

# グリオーマ手術の進歩： 手術支援としてのナビゲーションの役割

Progress in glioma surgery: a role of navigation system

大西丘倫, 大上史朗

愛媛大学医学部脳神経外科

Takanori Ohnishi, Shiro Ohue

Department of Neurosurgery, Ehime University School of Medicine

## 抄録

手術支援としてナビゲーション・システムの導入がグリオーマ治療成績にどのような効果を与えたか検証するため、過去12年間のグリオーマ手術を、A群（ナビゲーション非使用）、B群（Evans型ナビゲーション単独使用）、C群（超音波併用シンクロナイズド・ナビゲーションと5-ALA、機能マッピングの統合支援下手術）の3群に分け、腫瘍摘出率、機能予後、生存率について検討した。平均腫瘍摘出率はA群（68%）、B群（80%）、C群（90%）と、ナビゲーション・システムの使用により、腫瘍摘出率は向上した。一方、術後2ヶ月のKPSでみた機能予後はA群（69%）、B群（70%）、C群（70%）と、3群で差はみられず、術前後のKPSにおいても有意な悪化はみられなかった。評価可能な glioblastoma の生存率では、A群（12M）、B群（14.2M）、C群（15M）と3群間で差は見られなかった。グリオーマ手術において、最新のナビゲーションの導入は、機能を温存しつつ腫瘍摘出率の向上に寄与したが、glioblastoma においてはその生命予後には影響を与えず、今後の症例の蓄積による検証が必要であると思われた。

## Abstract

A key to glioma surgery is to maximally resect the tumor without compromising neuronal functions. In the present study, we examined effects of three different modes of operation in the patients with glioma on the tumor removal rate, Karnofsky performance status, and the overall survival rate. Three modes consisted of no navigation surgery (A group), surgery assisted with only Evans navigation system (B group), surgery with echo-linked synchronized navigation, photodynamic navigation using 5-ALA and functional mapping with subcortical stimulation (C group). Introduction of image-guided navigation in glioma surgery enhanced tumor removal rate without apparent deterioration of neurological function. Furthermore, echo-linked real time navigation combined with other recent modality of surgical assistance (C group) enabled us to maximally remove the tumor around the eloquent areas without compromising motor or speech function. The present study did not demonstrated a favorite effect of the increased rate of tumor removal on overall survival in the patients with glioblastoma.

**Key words:** glioma, surgery, navigation, brain mapping, 5-aminolevulinic acid

## はじめに

グリオーマは脳実質内の細胞より発生し、浸潤性増殖を特徴とする腫瘍である。その外科的摘出において絶対的治癒切除を達成することは一部の腫瘍でlobectomyが行える場合を除いて、通常、ほぼ不可能である。特にglioblastomaのように腫瘍周囲に広汎に腫瘍細胞が浸潤している場合、どこまで切除すべきか明確な答えはない。これまで、グリオーマ治療における長期生存への独立予後因子として、良性グリオーマでは、年齢、KPS、腫瘍摘出度が挙げられている。悪性グリオーマ、特にglioblastomaにおいては、腫瘍摘出度と予後との関係は肯定する報告から否定するものまで現時点では未解決である。

しかし、今後、グリオーマに対する画期的な治療法が開発されるまでは、神経機能を損なわずに可能な限り腫瘍の亜全摘出以上を目指すことが治療成績の向上につながるものと思われる。その目的のために、これまで種々の手術支援法が開発され、実際の手術に導入されてきた。その中で、画像誘導下ナビゲーションシステムは、多くの施設で取り入れられるようになってきた。最近では、さらに5-aminolevulinic acid (5-ALA) を用いて術中の腫瘍可視化を行うphotodynamic navigationや、腫瘍摘出過程で随時、皮質下神経線維の電気生理学的モニタリングを行い、神経機能を傷害せずに摘出する技術も取り入れられている。このような新しい医療機器や材料・技術の進歩は、グリオーマの治療成績をどのように変えたのであろうか。それに応えるため、今回、我々の施設において、手術支援モダリティの変遷によるグリオーマ手術の成績をretrospectiveに検討した。

## 対象・方法

1992年1月～2003年12月の期間で当施設で初回手術を行った大脳半球神経膠腫91例を対象とした。組織学的内訳は、diffuse astrocytoma

18例、anaplastic astrocytoma 18例、oligo-astrocytoma 2例、oligodendroglioma 2例、glioblastoma 51例であった。これらをA群：ナビゲーション非使用群（1992～1995年）（26例）、B群：Evansナビゲーション単独使用群（1996～2000年）（31例）、C群：超音波併用リアルタイムナビゲーションシステムならびに5-ALA、神経機能マッピングを用いた統合下ナビゲーションシステム使用群（2001～2003年）（34例）の3群に分け、①腫瘍摘出率、②機能予後、③生存率の3項目について比較検討を行った。

超音波併用リアルタイムナビゲーションシステムは、StealthStation™ (Medtronic) と超音波診断装置Prosound SSD-5500 (ALOKA) をSonoNav™プローベ (Medtronic) にてリンクさせ、術中のリアルタイム超音波画像とその画像に一致する術前MRIまたはCT画像を同時に並列して表示するナビゲーションシステムであり、これまでシンクロナイズド・ナビゲーションと呼んできた<sup>7,9)</sup>。5-ALAによるphotodynamic navigationでは、全身麻酔開始1時間前に20mg/kgの5-ALA経口投与を行い、挿管後、胃管チューブより10mg/kgの追加投与を行った。励起光源としてキセノンランプのviolet-blue光を用い、観察にはlow cut filter (cut under 480nm) を用いた。神経機能マッピングとして、運動機能に関してはSEP, MEPの他、皮質下線維に対して500Hzの高頻度単回刺激による身体各部位のEMGモニタリングを行った。言語機能に関しては硬膜下電極留置による機能マッピングの後、覚醒下手術を行い皮質下刺激のもと摘出を行った。

## 結果

平均腫瘍摘出率はA群：68 ± 22%、B群：80 ± 21%、C群：90 ± 11%と統合下ナビゲーションシステムの導入により有意に摘出率は向上した (Fig. 1)。また、摘出率の割合をみると、A群では、100%摘出は全体の5%、90%未満の

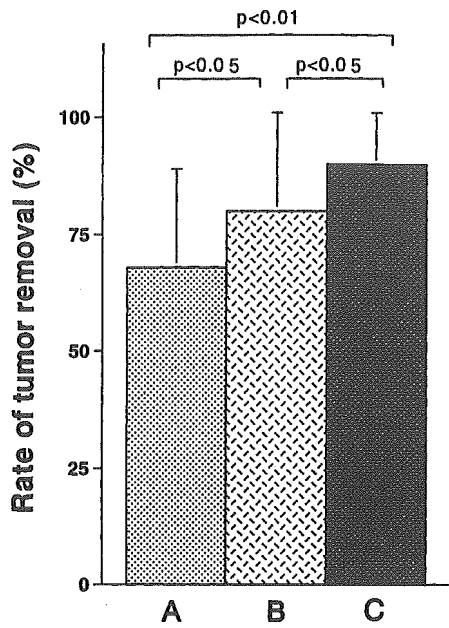


Fig. 1 Tumor removal rate in the three different modality of surgery.

A: no navigation used,  
 B: Evans navigation only,  
 C: echo-linked synchronized navigation system combined with 5-ALA fluorescence and functional mapping

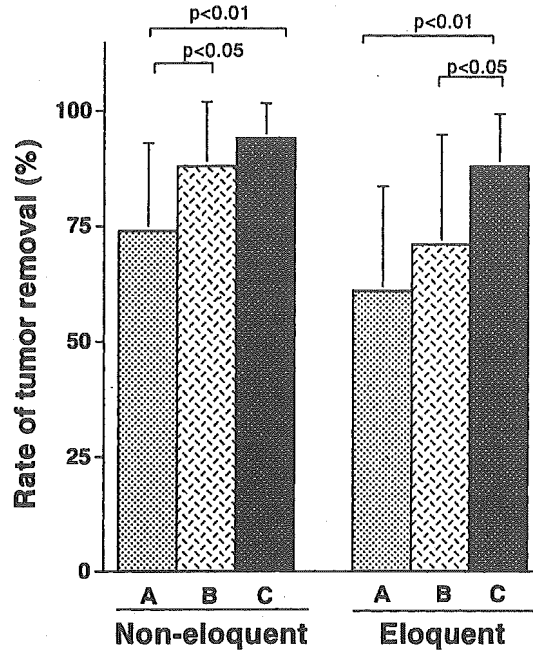


Fig. 3 Tumor removal rate of gliomas in eloquent area or non-eloquent area.

Three groups, A, B and C are the same as described in Fig. 1.

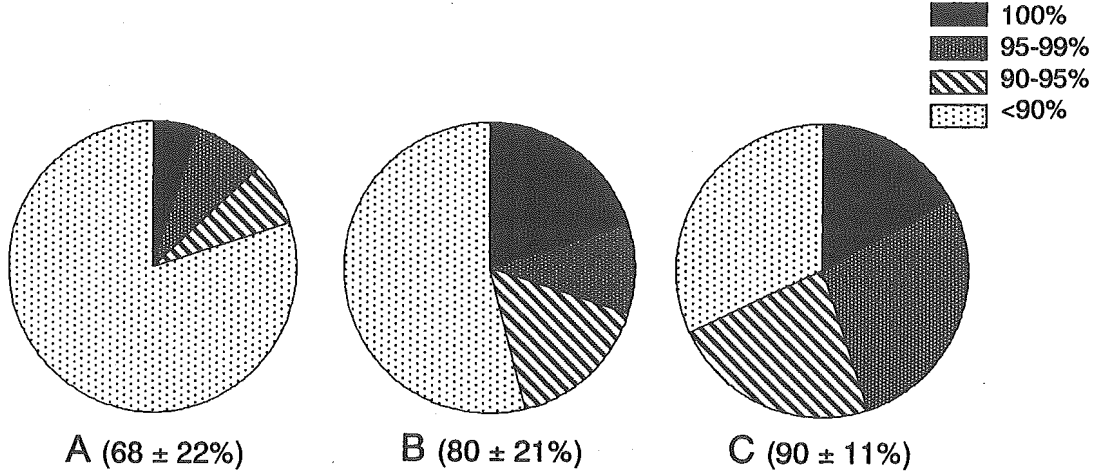


Fig. 2 Percentage of the extent of tumor removal in the three groups as described in Fig. 1.

The extent of tumor removal was divided into 100%, 95~99%, 90~95%, and less than 90%. Value in the parentheses of each group shows a mean removal rate and standard deviation.

摘出が80%であったが、B群では、100%摘出は20%、90%未満の摘出54%と特に100%摘出率の向上がみられ、さらにC群では、100%摘出は17%、90%未満の摘出が32%と90%以上の摘出

が著明に増加した (Fig. 2).

