HPC における NAB2-STAT6 融合遺伝子の正確な出現頻度は明らかになっていない。

Mohajeri らは、四肢軟部組織、胸膜、体幹などに発生した SFT の凍結検体を用いて、reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法により NAB2-STAT6 融合遺伝子を 41 例中 37 例（90%）で証明したが、融合遺伝子型と腫瘍発生部位、組織型、悪性度との相関は認めなかったとしている[160]。一方で、Barthelmess らは 52 例の SFT の FFPE 組織を用いて、multiplex RT-PCR 法で 48 例（92%）において NAB2-STAT6 融合遺伝子を検出し、融合遺伝子型が年齢、腫瘍径、組織型と関連することを示したが、髄膜発生 SFT/HPC は除外されており[161]、髄膜発生 SFT/HPC における融合遺伝子型と臨床病理学的因子との関連は未だに不明である。

SFT/HPC と p53 について

癌抑制遺伝子である p53 の変異や過剰発現は、癌や肉腫など様々な腫瘍で報告されている[162-164]。SFT においては、1998 年に Yokoi らが胸腔内や後腹膜に発生した SFT で p53 の免疫組織化学を施行し、悪性度の高い症例では p53 が陽性となる一方で、良性の SFT では p53 が陰性であることを示した[165]。また、Schiroshi らは肺胸膜の SFT において、p53 高発現が独立した予後不良因子であることを示している[166]。Morimitsu らは 13 例

の胸膜外 SFT において p53 の変異を検索し、1 例でミスセンス変異があったものの、p53 の過剰発現は認められず、予後良好の経過をとったと報告しており [167]、免疫組織化学での p53 の評価が予後予測に重要であることが示唆されている。

本研究の目的と概要

本研究は、髄膜発生 SFT/HPC における NAB2-STAT6 融合遺伝子の発生頻度を明らかにし、融合遺伝子型と臨床病理学的因子との相関を調べること、さらに SFT/HPC の悪性度と融合遺伝子型および p53 の関連を明らかにすることを目的とした。

本研究では、髄膜発生 SFT/HPC 19 例の FFPE 組織を用いて、RT-PCR 法にて NAB2-STAT6 融合遺伝子を検索した。その結果、14 例（74%）において 6 種類の融合遺伝子が見つかった。さらに本検討の 19 例を含む 339 例のメタ解析により、NAB2-STAT6 融合遺伝子型が大きく 2 種類に分類され、腫瘍発生部位により融合遺伝子型に偏りがあること、髄膜発生 SFT/HPC は全身の SFT と同率の NAB2-STAT6 融合遺伝子を有することを明らかにした。さらに髄膜発生 SFT/HPC 56 例のメタ解析では、融合遺伝子内にほぼ全長の STAT6 を含む症例［Fusion (STAT6-full)］は高齢で、緩徐進行性の SFT の形態を示すのに対し、STAT6 が短い融合遺伝子をもつ症例［Fusion (STAT6-ΔDBD)］の場合は若年で、より悪性度の高い HPC や malignant SFT、anaplastic HPC の形態を示すことを明らかにした。

【実験方法】

1) 対象症例および臨床所見の検討

北海道大学大学院医学研究科腫瘍病理学分野にて 2004 年から 2015 年までに SFT/HPC と診断された 22 例 31 検体を対象とした。うち 1 例は第一章 髄膜腫の遺伝子解析と臨床病理学的因子との相関に関する研究にて HPC と判明した症例であった。本実験は北海道大学大学院医学研究科医の倫理委員会による承認のもと行われた（承認番号：医 14-071)。

2) 病理組織像、免疫組織化学の検討

FFPE 組織を 4 μm に薄切後、H&E 染色を施行した。H&E 標本を 2 人の病理医がレビューし、現行の中枢神経系腫瘍 WHO 分類第 4 版に基づき組織型を決定した。また強拡大 10 視野あたりの核分裂像の数を評価した。組織像を確認したのち、免疫組織化学および RNA 抽出に用いるため、代表的な切片を選択した。

免疫組織化学は、切片をキシレンで脱パラフィン化し、エタノールで再水和した。次に、pH 9.0 の EDTA 緩衝液中で抗原を賦活化した。一次抗体として抗 STAT6 抗体（300 倍希釈）(clone S-20, sc-621, Santa Cruz, Dallas, TX, USA）および抗 p53 抗体（100 倍希釈）(clone DO-7, M7001, DAKO）を用いて、免疫組織化学を自動免疫染色装置でポリマー法にて行った。

p53 の免疫組織化学は染色強度を 0 (陰性)、1+ (弱陽性)、2+ (中等度陽性)、3+ (強陽性)の 4 段階で、また腫瘍全体における陽性率を 0–100%で評価し、5%以上が 2+となった場合に陽性と判断した。STAT6 の免疫組織化学は核の染色性を陽性、陰性で評価した。

3) RNA 抽出および逆転写（reverse transcription, RT）反応

RNeasy FFPE Kit (Qiagen）を用いて FFPE 組織から total RNA を抽出した。抽出した RNA は、NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA）にて濃度測定した。抽出した total RNA 0.9 μg から、SuperScript VILO (Invitrogen）を用いて cDNA を作製した。

4) Conventional PCR 法

NAB2-STAT6 融合転写産物検出のため、NAB2 に 7 種類の forward プ

ライマー、STAT6 に 6 種類の reverse プライマーを設計した（Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)。cDNA の quality 評価として、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を内因性コントロールに使用した。用いたプライマーの配列を表 12–14、プライマーの組み合わせを表 15 に示す。

cDNA を含む各 RT 反応液 1 µl に、GoTaq Green Master Mix (Promega) 12.5 µl、10 µM forward プライマー 1 µl, 10 µM reverse プライマー 1 µl、滅菌蒸留水 9.5 µl を添加し、各反応液を 95 °C にて 3 分反応させた後、95 °C にて 30 秒、58 °C にて 30 秒、72 °C にて 30 秒の条件で 35 サイクル反応させ、最後に 72 °C にて 5 分反応させた。PCR 増幅産物は、1 µg/ml 臭化エチジウム（EtBr）添加 2%アガロースゲルにて 100 V で 30 分間電気泳動し、UV trans illuminator Model M-20 および Doc-ItLS (UVP, Upland, CA, USA）にて検出、撮像した。分離された PCR 産物は、QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) を用いてゲルより精製し、Sanger 法で塩基配列を確認した。

表 12　NAB2 のプライマー配列

Exon 番号	プライマー名	プライマー配列
2	2-1F	5’-CCCCTTGAACTTGGAGAGAA-3’
2	2-2F	5’-GCGTTGGGCACATCTTTGAG-3’
3	3-1F	5’-CATGAGGGACAACACGCTCT-3’
4	4-1F	5’-GCTTCACCCTGAAGAACTGGGA-3’
5	5-1F	5’-CCTATGTACCCCCATACCGC-3’
6	6-1F	5’-CACTGATGGACGAGGGGCTG-3’
7	7-1F	5’-GACAGATGTCCTGCCCCAG-3’

表 13　STAT6 のプライマー配列

Exon 番号	プライマー名	プライマー配列
2	2-1R	5’-ACATAGAGCCGCTGCACTTT-3’
15	15-1R	5’-CGTCGGGCTCATTGAGAAGA-3’
16	16-1R	5’-GAGCTGAGCAAGATCCCGG-3’
16	16-2R	5’-GGCAGAGAATGGCTGGATGT-3’
17	17-1R	5’-CGGTCATCTTGATGGTAGCTG-3’
18	18-1R	5’-GGAATCAGGGGCCATTCCAA-3’

表 14　GAPDH のプライマー配列

プライマー名	プライマー配列
Forward	5’-CTCTGCTCCTCCTGTTCGAC-3’
Reverse	5’-TGAAGGGGTCATTGATGGCA-3’

表 15　プライマーの組み合わせ

標的融合遺伝子型	Forward プライマー	Reverse プライマー
NAB2ex2-STAT6ex2	2-1F	2-1R
NAB2ex2-STAT6ex2	2-2F	2-1R
NAB2ex4-STAT6ex2	3-1F	2-1R
NAB2ex4-STAT6ex2	4-1F	2-1R
NAB2ex6-STAT6ex2	6-1F	2-1R
NAB2ex7-STAT6ex2	7-1F	2-1R
NAB2ex5-STAT6ex16	5-1F	16-2R
NAB2ex6-STAT6ex15	6-1F	15-1R
NAB2ex6-STAT6ex16	5-1F	16-1R
NAB2ex6-STAT6ex16	6-1F	16-1R
NAB2ex6-STAT6ex17	5-1F	17-1R
NAB2ex6-STAT6ex17	6-1F	17-1R
NAB2ex6-STAT6ex18	6-1F	18-1R

5) メタ解析

2013 年から 2015 年 7 月 15 日までに、5 症例以上の SFT/HPC を用いて NAB2-STAT6 融合遺伝子を検出した文献を PubMed で検索し、該当文献より臨床病理学的因子および融合遺伝子型の情報を抽出し、NAB2-STAT6 融合遺伝子と臨床所見（年齢、性別、腫瘍発生部位、腫瘍径、予後)、組織型との関連性について、以下の方法で統計解析を行った。

6) 統計解析

統計解析には、エクセル統計 2015 version 1.03 を用いた。組織型と臨床所見の比較には、Kruskal–Wallis 検定と χ^2 検定、融合遺伝子型と臨床病理学的所見の比較には、一元配置分散分析、χ^2 検定、Mann–Whitney U test、Fisher's 正確確率検定、t 検定を用いた。予後解析には Kaplan-Meier 法と log-rank test を用いた。P 値は 0.05 未満を統計学的に有意差ありと判定した。

【実験結果】

1）対象症例および病理学的所見

31 検体中、RNA 濃度不足もしくは GAPDH の増幅が得られなかった 8 検体を除いた 19 症例 23 検体を評価対象とした。19 例中男性 14 例、女性 5 例で、年齢中央値は 50 歳（範囲 20–69 歳）であった。腫瘍部位は 15 例が頭蓋内、3 例が脊髄、1 例が頭蓋内から皮下であった。脊髄症例は全例頸髄発生であった。予後を追跡できた症例は 16 例で、経過観察期間中央値は 67.5 ヶ月（範囲 12 ヶ月–33 年)、16 例中 6 例（38%）が 27 ヶ月–13 年の間に再発し、1 例が頭蓋内多発転移のため死亡した。

組織型は 5 例が SFT、6 例が HPC、8 例が anaplastic HPC であった。1 例は大部分が SFT の形態をとっていたが、一部で HPC の成分も混じていた（図 23A、B)。また、HPC 2 例と anaplastic HPC 2 例において、典型的な HPC の成分とともに、血管性間質を軸に偽乳頭状に増殖する成分が認められた（図 23C、D)。各症例の臨床病理学的所見を表 16 に示す。

組織型と年齢（$P = 0.057$、Kruskal–Wallis 検定)、性別（$P = 0.677$、χ^2 検定)、腫瘍径（$P = 0.987$、Kruskal–Wallis 検定）とに相関は見られなかった。

免疫組織化学では、p53 は 6 例が陰性、13 例が陽性であった（図 24)。Anaplastic HPC は全例陽性を示したが、SFT で p53 陽性を示した症例は 5 例中 1 例のみであった。STAT6 は SFT、HPC ともに全例核に陽性であった。偽乳頭状成分を有する症例では、典型的な HPC 成分、偽乳頭状成分、いずれも STAT6 が核に陽性であった（図 25)。

