

統計学的にみた悪性神経膠腫の治療成績

Statistical Study of Chemotherapy for Malignant Gliomas

聖マリアンナ医科大学 脳神経外科¹⁾、予防医学²⁾

田中 克之¹⁾、吉田 泰之¹⁾、橋本 卓雄¹⁾、須賀 万智²⁾、吉田 勝美²⁾

【はじめに】

本学における悪性神経膠腫の治療方針は、手術療法にて外科的に可能な限り開頭腫瘍摘出を行い、病理組織学的に悪性神経膠腫の診断がなされた際には、術後に放射線治療を拡大局所に60Gyを照射し、さらに化学療法を行なうものである。1994年まではいわゆるInterferon- β /ACNU(IAR)療法を行なっていたが、その後ACNU/VP16療法を取り入れ、今年まで初期導入療法として行なっていた。2000年より、再発例ならび維持化学療法として高気圧酸素療法(HBO)併用化学療法を行なっている。これらの治療成績の解析においては、十分に予後影響因子を考慮して統計学的検討を加え報告してきた²⁻⁴⁾。

そこで、これまでの本学における悪性神経膠腫の治療成績を示し、統計学的解析法とその解釈における注意点を述べる。

【統計学的手法】

これまでに治療成績の検討に用いた統計学的手法は、以下の通りである。

- ①単変量解析:比較したい群間の予後の検定にKaplan-Meier法による生存分析が用いられる。ただし比較する群間の影響因子の分布の違いを調整できない。今回は、悪性神経膠腫における予後影響因子の初期の探索に用いた。
- ②多変量解析:ロジスティック回帰分析やCoxの比例ハザードモデルが一般的に用いられている。交絡因子の影響を調整できる。すなわち、複数の因子を同時に考慮して、交絡因子の影響を除外したそれぞれの因子の影響を評価できる。今回は、単変量解析で推定された予後影響因子同士の影響を調整した治療効果の評価に用いた。
- ③マッチングMatching:さらに交絡因子の影響をより少なく、直接的に治療群間の比較検討を行なうためペアマッチング(マッチドペア法)による検討を加えた。

【結果】

①母集団の検討:

母集団の偏りを検討するべく、単変量解析によって悪性神経膠腫の組織別にみた累積生存率曲線を示す(Fig.1)。他の報告ともあまり相違ない結果であった。多変量解析から、発症時年齢、入院時KPS、組織診断が予後影響因子として有意な関連を認めたことから、60歳以上と以下において層別に解析すると、60歳以下では組織診断別な差を有意に認めた(Fig.2)。

②ACNU/VP16療法:Coxの比例ハザードモデルを用いた検討

Coxの比例ハザードモデルを用いた多変量解析からACNU/VP16療法の有効性が認められた(Fig.3)。

③HBO併用化学療法:Coxの比例ハザードモデルとマッチドペア法を用いた検討

HBO併用化学療法の有用性を検討した。単変量解析から、年齢、入院時KPS、化学療法の有無で有意差がみられた。HBO併用化学療法群では推定生存期間の延長の傾向を認められたが、比例ハザードモデルでは予後影響因子として有意な関連は示されなかった(Fig.4)。

つぎに、悪性神経膠腫例で治療観察期間も明確な78例のうち、入院時KPSや診断名を一致させた1:2のペアを選択し解析を行なった。その結果、HBO併用群で治療効果が認められた(Fig.5)。

【考察】

脳腫瘍のように予後影響因子の多い疾患において、その治療成績を比較検討する上で注意すべきなのは、真にその治療法による効果であるのか、比較しようとする治療群間ですでに重症度の差が存在しているかということである。つまり、今日まで多く用いられてきたKaplan-Meier法は単変量解析であり、両群の重症度は同一であるという大前提が必要で、その上ではじめて治療法の効果が検定できるのである¹⁾。

では、統計学的にはどのようにしてこの予後影響因子を考慮するかであるが、理想は比較する両群間で、他の予後影響因子を同一条件とし、測定しようとする因子のみに注目して比較することである。こ

Fig.1

Kaplan-Meier cumulative survival plots for the pathological diagnosis in the malignant gliomas.