また、腫瘍局在部位を一次運動野や言語野内およびその近傍領域を含む eloquent area とそれ以外の non-eloquent area に分けた場合、non-

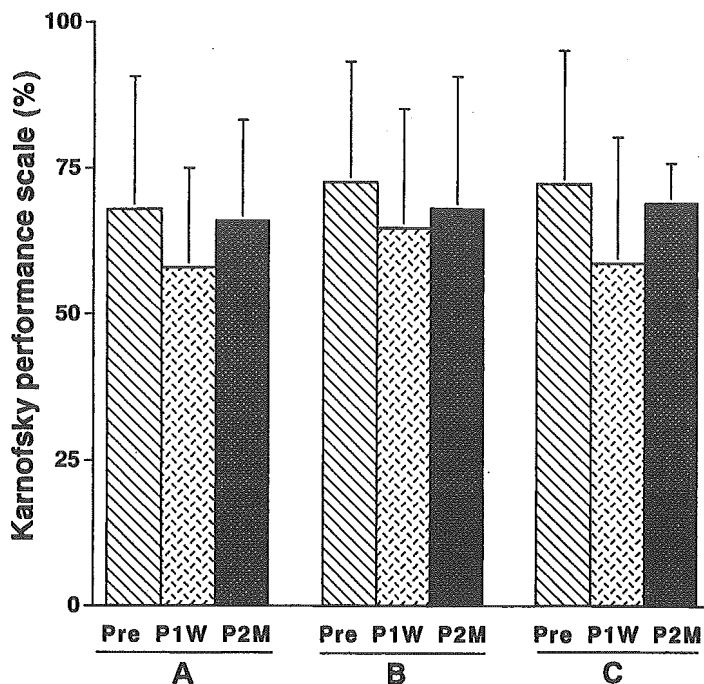


Fig. 4 Functional outcome evaluated by Karnofsky performance scale (KPS) in the three surgical groups. KPS was determined at the preoperative status (Pre), one week after surgery (P1W) and two months after surgery (P2M).

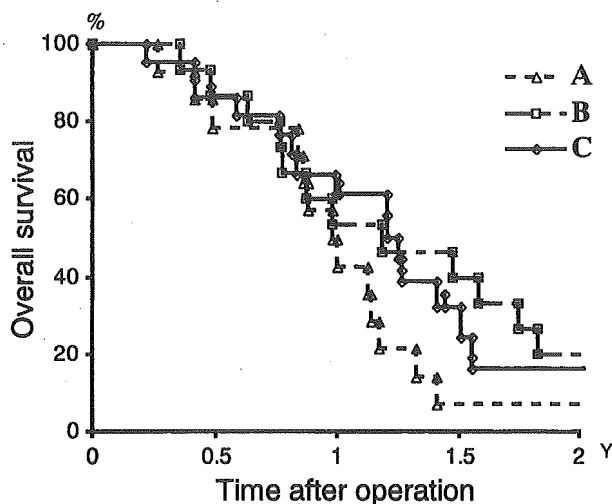


Fig. 5 Overall survival rate of glioblastomas in the three surgical groups, A, B and C.

eloquent areaでは、従来型のナビゲーションシステムでも腫瘍摘出率の向上はみられたが、eloquent areaのグリオーマに関しては、シンクロナイズド・ナビゲーション、機能マッピング、5-ALAを用いた統合下ナビゲーションにより、平均摘出率が88%にまで向上した (Fig. 3).

一方、神経機能を含む障害度について、各群での術前、術後1週、術後2ヶ月のKPSを比較検討すると、いずれの治療群においても術前、術後(2ヶ月)で、ほとんど差はみられなかった (Fig. 4)。またeloquent areaに限って機能予後をみても、全ての群で、術前後でのKPSに

差はみられなかった。

生存率について、各治療群の astrocytoma, anaplastic astrocytoma の症例数が少なかったため、glioblastoma についてのみ解析を行った。各群の生存期間中央値は A 群：12.0 ヶ月，B 群：14.2 ヶ月，C 群：15.0 ヶ月で三者間に有意な差はみられなかった (Fig. 5)。ただし、腫瘍再発までの期間 (TTP) をみると、C 群でやや長い傾向がみられた。

## 考 察

グリオーマ手術において、画像誘導下ナビゲーションの導入は、明らかに腫瘍摘出率の向上に寄与した。脳内深部の血管が豊富な glioblastoma においても、ナビゲーション誘導下で、比較的完全に全摘出が可能となった。さらに、運動野や言語野近傍の eloquent area に存在する腫瘍では、画像誘導下のナビゲーションに加えて機能マッピングや皮質下電気刺激、さらに必要に応じて覚醒下手術を行うことにより、より安全に神経機能を残しながら摘出術が行えるようになった。

グリオーマ手術にナビゲーションが導入された最大の理由は、脳内深部での腫瘍の位置情報を得ることと、浸潤性で境界不明瞭な intrinsic tumor に対して機能障害を出さずに正確に最大限摘出することであり、これまで種々の画像誘導下ナビゲーションシステムが開発されてきた。しかし、最大の課題は髄液の流出や腫瘍摘出に伴って生じる brain shift であり、特に高度な脳浮腫を伴った悪性グリオーマの手術では、しばしばナビゲーションの機能を活用できないことも起こり得る。その対策の一つとしてオープン MRI などにより、術中画像をアップデートし、リアルタイム・ナビゲーションを行うことが挙げられるが、機器整備の面での問題を含め、一般的に普及するには至っていない。我々はこれまで、超音波診断装置を StealthStation の光学式ナビゲーションとリンクさせ、術中の超音波画像をそれと対応する術前の MRI あるいは

CT 画像と同時に描出させることにより、brain shift に対処してきた<sup>6, 8)</sup>。この方法は、硬膜切開後から腫瘍摘出初期過程での brain shift に対しては非常に有用であり、精度の高い腫瘍摘出が可能となった。ただし、摘出が進行するにつれて、超音波画像の描出が不良になることも多く、分解能の高い超音波画像の描出の開発とともに今後の課題である。

一方、浸潤性の腫瘍を画像誘導下のナビゲーションのみで摘出することは不可能で、最近、蛍光物質で標識された腫瘍の可視化が目されるようになってきた。5-ALA を用いた標識方法では、特に悪性グリオーマでの感度、特異性は共に高く、残存腫瘍の探索に非常に有用である<sup>3, 10)</sup>。ただ、腫瘍浸潤部位では、肉眼的な蛍光発色の同定では腫瘍の有無の判定は困難で、最近、我々はレーザーダイオードを用いて蛍光スペクトルを取り、自家蛍光とプロトポルフィリン IX の蛍光強度比から定量的に腫瘍の有無を判定している。しかし、微弱な蛍光強度と組織学的な関係はまだ十分解析されていないこと、また low-grade グリオーマでは 5-ALA による明瞭な標識が得られないことなど、今後の検討が必要である。

運動野や言語野などの重要な機能を担っている領域に近接するグリオーマの摘出においては、SEP や MEP などの機能マッピングと共に術中皮質下線維を電気刺激することにより、より安全に機能障害を出さずに摘出を進めることが今や標準となっている<sup>4)</sup>。また、言語野近傍の腫瘍については、覚醒下手術を行うことにより、機能障害を最小にする努力がなされている。著者らも 500Hz の高頻度電気刺激による筋電図モニタリングにより、リアルタイムに運動機能の状態を把握し、良好な結果を得た。最近、錐体路や視覚路などの神経線維を描出する fiber tractography が術前の評価に用いられているが<sup>1)</sup>、今後、皮質下電気刺激とともに、術中の functional navigation としての応用が期待される。

手術支援機器の進歩により、確かに機能を温存した最大腫瘍摘出が可能になってきた。腫瘍

摘出率の向上は、グリオーマ患者の生命予後を改善したとの報告がみられる一方、否定的な意見もある<sup>2,5)</sup>。特に、悪性グリオーマとして最も多いglioblastomaでは、現在、腫瘍の摘出度と生命予後との明らかな相関は報告されていない。今回の我々の結果でも、glioblastomaにおいて最新の手術支援モダリティをもって摘出率を向上しても、生命予後には大きな貢献をしなかった。ただ、症例の中には比較的長期生存例もみられるようになり、今後、さらに症例を蓄積することにより、摘出度と生存率の関係を検証する必要がある。

## 結 語

グリオーマ手術においてナビゲーション・システムの導入は、神経機能を損なうことなく腫瘍摘出率を向上させた。特に、運動野や言語野などの機能領域の腫瘍摘出には、超音波診断装置をリンクさせたシンクロナイズド・ナビゲーションシステムに、皮質下機能マッピングを付加することにより、安全に機能を温存しつつ腫瘍摘出が可能となった。また、浸潤部位の腫瘍摘出には、5-ALAによるphotodynamic navigationが有用であった。Glioblastomaにおいて、腫瘍摘出度と生命予後に正の相関はみられなかったが、全摘出が行えた症例では腫瘍再発までの期間が延長する傾向がみられた。

## 参考文献

- 1) Berman JI, Berger MS, Mukherjee P, et al.: Diffusion-tensor imaging-guided tracking of fibers of the pyramidal tract combined with intraoperative cortical stimulation mapping in patients with gliomas. *J Neurosurg* 101: 66-72, 2004.
- 2) Hess KR: Extent of resection as a prognostic variable in the treatment of gliomas. *Neuro-Oncol* 42: 227-231, 1999.
- 3) 金子貞男: 脳腫瘍に対する光モニタリング - ALA induced Pp IX による術中脳腫瘍蛍光診断. *脳神経外科* 29: 1019-1031, 2001.
- 4) Keles GE, Lundin DA, Lamborn KR, et al.: Intraoperative subcortical stimulation mapping for hemispherical perirolandic gliomas located within or adjacent to the descending motor pathways: evaluation of morbidity and assessment of functional outcome in 294 patients. *J Neurosurg* 100: 369-375, 2004.
- 5) Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, et al.: A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* 95: 190-198, 2001.
- 6) 大西丘倫, 大上史朗, 久門良明: ナビゲーション手術の進歩: リアルタイム・ナビゲーション. 吉田 純, 橋本信夫, 榎 寿右, 片山容一編, *脳神経外科の最新医療. 先端医療技術研究所*, 東京, 2004, pp189-194.
- 7) 大上史朗, 大西丘倫: 神経機能温存をめざして - 最近の脳神経外科手術について. *愛媛医学* 20: 342-352, 2001.
- 8) 大上史朗, 長戸重幸, 中川 晃ほか: 超音波診断装置を併用したシンクロナイズド・ナビゲーション・システム. 坂井 昇編, *脳腫瘍の外科: 手術による根治性と神経機能*. メディカ出版, 大阪, pp264-269, 2003.
- 9) 大上史朗, 大西丘倫: 超音波装置つきナビゲーションによる手術. *Clin Neurosci* 22: 114-115, 2004.
- 10) Stummer W, Novotny A, Stepp H, et al.: Fluorescence-guided resection of glioblastoma multiforme by using 5-ALA induced porphyrins: a prospective study in 52 consecutive patients. *J Neurosurg* 93: 1003-1013, 2000.