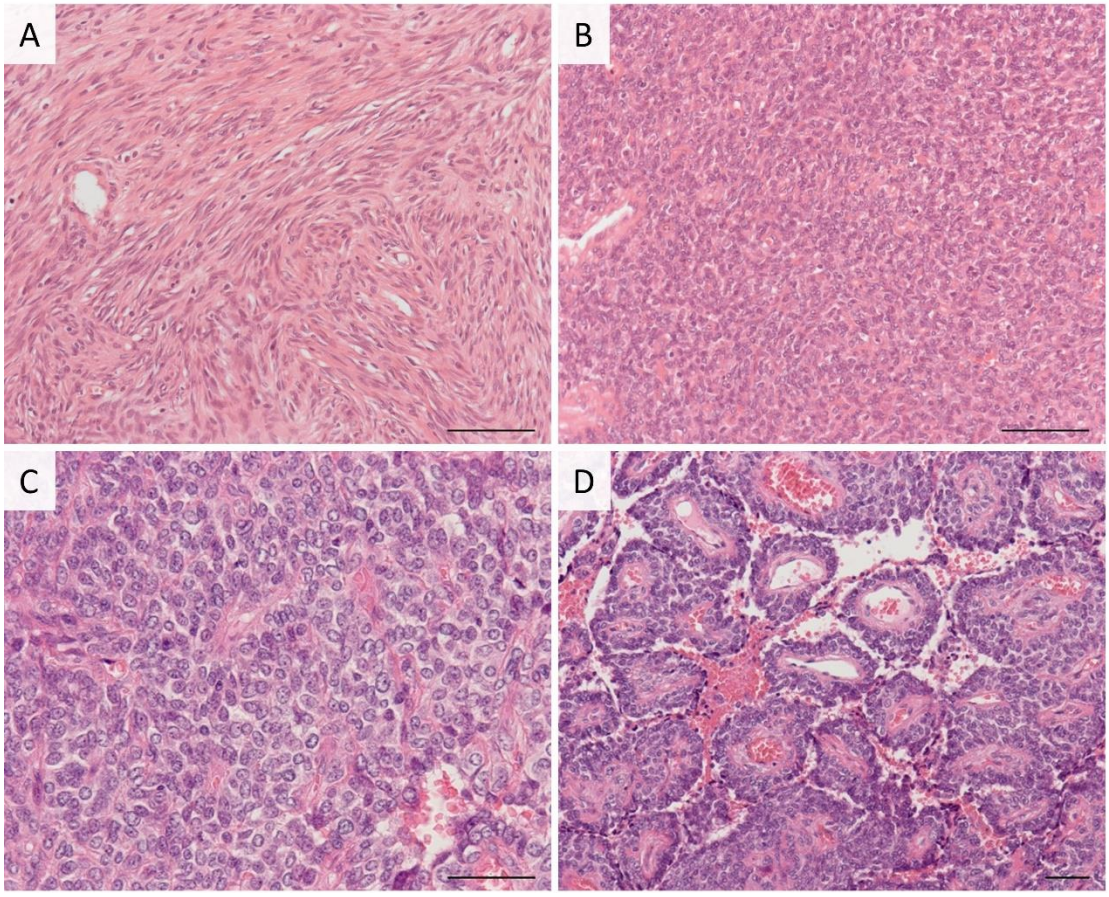


図 23　(A)(B) 症例 5 の H&E 染色。同一腫瘍内に SFT 成分 (A) と HPC 成分 (B) を有していた。(C)(D) 症例 19 の H&E 染色。類円形核を有する腫瘍細胞が密に増殖する HPC 成分 (C) とともに、血管性間質を軸に偽乳頭状構造を示す成分(D) が混在していた。Scale bar: (A)(B) 100 μm、(C)(D) 50 μm。

表 16　臨床病理学的所見

症例	年齢/性別	腫瘍部位	初発時腫瘍径	局所再発	転移	病理診断
1	57/男	トルコ鞍内～鞍上部	不明	不明	不明	SFT
2	57/女	頸髄	11 mm	なし	なし	SFT
3	36/男	頸髄	20 mm	3 年後	不明	SFT
4	41/女	大脳鎌	65 mm	なし	なし	SFT
5	69/男	蝶形骨縁	72 mm	なし	なし	SFT+HPC
6	53/男	右後頭葉	70 mm	なし	なし	pHPC
7R	60/男	小脳橋角部	40 mm	7 年後	なし	HPC
8	52/女	松果体部	35 mm	なし	なし	HPC
9	23/男	静脈洞交会	33 mm	なし	なし	HPC
10	55/男	傍矢状洞部	50 mm	なし	なし	HPC
11	44/男	中頭蓋底～右側頭葉	50 mm	不明	不明	pHPC
12R1	72/女	頸髄	不明	13 年後	多発脳転移死亡	aHPC
12R2	72/女	頸髄、小脳後部				aHPC
12R3	73/女	頸髄				aHPC
13R	60/女	側頭葉	不明	5 年後	多発脳転移腎転移	aHPC
14R	64/男	傍矢状洞部	35 mm	27 ヶ月後	なし	aHPC
15	43/男	小脳テント	38 mm	なし	なし	aHPC
16	20/男	小脳橋角部	43 mm	なし	なし	aHPC
17	50/男	硬膜～左後耳介部皮下	不明	不明	不明	aHPC
18	42/男	小脳テント上	64 mm	61 ヶ月後	なし	apHPC
18’	42/男	小脳テント下				apHPC
18R	47/男	小脳テント				aHPC
19	62/男	小脳テント	43 mm	なし	なし	apHPC

R: 再発検体、pHPC: HPC with pseudopapillary feature、aHPC: anaplastic HPC、apHPC: anaplastic HPC with pseudopapillary feature。

※18 と 18’ は約 1 ヶ月の間隔で小脳テント上下より腫瘍が切除された。

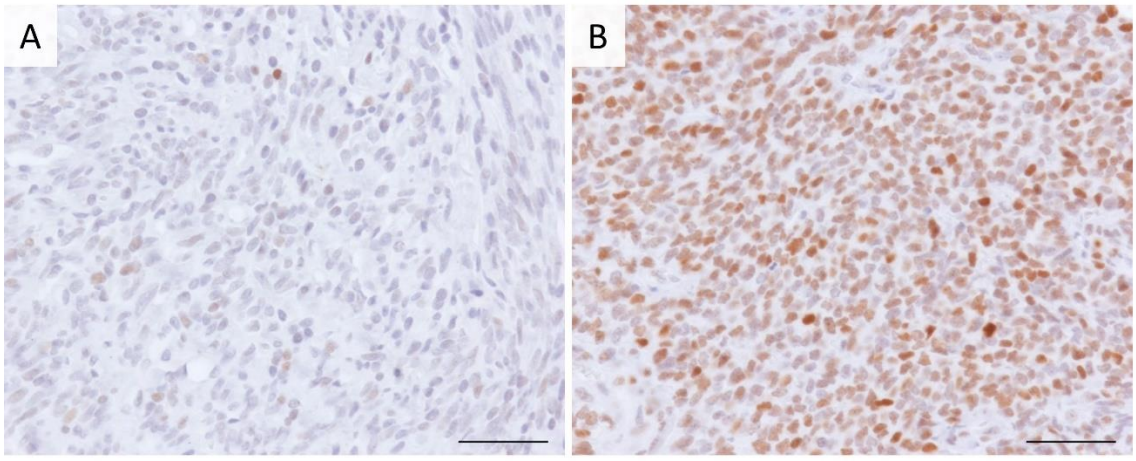


図 24　p53 の免疫組織化学。(A) 症例 2、陰性、(B) 症例 19、陽性。Scale bar: 50 μm。

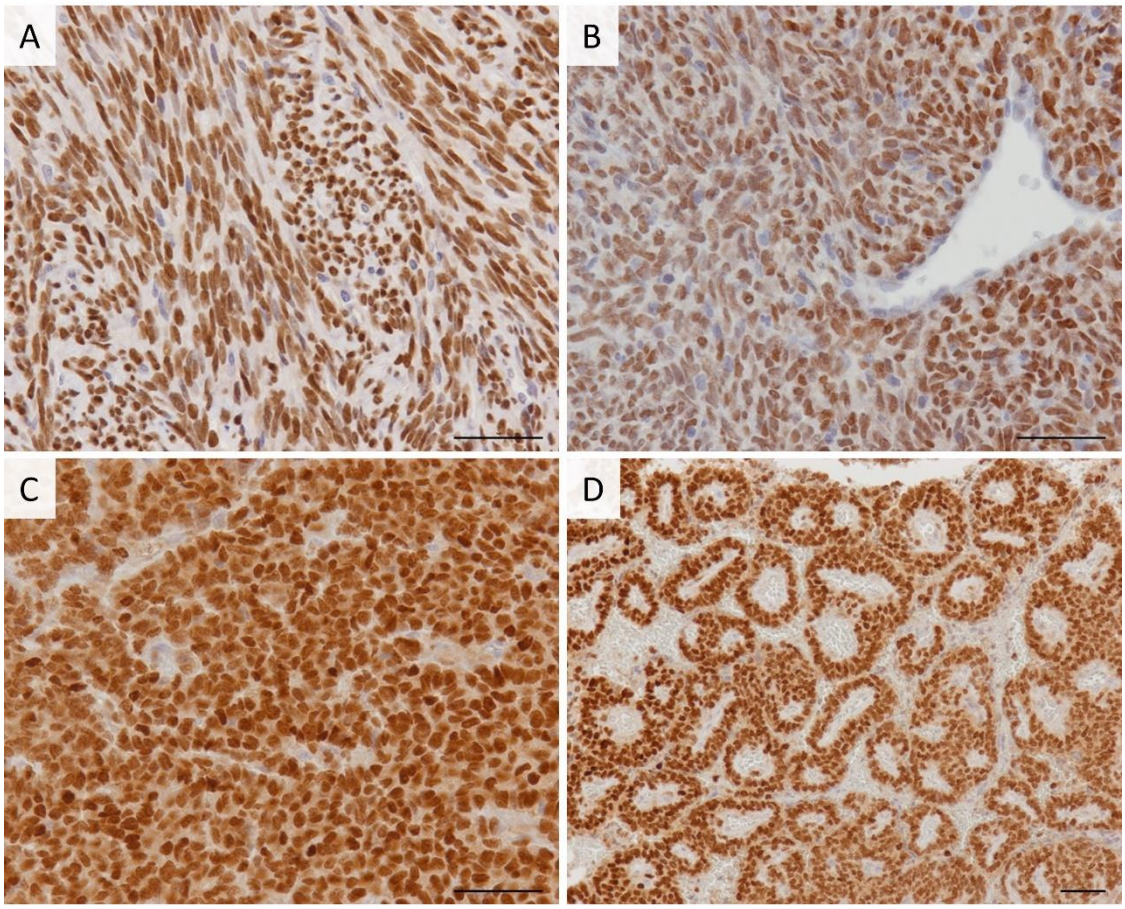


図 25　STAT6 の免疫組織化学。(A) 症例 2 (SFT)、(B) 症例 8 (HPC)、(C) 症例 19 の典型的 HPC 部分、(D) 症例 19 の偽乳頭状成分。Scale bar: 50 μm。

2) NAB2-STAT6 融合転写産物の検出

NAB2 遺伝子上に 7 個の forward プライマー、STAT6 遺伝子上に 6 個の reverse プライマーを設計し、13 種類の RT-PCR を行い、NAB2-STAT6 融合転写産物を検索した結果、19 例中 14 例（74%）で 6 種類の融合転写産物が認められた（図 26)。最も多い融合遺伝子型は NAB2ex6-STAT6ex17 で 4 例に認められ、次に NAB2ex4-STAT6ex2 の 3 例が続いた。NAB2ex6-STAT6ex16 は 3 例に見られたが、breakpoint の異なる 2 種類の融合転写産物が認められた。また、NAB2ex5-STAT6ex16 も breakpoint が異なる 2 種類、各 1 例ずつに認められ、うち 1 種類は NAB2 の intron が介在していた。融合遺伝子産物はいずれもインフレームの融合であった。再発症例で複数の検体が得られた症例では、再発前後においても同じ融合遺伝子が検出された。

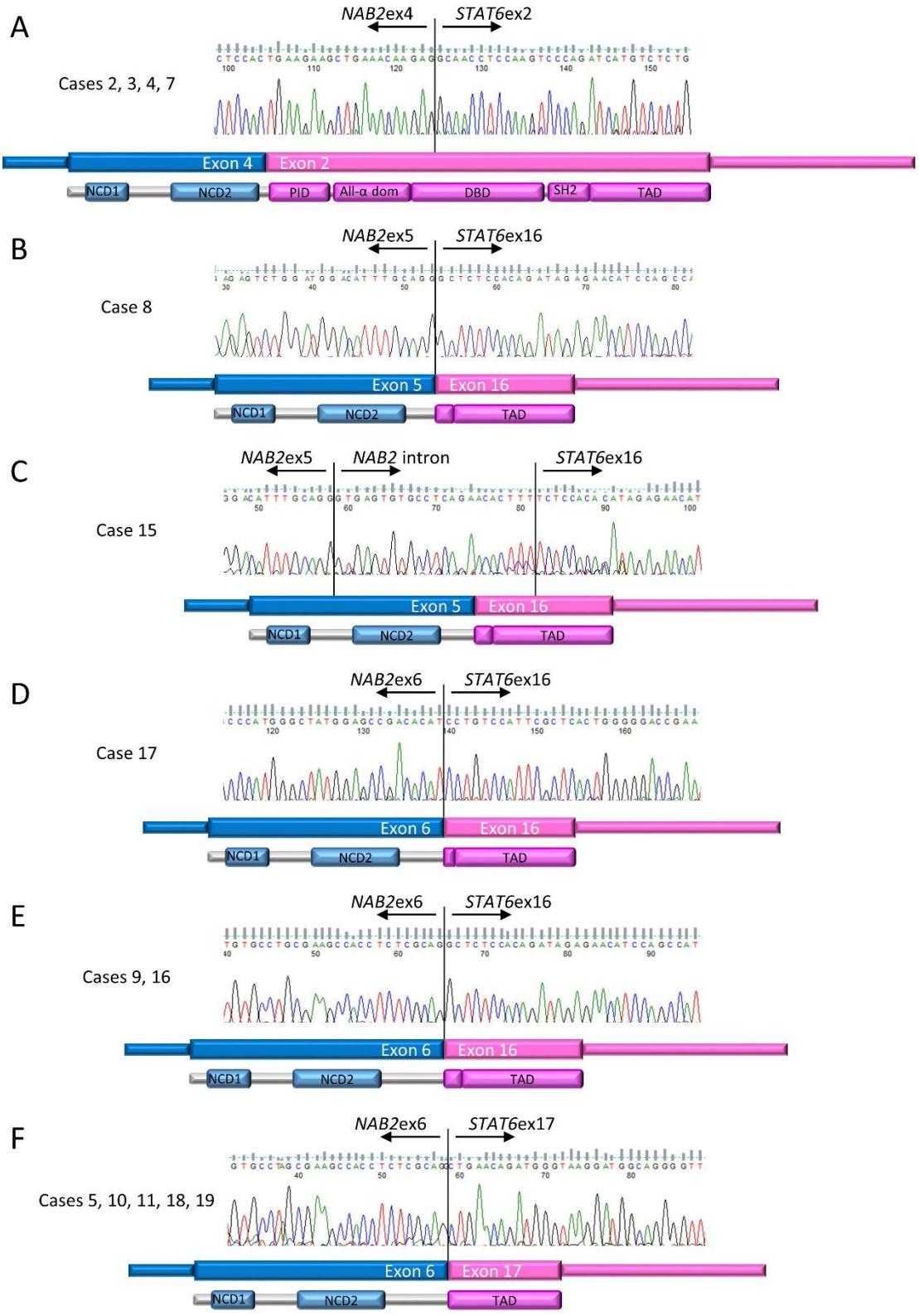


図 26　検出された NAB2-STAT6 融合遺伝子と、予想される 6 種類の融合タンパクの構造。青は NAB2 関連領域、ピンクは STAT6 関連領域を示す。