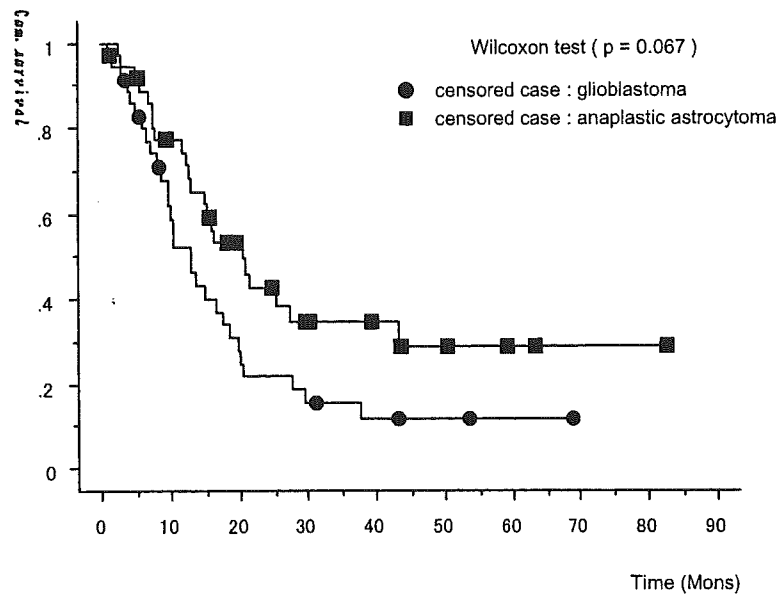


Fig.2

Kaplan-Meier cumulative survival plots for the pathological diagnosis in the malignant gliomas. (文献3より一部改変)

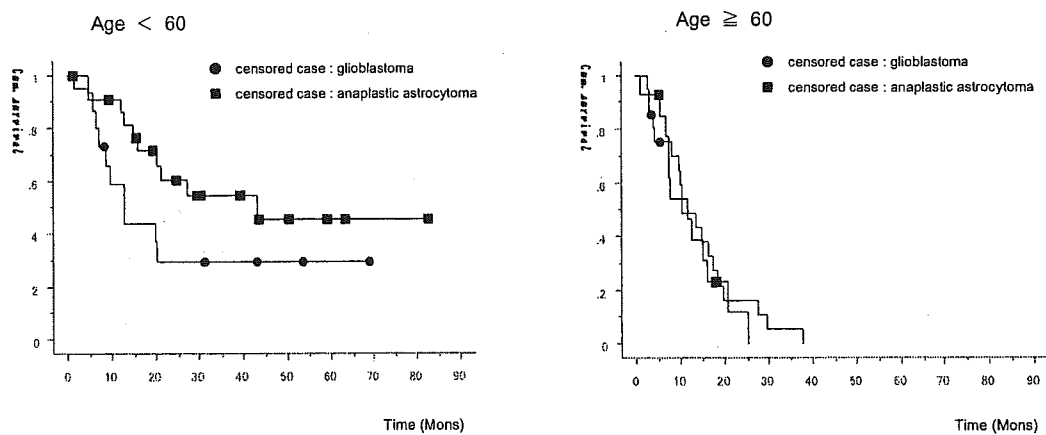


Fig.3

Baseline cumulative survival plots and estimated cumulative survival plots for the chemotherapy in patients with malignant gliomas. (文献2より一部改変)