連絡先：大西丘倫  
愛媛大学医学部脳神経外科  
〒791-0295 愛媛県東温市志津川  
Phone: 089-960-5338  
Fax : 089-960-5340  
E-mail: tohnishi@m.ehime-u.ac.jp

## □ VII. 脳腫瘍

### 3. 中枢神経系悪性リンパ腫

埼玉医科大学脳神経外科助教授 西川 亮

**key words** malignant lymphoma, high-dose methotrexate, chemotherapy, radiation therapy, radiation injury

#### 動 向

現時点における中枢神経系悪性リンパ腫に対する標準治療は high-dose methotrexate (MTX) を含んだ化学療法と化学療法後の全脳照射であると考えられるが<sup>1)</sup>、近年の討論の大きな焦点は、化学療法後の放射線照射の必要性についてである<sup>2)</sup>。National Comprehensive Cancer Network の Clinical Practice Guideline には、60歳を越えた患者の場合、照射は避けるべきであると明記されている<sup>1)</sup>が(図1)、National Cancer Institute の PDQ (Physician Data Query) では、この点に関して、今後高次機能検査を含んだ比較試験が

必要であるという記載にとどまっている<sup>3)</sup>。

#### A. Memorial Sloan-Kettering Cancer Center からの報告

2000年に米国の Memorial Sloan-Kettering Cancer Center から、high-dose MTX を含む化学療法 + 全脳照射 45Gy による生存期間中央値 60 カ月という成績が報告された<sup>4)</sup>。MTX は 3.5mg/m<sup>2</sup> の静脈内投与を 2週間毎に 5回、MTX12mg の髄腔内投与も 2週間毎に 5回、vincristine 1.4mg /m<sup>2</sup> を MTX 静脈内投与と同日に 5回、procar-

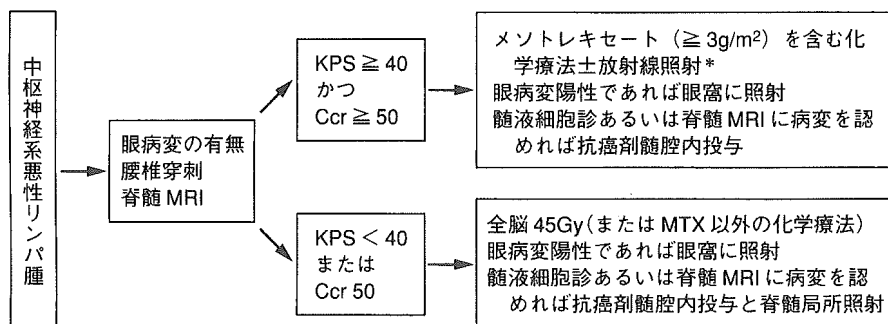


図1 中枢神経系悪性リンパ腫治療ガイドライン

\* 60歳を越える患者の場合は可能な限り放射線照射は避ける。

(National Comprehensive Cancer Network Clinical Practice Guidelines in Oncology-v. 1.2003. [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/f\\_guidelines.asp#site](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#site) を改変)

bazine 100mg/m<sup>2</sup>の7日間内服を1, 3, 5回目のMTX 静脈内投与と同時に施行し, その後45Gyの全脳照射, 照射終了後3g/m<sup>2</sup>のcytarabineを2日間というスケジュールで治療が行われた. その優れた治療成績もさることながら, 注目されたのは照射を行わなかった高齢者症例の解析である. 何らかの理由で照射を行わなかった症例が22例あり, 年齢中央値は70歳(範囲54~89歳)と高齢者がほとんどであったことから, 60歳以上で照射を行った12例(年齢中央値67歳, 範囲60~72歳)との比較を行った. 化学療法のみで照射を行わなかった症例群の10/22(45%)に腫瘍再発がみられ生存期間中央値は33カ月であったが, 一方化学療法後に照射を施行した症例群では, 腫瘍再発は1/12(8%)のみであったにもかかわらず, 10/12例(83%)に遅発性中枢神経障害が出現し, 多くの症例は合併症で死亡し, 生存期間中央値は32カ月と非照射症例と同等であった. すなわち高齢者においては照射の意味がないことが示唆された. なおこの成績はsingle instituteからのものであるが, 後にMTXを2.5mg/m<sup>2</sup>にdose-downしたレジメンでRadiation Therapy Oncology Groupによるmulti-institutional phase II studyとして施行され, 無増悪生存期間中央値24.0カ月, 生存期間中央値36.9カ月, 60歳未満の生存期間中央値50.4カ月, 60歳以上では21.8カ月, 重度の遅発性白質脳症を15%に認めたと報告された<sup>5)</sup>.

## B. 化学療法後の放射線照射の必要性について

放射線照射による遅発性神経毒性の発生は否定できない大きな問題である. では, いっそのこと照射しないとどうなるか.

Massachusetts General HospitalのグループはMTX 8g/m<sup>2</sup>を2週間毎にCRになるまで, ある

いは8回になるまで繰り返し, CRが達成されたらさらに2回追加した後, あとは4週毎に11回維持療法として投与するという方法で治療した成績を報告した<sup>6)</sup>. 無増悪生存期間中央値は12.8カ月, 生存期間中央値は22.8+カ月, CR+PRの奏効率は74%で, 化学療法後に全脳照射を行った報告に匹敵する成績であった. 副作用は耐えられる範囲内で, 痴呆の出現は1例も認めていない. また多剤併用によるstudyとしてはMTX 5g/m<sup>2</sup>を16週の間4回投与し, vincristine, ifosfamide, cytarabine, cyclophosphamide, vindesineの静脈内投与と, さらにMTXとcytarabineの髄腔内投与を併用したレジメンの結果が報告されているが, CR+PRの奏効率71%, 無増悪生存期間中央値21カ月, 生存期間中央値50カ月という優れた結果であった<sup>7)</sup>. 60歳以上の症例に限ってみても無増悪生存期間中央値15カ月, 生存期間中央値34カ月である. またこのレジメンによる詳細な高次機能の評価も報告されているが, 治療後に高次機能が低下した症例は1例もなかった<sup>8)</sup>. ただ治療死を9%に認めている. さらにまた別の報告によれば, 60歳以上の症例を対象として, MTX 1g/m<sup>2</sup>の3回の静脈内投与に, lomustine (CCNU), procarbazine, MTX 髄腔内投与を組合せたサイクルを6回繰り返す方法によって治療した結果, CR+PRの奏効率48%, 無増悪生存期間中央値は10.6カ月, 生存期間中央値は14.3カ月であったと報告されている<sup>9)</sup>. 症例の年齢中央値は72歳と真に高齢者を対象としているにもかかわらず, 痴呆の出現あるいは進行(mini-mental state examination: MMSEで4点以上の低下)を認めた症例は8%のみであったとのことである.

これらに対して, 化学療法のみではやはり治療効果が不十分であることを示唆する報告も存在する. German Cancer Society Neuro-Oncology Working Groupのstudyは, やはりMTX 8g/m<sup>2</sup>

を2週毎に6回投与する方法で治療した結果を報告しているが、CR + PRの奏効率は35.1%でしかなかった<sup>10)</sup>。これは先に紹介したMassachusetts General Hospitalのグループによる奏効率74%と比べて著しく劣る成績であるが、おそらくMTXの投与を6回までに制限したことによるものであろうと考えられている。別のstudyではMTX 1.5 g/m<sup>2</sup>を2週毎に6回施行し、cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, cytarabineを併用する化学療法の後、45Gyを全脳に照射する群と30.6Gyを全脳に照射する群との比較が行われている<sup>11)</sup>。60歳未満の症例では、3年再発率が全脳45Gy群で25%であったのに対して全脳30.6Gy群では83% (p = 0.01)であったが、60歳以上の症例ではこの差を認めなかった、また、全体としての生存率には照射線量による差は認めなかったが、これをCRを達成した症例に限ってみると、やはり60歳未満の症例において全脳45Gy照射群の3年生存率は92%であったのに対し、30.6Gy群では60%で、すなわち60歳未満の症例においては照射線量を落とすと治療成績が低下するという結論となった。逆に60歳以上の症例群では照射線量による治療成績の違いは検出されていない。

さて、どうも高齢者においては可能であれば照射は避けるべきという方向にエビデンスが蓄積しつつあるようである。しかしすべての中枢神経系悪性リンパ腫において化学療法単独での治療が適切であるかどうかについては論争がある<sup>12)</sup>。特に、今後無作為化比較試験を行うべきかどうかについて異論がある。それぞれの立場の論拠を表1にまとめた。

### C. 新しい試み

#### 1. blood brain barrier disruption

Neuweltらによるblood brain barrier disruption (BBBD)を併用した中枢神経系悪性リ

ンパ腫治療の試み自体は新しいものではないが、最近多施設で治療した結果が発表された<sup>13,14)</sup>。全麻下にmannitol (25%)を4~10ml/secondの速度で30秒間(120~300ml)動脈内投与した後、MTX 2,500mgを動脈内投与、cyclophosphamide 500mg/m<sup>2</sup>とetoposide 150mg/m<sup>2</sup>を静脈内投与し、これを2日間行うレジメンを4週間毎に1年間行った。CR + PRの奏効率は48/56 (86%)<sup>13)</sup>、5年生存率は42%<sup>14)</sup>とのことである。しかし、きちんとしたデータ管理が行われたphase studyは行われていない。

#### 2. hematopoietic stem-cell rescueを併用した high-dose chemotherapy

High-dose MTXが導入され中枢神経系悪性リンパ腫の治療成績は進歩したが、しかしおよそ生存期間中央値は3年のレベルで頭打ちでもある。そこで、生存期間のさらなる延長を目的として、また前述のように放射線照射を回避するためにも、hematopoietic stem-cell rescueを用いた high-dose chemotherapyの可能性が模索されている。

フランスのグループは、high-dose MTXとcytarabineによって治療したにもかかわらず再発した症例あるいは治療が無効であった症例22例を対象として、peripheral-blood stem cellによるrescueと併用したintensified chemotherapyを行った成績を発表した。患者はまずcytarabine (初日は50mg/m<sup>2</sup>を12時間かけて投与、2日目から5日目は2g/m<sup>2</sup>の3時間かけての投与と50mg/m<sup>2</sup>を12時間かけての投与の両方)と、etoposide (200mg/m<sup>2</sup>を4日間)による治療 (CYVE regimen)を行い、その後peripheral-blood stem cellを採取、さらにもう1回同じ化学療法を行って反応があった場合にintensified chemotherapyを施行した。そのレジメンは、thiotepa (day-9から-7まで250mg/m<sup>2</sup>を3日間)、busulfan (day-6から