3) 組織型と融合遺伝子型、p53 の免疫組織化学の比較

組織型と融合遺伝子型、p53 発現のまとめを表 17 に示す。SFT の 5 例中 3 例は NAB2ex4-STAT6ex2 を有し、1 例は NAB2ex6-STAT6ex17、1 例は融合遺伝子が検出できなかった。NAB2ex6-STAT6ex17 を有する SFT 症例は、部分的に HPC の成分が混在する症例であった（図 23A、B)。一方、HPC および anaplastic HPC のうち NAB2ex4-STAT6ex2 を有する症例は 1 例のみであったが、この症例は p53 陽性（3+/70%)を示した。偽乳頭状構造を示す 4 例のうち 3 例は NAB2ex6-STAT6ex17 を有していた。

表 17　組織型と融合遺伝子型、p53 発現のまとめ

No	組織型	NAB2-STAT6 融合遺伝子	p53
1	SFT	未検出	−
2	SFT	NAB2ex4-STAT6ex2	−
3	SFT	NAB2ex4-STAT6ex2	−
4	SFT	NAB2ex4-STAT6ex2	＋
5	SFT with HPC component	NAB2ex6-STAT6ex17	−
6	HPC with pseudopapillary feature	未検出	−
7	HPC	NAB2ex4-STAT6ex2	＋
8	HPC	NAB2ex5-STAT6ex16	＋
9	HPC	NAB2ex6-STAT6ex16	＋
10	HPC	NAB2ex6-STAT6ex17	−
11	HPC with pseudopapillary feature	NAB2ex6-STAT6ex17	＋
12	Anaplastic HPC	未検出	＋
13	Anaplastic HPC	未検出	＋
14	Anaplastic HPC	未検出	＋
15	Anaplastic HPC	NAB2ex5-STAT6ex16	＋
16	Anaplastic HPC	NAB2ex6-STAT6ex16	＋
17	Anaplastic HPC	NAB2ex6-STAT6ex16	＋
18	Anaplastic HPC with pseudopapillary feature	NAB2ex6-STAT6ex17	＋
19	Anaplastic HPC with pseudopapillary feature	NAB2ex6-STAT6ex17	＋

4) メタ解析による NAB2-STAT6 融合遺伝子の頻度と種類の検討

2013 年から 2015 年 7 月 15 日までに、SFT/HPC 5 症例以上で NAB2-STAT6 融合遺伝子を検索した論文は 10 編で、本検討とあわせて、髄膜発生 SFT/HPC 56 例を含む全身の SFT/HPC 341 例の融合遺伝子検索結果が得られた（表 18)。融合遺伝子の検出率は文献によって 52–100%と差が見られたが、全体では全身の 341 例中 287 例（84%)、髄膜発生例のみでは 56 例中 47 例（84%）で融合遺伝子が検出されており、髄膜発生例と全身の SFT では同等の陽性率であった。

表 18　過去の文献と本検討の NAB2-STAT6 融合遺伝子検出結果

著者	全身（髄膜含む）			髄膜のみ		
	検索数	陽性数	陽性率	検索数	陽性数	陽性率
Chmielecki[157]	48	25	52%	3	0	0%
Robinson[158]	51	51	100%	15	15	100%
Schweizer[159]	10	9	90%	10	9	90%
Mohajeri[160]	44	37	84%	3	3	100%
Barthelmess[161]	52	48	92%	0		
Vogels[168]	28	19	68%	0		
Yamada[169]	9	7	78%	0		
Akaike[170]	40	40	100%	4	4	100%
Dagrada[171]	21	21	100%	2	2	100%
Kao[172]	19	16	84%	0		
本検討	19	14	74%	19	14	74%
合計	341	287	84%	56	47	84%

341 例中具体的な融合遺伝子型が得られなかった 2 例を除いた全身の SFT/HPC 339 例では、27 種類の融合遺伝子型が認められた。最多は NAB2ex4-STAT6ex2 の 107 例（31.6%）で、次に NAB2ex6-STAT6ex16 (66 例、19.5%)、NAB2ex6-STAT6ex17 (31 例、9.1%)、NAB2ex7-STAT6ex2 (13 例、3.8%)、NAB2ex6-STAT6ex18 (10 例、2.9%）と続いた (表 19)。

一方で、髄膜発生 SFT/HPC 56 例では、8 種類の融合遺伝子型が認められ、最多は NAB2ex6-STAT6ex16 (21 例、37.5%）であった。NAB2ex4-STAT6ex2 (10 例、17.9%)、NAB2ex6-STAT6ex17 (9 例、16.1%）が続いた（表 19)。

表 19　NAB2-STAT6 融合遺伝子型の種類と頻度

NAB2	STAT6	全身(髄膜含む)		髄膜	
exon	exon	症例数	割合	症例数	割合
4	2	107	31.6%	10	17.9%
6	16	66	19.5%	21	37.5%
6	17	31	9.1%	9	16.1%
7	2	13	3.8%		
6	18	10	2.9%	1	1.8%
2	2	9	2.7%	2	3.6%
2	6	7	2.1%		
4	3	6	1.8%		
4	4	5	1.5%		
3	19	4	1.2%		
6	2	4	1.2%	1	1.8%
2	5	3	0.9%		
2	1	2	0.6%		
3	17	2	0.6%		
5	16	2	0.6%	2	3.6%
5	17	2	0.6%		
6	3	2	0.6%		
3	2	1	0.3%		
3	18	1	0.3%		
4	18	1	0.3%		
5	2	1	0.3%		
5	18	1	0.3%		
6	1	1	0.3%		
6	15	1	0.3%	1	1.8%
7	17	1	0.3%		
7	18	1	0.3%		
7	20	1	0.3%		
非検出		54	15.9%	9	16.1%

現在までに報告されている breakpoint を図 27 に示す。NAB2 は NCD1 に相当する部分より 3'側に比較的万遍なく breakpoint が分布しているの

に対し、STAT6 の breakpoint は DBD に相当する領域を挟んで 5’側と 3’側に大きく二分されていた。このことから、NAB2-STAT6 融合遺伝子を、以下の 2 種類に分類した。1 つは、NAB2 の任意の領域と、ほぼ全長の STAT6 とが融合した Fusion (STAT6-full) であり、これには全身の SFT で最も多かった NAB2ex4-STAT6ex2 や NAB2ex7-STAT6ex2、NAB2ex2-STAT6ex2 などを含む。もう 1 つは、NAB2 の任意の領域と STAT6 の DBD 以降の領域が融合した Fusion (STAT6-ΔDBD) であり、これには全身の SFT で 2 番めに多かった NAB2ex6-STAT6ex16 や NAB2ex6-STAT6ex17、NAB2ex3-STAT6ex19 などを含む。

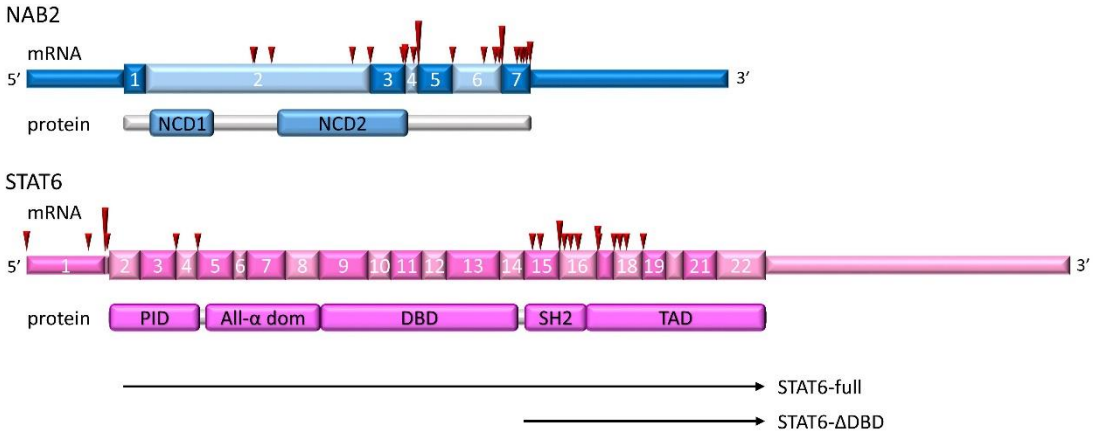


図 27　現在までに報告のある breakpoint 部位。NAB2 (上部、青) と STAT6 (下部、ピンク) において、文献上、詳細な記載のある breakpoint を赤矢頭で示す。長い矢頭は hotspot を表す。STAT6 の breakpoint は DBD に相当する部位より 5’側もしくは 3’側に見られ、DBD より 5’側に breakpoint があるものを STAT6-full、DBD より 3’側にあるものを STAT6-ΔDBD とした。

上記の通り融合遺伝子型を分類すると、腫瘍の発生部位により、融合遺伝子型が有意に異なっていた（$P < 0.0001$）(図 28)。胸腔内発生の SFT は Fusion (STAT6-full) が 93% (86 例/92 例) を占めるのに対し、軟部組織発生の SFT における Fusion (STAT6-full) の割合は 60% (34 例/57 例) であった。一方、髄膜発生 SFT は Fusion (STAT6-full) が 28% (13 例/47 例) であり、これは腹腔内・後腹膜 (33%、15 例/31 例) や髄膜を除く頭頸部 (32%、12 例/26 例) と同じ傾向を示した。

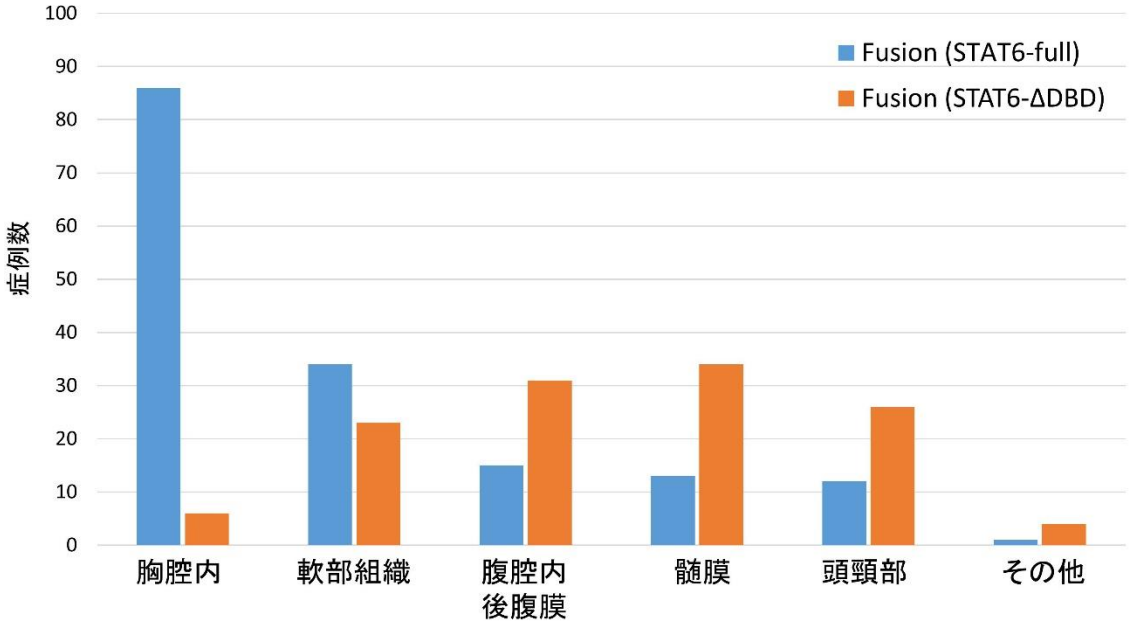


図 28　腫瘍発生部位別の融合遺伝子型の割合。

5) メタ解析による髄膜発生 SFT/HPC の NAB2-STAT6 融合遺伝子型と臨床病理学的因子との相関

髄膜発生 SFT/HPC において、融合遺伝子型は年齢と相関が見られた。Fusion (STAT6-full) を有する SFT 患者の平均年齢は 53.6 歳（標準偏差 13.9 歳）と、Fusion (STAT6-ΔDBD) を有する SFT 患者の平均年齢 41.7 歳（±13.0 歳）より有意に高かった（$P = 0.017$、t 検定) (図 29A)。一方、融合遺伝子型と性別（$P = 0.285$、Fisher's 正確確率検定)、腫瘍径（$P = 0.176$、t 検定）との相関は見られなかった（図 29B、C)。