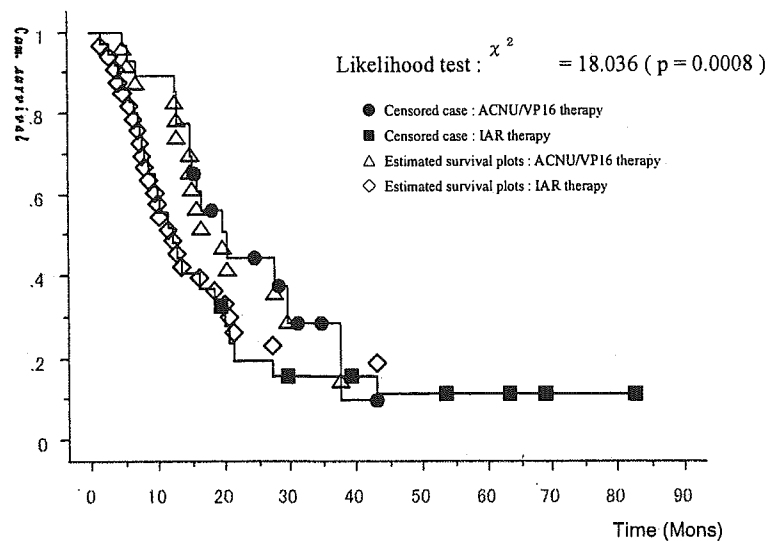
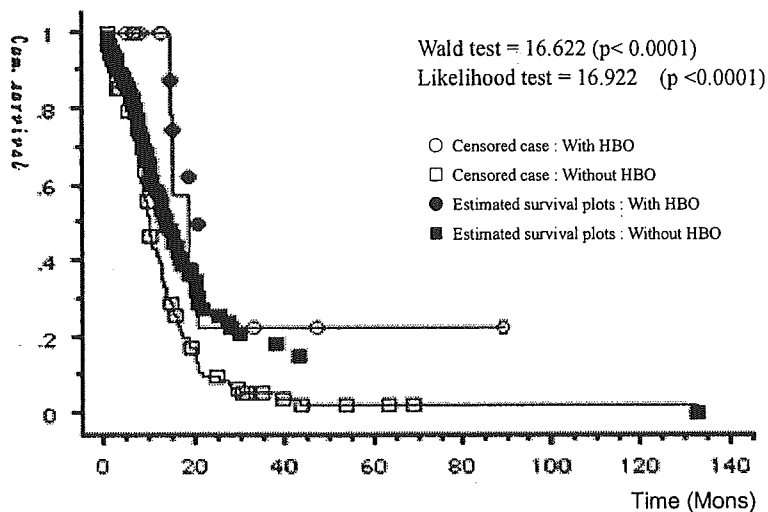
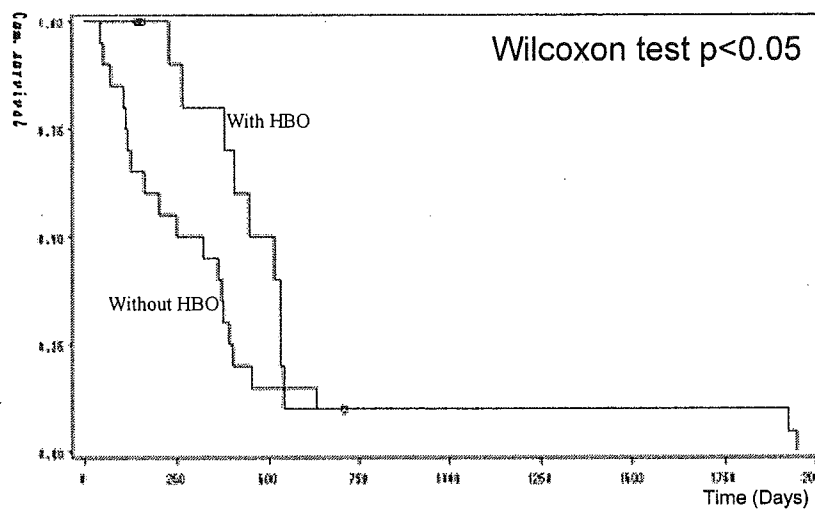


Fig.4

Baseline cumulative survival plots and estimated cumulative survival plots for the chemotherapy with/without hyperbaric oxygenation for malignant gliomas.