表1 中枢神経系悪性リンパ腫に放射線照射をするべきかどうかの論争

Reni M and Ferreri AJMの主張 <sup>12)</sup>	Hoang-Xuan K and Delattre JYの反論 <sup>12)</sup>	筆者のコメント
High-dose MTX (HDMTX) に照射を加えた治療の成績はCR率82～89%、無増悪生存期間 (PFS) 中央値32～40カ月、生存期間 (OS) 中央値33カ月と報告されているのに対して、HDMTX単独による治療ではCR率30～65%、PFS 13～17カ月であるから、治療効果という観点では放射線の必要性は明らかである。		化学療法のみの場合PFSは短いかもしれないが、再発後照射を行うことによってOSは概して遜色なく、Reni Mらによって引用されている文献でもPFS中央値は13カ月であるがOS中央値は23+カ月で、遜色ない <sup>6)</sup> 。
60歳以上についてみても、放射線照射を加えた場合の奏効率90%、OS中央値22～32カ月は、化学療法単独の場合の奏効率48%、OS中央値14カ月より優れている。	高齢者で化学療法単独の場合のOS中央値の報告は14～34カ月で、照射を併用した場合の18～32カ月と違いはない。	引用論文の食い違いがある。
最近のphase III studyによればHDMTXを含む多剤併用療法に照射を加えて治療された症例の神経毒性発生率は23%で、同じ化学療法のみで照射を加えなかった場合の発生率21%と同じであった。また治療後2年間に神経毒性が発生する率は、多剤併用化学療法の報告でも8～14%で、これはHDMTX単独治療に照射を加えた場合の6～10%と同等である (したがって化学療法特にMTX以外の薬剤も神経毒性に関与しているはずである)。	化学療法単独の場合の遅発性神経毒性の発生率は0～8%である。	
化学療法単独治療における神経毒性の発生率の報告はCRであった症例に限って述べられていることが多い。放射線照射を併用した場合でも全体の神経毒性発生率は15%であるが、CR症例に限れば3.7%である <sup>5)</sup> 。		確かに、残存腫瘍による神経症状の悪化を区別しなければならぬという点は、データの解釈に注意を要する。
照射による神経毒性が高齢者に起こりやすいというが、元来高齢者には認知機能障害が存在する可能性が高いから、その評価は十分に慎重であるべきである。事実、神経毒性の発生率は年齢とは関係しないという報告もある。	60歳以上の症例に化学療法+照射を行った場合の痴呆の発生率の高いことは明らかで、発生率は19～62%、あるいはそれ以上に及ぶ <sup>5,11)</sup> 。	
結論 照射を施行しないという選択は、たとえ高齢者においても、あくまで、無作為化比較試験の結果を待つべきである。	高齢者において無作為化比較試験を行うことは、わかり切った神経毒性の発生を招来することになり、倫理的に許されない。	

-4まで total 10mg/kg), cyclophosphamide (day-3と-2の2日間60mg/kgずつ) という3剤によるものであった。治療の結果22人中12人がCRを維持して3年生存率は63.7%であった<sup>15)</sup>。経過中7人が神経毒性を発症し2人がそのために死亡しているが、再発あるいは治療抵抗性の中枢神経系悪性リンパ腫の治療成績としてはきわめて優れたものと考えられる。

初発症例に対してはMemorial Sloan-Kettering Cancer Centerからの報告がある<sup>16)</sup>。まずMTX 3.5g/m<sup>2</sup>を2週間毎に4回投与して効果を評価しCRまたはPRの症例のみをピックアップした。続いて5回目を投与した後、cytarabine 3g/m<sup>2</sup>を2日間投与してからperipheral-blood stem cellを採取、1カ月後に2クール目のcytarabineを同様に投与した後、intensified chemotherapyを開始した。Carmustine (BCNU) 300mg/m<sup>2</sup>をday-7に、etoposide 100mg/m<sup>2</sup>とcytarabine 200mg/m<sup>2</sup>を12時間ごとにday-6から-3までそれぞれ8回、melphalan 140mg/m<sup>2</sup>をday-2に投与した(BEAM regimen)。28症例が登録され、16例がはじめの4回のMTXによってPR以上となり14例がBEAM regimenに進んだ。中央値28カ月の追跡の時点では全体の生存率は55%、無増悪生存期間中央値は5.6カ月、BEAM regimenを行った症例の生存率は60%、無増悪生存期間中央値は9.3カ月であった。治療死を1例認めているが有意の高次機能障害は出現していない。放射線照射を行わずに強力な化学療法で治療していこうという考え方が基本的なコンセプトであるが、まだまだ試みは始まったばかりである。

### 3. 予後スコア

中枢神経系悪性リンパ腫の予後を予測するスコアの提案がなされている<sup>17)</sup>。ヨーロッパのThe International Extranodal Lymphoma Study Groupは378例の中枢神経系悪性リンパ腫を渉猟

し、まず予後因子を抽出した。単変量解析による検定の後、多変量解析で独立な予後因子であることが確認されたのは、年齢、The Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) によるperformance status (PS)、血清LDH値、髄液蛋白濃度、および腫瘍占拠部位の5つであった。これらから表2のようなスコアを算出し、105例の

表2 The International Extranodal Lymphoma Study Groupによる中枢神経系悪性リンパ腫の予後スコア (文献17)

項目	基準	スコア
年齢	60歳以下	0
	61歳以上	1
ECOG * PS	0, 1	0
	2, 3, 4	1
血清LDH	正常	0
	上昇	1
髄液蛋白濃度	正常 60歳以下の場合45mg/dl以下	0
	61歳以上の場合60mg/dl以下	
	上昇	1
腫瘍占拠部位	脳深部に及ばない	0
	脳深部に及ぶ 脳室周囲, 基底核, 脳梁, 脳幹, 小脳	1

\*Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status

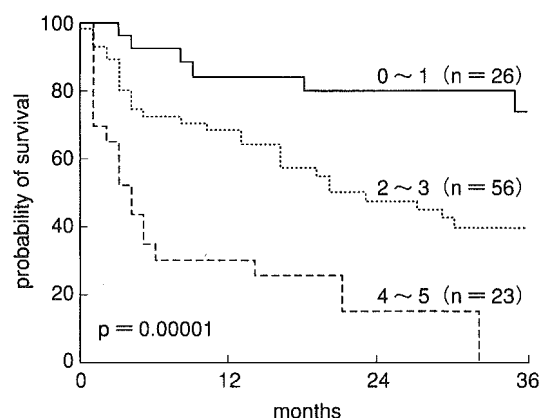


図2 The International Extranodal Lymphoma Study Groupのprognostic scoreによって層別された中枢神経系悪性リンパ腫の生存曲線 Score 0~1, score 2~3, score 4~5の症例の2年生存率はそれぞれ80%, 48%, 15%で、このscoreは有意に生存率を予測する (p = 0.00001) (文献17)。

症例で検討した結果、有意な予後予測が可能であることが示された (図2)。腰椎穿刺による髄液採取は侵襲的であり、また全例に可能なわけではないという問題点がある。

## 文献

- 1) National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Clinical Practice Guidelines in Oncology. Ver. 1. 2003. [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/f\\_guidelines.asp#site](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#site)
- 2) Fine HA. Primary central nervous system lymphoma: Time to ask the question. *J Clin Oncol* 2002; 24: 4615-7.
- 3) Primary CNS Lymphoma (PDQ®). <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/primary-CNS-lymphoma/HealthProfessional/page1>
- 4) Abrey LE, Yohalom J, DeAngelis LM. Treatment for primary CNS lymphoma: The next step. *J Clin Oncol* 2000; 18: 3144-50.
- 5) DeAngelis LM, Seiferheld W, Schold SC, et al. Combination chemotherapy and radiotherapy for primary central nervous system lymphoma: Radiation Therapy Oncology Group Study 93-10. *J Clin Oncol* 2002; 20: 4643-8.
- 6) Batchelor T, Carson K, O'Neill A, et al. Treatment of primary CNS lymphoma with methotrexate and deferred radiotherapy: a report of NABTT 96-07. *J Clin Oncol* 2003; 21: 1044-9.
- 7) Pels H, Schmidt-Wolf IG, Glasmacher A, et al. Primary central nervous system lymphoma: results of a pilot and phase II study of systemic and intraventricular chemotherapy with deferred radiotherapy. *J Clin Oncol* 2003; 21: 4489-95.
- 8) Fliessbach K, Urbach H, Helmstaedter C, et al. Cognitive performance and magnetic resonance imaging findings after high-dose systemic and intraventricular chemotherapy for primary central nervous system lymphoma. *Arch Neurol* 2003; 60: 563-8.
- 9) Hoang-Xuan K, Taillandier L, Chinot O, et al. Chemotherapy alone as initial treatment for primary CNS lymphoma in patients older than 60 years: a multicenter phase II study (26952) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group. *J Clin Oncol* 2003; 21: 2726-31.
- 10) Herrlinger U, Schaber M, Brugger W, et al. German Cancer Society Neuro-Oncology Working Group NOA-03 multicenter trial of single-agent high-dose methotrexate for primary central nervous system lymphoma. *Ann Neurol* 2000; 51: 247-52.
- 11) Bessell EM, López-Guillermo A, Villa S, et al. Importance of radiotherapy in the outcome of patients with primary CNS lymphoma: an analysis of the CHOD/BVAM regimen followed by two different radiotherapy treatments. *J Clin Oncol* 2001; 20: 231-6.
- 12) Reni M, Ferreri AJM. Is withdrawal of consolidation radiotherapy an evidence-based strategy in primary central nervous system lymphomas? *J Clin Oncol* 2004; 22: 1165-7.
- 13) Doolittle ND, Miner ME, Hall WA, et al. Safety and efficacy of a multicenter study using intraarterial chemotherapy in conjunction with osmotic opening of the blood-brain barrier for the treatment of patients with malignant brain tumors. *Cancer* 2000; 88: 637-47.
- 14) Tyson RM, Siegal T, Doolittle ND, et al. Current status and future of relapsed primary central nervous system lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2003; 44: 627-33.
- 15) Soussain C, Suzan F, Hoang-Xuan K, et al. Results of intensive chemotherapy followed by hematopoietic stem-cell rescue in 22 patients with refractory or recurrent primary CNS lymphoma or intraocular lymphoma. *J Clin Oncol* 2001; 19: 742-9.
- 16) Abrey LE, Moskowitz CH, Mason WP, et al. Intensive methotrexate and cytarabine followed by high-dose chemotherapy with autologous stem-cell rescue in patients with newly diagnosed primary CNS lymphoma: an intent-to-treat analysis. *J Clin Oncol* 2003; 21: 4151-6.
- 17) Ferreri AJM, Blay J-Y, Reni M, et al. Prognostic scoring system for primary CNS lymphomas: The International Extranodal Lymphoma Study Group experience. *J Clin Oncol* 2003; 21: 266-72.