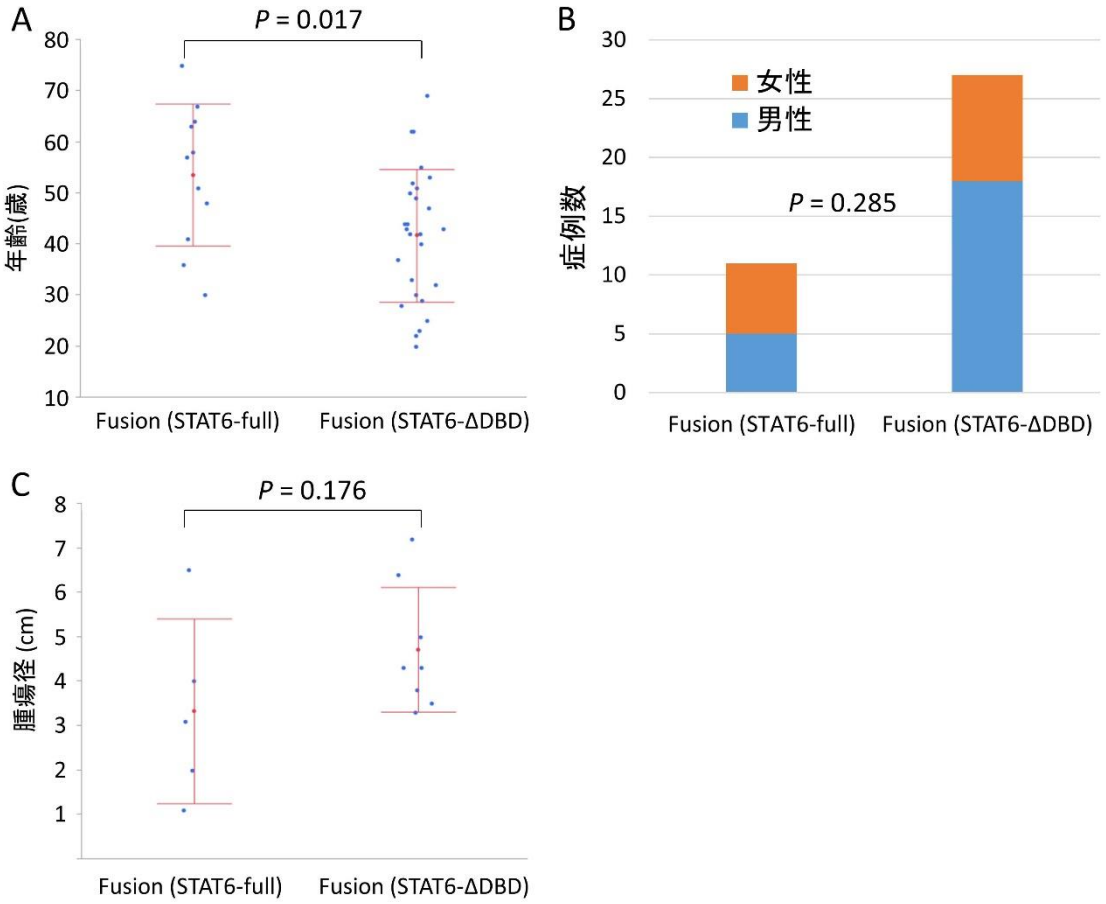


図 29　NAB2-STAT6 融合遺伝子型と臨床所見との相関。(A) 融合遺伝子型別の SFT/HPC 症例の年齢の分布。(B) 融合遺伝子型別の男女比。 (C) 融合遺伝子型別の腫瘍径の分布。(A)(C) の赤線は平均±標準偏差を示す。

融合遺伝子型と組織型には相関が認められた（表 20、図 30A)。Fusion (STAT6-full) をもつ症例は、69% (9 例/13 例) が SFT であったのに対し、Fusion (STAT6-ΔDBD) を有する症例で SFT であったのは 26% (9 例/34 例) に留まり、その他の悪性度の高い組織型を示す症例が多かった（P = 0.017、Fisher's 正確確率検定)。また、Fusion (STAT6-full) における強拡大 10 視野あたりの核分裂像の数は Fusion (STAT6-ΔDBD) より有意に少なかった（P = 0.033、Mann–Whitney U test) (図 30B)。

表 20　SFT/HPC における融合遺伝子型別の各組織型の頻度

組織型	Fusion (STAT6-full)	Fusion (STAT6-ΔDBD)
SFT	9　(69%)	9　(26%)
Malignant SFT	1　(8%)	8　(24%)
Dedifferentiated SFT	0　(0%)	1　(3%)
HPC	3　(23%)	11　(32%)
Anaplastic HPC	0　(0%)	5　(15%)
合計	13	34

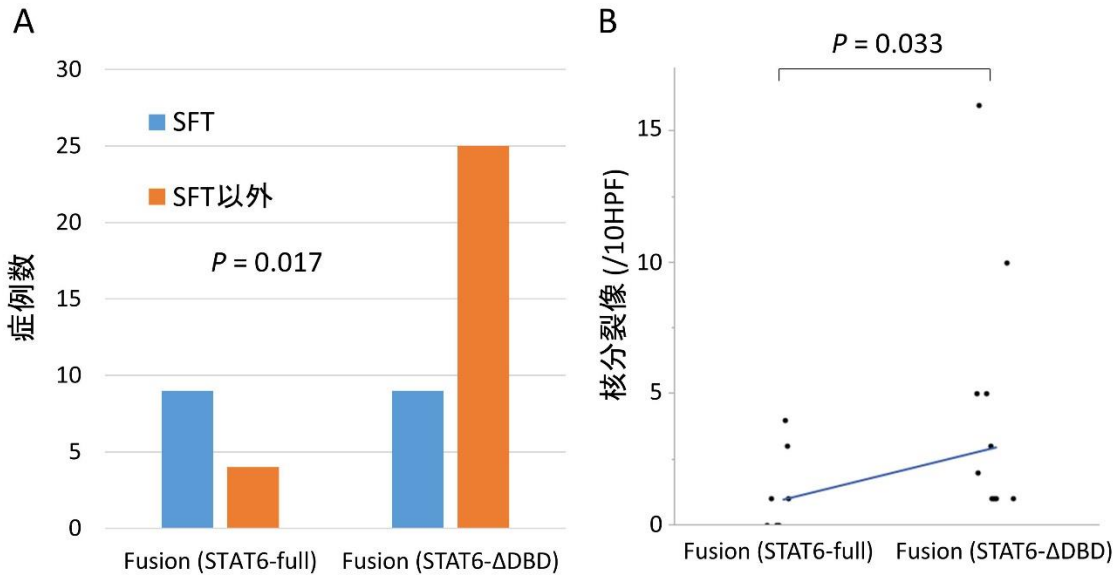


図 30　NAB2-STAT6 融合遺伝子と病理学的因子との相関。(A) 融合遺伝子型別の組織型の割合。「SFT 以外」は HPC、anaplastic HPC、malignant SFT、dedifferentiated SFT を含む。(B) 融合遺伝子型別の核分裂数。青線は中央値を示す。

6) 髄膜発生 SFT/HPC の予後解析

組織型、融合遺伝子型および p53 発現と無再発生存率を Kaplan–Meier 法にて検討したが、いずれも有意差は見られなかった（図 31)。

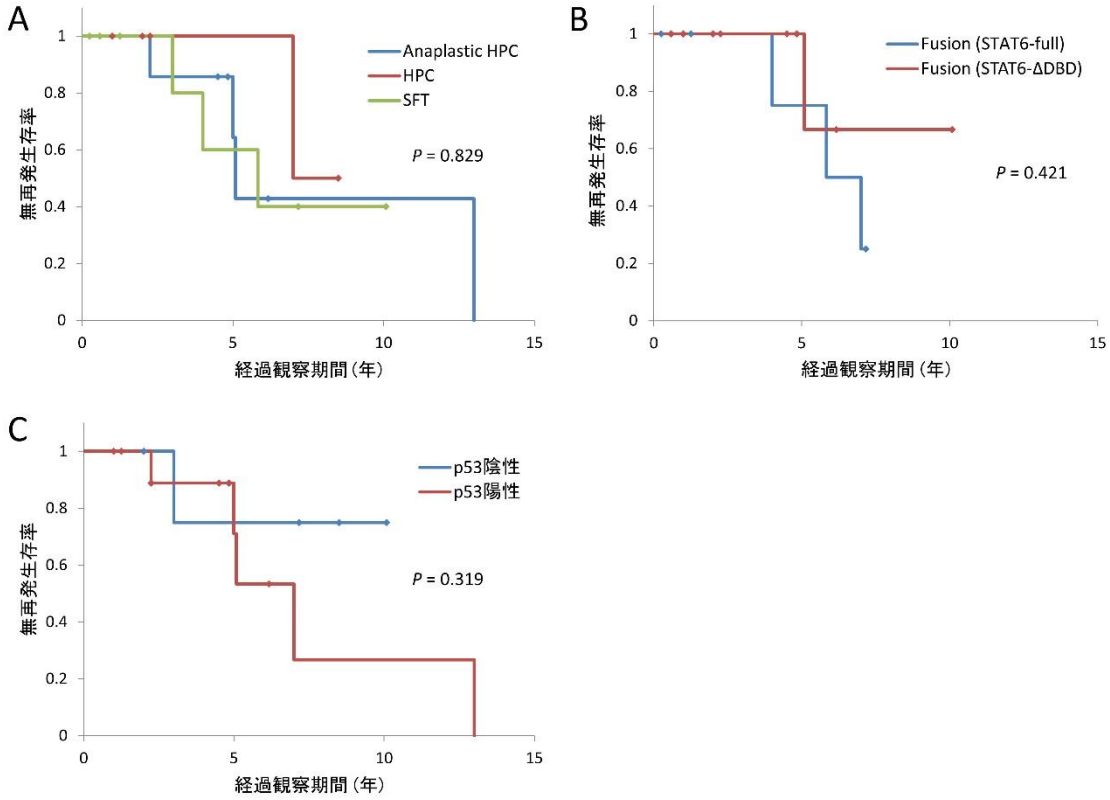


図 31　Kaplan–Meier 曲線。(A) 組織型、(B) NAB2-STAT6 融合遺伝子型、(C) p53 発現による無再発生存率。

【考察】

本検討では、19 例の髄膜発生 SFT/HPC において、NAB2-STAT6 融合遺伝子を検索し、14 例（74%）で融合遺伝子が検出された。SFT、HPC の両者で融合遺伝子が認められたことから、髄膜以外に発生する SFT と同様、髄膜発生 SFT/HPC も一連の疾患スペクトラムであるとする Schweizer ら[159]の結果が再確認された。

メタ解析では、髄膜発生 SFT/HPC は NAB2-STAT6 融合遺伝子のうち、Fusion (STAT6-ΔDBD) が多く、これは肺胸膜とは異なり、腹腔内・後腹膜や髄膜を除く頭頸部と同様の傾向を示すことが明らかとなった。さらに、髄膜発生 SFT/HPC のうち Fusion (STAT6-ΔDBD) を有する症例は若年であったが、これは髄膜以外に発生する SFT において、Fusion (STAT6-full) の一つである NAB2ex4-STAT6ex2 が、Fusion (STAT6-ΔDBD) に含まれる NAB2ex6-STAT6ex16/17 より若年であるとした Barthelmess らの報告[161]と合致する結果であった。Barthelmess らはさらに、髄膜以外に発生する SFT において、NAB2ex4-STAT6ex2 を有する症例は NAB2ex6-STAT6ex16/17 より有意に腫瘍径が大きいことを示しているが[161]、髄膜発生 SFT/HPC においては融合遺伝子型と腫瘍径に関して有意な相関は認められなかった。