**Fig.5**

Kaplan-Meier cumulative survival plots for the chemotherapy with/without hyperbaric oxygenation using matched pair method. (文献4より一部改変)



のためには、予測できないすべての因子を含めて対象患者をランダム化する方法や収集したデータを同様の特性ごとに分けて解析する層別化がある。層別化はもっとも一般的な手法と言える。例えば、今回の解析で、年齢層別解析は母集団から年齢の影響を除いている⁵⁾。

臨床では多くの予後影響因子が存在するために、予後に影響する因子ごとに重み付けが必要となり、多変量補正が行われることが望まれる。比較しようとする治療群において予後影響因子を調整して、治療効果(生存期間)の検討を行なうことができる多変量解析が、Coxの比例ハザードモデルである。このモデルを用いて、ACNU/VP16併用療法の化学療法とし

ての有用性を導き出して報告した(Fig.3)²⁾。その中で、単変量解析のみでその有効性を議論していた脳腫瘍の化学療法において、多変量解析の重要性を述べたつもりである。さらにこのモデルでは推定生存率曲線も作成できるので、その予後予測性においても有用性は高いと考える。

ただし注意すべきことは、このモデルが成立するということは、すでに選択された予後影響因子と生存期間との関連が強過ぎて、期待して検討しようとしている治療法が何ら影響を与えていないことを意味するということである¹⁾。もし非常に有効性の高い化学療法があったとすると、それによって高齢者で入院時KPSの悪い患者でも長期間生存し、若年者で

入院時KPSがよくその治療法を受けない患者の生存期間と同等の結果を導き出すこととなり、これらの予後影響因子と生存期間との間に関連性は少なくなるはずなのである。言い換えると常に一定の予後との相関性があるのであれば、その化学療法は、これらの予後影響因子が強く働く患者では臨床的な治療効果が少ないことを意味している。

また、選択された予後影響因子が多ければよい解析ではないことにも注意する必要がある。つまり、多変量解析の原則であるparsimony(倭約・けち)を知っておくことが大切である。多変量解析では、より少ない予後影響因子によって、より高い予後予測性が望まれるという注意点である。そのためには、相互に影響し合う予後影響因子を選択していないか、尤度比検定などによって十分に検定を行ない、できるだけ少ない数の予後影響因子を取捨選択することが望まれる。

脳腫瘍の予後影響因子については多くの報告がある。近年では、分子生物学的な報告が散見されるが、この場合も従来の予後影響因子よりも予後を予測できるものでなければならぬはずである。年齢や入院時KPSで説明できる場合、それ以上の説明因子は必要性がない。例えば、脳腫瘍の局在や大きさが因子として検討された場合、優位半球でeloquent areaにあるものは腫瘍が小さくとも入院時KPSは低く、また摘出率も下がるであろう。一方で、劣位半球のnon-eloquent areaであれば入院時KPSはよほどの腫瘍サイズにならなければ低下せず、また摘出率も高くなるはずである。これらは互いに影響し合うので、すべてを影響因子として選択すれば正しい解析にならないのである。もし、外科的摘出率の影響を検討するのであれば、その他の因子の影響を受けない状態で予後との関係を比較することが望ましいし、期待しうる結果が得られると思われる。

これまで述べたように、多変量解析は交絡因子を考慮した統計学的手法として有用であるが、あくまで推定から推定していることを理解しておくことが重要と言える。

そこで、今回は統計学的には古くから用いられているマッチング(matching)を解析法として選択した⁵⁾。比較しようとする治療群間で予後影響因子が同一となるように患者同士をマッチングさせて選択し、バイアスをコントロールした。症例数が少ない場合に有効で、今回はHBO施行症例において個々の患者に対して同一の条件を満たす症例を非HBO施行症例から1:2で選び解析した。多変量解析では選択した予後影響因子が互いに影響が少ない前提のもと、どれだけ予後に影響しているかによって数式的に導き出された結果であるのに対して、このマッチングは比較したいものだけに着目して直接的に治療効果を比