Masato Ohki · Kaori Sakurada · Yukihiro Sonoda ·  
Shinya Sato · Shinjiro Saito · Takamasa Kayama

## Analysis of the extent of astrocytic tumour resection evaluated by magnetic resonance images

Received: 14 January 2003 / Accepted: 3 April 2003 / Published online: 19 June 2003  
© Springer-Verlag 2003

**Abstract** One of the most important prognostic factors in brain tumours is the extent of tumour resection. Its evaluation has been difficult on computed tomography (CT); however, magnetic resonance imaging (MRI) can clearly determine the extent of tumour resection. Using MRI, we analyzed 77 patients with astrocytic tumours that were surgically treated at our department from 1994 to 2001. The tumours were classified into the following types: (a) well-circumscribed: single lesions that can be distinguished from normal brain; (b) localised: single lesions that are localised in one gyrus; and (c) diffuse: other tumours. Our treatment of glioma resection is to use sulcus opening and gyrectomy, a technique based on identification and dissection of the sulcus adjacent to the tumour followed by en bloc tumour resection. Almost total tumour resection ( $\geq 95\%$  resection) was achieved in 76.8% in the well-circumscribed type, 100% in the localised type, and only 10.5% in the diffuse type. Nearly total resection was achieved in 61%, which is considerably more than in the literature of the CT era (10.4–23.5%). The sulcus opening and gyrectomy technique based on MRI achieved radical glioma removal in cases which could be identified by MRI, resulting in a better tumour removal rate than that based on CT.

**Keywords** Extent of tumour resection · Glioma · Gyrectomy · Magnetic resonance imaging

### Introduction

The extent of tumour removal at surgery is one of the most important prognostic factors in the treatment of

brain tumours. Planning for the maximum extent of removal can be based on magnetic resonance imaging (MRI), which provides more detailed anatomical information than computed tomography (CT), is very useful for selecting the optimum operative approach, and allows accurate estimation of the possible extent of tumour removal. This extent can also be assessed more correctly using pre- and postoperative MRI. However, safe and reliable methods of radical tumour removal should also prevent postoperative aggravation of neurological symptoms. Here we describe our experience with surgical removal of the brain tumour bulk using our sulcus opening and gyrectomy technique [2, 4] based on preoperative MRI findings.

### Materials and methods

#### Subjects

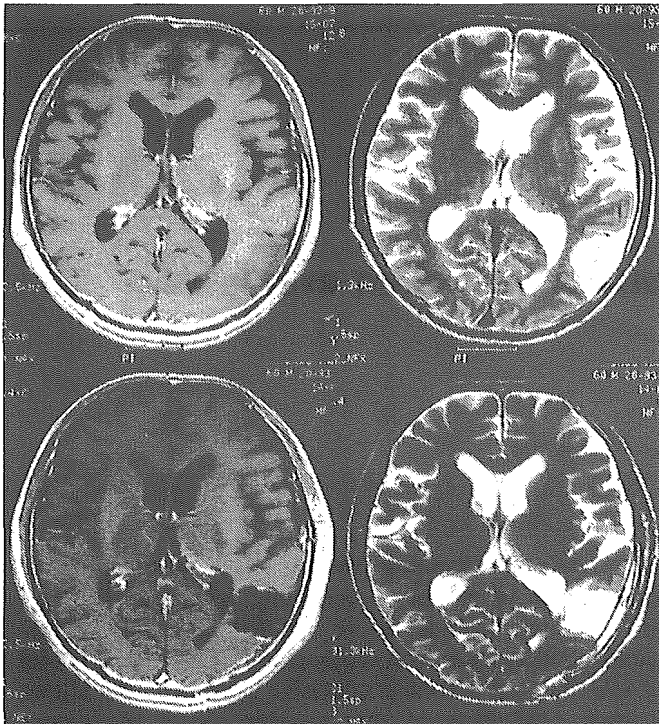
Seventy-seven patients, 51 females and 26 males aged 1 to 80 years (mean 49.9) with astrocytic tumours, underwent surgery including biopsy in the neurosurgical department of Yamagata University School of Medicine from May 1994 to April 2001. Histological diagnosis was pilocytic astrocytoma in three cases, fibrillary astrocytoma in 22, protoplasmic astrocytoma in one, gemistocytic astrocytoma in two, pleomorphic xanthoastrocytoma in one, anaplastic astrocytoma in 18, glioblastoma multiforme in 28, and "other" in two.

#### Classification of brain tumours by magnetic resonance imaging

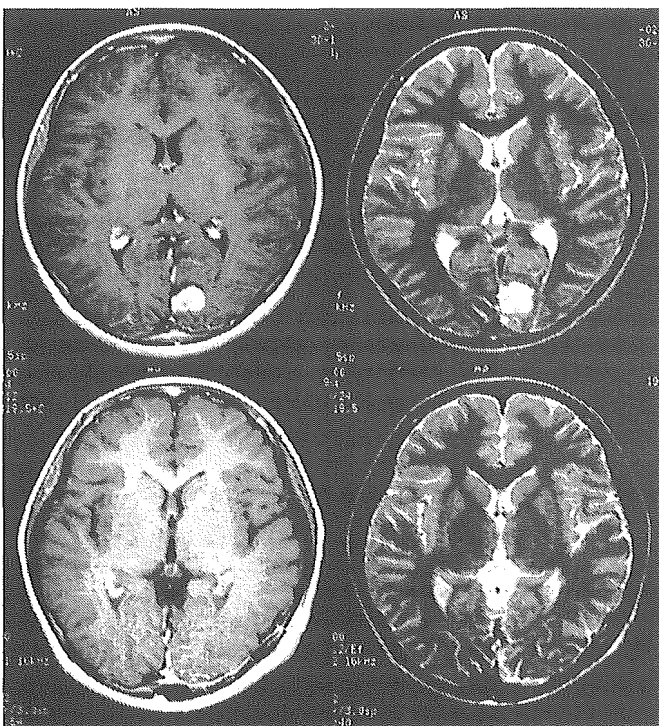
The brain tumour bulk was considered to be the area on T1-weighted MR images enhanced with gadolinium (Gd) or the area of abnormal intensity, if no enhancement was present. The tumours were classified into three types according to the appearance on MRI of the bulk portion as follows.

- Well-circumscribed: the lesion boundaries were clear, even in cases showing abnormal intensity without Gd enhancement. The lesion did not extend outside the sulcus, and the boundary with the subcortex was also identifiable. The position and depth of the sulcus provided good indicators of tumour extent, and total tumour removal was achieved easily (Fig. 1).

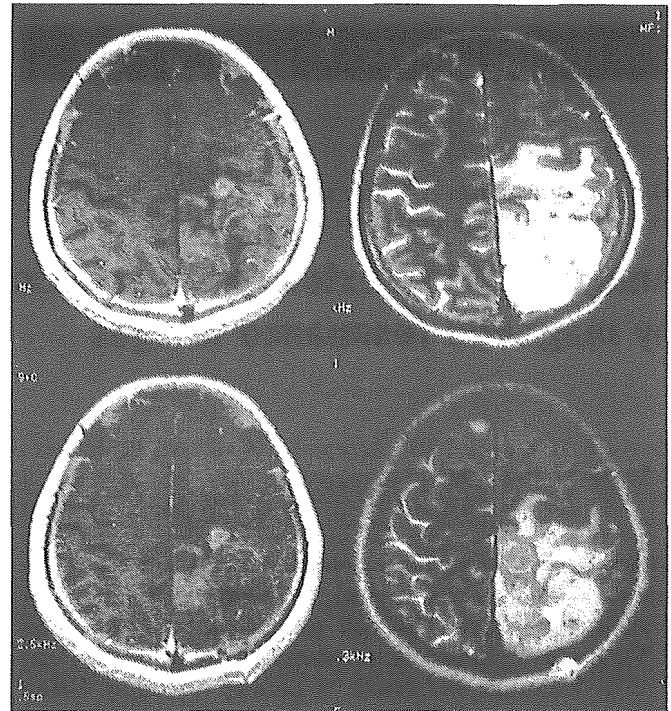
M. Ohki · K. Sakurada · Y. Sonoda · S. Sato · S. Saito ·  
T. Kayama (✉)  
Department of Neurosurgery,  
Yamagata University School of Medicine,  
2-2-2 Iida-Nishi, Yamagata 990-9585, Japan  
e-mail: nouge@med.id.yamagata-u.ac.jp  
Tel.: +81-23-6285349  
Fax: +81-23-6285351



**Fig. 1** The well-circumscribed type of astrocytic tumour. Preoperative (*upper*) and postoperative (*lower*) Gd-enhanced T1- and T2-weighted axial MRI scans. The margin of the tumour bulk can be distinguished from surrounding normal brain. Extent of tumour removal is over 95%



**Fig. 2** The localised type of tumour. Preoperative (*upper*) and postoperative (*lower*) Gd-enhanced T1- and T2-weighted axial MRI scans. Tumour bulk is located in only one gyrus. Extent of tumour removal is over 95%



**Fig. 3** The diffuse type of tumour. Preoperative (*upper*) and postoperative (*lower*) Gd-enhanced T1- and T2-weighted axial MRI scans. The margin of the tumour bulk is not clear, therefore only a biopsy was performed

- b. Localised: the tumour was demarcated by the sulcus and localised in one gyrus. The boundary with the subcortex was also identifiable. Total tumour removal could be achieved by sulcotomy and en bloc removal of the gyrus including the lesion (Fig. 2).
- c. Diffuse: the boundary of the enhanced tumour was unclear, or the area of abnormal intensity was extensive. Total tumour removal was rarely achieved (Fig. 3).

#### Assessment of brain tumour bulk removal

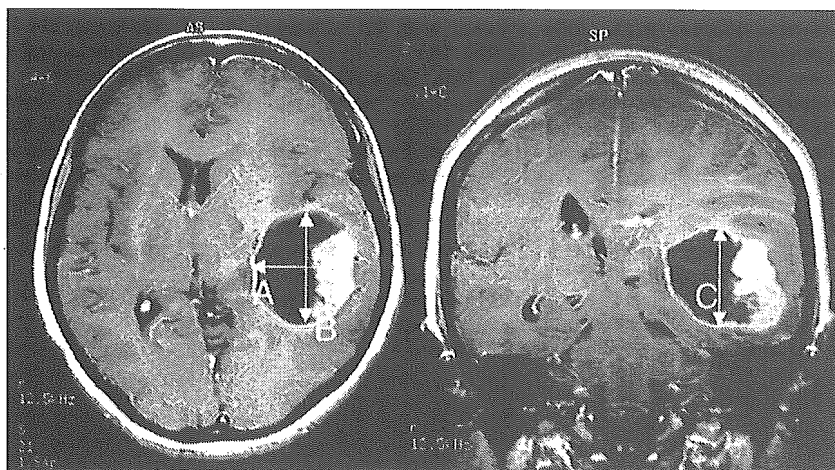
The maximum dimensions of the brain tumour bulk were measured in anteroposterior, lateral, and superoinferior directions on pre- and postoperative MR images, and the percentage of removal was calculated from them (Fig. 4). The extent of removal was divided into four categories: total, indicating  $\geq 95\%$  removal (including 100%); subtotal, indicating 65–94% removal; partial, indicating  $\leq 64\%$  removal; and biopsy [1]. Differentiation between 95% and 100% removal was impossible due to the presence of surrounding oedema or haematoma caused by the tumour or surgery.