またメタ解析により、NAB2-STAT6 融合遺伝子は組織型と有意に相関することが示された。Fusion (STAT6-full) は核分裂像が少なく緩徐進行性の SFT の形態を呈するのに対し、Fusion (STAT6-ΔDBD) は核分裂像が多く、より悪性度が高い HPC や malignant SFT、anaplastic HPC の組織像をとっていた。Fusion (STAT6-ΔDBD) でも SFT と報告されている症例があるが、組織型の詳細な区別がなされていなかったためと考えられる[158]。症例 7 は Fusion (STAT6-full) を有するものの、HPC の形態をとっていたが、p53 の高発現が認められた。p53 は悪性度の高い SFT に高発現していることが報告されており[165]、HPC に含まれる群には Fusion (STAT6-ΔDBD) を有する症例のほかに、Fusion (STAT6-full)に p53 異常が加わった症例が含まれている可能性が考えられる。また、p53 は anaplastic HPC の全例で陽性であったが、anaplastic HPC の診断基準を満たさない HPC でも陽性症例があり、p53 発現は悪性化の必要条件ではあるが、十分条件ではない可能性が考えられる。今回の検討から想定される NAB2-STAT6 融合遺伝子型と p53、組織型の関連を図 32 に示す。

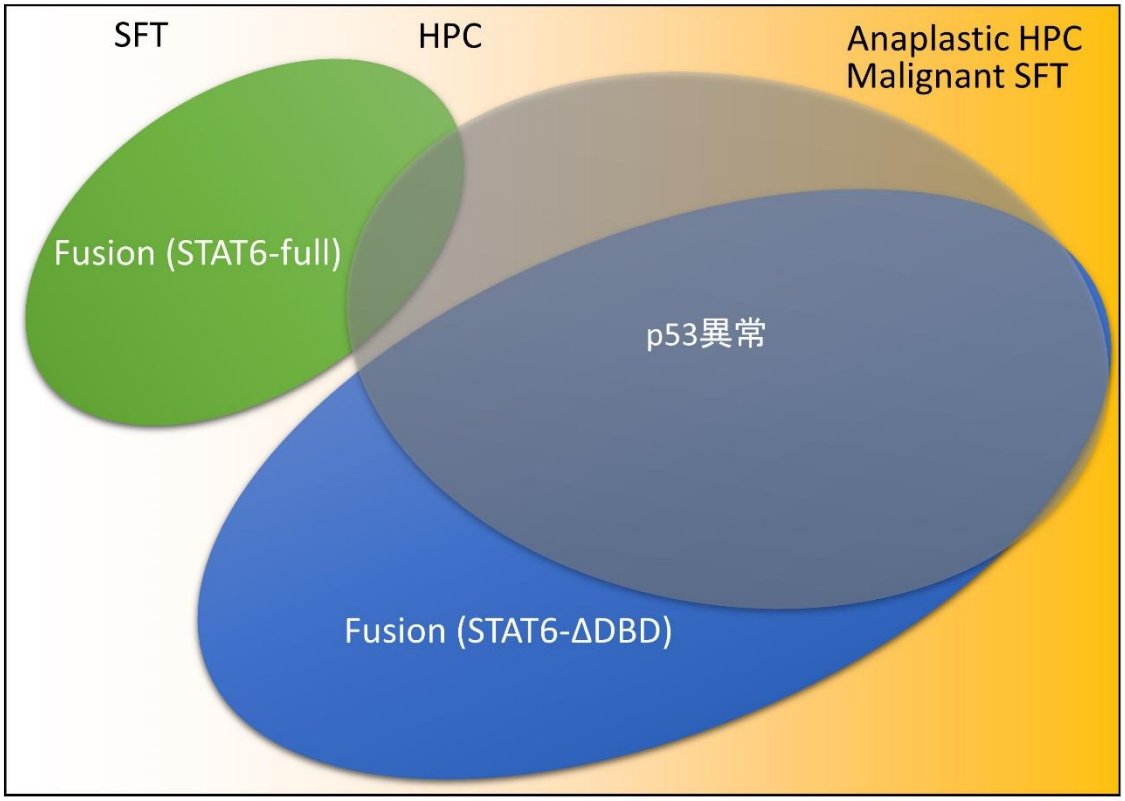


図 32　髄膜発生 SFT/HPC における組織型と融合遺伝子型、p53 の関係。SFT、HPC、malignant SFT、anaplastic HPC は同じ遺伝子背景をもつ単一の腫瘍スペクトラムであるが、融合遺伝子型の違いと p53 異常により、異なる組織型を示すことが示唆される。

NAB2 は EGR1 の転写リプレッサーとして機能するが、STAT6 と融合遺伝子を形成することで、C 末端の CID を失い、さらに STAT6 の転写活性ドメインを獲得して EGR1 の標的遺伝子の発現を亢進させるとされている（図 33）[158]。Robinson らは、前立腺上皮細胞株、RWPE-1 に NAB2-STAT6 融合遺伝子を導入すると増殖能が亢進すること、また同細胞株において EGR1 をノックダウンすると増殖能が抑制されることを示した。さらに、NAB2-STAT6 融合遺伝子導入細胞株ならびに SFT の患者検体において、EGR1 の標的遺伝子である insulin-like growth factor 2 (IGF2)、fibroblast growth factor 2 (FGF2)、PDGFD などの発現が亢進していることを報告している [158]。しかし、腫瘍形成に関する詳細な機序は明らかになっておらず、また、遺伝子導入に用いられた融合遺伝子は NAB2ex6-STAT6ex17 の 1 種類のみであり、本検討での Fusion (STAT6-full) に相当する融合遺伝子を用いた検討は現在までなされていない。

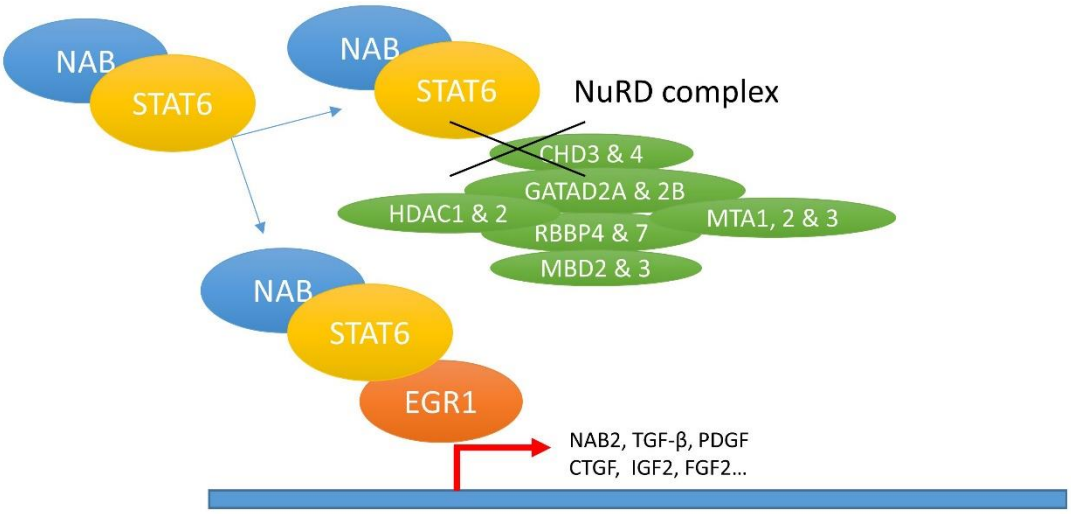


図 33　NAB2-STAT6 融合遺伝子の予想される機能。融合遺伝子形成により、NAB2 は NuRD complex との結合性が失われる。さらに STAT6 の転写活性ドメインを獲得し、EGR1 の標的遺伝子の転写を促進させる。

STAT6 を含め、STAT の活性化はリンパ腫や胃癌、大腸癌、頭頸部癌、悪性神経膠腫など、様々な腫瘍で報告されている[173-176]。一方で、Ritz らは、縦隔原発 B 細胞性リンパ腫の 36%において、STAT6 の DNA 結合ドメインに変異があり、これらの変異は DNA 結合能力を低下させることを明らかにした[177]。しかし、これらの変異がどのように腫瘍形成に関わっているのかは明らかになっておらず、髄膜発生 SFT/HPC においても STAT6 の DNA 結合ドメインの欠損がどのように影響しているのかは今後の検討課題である。

本検討において、偽乳頭状構造を示す HPC が 4 例含まれていたが、文献上、偽乳頭状もしくは乳頭状構造を示す SFT/HPC は 2 例の症例報告があるのみであり[178,179]、そのまれな形態から乳頭状髄膜腫や上衣腫との鑑別が問題となる。実際、偽乳頭状構造を呈した本検討の HPC のうち 2 例は当初、乳頭状髄膜腫、退形成性上衣腫と診断され、追加検討にて HPC の最終診断となっていた。過去の偽乳頭状構造を有する SFT/HPC の症例報告 2 例において、融合遺伝子の検索がされていたのは 1 例のみであり、この 1 例は、STAT6 の免疫組織化学で核陽性像は認められたものの、融合遺伝子は検出されておらず[179]、現在までに融合遺伝子を証明した偽乳頭状 SFT/HPC は報告がない。本検討の偽乳頭状構造を示す HPC4 例中 1 例は融合遺伝子が検出できなかったものの、3 例は同一の融合遺伝子型、

NAB2ex6-STAT6ex17 を有していた。この融合遺伝子が、豊富な血管形成や細胞接着の低下など、他の融合遺伝子型とは異なる機能を有する可能性が考えられるが、症例数が少なく、追加検討が必要である。

NAB2-STAT6 融合遺伝子型は組織型との相関が認められたものの、予後との相関は認められなかった。SFT は一般的には予後良好とされているが、組織型別に見た予後曲線においても有意差は認められず、症例数の不足が一つの要因と考えられる。また、SFT において不完全切除は有意な再発因子とされている[121]。実際、本検討において再発した SFT は 1 例のみであったが、初回手術は不完全切除であり、融合遺伝子型のほかに切除率が再発に寄与している可能性が考えられる。

本検討の 19 例では、全例で STAT6 の免疫組織化学核陽性像が認められた。STAT6 の免疫組織化学の感度、特異度はそれぞれ 86–100%、96–100%と報告されている[159,180-184]。本検討においても感度は 100%であり、全例において NAB2-STAT6 融合遺伝子の存在が期待されたが、実際に融合遺伝子が検出できた症例は 74%であった。免疫組織化学の陽性率と融合遺伝子検出率の差異に関しては、過去にも同様の報告があり[161,168]、RT-PCR 法の限界が原因と考えられる。NAB2-STAT6 融合遺伝子の breakpoint と融合パターンは様々であり、また本検討の症例 15 のように intron を含む場合や、由来不明の塩基配列の挿入を伴う例も報告されている[169]。さらに、FFPE 組織ではホルマリンおよび長期保存による核酸分解の影響を受けることから[185]、全ての融合遺伝子型を単一の PCR プロトコールでカバーすることは困難であり、多数の primer を組み合わせる必要がある。本症例の NAB2-STAT6 融合遺伝子陰性例も、他の primer の組み合わせで NAB2-STAT6 融合遺伝子が検出できる可能性が考えられる。過去の文献においても NAB2-STAT6 融合遺伝子検出率は 52–100%と差が見られた。検体の種類（凍結検体か FFPE 組織か)、手法の違い（NGS を用いた全ゲノムシークエンスか全エクソームシークエンスか、もしくは RT-PCR か)、さらに RT-PCR の場合には使われた primer の組み合わせにより、検出率が大きく異なったものと考えられる。

STAT6 の免疫組織化学の有用性は高いものの、NAB2-STAT6 融合遺伝子自体の検出が重要な場合も存在する。Nakada らは、小脳発生 SFT/HPC の 1 例で、原発巣においては STAT6 の核陽性像が確認されたものの、転移巣においては STAT6 の核の染色性が減弱した症例を報告している[186]。また、Dagrada らは、dedifferentiated SFT の 11 例中 9 例において、NAB2-STAT6 融合遺伝子は存在するものの、融合タンパクの発現が

低下もしくは消失していたとしている[171]。Dedifferentiated SFT は、脱分化成分のみの組織採取で典型的な SFT 成分が含まれない場合、病理診断が困難となることが予想され、このような症例では診断のために NAB2-STAT6 融合遺伝子そのものの検出が重要となる。また Doyle らは、脱分化型脂肪肉腫の一部において、STAT6 の増幅による STAT6 の核陽性像が見られることを報告している[180,187]。脱分化型脂肪肉腫も時に SFT/HPC との鑑別を要し、そのような場合には NAB2-STAT6 融合遺伝子の検出が必要である。以上より、髄膜性腫瘍で SFT/HPC が鑑別にあがった場合には、STAT6 の免疫組織化学とともに、本研究で用いた NAB2-STAT6 融合遺伝子の検出が重要となる場合があると考えられる。