## Results

### Classification of brain tumours

The well-circumscribed type was the most common, occurring in 56 patients (72.7%), followed by the diffuse type in 19 (24.7%) and the localised type in two (2.6%).

**Fig. 4** Evaluation method of the extent of tumour resection in MRI scans. Tumour volume is calculated using horizontal (A), anteroposterior (B), and vertical (C) maximum tumour diameters.  $(ABC/2)$ .  $(1 - \text{postoperative tumor volume/preoperative tumor volume}) \times 100\%$  is the formula for calculating the extent of tumour resection



**Table 1** Tumour type and extent of tumour removal

	Well circumscribed	Diffuse	Localised	All
Total removal	43	2	2	47 (61%)
Subtotal removal	3	2	0	5 (6.5%)
Partial removal	2	2	0	4 (5.2%)
Biopsy	8	13	0	21 (27.3%)
Total	56 (72.7%)	19 (24.7%)	2 (2.6%)	77

**Table 2** Summary of reported series. *BTRJ* Brain Tumour Registry of Japan

Author	Year	Total cases	Total removal cases	Ratio of total removal
Laws	1984	461	57	12.4
Soffietti	1989	81	19	23.5
Shaw	1988	126	23	18.3
North	1990	77	10.4	—
McCormack	1992	53	10	18.9
Philippon	1993	118	16	13.6
Suzuki	1988	503	106	21.1
BTRJ	1978–1987	3,092	441	14.3
Present study	1994–2001	77	47	61.0

### Removal of the brain tumour bulk

Total removal was achieved in all of the localised and 43/56 of the well-circumscribed types, but in only two of 19 cases of the diffuse type. Partial and subtotal removal was performed in nine patients. Biopsy was performed in 21 patients, of which 13 were of the diffuse type. Eight of 56 cases of the well-circumscribed type underwent biopsy, since the brain tumour bulk was located in eloquent areas or the deep brain (Table 1).

### Discussion

The study found that the well-circumscribed type, with an identifiable boundary between the brain tumour bulk and surrounding normal tissue on MRI, was easily removed at the high percentage of  $\geq 95\%$  in 43 of 56 cases. The overall rate of  $\geq 95\%$  removal in the present series assessed by MRI was 47 of 77 cases (61%), suggesting an improvement in total removal over series evaluated by

CT, with rates of around 20% and a maximum of 23.5% [3, 5, 6, 7, 8, 9] (Table 2).

### Conclusions

Our sulcus opening and gyrectomy technique can remove the gyrus and lesion safely and reliably only when the brain tumour bulk and adjacent sulcus can be identified by preoperative MRI [2, 4]. This method represents an improvement in the rate of brain tumour removal, achieving radical glioma removal and a higher tumour removal rate than that based on CT.

### References

1. Kayama T, Kumabe T, Tominaga T, Yoshimoto T (1996) Prognostic value of complete response after the initial treatment for malignant astrocytoma. *Neurol Res* 18:321–324
2. Kokubo Y, Takamasa K, Saito S, Kuroki A, Saino M, Nakajima M (1997) A case of tuberous sclerosis presenting intractable

- adversive seizure, successfully resected with the technique of "gyrectomy". *No Shinkei Geka* 25:959-964
3. Laws ER Jr, Taylor WF, Clifton MB, Okazaki H (1984) Neurosurgical management of low-grade astrocytoma of the cerebral hemisphere. *J Neurosurg* 61:665-673
  4. Maruya J, Takamasa K, Kuchiki H, Ando T (1997) Localized glioma in the occipital lobe manifesting as scintillating scotoma: case report. *No Shinkei Geka* 25:265-269
  5. McCormack BM, Miller DC, Budzilovich GN, Voorhees GJ, Ransohoff J (1992) Treatment and survival of low-grade astrocytoma in adults—1977-1988. *Neurosurgery* 31:636-642
  6. North CA, North RB, Epstein JA, Piantadosi S, Wharam MD (1990) Low-grade cerebral astrocytomas. Survival and quality of life after radiation therapy. *Cancer* 66:6-14
  7. Philippon JH, Clemenceau SH, Fauchon FH, Foncin JF (1993) Supratentorial low-grade astrocytomas in adults. *Neurosurgery* 32:554-559
  8. Shaw EG, Daumas-Duport C, Scheithauer BW, Gilbertson DT, O'Fallon JR, Earle JD, Laws ER Jr, Okazaki H (1989) Radiation therapy in the management of low-grade supratentorial astrocytomas. *J Neurosurg* 70:853-861
  9. Soffietti R, Chio A, Giordana MT, Vasario E, Schiffer D (1989) Prognostic factors in well-differentiated cerebral astrocytomas in the adult. *Neurosurgery* 24:686-692

# Inhibition of angiogenesis in human glioma cell lines by antisense RNA from the soluble guanylate cyclase genes, *GUCY1A3* and *GUCY1B3*

MAKOTO SAINO<sup>1,2</sup>, TOMOKO MARUYAMA<sup>1</sup>, TAKAO SEKIYA<sup>1</sup>,  
TAKAMASA KAYAMA<sup>2</sup> and YOSHINORI MURAKAMI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Tumor Suppression and the Functional Genomics Project, National Cancer Center Research Institute, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045; <sup>2</sup>Department of Neurosurgery, Yamagata University School of Medicine, 2-2-2 Iida-nishi, Yamagata 990-9585, Japan

Received December 11, 2003; Accepted February 9, 2004

**Abstract.** Malignant gliomas, most of which show an elevated level of vascular endothelial cell growth factor (VEGF) expression, are well known for their hyper-vascularity. One of the possible inducers of VEGF in tumor cells is nitric oxide (NO), which is synthesized by NO synthase and stimulates soluble guanylate cyclase (GC) in tumor cells. Here, we report that 2 of 9 human glioma cell lines, CCF-STTG1 and U-87MG, overproduced cyclic GMP (cGMP) and showed increased expression of both or either subunits of soluble GC1, *GUCY1A3* and *GUCY1B3*. Transfection of antisense *GUCY1A3* or *GUCY1B3* into these two glioma cell lines markedly reduced the content of cGMP and expression of VEGF. The angiogenic activity *in vitro* was subsequently inhibited, which was determined by induction of HUVEC cell growth. Furthermore, subcutaneous tumor formation by U-87MG cells in nude mice was dramatically suppressed to less than 0.05% in volume by transfection of either antisense *GUCY1A3* or antisense *GUCY1B3*, which was accompanied

by the significant decrease in vascular index to about 10%. These findings demonstrate that cGMP is an upstream mediator of VEGF expression in glioma cells and that soluble guanylate cyclases could be the target molecules for controlling neo-vascularization in a subset of human malignant gliomas.

## Introduction

Malignant gliomas, the most common type of adult human brain tumors, are well known for their hypervascular features (1). Since the growth of solid tumors, including malignant gliomas, requires neo-vascularization, one of the most promising approaches to the control of malignant gliomas is the blockade of oxygen or nutrition to tumor cells by inhibiting neo-vascularization (2,3). The vascular endothelial cell growth factor (VEGF), an endothelial cell-specific mitogen, is one of the main factors involved in neo-vascularization in tumor tissues (4). In fact, the expression of VEGF is highly up-regulated in malignant gliomas (5,6). A hypoxic state or several cytokines, including basic fibroblast growth factor (bFGF), platelet-derived growth factor (PDGF), and hepatocyte growth factor (HGF), are widely accepted inducers of VEGF expression in tumor cells (7-11). In addition, some studies suggest that nitric oxide (NO) induces VEGF expression in tumor cells (12,13). Since several studies have demonstrated that VEGF up-regulates NO synthase expression in endothelial cells through their VEGF receptors (14-17), the paracrine cascades of VEGF and NO between a tumor and the surrounding endothelial cells would be activated autonomously in terms of tumor angiogenesis.

We are interested in the possible involvement of the cascade downstream of NO in autonomously activated angiogenesis in malignant glioma cells. Chin *et al* have reported that the induction of VEGF by NO is abrogated by guanylate cyclase (GC) inhibitors in hepatocellular carcinoma and glioma cells (12). Gallo *et al* also demonstrated positive correlation between NO synthase activity, cyclic GMP (cGMP) level, and tumor angiogenesis (18). NO is known to activate soluble GCs (19). Three types of soluble GCs have been reported so far, all of which are hetero-dimeric enzymes

---

*Correspondence to:* Dr Yoshinori Murakami, Tumor Suppression and the Functional Genomics Project, National Cancer Center Research Institute, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan  
E-mail: ymurakam@gan2.ncc.go.jp

**Abbreviations:** VEGF, vascular endothelial cell growth factor; bFGF, basic fibroblast growth factor; PDGF, platelet derived growth factor; HGF, hepatocyte growth factor; NO, nitric oxide; GC, guanylate cyclase; cGMP, cyclic GMP; *GUCY1A3*, soluble guanylate cyclase 1  $\alpha$  3; *GUCY1B3*, soluble guanylate cyclase 1  $\beta$  3; RT, reverse transcription; PCR, polymerase chain reaction; bp, base pairs; SDS, sodium dodecyl sulphate; EIA, enzyme immuno-assay; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FBS, fetal bovine serum; PBS, phosphate-buffered saline; HUVEC, human umbilical vascular endothelial cells

**Key words:** angiogenesis, glioma, vascular endothelial cell growth factor, soluble guanylate cyclases

consisting of an  $\alpha$  and a  $\beta$  subunit that catalyze the conversion of GTP to cGMP (20). Among them, the type 3 GC is expressed in the human brain, and both subunits [soluble guanylate cyclase 1 $\alpha$  3 (GUCY1A3) and soluble guanylate cyclase 1 $\beta$  3 (GUCY1B3)] have been previously cloned (21). In the present study, we investigated the possible involvement of the soluble GCs/cGMP cascade in VEGF-mediated angiogenesis in glioma cells using the antisense RNA of a pair of subunits of soluble GCs, GUCY1A3 or GUCY1B3.