【総括および結論】

本研究において得られた新知見は、以下の通りである。

1) 髄膜発生 SFT/HPC はその他の部位の SFT と同頻度の NAB2-STAT6 融合遺伝子を有している。
2) SFT/HPC における NAB2-STAT6 融合遺伝子は STAT6 の breakpoint により主に 2 種類［Fusion (STAT6-full)と Fusion (STAT6-ΔDBD)］に分けられる。
3) SFT/HPC では発生臓器によって NAB2-STAT6 融合遺伝子の種類が異なり、髄膜発生 SFT/HPC は腹腔内・後腹膜、髄膜以外の頭頸部に発生する SFT と同様の融合遺伝子型を有し、胸腔内発生 SFT とは異なる。
4) 髄膜発生 SFT/HPC では NAB2-STAT6 融合遺伝子型は年齢と相関があるが、腫瘍径とは相関がない。
5) 髄膜発生 SFT/HPC では Fusion (STAT6-full) を有する症例は緩徐進行性の SFT の形態をとるが、Fusion (STAT6-ΔDBD) ではより悪性度の高い組織型をとる。
6) 偽乳頭状構造を呈する SFT/HPC は、大部分は NAB2ex6-STAT6ex17 を有している。
7) p53 は悪性度の高い組織型では高発現しているが、p53 発現が必ずしも悪性を示すわけではない。
8) NAB2-STAT6 融合遺伝子型は予後に影響を与えない。

以上の知見をもとに、今後異なる NAB2-STAT6 融合遺伝子の機能の違いについて研究が展開されると考えられる。この融合遺伝子の機能の違い、もしくは共通点の解明により、NAB2 および STAT6 の新たな機能に関する知見や、SFT/HPC における新たな分子標的治療薬の開発が進むことが期待される。

【全体の総括および結論】

第一章において髄膜腫の遺伝子解析、第二章において髄膜発生 SFT/HPC の遺伝子解析を行い、以下の新知見が得られた。

1) 髄膜腫、髄膜発生 SFT/HPC はそれぞれ特徴的な遺伝子変化を有し、これらの遺伝子変化を同定することは、病理診断の補助となる。
2) これらの遺伝子変化は比較的容易に検出でき、病理診断と並行して行うことができる。
3) 髄膜腫では genotype は予後と相関していたが、髄膜発生 SFT/HPC の NAB2-STAT6 融合遺伝子型は予後と相関しなかった。

今後の研究課題として、各々の遺伝子変化がどのように腫瘍発生に関与するのか、また同一の腫瘍でも異なる形態を示す分子機構の解明が必要である。また、それぞれの遺伝子変化に基づいた疾患の再分類、及びそれに基づく病理診断を行うことで、適切な治療、特に分子標的薬を含めた個別化医療が期待される。

【謝辞】

本研究の機会を与えて頂いた、北海道大学大学院医学研究科腫瘍病理学分野 田中伸哉教授に深く感謝致します。また、適切な助言と直接の御指導を賜りました北海道大学大学院医学研究科探索病理学講座 西原広史特任教授に心から感謝致します。

最後に、本研究に当たってご指導･ご協力を頂いた、腫瘍病理学分野、探索病理学講座の全ての皆様に、心よりお礼申し上げます。

【引用文献】

1 平成 26 年(2014) 人口動態統計(確定数)の概況, 厚生労働省.

2 Ostrom, Q. T. *et al.* CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro Oncol.* **17 Suppl 4**, iv1-iv62 (2015).

3 Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D. & Cavenee, W. K. *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System, 4th ed*. IARC Press, Lyon, 2007.

4 Mennel, H. D. Klaus Joachim Zulch: Partner to neurosurgery, advocate of neurology and the neuropathological basis. *Zentralbl. Neurochir.* **63**, 29-35 (2002).

5 Parsons, D. W. *et al.* An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* **321**, 1807-1812 (2008).

6 Schwartzentruber, J. *et al.* Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* **482**, 226-231 (2012).

7 Louis, D. N. *et al.* International Society Of Neuropathology--Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading. *Brain Pathol.* **24**, 429-435 (2014).

8 *脳腫瘍取扱い規約 第3版　臨床と病理カラーアトラス*. 社団法人日本脳神経外科学会・社団法人日本病理学会, 2010.

9 Riemenschneider, M. J., Perry, A. & Reifenberger, G. Histological classification and molecular genetics of meningiomas. *Lancet Neurol.* **5**, 1045-1054 (2006).

10 Bailey, P., Cushing, H. & Eisenhardt, L. Angioblastic meningiomas. *Arch Path* **6**, 953-990 (1928).

11 Fisher, E. R., Davis, J. S. & Lemmen, L. J. Meningeal hemangiopericytoma. *AMA Arch. Neurol. Psychiatry* **79**, 40-45 (1958).

12 Zulch, K., J. *Histological Typing of Tumours of the Central Nervous System. International Histological Classification of Tumours*. World Health Organization, Geneva, 1979.

13 Pitkethly, D. T., Hardman, J. M., Kempe, L. G. & Earle, K. M. Angioblastic meningiomas; clinicopathologic study of 81 cases. *J.*

Neurosurg. **32**, 539-544 (1970).

14 Jellinger, K. & Slowik, F. Histological subtypes and prognostic problems in meningiomas. *J. Neurol.* **208**, 279-298 (1975).

15 Kleihues , P., Burger, P., C. & Scheithauer, B., W. *Histological Typing of Tumours of the Central Nervous System. Second Edition*. Springer-Verlag, Berlin, 1993.

16 Carneiro, S. S. *et al.* Solitary fibrous tumor of the meninges: a lesion distinct from fibrous meningioma. A clinicopathologic and immunohistochemical study. *Am. J. Clin. Pathol.* **106**, 217-224 (1996).

17 Brunori, A. *et al.* Solitary fibrous tumor of the meninges: two new cases and review of the literature. *Surg. Neurol.* **51**, 636-640 (1999).

18 Suzuki, S. O., Fukui, M., Nishio, S. & Iwaki, T. Clinicopathological features of solitary fibrous tumor of the meninges: An immunohistochemical reappraisal of cases previously diagnosed to be fibrous meningioma or hemangiopericytoma. *Pathol. Int.* **50**, 808-817 (2000).

19 Kleihues, P. & Cavenee, W., K. *Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System*. IARC Press, Lyon, 2000.

20 Fletcher, C. D. M., Bridge, J. A., Hogendoorn, P. C. W. & Mertens, F. *WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone, 4th ed.* IARC Press, Lyon, 2013.

21 Travis, W. D. *et al. WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart, 4th ed.* IARC Press, Lyon, 2015.

22 Tihan, T. *et al.* Solitary fibrous tumors in the central nervous system. A clinicopathologic review of 18 cases and comparison to meningeal hemangiopericytomas. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **127**, 432-439 (2003).

23 Hayashi, Y. *et al.* A reevaluation of the primary diagnosis of hemangiopericytoma and the clinical importance of differential diagnosis from solitary fibrous tumor of the central nervous system. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **111**, 34-38 (2009).

24 Suzuki, H. *et al.* Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas. *Nat. Genet.* **47**, 458-468 (2015).

25 Kane, A. J. *et al.* Anatomic location is a risk factor for atypical and malignant meningiomas. *Cancer* **117**, 1272-1278 (2011).
26 Mawrin, C. & Perry, A. Pathological classification and molecular genetics of meningiomas. *J. Neurooncol.* **99**, 379-391 (2010).
27 Nguyen-Huynh, A., Blevins, N. H. & Jackler, R. K. The challenges of revision skull base surgery. *Otolaryngol. Clin. North Am.* **39**, 783-799, viii (2006).
28 Almefty, R. *et al.* True petroclival meningiomas: results of surgical management. *J. Neurosurg.* **120**, 40-51 (2014).
29 Stienen, M. N. *et al.* The intracranial meningioma - therapeutic possibilities and limitations. *Praxis* **99**, 1479-1494 (2010).
30 Chamberlain, M. C. & Blumenthal, D. T. Intracranial meningiomas: diagnosis and treatment. *Expert Rev. Neurother.* **4**, 641-648 (2004).
31 Chamberlain, M. C. & Johnston, S. K. Hydroxyurea for recurrent surgery and radiation refractory meningioma: a retrospective case series. *J. Neurooncol.* **104**, 765-771 (2011).
32 Chamberlain, M. C. Hydroxyurea for recurrent surgery and radiation refractory high-grade meningioma. *J. Neurooncol.* **107**, 315-321 (2012).
33 Scott, A. M., Wolchok, J. D. & Old, L. J. Antibody therapy of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 278-287 (2012).
34 Horsfall, D. J. *et al.* Steroid hormone and epidermal growth factor receptors in meningiomas. *Aust. N. Z. J. Surg.* **59**, 881-888 (1989).
35 Torp, S. H., Helseth, E., Dalen, A. & Unsgaard, G. Expression of epidermal growth factor receptor in human meningiomas and meningeal tissue. *APMIS* **100**, 797-802 (1992).
36 Andersson, U. *et al.* Epidermal growth factor receptor family (EGFR, ErbB2-4) in gliomas and meningiomas. *Acta Neuropathol.* **108**, 135-142 (2004).
37 Kuratsu, J. I., Seto, H., Kochi, M. & Ushio, Y. Expression of PDGF, PDGF-receptor, EGF-receptor and sex hormone receptors on meningioma. *Acta Neurochir. (Wien.)* **131**, 289-293 (1994).
38 Maxwell, M. *et al.* Human meningiomas co-express platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF-receptor genes and their

protein products. *Int. J. Cancer* **46**, 16-21 (1990).

39 Wen, P. Y. *et al.* Phase II study of imatinib mesylate for recurrent meningiomas (North American Brain Tumor Consortium study 01-08). *Neuro Oncol.* **11**, 853-860 (2009).

40 Norden, A. D. *et al.* Phase II trials of erlotinib or gefitinib in patients with recurrent meningioma. *J. Neurooncol.* **96**, 211-217 (2010).

41 Mazza, E. *et al.* Hydroxyurea with or without imatinib in the treatment of recurrent or progressive meningiomas: a randomized phase II trial by Gruppo Italiano Cooperativo di Neuro-Oncologia (GICNO). *Cancer Chemother. Pharmacol.* **77**, 115-120 (2016).

42 Kaley, T. J. *et al.* Phase II trial of sunitinib for recurrent and progressive atypical and anaplastic meningioma. *Neuro Oncol.* **17**, 116-121 (2015).

43 Alanin, M. C. *et al.* Effect of bevacizumab on intracranial meningiomas in patients with neurofibromatosis type 2 - a retrospective case series. *Int. J. Neurosci.*, 1-5 (2015).

44 Kaley, T. *et al.* Historical benchmarks for medical therapy trials in surgery- and radiation-refractory meningioma: a RANO review. *Neuro Oncol.* **16**, 829-840 (2014).

45 Ruiz, J. *et al.* Clinicopathological variables, immunophenotype, chromosome 1p36 loss and tumour recurrence of 247 meningiomas grade I and II. *Histol. Histopathol.* **25**, 341-349 (2010).

46 Adeberg, S. *et al.* Long-term outcome after radiotherapy in patients with atypical and malignant meningiomas--clinical results in 85 patients treated in a single institution leading to optimized guidelines for early radiation therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **83**, 859-864 (2012).

47 Simpson, D. The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **20**, 22-39 (1957).

48 Claus, E. B. *et al.* Epidemiology of intracranial meningioma. *Neurosurgery* **57**, 1088-1095 (2005).

49 Zankl, H. & Zang, K. D. Cytological and cytogenetical studies on

brain tumors. 4. Identification of the missing G chromosome in human meningiomas as no. 22 by fluorescence technique. *Humangenetik* **14**, 167-169 (1972).

50 Mark, J., Levan, G. & Mitelman, F. Identification by fluorescence of the G chromosome lost in human meningomas. *Hereditas* **71**, 163-168 (1972).

51 Sanson, M. *et al.* Germline deletion in a neurofibromatosis type 2 kindred inactivates the NF2 gene and a candidate meningioma locus. *Hum. Mol. Genet.* **2**, 1215-1220 (1993).

52 Baser, M. E., DG, R. E. & Gutmann, D. H. Neurofibromatosis 2. *Curr. Opin. Neurol.* **16**, 27-33 (2003).

53 Dumanski, J. P., Carlbom, E., Collins, V. P. & Nordenskjold, M. Deletion mapping of a locus on human chromosome 22 involved in the oncogenesis of meningioma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 9275-9279 (1987).

54 Kros, J. *et al.* NF2 status of meningiomas is associated with tumour localization and histology. *J. Pathol.* **194**, 367-372 (2001).

55 Hansson, C. M. *et al.* Comprehensive genetic and epigenetic analysis of sporadic meningioma for macro-mutations on 22q and micro-mutations within the NF2 locus. *BMC Genomics* **8**, 16 (2007).

56 Tabernero, M. *et al.* Association between mutation of the NF2 gene and monosomy 22 in menopausal women with sporadic meningiomas. *BMC Med. Genet.* **14**, 114 (2013).

57 Buccoliero, A. M. *et al.* NF2 gene expression in sporadic meningiomas: relation to grades or histotypes real time-pCR study. *Neuropathology* **27**, 36-42 (2007).

58 Dumanski, J. P., Rouleau, G. A., Nordenskjold, M. & Collins, V. P. Molecular genetic analysis of chromosome 22 in 81 cases of meningioma. *Cancer Res.* **50**, 5863-5867 (1990).

59 Clark, V. E. *et al.* Genomic analysis of non-NF2 meningiomas reveals mutations in TRAF7, KLF4, AKT1, and SMO. *Science* **339**, 1077-1080 (2013).

60 Reuss, D. E. *et al.* Secretory meningiomas are defined by combined KLF4 K409Q and TRAF7 mutations. *Acta Neuropathol.*

125, 351-358 (2013).

61 Davey, J. W. *et al.* Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 499-510 (2011).

62 Gagan, J. & Van Allen, E. M. Next-generation sequencing to guide cancer therapy. *Genome Med.* **7**, 80 (2015).

63 Coco, S. *et al.* Next generation sequencing in non-small cell lung cancer: new avenues toward the personalized medicine. *Curr. Drug Targets* **16**, 47-59 (2015).

64 Roy-Chowdhuri, S. *et al.* Multigene Clinical Mutational Profiling of Breast Carcinoma Using Next-Generation Sequencing. *Am. J. Clin. Pathol.* **144**, 713-721 (2015).

65 Marrone, M. *et al.* Multi-marker Solid Tumor Panels Using Next-generation Sequencing to Direct Molecularly Targeted Therapies. *PLoS Curr* **6** (2014).

66 Lee, W. H. Characterization of a newly established malignant meningioma cell line of the human brain: IOMM-Lee. *Neurosurgery* **27**, 389-395 (1990).

67 Tanaka, K. *et al.* Establishment of a human malignant meningioma cell line with amplified c-myc oncogene. *Cancer* **64**, 2243-2249 (1989).

68 Ishiwata, I. *et al.* In vitro culture of various typed meningiomas and characterization of a human malignant meningioma cell line (HKBMM). *Hum. Cell* **17**, 211-217 (2004).

69 Rutka, J. T. *et al.* An ultrastructural and immunocytochemical analysis of leptomeningeal and meningioma cultures. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **45**, 285-303 (1986).

70 Puttmann, S. *et al.* Establishment of a benign meningioma cell line by hTERT-mediated immortalization. *Lab. Invest.* **85**, 1163-1171 (2005).

71 Ragel, B. T. *et al.* A comparison of the cell lines used in meningioma research. *Surg. Neurol.* **70**, 295-307 (2008).

72 Brastianos, P. K. *et al.* Genomic sequencing of meningiomas identifies oncogenic SMO and AKT1 mutations. *Nat. Genet.* **45**, 285-289 (2013).

73 Yu, Y. *et al.* Targeting AKT1-E17K and the PI3K/AKT Pathway with an Allosteric AKT Inhibitor, ARQ 092. *PLoS One* **10**, e0140479 (2015).

74 Reinecke, F., Satya, R. V. & DiCarlo, J. Quantitative analysis of differences in copy numbers using read depth obtained from PCR-enriched samples and controls. *BMC Bioinformatics* **16**, 17 (2015).

75 Ruttledge, M. H. *et al.* Evidence for the complete inactivation of the NF2 gene in the majority of sporadic meningiomas. *Nat. Genet.* **6**, 180-184 (1994).

76 Seizinger, B. R. *et al.* Molecular genetic approach to human meningioma: loss of genes on chromosome 22. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 5419-5423 (1987).

77 Ng, H. K. *et al.* Combined molecular genetic studies of chromosome 22q and the neurofibromatosis type 2 gene in central nervous system tumors. *Neurosurgery* **37**, 764-773 (1995).

78 De Vitis, L. R. *et al.* Screening for mutations in the neurofibromatosis type 2 (NF2) gene in sporadic meningiomas. *Hum. Genet.* **97**, 632-637 (1996).

79 Leone, P. E. *et al.* NF2 gene mutations and allelic status of 1p, 14q and 22q in sporadic meningiomas. *Oncogene* **18**, 2231-2239 (1999).

80 Ueki, K. *et al.* Tight association of loss of merlin expression with loss of heterozygosity at chromosome 22q in sporadic meningiomas. *Cancer Res.* **59**, 5995-5998 (1999).

81 Sulman, E. P. *et al.* Identification of a consistent region of allelic loss on 1p32 in meningiomas: correlation with increased morbidity. *Cancer Res.* **58**, 3226-3230 (1998).

82 Linsler, S. *et al.* Molecular biological determinations of meningioma progression and recurrence. *PLoS One* **9**, e94987 (2014).

83 Abry, E., Thomassen, I. O., Salvesen, O. O. & Torp, S. H. The significance of Ki-67/MIB-1 labeling index in human meningiomas: a literature study. *Pathol. Res. Pract.* **206**, 810-815 (2010).

84 Oya, S., Kawai, K., Nakatomi, H. & Saito, N. Significance of

Simpson grading system in modern meningioma surgery: integration of the grade with MIB-1 labeling index as a key to predict the recurrence of WHO Grade I meningiomas. *J. Neurosurg.* **117**, 121-128 (2012).

85 Yamaguchi, S. *et al.* Prognostic factors for survival in patients with high-grade meningioma and recurrence-risk stratification for application of radiotherapy. *PLoS One* **9**, e97108 (2014).

86 Aboukais, R. *et al.* Early postoperative radiotherapy improves progression free survival in patients with grade 2 meningioma. *Acta Neurochir. (Wien.)* **155**, 1385-1390 (2013).

87 Kaur, G. *et al.* Adjuvant radiotherapy for atypical and malignant meningiomas: a systematic review. *Neuro Oncol.* **16**, 628-636 (2014).

88 Jenkinson, M. D. *et al.* The ROAM/EORTC-1308 trial: Radiation versus Observation following surgical resection of Atypical Meningioma: study protocol for a randomised controlled trial. *Trials* **16**, 519 (2015).

89 Abedalthagafi, M. *et al.* Oncogenic PI3K mutations are as common as AKT1 and SMO mutations in meningioma. *Neuro Oncol.* (2016). [Epub ahead of print]

90 Sahm, F. *et al.* TERT Promoter Mutations and Risk of Recurrence in Meningioma. *J. Natl. Cancer Inst.* **108** (2016).

91 Goutagny, S. *et al.* High incidence of activating TERT promoter mutations in meningiomas undergoing malignant progression. *Brain Pathol.* **24**, 184-189 (2014).

92 Mansouri, A. *et al.* Surgically resected skull base meningiomas demonstrate a divergent postoperative recurrence pattern compared with non-skull base meningiomas. *J. Neurosurg.* (2016). [Epub ahead of print]

93 Ohba, S. *et al.* Long-term surgical outcome and biological prognostic factors in patients with skull base meningiomas. *J. Neurosurg.* **114**, 1278-1287 (2011).

94 Antinheimo, J. *et al.* Proliferation potential and histological features in neurofibromatosis 2-associated and sporadic meningiomas. *J. Neurosurg.* **87**, 610-614 (1997).

95 Pavelin, S. *et al.* The significance of immunohistochemical expression of merlin, Ki-67, and p53 in meningiomas. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **22**, 46-49 (2014).

96 Wellenreuther, R. *et al.* Analysis of the neurofibromatosis 2 gene reveals molecular variants of meningioma. *Am. J. Pathol.* **146**, 827-832 (1995).

97 Dietel, M. *et al.* Predictive molecular pathology and its role in targeted cancer therapy: a review focussing on clinical relevance. *Cancer Gene Ther.* **20**, 211-221 (2013).

98 Smith, J. S. *et al.* Association between absence of epidermal growth factor receptor immunoreactivity and poor prognosis in patients with atypical meningioma. *J. Neurosurg.* **106**, 1034-1040 (2007).

99 Saini, M., Jha, A. N., Abrari, A. & Ali, S. Expression of proto-oncogene KIT is up-regulated in subset of human meningiomas. *BMC Cancer* **12**, 212 (2012).

100 Growney, J. D. *et al.* Activation mutations of human c-KIT resistant to imatinib mesylate are sensitive to the tyrosine kinase inhibitor PKC412. *Blood* **106**, 721-724 (2005).

101 Yan, L. *et al.* Clinicopathological significance of c-KIT mutation in gastrointestinal stromal tumors: a systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* **5**, 13718 (2015).

102 Hodi, F. S. *et al.* Imatinib for melanomas harboring mutationally activated or amplified KIT arising on mucosal, acral, and chronically sun-damaged skin. *J. Clin. Oncol.* **31**, 3182-3190 (2013).

103 Romond, E. H. *et al.* Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **353**, 1673-1684 (2005).

104 Gravalos, C. & Jimeno, A. HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Ann. Oncol.* **19**, 1523-1529 (2008).

105 Hamilton, B. O., Sy, J. S., Megyesi, J. F. & Ang, L. C. Her2neu amplification associates with Co-deletion 1p/14q in recurrent meningiomas. *Can. J. Neurol. Sci.* **40**, 361-365 (2013).

106 Mahzouni, P. & Movahedipour, M. An immunohistochemical study of HER2 expression in meningioma and its correlation with tumor grade. *Pathol. Res. Pract.* **208**, 221-224 (2012).

107 Lee, J., Tran, P. & Klempner, S. J. Targeting the MET Pathway in Gastric and Oesophageal Cancers: Refining the Optimal Approach. *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol.)* (2016). [Epub ahead of print]

108 Engelman, J. A. *et al.* MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* **316**, 1039-1043 (2007).

109 Kang, Y. K. *et al.* A phase II trial of a selective c-Met inhibitor tivantinib (ARQ 197) monotherapy as a second- or third-line therapy in the patients with metastatic gastric cancer. *Invest. New Drugs* **32**, 355-361 (2014).

110 Scagliotti, G. *et al.* Phase III Multinational, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Tivantinib (ARQ 197) Plus Erlotinib Versus Erlotinib Alone in Previously Treated Patients With Locally Advanced or Metastatic Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *J. Clin. Oncol.* **33**, 2667-2674 (2015).

111 Tolaney, S. M. *et al.* Phase II study of tivantinib (ARQ 197) in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *Invest. New Drugs* **33**, 1108-1114 (2015).

112 Wolfsberger, S. *et al.* Progesterone-receptor index in meningiomas: correlation with clinico-pathological parameters and review of the literature. *Neurosurg. Rev.* **27**, 238-245 (2004).

113 Gursan, N., Gundogdu, C., Albayrak, A. & Kabalar, M. E. Immunohistochemical detection of progesterone receptors and the correlation with Ki-67 labeling indices in paraffin-embedded sections of meningiomas. *Int. J. Neurosci.* **112**, 463-470 (2002).

114 Tsuchida, T. *et al.* Immunohistochemical observation of foci of muscle actin-positive tumor cells in meningiomas. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **120**, 267-269 (1996).

115 Goutagny, S. *et al.* Genomic profiling reveals alternative genetic pathways of meningioma malignant progression dependent on the underlying NF2 status. *Clin. Cancer Res.* **16**, 4155-4164 (2010).

116 Kap, M. *et al.* Histological assessment of PAXgene tissue fixation and stabilization reagents. *PLoS One* **6**, e27704 (2011).
117 Viertler, C. *et al.* A new technology for stabilization of biomolecules in tissues for combined histological and molecular analyses. *J. Mol. Diagn.* **14**, 458-466 (2012).
118 Staff, S. *et al.* Preservation of nucleic acids and tissue morphology in paraffin-embedded clinical samples: comparison of five molecular fixatives. *J. Clin. Pathol.* **66**, 807-810 (2013).
119 Howat, W. J. & Wilson, B. A. Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. *Methods* **70**, 12-19 (2014).
120 Lehmann, U. & Kreipe, H. Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. *Methods* **25**, 409-418 (2001).
121 Metellus, P. *et al.* Solitary fibrous tumors of the central nervous system: clinicopathological and therapeutic considerations of 18 cases. *Neurosurgery* **60**, 715-722 (2007).
122 Caroli, E. *et al.* Solitary fibrous tumors of the meninges: report of four cases and literature review. *Neurosurg. Rev.* **27**, 246-251 (2004).
123 Martin, A. J. *et al.* Solitary fibrous tumours of the meninges: case series and literature review. *J. Neurooncol.* **54**, 57-69 (2001).
124 Stout, A. P. & Murray, M. R. HEMANGIOPERICYTOMA: A VASCULAR TUMOR FEATURING ZIMMERMANN'S PERICYTES. *Ann. Surg.* **116**, 26-33 (1942).
125 Mekni, A. *et al.* Hemangiopericytoma in the central nervous system. A study of eight cases. *Neurochirurgie* **54**, 15-20 (2008).
126 Kumar, N. *et al.* Intracranial meningeal hemangiopericytoma: 10 years experience of a tertiary care Institute. *Acta Neurochir. (Wien.)* **154**, 1647-1651 (2012).
127 Schiariti, M. *et al.* Hemangiopericytoma: long-term outcome revisited. Clinical article. *J. Neurosurg.* **114**, 747-755 (2011).
128 Deniz, K., Kontas, O., Tucer, B. & Kurtsoy, A. Meningeal solitary fibrous tumor: report of a case and literature review. *Folia Neuropathol.* **43**, 178-185 (2005).