## Materials and methods

**Cell lines.** Eight human glioma cell lines (Hs683, SW1088, SW1783, DBTRG-05MG, CCF-STTG1, U-87MG, U-118MG, and U-373MG) were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). One human glioma cell line (T98G) was obtained from the Human Science Research Resources Bank (Osaka, Japan). Cells were cultured according to the supplier's recommendation.

**Northern blot analysis.** Poly(A) RNAs were extracted from cells using a Fast Track mRNA isolation kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). RNA (2  $\mu$ g) was subjected to electrophoresis in 1% agarose gels containing 2.1 M formamide and transferred onto nylon membranes, Hybond-N+ (Amersham Pharmacia, Cleveland, OH). The probe for VEGF was the reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR) product of 563 base pairs (bp) amplified from human brain poly-A RNA using a pair of primers, 5'-ATG AAC TTT CTG CTG TCT TGG -3' and 5'-CTT GTC ACA TCT GCA AGT AC-3'. A cDNA probe for human  $\beta$ -actin was purchased from Clontech (Palo Alto, CA). These probes were labeled with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP using a Multiprime DNA labeling system (Amersham Pharmacia). Hybridization was carried out at 42°C for 18 h in 5X SSC, 20 mM sodium phosphate, 1x Denhardt's solution, 0.2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 100  $\mu$ g/ml denatured salmon testis DNA, 10% dextran sulfate, and 50% formamide. Membranes were then washed with 2X SSC/0.1% SDS at 42°C for 15 min followed by exposure for 1-4 days at -70°C to BioMax film (Kodak, Rochester, NY) with an intensifying screen.

**Enzyme immunoassay (EIA) for cGMP and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for human VEGF.** The content of cGMP and VEGF in a cultured medium was quantified using EIA for cGMP (Assay design, Ann Arbor, MI) and ELISA for human VEGF (R&D systems, Minneapolis, MN) according to the manufacturer's recommendation. Cells (10<sup>6</sup>) were seeded on 6-well plates and cultured with a medium containing 10% fetal bovine serum (FBS) for the detection of cGMP or 0.2% FBS for the detection of VEGF. Twenty-four hours before the measurement, the medium was aspirated. The cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and then incubated with 2 ml of a fresh medium containing 10% FBS for EIA for cGMP or 0.2% FBS for ELISA for VEGF.

**Transfection of antisense GUCY1A3 and antisense GUCY1B3 expression vectors.** Antisense-oriented DNA fragments were

obtained by RT-PCR from human brain poly(A) RNA (Clontech). The pairs of primers used are as follows: 5'-ATA AGAATGCGGCCGCGCAGCAGGGTAAGAGACACC-3' and 5'-GGGGTACCAACCACCCCAAGGATGTTTTC ATC-3' for a 491-bp fragment complementary to the 5' portion of GUCY1A3 cDNA; 5'-ATAAGAATGCGGCCGC GCTGGGGGATTACACAAAGA-3' and 5'-GGGGTACCC AATGAGTCAAACCCCAAGAC-3' for a 515-bp fragment complementary to the 3' portion of GUCY1A3 cDNA; 5'-ATA AGAATGCGGCCGCGCAGACACCATGTACGGATT-3' and 5'-GGGGTACCTGGATTTGTTGTGCCACTGTT-3' for a 482-bp fragment complementary to the 5' portion of GUCY1B3 cDNA; and 5'-ATAAGAATGCGGCCGC GGTGGAGACTGTTGGTGACA-3' and 5'-GGGGTA CCCTCCTCTTACCCCATATCC-3' for a 473-bp fragment complementary to the 3' portion of GUCY1B3 cDNA. Each fragment was cloned into the NotI/KpnI restriction site of a plasmid pcDNA3.1/Hygro(+) to obtain pASGUCY1A3-5', pASGUCY1A3-3', pASGUCY1B3-5', and pASGUCY1B3-3', respectively. These plasmids were transfected into cells using Lipofectamine (Gibco/BRL, Rockville, MD), and stable clones were obtained by selection against hygromycin (100  $\mu$ g/ml for CCF-STTG1 cells or 150  $\mu$ g/ml for U-87MG cells). CCF-STTG1-derived cells carrying pcDNA3.1/Hygro(+), pASGUCY1A3-3', pASGUCY1B3-5', and pASGUCY1B3-3' are named STTG1cp, STTG1as GUCY1A3-3', STTG1as GUCY1B3-5', and STTG1as GUCY1B3-3', respectively, while U-87MG-derived cells carrying pcDNA3.1/Hygro(+), pASGUCY1B3-5', and pASGUCY1B3-3' are named U-87cp, U-87asGUCY1B3-5', and U-87asGUCY1B3-3', respectively. Three independent clones for each plasmid were analyzed.

**Angiogenic assay *in vitro*.** Glioma cells (2.5x10<sup>4</sup>) of mock or antisense transfectants were seeded onto Millicell (Millipore, Bedford, MA), whereas 5x10<sup>3</sup> of human umbilical vascular endothelial cells (HUVEC) (Kurabo, Tokyo, Japan) were seeded on a 24-well plate. Twenty-four hours later, the cells were washed twice with PBS and co-cultured with HU media (Kurabo) containing 0.2% FBS for 24-72 h. The number of HUVEC was counted at each time point as an indicator of angiogenic activity *in vitro*.

**Tumor angiogenesis assay *in vivo*.** Glioma cells (1x10<sup>5</sup>) of mock or antisense transfectants was inoculated into the flanks of 5- to 6-week old female BALB/c athymic nu/nu mice. Tumor growth was monitored by measuring the xenografts in three dimensions. Tumors were removed at 32 days after injection, fixed in 10% formalin, blocked, cut into sections of 4-6  $\mu$ m in thickness, and stained with hematoxylin and eosin or a monoclonal antibody against CD-31 (Dako; Carpinteria, CA). The vascular index in each sample was counted in x200 fields. All animal experiments were performed in accordance with institutional guidelines.

## Results

**Increased expression of VEGF in human glioma cell lines.** We first examined the expression of VEGF in 9 human malignant glioma cell lines. Northern blot analysis revealed that VEGF

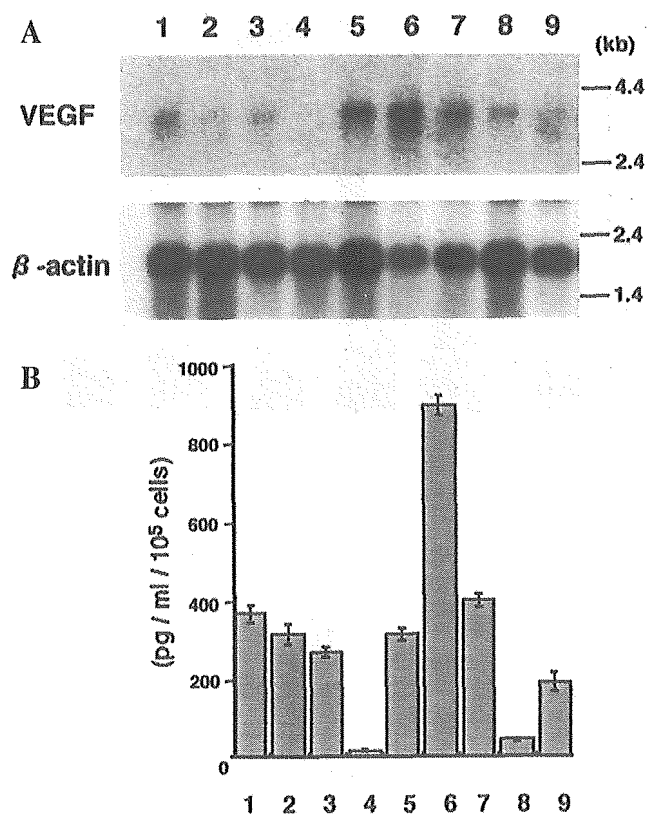


Figure 1. Increased expression of VEGF in human malignant glioma cell lines. A, Northern blot analysis of the VEGF (upper) and  $\beta$ -actin (lower); B, ELISA of VEGF protein in a cultured medium of glioma cells. The content of VEGF was adjusted by the volume of medium and the number of cells. Lane 1, Hs683; 2, SW1088; 3, SW1783; 4, DBTRG-05MG; 5, CCF-STTG1; 6, U-87MG; 7, U-118MG; 8, U-373MG; 9, T98G.

was significantly expressed in all cell lines except DBTRG-05MG cells, in which overexpression of VEGF was detected in 3 cell lines, CCF-STTG1, U-87MG, and U-118MG (Fig. 1A). Secretion of VEGF proteins into the cultured medium was subsequently measured in the same series of glioma cell lines using an ELISA. Significant amounts of VEGF proteins were detected in the cultured medium of 7 cell lines except DBTRG-05MG and U-373MG, in which U-87MG cells showed the highest content of VEGF (Fig. 1B).

**Activation of GCs in a subset of human glioma cell lines.** In order to understand the possible role of GCs/cGMP cascade in VEGF expression, we examined the level of cGMP in the same set of glioma cell lines. An EIA against cGMP revealed that the content of cGMP in the conditioned medium was significantly increased in two glioma cell lines, CCF-STTG1 and U-87MG (Fig. 2A), both of which were shown to express a high level of VEGF. We next examined the expression of two subunits of the soluble GCs, GUCY1A3 and GUCY1B3, in the same series of glioma cell lines. CCF-STTG1 cells showed overexpression of both genes, while U-87MG cells expressed relatively high amount of GUCY1B3 (Fig. 2B). A low amount of GUCY1A3 expression was also detected by long exposure in U-87MG cells (data not shown). These results suggest that the elevated level of cGMP in these cells would be due to the increased expression of GUCY1A3 or GUCY1B3, although possible reduced activity of phospho-

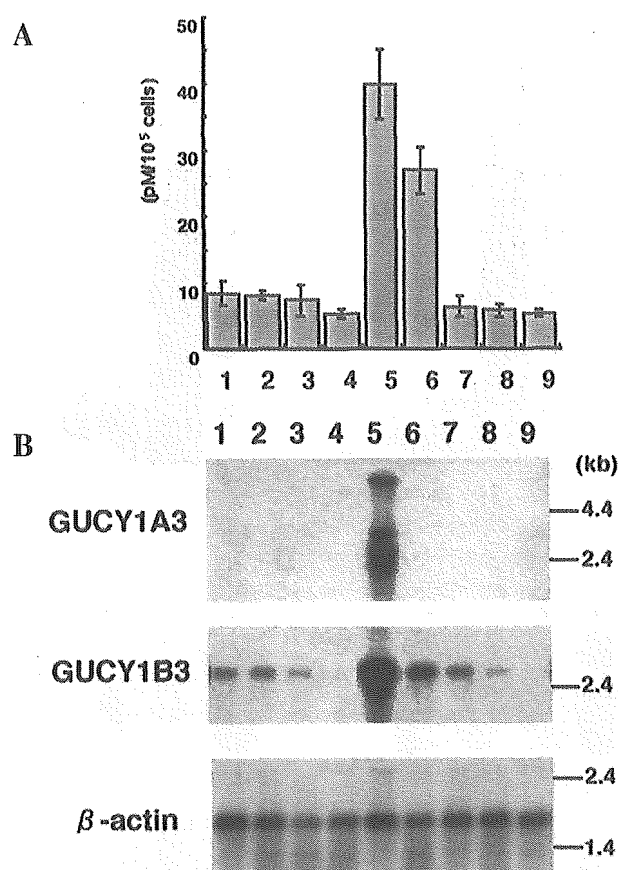


Figure 2. Activation of the guanylate cyclase/cGMP cascade in human malignant glioma cell lines. A, Increased amount of cGMP in the cell lysate from two human malignant glioma cell lines. cGMP was detected by an EIA and adjusted for the number of cells. B, Northern blot analysis of the two subunits of soluble guanylate cyclase, GUCY1A3 (upper) and GUCY1B3 (middle), and  $\beta$ -actin (lower). Lane 1, Hs683; 2, SW1088; 3, SW1783; 4, DBTRG-05MG; 5, CCF-STTG1; 6, U-87MG; 7, U-118MG; 8, U-373MG; 9, T98G.

diesterases might also participate in a high content of the cGMP.