129 Cummings, T. J., Burchette, J. L. & McLendon, R. E. CD34 and dural fibroblasts: the relationship to solitary fibrous tumor and meningioma. *Acta Neuropathol.* **102**, 349-354 (2001).
130 Perry, A., Scheithauer, B. W. & Nascimento, A. G. The immunophenotypic spectrum of meningeal hemangiopericytoma: a comparison with fibrous meningioma and solitary fibrous tumor of meninges. *Am. J. Surg. Pathol.* **21**, 1354-1360 (1997).
131 Ogawa, K. *et al.* Malignant solitary fibrous tumor of the meninges. *Virchows Arch.* **444**, 459-464 (2004).
132 Ng, H. K. *et al.* Metastatic solitary fibrous tumor of the meninges. Case report. *J. Neurosurg.* **93**, 490-493 (2000).
133 Mosquera, J. M. & Fletcher, C. D. Expanding the spectrum of malignant progression in solitary fibrous tumors: a study of 8 cases with a discrete anaplastic component--is this dedifferentiated SFT? *Am. J. Surg. Pathol.* **33**, 1314-1321 (2009).
134 Maekawa, A. *et al.* A case of intracranial solitary fibrous tumor/hemangiopericytoma with dedifferentiated component. *Neuropathology* **35**, 260-265 (2015).
135 Teranishi, K. *et al.* Recurrent solitary fibrous tumor of the falx cerebri with intraventricular extension: case report. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* **47**, 269-272 (2007).
136 Okada, T. *et al.* A strongly CD34-positive meningioma that was difficult to distinguish from a solitary fibrous tumor. *Ultrastruct. Pathol.* **38**, 290-294 (2014).
137 Chaubal, A., Paetau, A., Zoltick, P. & Miettinen, M. CD34 immunoreactivity in nervous system tumors. *Acta Neuropathol.* **88**, 454-458 (1994).
138 Suzuki, S., Uchida, K. & Nakayama, H. The effects of tumor location on diagnostic criteria for canine malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNSTs) and the markers for distinction between canine MPNSTs and canine perivascular wall tumors. *Vet. Pathol.* **51**, 722-736 (2014).
139 Sakellaridis, N., Mahera, H. & Pomonis, S. Hemangiopericytoma-like synovial sarcoma of the lumbar spine. Case report. *J. Neurosurg. Spine* **4**, 179-182 (2006).

140 Park, M. S. & Araujo, D. M. New insights into the hemangiopericytoma/solitary fibrous tumor spectrum of tumors. *Curr. Opin. Oncol.* **21**, 327-331 (2009).
141 Bouvier, C. *et al.* Solitary fibrous tumors and hemangiopericytomas of the meninges: overlapping pathological features and common prognostic factors suggest the same spectrum of tumors. *Brain Pathol.* **22**, 511-521 (2012).
142 Svaren, J. *et al.* The Nab2 and Stat6 genes share a common transcription termination region. *Genomics* **41**, 33-39 (1997).
143 Svaren, J. *et al.* NAB2, a corepressor of NGFI-A (Egr-1) and Krox20, is induced by proliferative and differentiative stimuli. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 3545-3553 (1996).
144 Srinivasan, R. *et al.* NAB2 represses transcription by interacting with the CHD4 subunit of the nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) complex. *J. Biol. Chem.* **281**, 15129-15137 (2006).
145 Lai, A. Y. & Wade, P. A. Cancer biology and NuRD: a multifaceted chromatin remodelling complex. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 588-596 (2011).
146 Denslow, S. A. & Wade, P. A. The human Mi-2/NuRD complex and gene regulation. *Oncogene* **26**, 5433-5438 (2007).
147 Bhattacharyya, S. *et al.* Early growth response transcription factors: key mediators of fibrosis and novel targets for anti-fibrotic therapy. *Matrix Biol.* **30**, 235-242 (2011).
148 Khachigian, L. M., Williams, A. J. & Collins, T. Interplay of Sp1 and Egr-1 in the proximal platelet-derived growth factor A-chain promoter in cultured vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 27679-27686 (1995).
149 Bhattacharyya, S. *et al.* The transcriptional cofactor nab2 is induced by tgf-Beta and suppresses fibroblast activation: physiological roles and impaired expression in scleroderma. *PLoS One* **4**, e7620 (2009).
150 Kumbrink, J., Kirsch, K. H. & Johnson, J. P. EGR1, EGR2, and EGR3 activate the expression of their coregulator NAB2 establishing a negative feedback loop in cells of neuroectodermal

and epithelial origin. *J. Cell. Biochem.* **111**, 207-217 (2010).

151 Hebenstreit, D., Wirnsberger, G., Horejs-Hoeck, J. & Duschl, A. Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6. *Cytokine Growth Factor Rev.* **17**, 173-188 (2006).

152 Abdulkadir, S. A. *et al.* Frequent and early loss of the EGR1 corepressor NAB2 in human prostate carcinoma. *Hum. Pathol.* **32**, 935-939 (2001).

153 Shimoyamada, H. *et al.* Early growth response-1 induces and enhances vascular endothelial growth factor-A expression in lung cancer cells. *Am. J. Pathol.* **177**, 70-83 (2010).

154 Skinnider, B. F. *et al.* Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* **99**, 618-626 (2002).

155 Qin, J. Z. *et al.* Constitutive and interleukin-7- and interleukin-15-stimulated DNA binding of STAT and novel factors in cutaneous T cell lymphoma cells. *J. Invest. Dermatol.* **117**, 583-589 (2001).

156 Ni, Z. *et al.* Selective activation of members of the signal transducers and activators of transcription family in prostate carcinoma. *J. Urol.* **167**, 1859-1862 (2002).

157 Chmielecki, J. *et al.* Whole-exome sequencing identifies a recurrent NAB2-STAT6 fusion in solitary fibrous tumors. *Nat. Genet.* **45**, 131-132 (2013).

158 Robinson, D. R. *et al.* Identification of recurrent NAB2-STAT6 gene fusions in solitary fibrous tumor by integrative sequencing. *Nat. Genet.* **45**, 180-185 (2013).

159 Schweizer, L. *et al.* Meningeal hemangiopericytoma and solitary fibrous tumors carry the NAB2-STAT6 fusion and can be diagnosed by nuclear expression of STAT6 protein. *Acta Neuropathol.* **125**, 651-658 (2013).

160 Mohajeri, A. *et al.* Comprehensive genetic analysis identifies a pathognomonic NAB2/STAT6 fusion gene, nonrandom secondary genomic imbalances, and a characteristic gene expression profile in solitary fibrous tumor. *Genes Chromosomes Cancer* **52**, 873-886 (2013).

161 Barthelmess, S. *et al.* Solitary fibrous tumors/hemangiopericytomas with different variants of the NAB2-STAT6 gene fusion are characterized by specific histomorphology and distinct clinicopathological features. *Am. J. Pathol.* **184**, 1209-1218 (2014).

162 Russo, A. *et al.* The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J. Clin. Oncol.* **23**, 7518-7528 (2005).

163 Taubert, H., Meye, A. & Wurl, P. Soft tissue sarcomas and p53 mutations. *Mol. Med.* **4**, 365-372 (1998).

164 Deben, C. *et al.* TP53 and MDM2 genetic alterations in non-small cell lung cancer: Evaluating their prognostic and predictive value. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **99**, 63-73 (2016).

165 Yokoi, T. *et al.* Solitary fibrous tumour: significance of p53 and CD34 immunoreactivity in its malignant transformation. *Histopathology* **32**, 423-432 (1998).

166 Schirosi, L. *et al.* Pleuro-pulmonary solitary fibrous tumors: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular study of 88 cases confirming the prognostic value of de Perrot staging system and p53 expression, and evaluating the role of c-kit, BRAF, PDGFRs (alpha/beta), c-met, and EGFR. *Am. J. Surg. Pathol.* **32**, 1627-1642 (2008).

167 Morimitsu, Y., Nakajima, M., Hisaoka, M. & Hashimoto, H. Extrapleural solitary fibrous tumor: clinicopathologic study of 17 cases and molecular analysis of the p53 pathway. *APMIS* **108**, 617-625 (2000).

168 Vogels, R. *et al.* Solitary fibrous tumor - clinicopathologic, immunohistochemical and molecular analysis of 28 cases. *Diagn. Pathol.* **9**, 224 (2014).

169 Yamada, Y. *et al.* Malignant solitary fibrous tumor with high-grade nuclear atypia: an alternate entity for the undetermined tumor group. *Pathol. Res. Pract.* **211**, 117-124 (2015).

170 Akaike, K. *et al.* Distinct clinicopathological features of NAB2-STAT6 fusion gene variants in solitary fibrous tumor with

emphasis on the acquisition of highly malignant potential. *Hum. Pathol.* **46**, 347-356 (2015).

171 Dagrada, G. P. *et al.* Solitary fibrous tumors: loss of chimeric protein expression and genomic instability mark dedifferentiation. *Mod. Pathol.* **28**, 1074-1083 (2015).

172 Kao, Y. C. *et al.* Clinicopathological and genetic heterogeneity of the head and neck solitary fibrous tumours: a comparative histological, immunohistochemical and molecular study of 36 cases. *Histopathology* **68**, 492-501 (2016).

173 Netchiporouk, E. *et al.* Deregulation in STAT signaling is important for cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) pathogenesis and cancer progression. *Cell Cycle* **13**, 3331-3335 (2014).

174 Geiger, J. L., Grandis, J. R. & Bauman, J. E. The STAT3 pathway as a therapeutic target in head and neck cancer: Barriers and innovations. *Oral Oncol.* (2015).

175 Li, M. X. *et al.* Prognostic Role of Phospho-STAT3 in Patients with Cancers of the Digestive System: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* **10**, e0127356 (2015).

176 Senft, C. *et al.* Inhibition of the JAK-2/STAT3 signaling pathway impedes the migratory and invasive potential of human glioblastoma cells. *J. Neurooncol.* **101**, 393-403 (2011).

177 Ritz, O. *et al.* Recurrent mutations of the STAT6 DNA binding domain in primary mediastinal B-cell lymphoma. *Blood* **114**, 1236-1242 (2009).

178 Tomek, M. *et al.* Spinal extradural solitary fibrous tumor with retiform and papillary features. *Ann. Diagn. Pathol.* **17**, 281-287 (2013).

179 Tsukamoto, Y. *et al.* STAT6-positive intraorbital papillary tumor: a rare variant of solitary fibrous tumor? *Pathol. Res. Pract.* **210**, 450-453 (2014).

180 Doyle, L. A. *et al.* Nuclear expression of STAT6 distinguishes solitary fibrous tumor from histologic mimics. *Mod. Pathol.* **27**, 390-395 (2014).

181 Yoshida, A. *et al.* STAT6 immunohistochemistry is helpful in the diagnosis of solitary fibrous tumors. *Am. J. Surg. Pathol.* **38**, 552-

559 (2014).

182 Koelsche, C. *et al.* Nuclear relocation of STAT6 reliably predicts NAB2-STAT6 fusion for the diagnosis of solitary fibrous tumour. *Histopathology* **65**, 613-622 (2014).

183 Cheah, A. L. *et al.* STAT6 rabbit monoclonal antibody is a robust diagnostic tool for the distinction of solitary fibrous tumour from its mimics. *Pathology* **46**, 389-395 (2014).

184 Demicco, E. G. *et al.* Extensive survey of STAT6 expression in a large series of mesenchymal tumors. *Am. J. Clin. Pathol.* **143**, 672-682 (2015).

185 Nam, S. K. *et al.* Effects of fixation and storage of human tissue samples on nucleic Acid preservation. *Korean J Pathol* **48**, 36-42 (2014).

186 Nakada, S. *et al.* NAB2-STAT6 fusion gene analysis in two cases of meningeal solitary fibrous tumor/hemangiopericytoma with late distant metastases. *Brain Tumor Pathol.* **32**, 268-274 (2015).

187 Doyle, L. A., Tao, D. & Marino-Enriquez, A. STAT6 is amplified in a subset of dedifferentiated liposarcoma. *Mod. Pathol.* **27**, 1231-1237 (2014).