**Inhibition of angiogenic activity in vitro by antisense RNA of soluble GCs, GUCY1A3 or GUCY1B3.** Next, for the assessment of the direct involvement of the GCs/cGMP cascade in the angiogenic activity of glioma cells, we tried to inhibit either GUCY1A3 or GUCY1B3 in CCF-STTG1 cells and GUCY1B3 in U-87MG cells by transfecting antisense RNA. All cell lines expressing antisense RNA showed a marked reduction in the content of cGMP in comparison with those in CCF-STTG1 or U-87MG cells transfected with vectors alone, suggesting that the activity of soluble GCs was inhibited by antisense RNA (Fig. 3A and B). Correspondingly, Northern blot analysis revealed that VEGF expression in the cell lines expressing antisense RNA was prominently suppressed (Fig. 3C and D). Concentration of the VEGF proteins in a cultured medium was also significantly reduced in both CCF-STTG1-derived and U-87MG-derived cell lines expressing antisense RNA (Fig. 3E and F). However, a small portion of VEGF was still present in the cultured medium, suggesting that additional mediators are involved in VEGF expression in these cell lines. Alternatively, a small amount of cGMP not inhibited by the antisense RNA of GUCY1A3 and GUCY1B3 may induce VEGF expression.

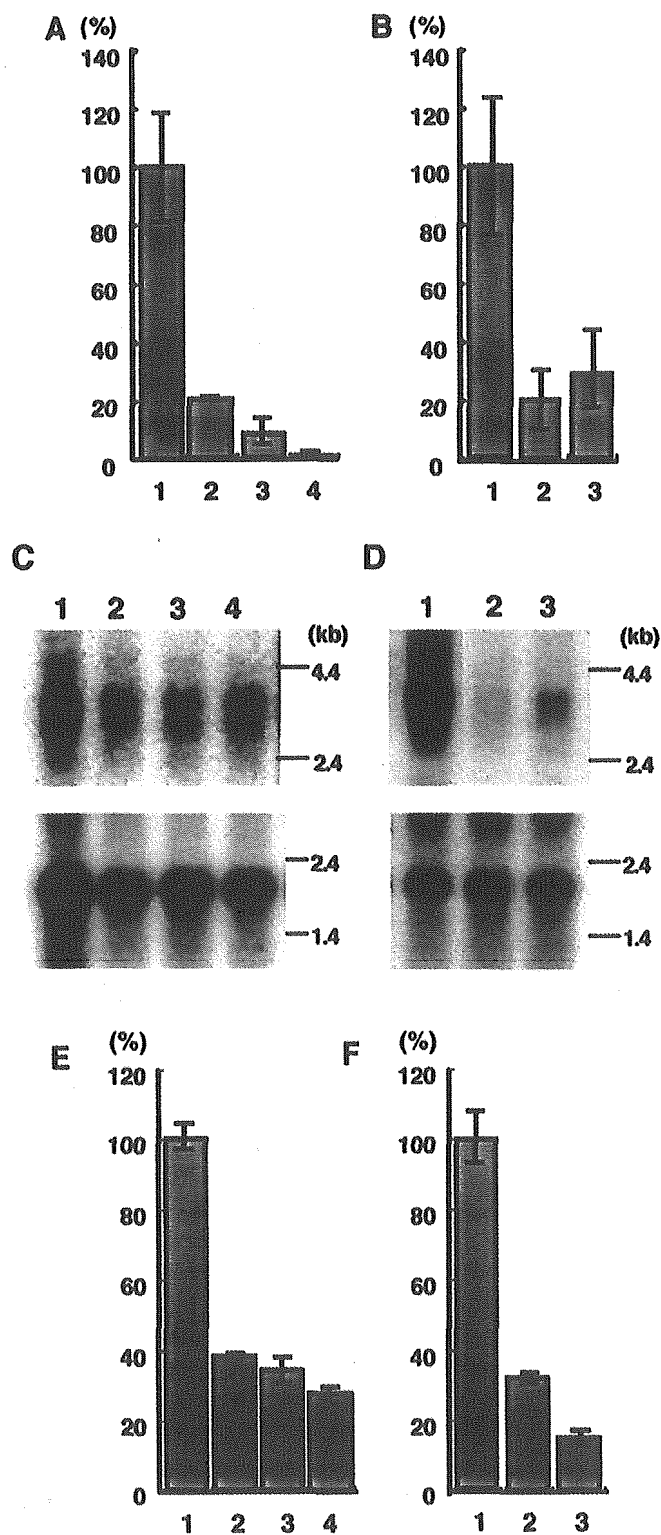


Figure 3. Reduction of cGMP content and VEGF expression by the antisense RNA of GUCY1A3 or GUCY1B3. The results in CCF-STTG1 (A, C, E) and U-87MG (B, D, F) cells are shown. A and B, Reduction of cGMP content by the antisense RNA of GUCY1A3 or GUCY1B3. The content of cGMP was detected by EIA and adjusted by the number of cells; it was then presented as a relative amount in comparison with that of cells transfected with the control plasmid. C and D, Reduced expression of the *VEGF* gene by the antisense RNA of GUCY1A3 or GUCY1B3. E and F, Reduction of VEGF protein in a cultured medium of the cells transfected with the antisense RNA of GUCY1A3 or GUCY1B3. VEGF protein was detected by ELISA and adjusted by the volume of cell medium and the number of cells; it was then presented as a relative amount. A, C and E: Lane 1, STTG1cp; 2, STTG1asGUCY1A3-3'; 3, STTG1asGUCY1B3-5'; 4, STTG1asGUCY1B3-3'. B, D and F: Lane 1, U87cp; 2, U87aspGUCY1B3-5'; 3, U87aspGUCY1B3-3'.

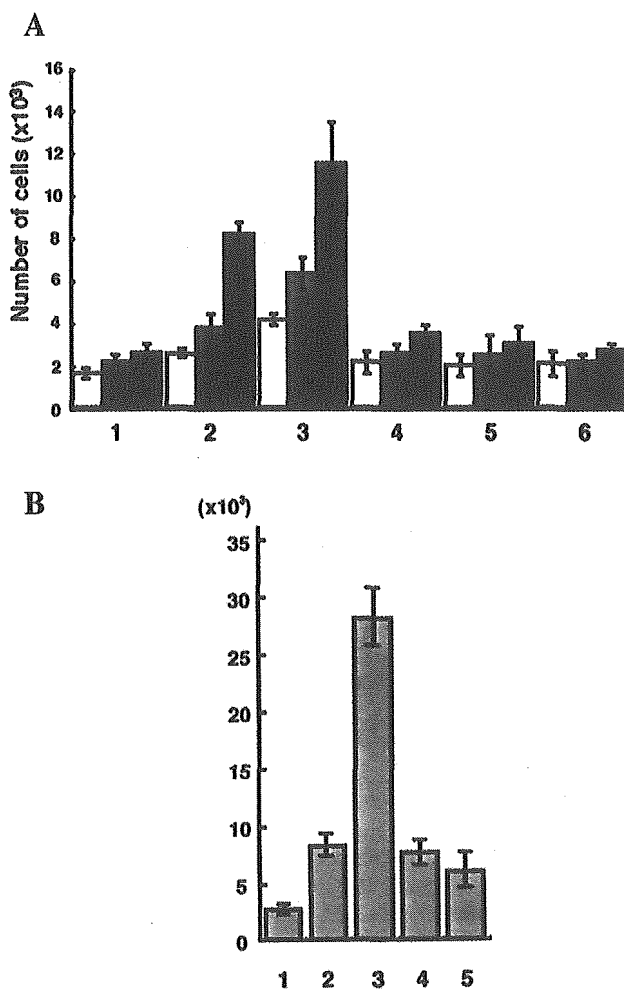


Figure 4. Inhibition of the angiogenic activity *in vitro* by antisense RNA of GUCY1A3 or GUCY1B3. A, Mitogenic activity of HUVEC cells by cultured media derived from the CCF-STTG1 cell line and its derivatives. The number of HUVEC cells was counted at 24, 48, and 72 h after incubation with relevant media and is indicated with open, gray, and closed bars, respectively. Cultured media with 0.2% of FBS (lane 1), with 10 ng/ml of VEGF (lane 2), and derived from STTG1cp (lane 3), STTG1asGUCY1A3-3' (lane 4), STTG1asGUCY1B3-5' (lane 5), and STTG1asGUCY1B3-3' (lane 6) were examined. B, Mitogenic activity of HUVEC cells by cultured media derived from the U-87MG cell line and its derivatives. The number of HUVEC cells at 72 h after incubation with relevant media was counted. Culture media with 0.2% of FBS (lane 1), with 10 ng/ml of VEGF (lane 2), and derived from U87cp (lane 3), U87asGUCY1B3-5' (lane 4), and U87asGUCY1B3-3' (lane 5).

We then examined the angiogenic activity of the secreted VEGF from these cell lines *in vitro* using human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) as indicators. CCF-STTG1 cells with a vector alone, as well as three CCF-STTG1-derived cell lines expressing the antisense RNA of GUCY1A3 or GUCY1B3, were cultured with HUVEC cells so that only the cultured medium and not the cells, interacted with each other. HUVEC cells grew rapidly in the cultured medium from CCF-STTG1 cells with a vector alone, where the growth rate was almost equivalent to that treated with 10 ng/ml of VEGF in the medium. In contrast, the cultured medium from CCF-STTG1-derived cell lines expressing the antisense RNA of GUCY1A3 or GUCY1B3 did not show significant angiogenic activity because the growth rates of HUVEC cells in these