較検討できることが利点と言える。つまり、これによって統計学的にHBO併用化学療法施行群の方が有意に生存期間を延長させていることを証明できたと考え、その機序も考察し報告している⁴⁾。ただし、このマッチングも選択する因子の限定や変数を因子にした場合などでは転帰への影響を評価しきれないので注意が必要である。

近年、多変量解析を用いた研究発表が増えてきていることは好ましい傾向である。統計学ソフトによって容易に統計学的検討ができるようになったことも要因の一つと言える。しかし、臨床データを解析する上で非常に有用な情報を与えてくれる多変量解析も万能ではないことを承知して、治療法を選択などにおいて正しく判断しなければならない。

【まとめ】

- ①これまでの本学における悪性神経膠腫の治療成績を示し、統計学的解析法とその解釈における注意点を述べた。
- ②多変量解析としてCoxの比例ハザードモデルを用いて、ACNU/VP16併用療法の化学療法としての有用性を導き出した。
- ③交絡因子の影響をより少なくし、直接的に少ない症例数における治療群間の比較検討を行なうためペアマッチング(マッチドペア法)を用いて、HBO併用化学療法の有効性を示した。
- ④治療法を選択などにおいては、統計学的手法を理解し、臨床データを解析した上で、正しく判断しなければならないと考える。

【文献】

- 1) 高橋善弥太：医者のためのロジスチック・Cox 回帰入門. 日本医学館, 東京, 1995年, pp1~16
- 2) 田中克之、関野宏明：悪性神経膠腫に対するACNU/VP16併用化学療法の治療成績—第1報Cox's Proportional Hazard Modelを用いた統計学的検討—Jpn J Neurosurg 8(9): 583-590, 1990
- 3) 田中克之、山口由太郎、鈴木理恵、平本 準、関野宏明：当院におけるanaplastic astrocytomaの治療成績—統計学的検討による考察—Neuro-Oncology 8(2): 56-60, 1998
- 4) 田中克之、吉田泰之、橋本卓雄、須賀万智、吉田勝美：脳腫瘍の外科. メディカ出版, 大阪. (掲載予定)
- 5) Robert HF, Suzne WF, Edward HW: Clinical Epidemiology: The Essentials. (邦訳 福井次矢：臨床疫学. EBM実践のための必須知識. メディカル・サイエンス・インターナショナル, 東京, pp132-136)

High-dose conformal radiotherapy for supratentorial malignant glioma: a historical comparison



Minoru Tanaka, Yasushi Ino, Keiichi Nakagawa, Masao Tago, Tomoki Todo

Summary

Background Although radiotherapy remains the main postoperative treatment for patients with malignant glioma, modifications to regimens have not improved the poor outlook of patients with this disease. We aimed to investigate whether high-dose conformal radiotherapy improves the survival of patients with supratentorial malignant glioma compared with conventional radiotherapy.

Methods 29 patients with anaplastic astrocytoma and 61 patients with glioblastoma who received high-dose conformal radiotherapy during 1990–2002 were compared with 34 patients with anaplastic astrocytoma and 60 patients with glioblastoma who received conventional 60 Gy radiotherapy during 1979–89. 77 of the 90 patients receiving high-dose radiotherapy were given 80 Gy; the remaining 13 patients, all with glioblastoma, received 90 Gy. Radiotherapy was planned on the basis of images taken before surgery, and doses were delivered in 2 Gy per fraction per day for 5 days a week. Hazard ratios for death were calculated with a Cox model, and were adjusted for age, Karnofsky performance scale, tumour size, and extent of resection.

Findings Patients who received high-dose radiotherapy had significantly longer overall survival compared with those who received conventional radiotherapy (adjusted hazard ratio 0.30 [95% CI 0.12–0.76], $p=0.011$ for anaplastic astrocytoma and 0.49 [0.28–0.87], $p=0.014$ for glioblastoma). Patients with anaplastic astrocytoma in the high-dose group have not yet reached median survival; median survival in the conventional radiotherapy group was 22.3 months (95% CI 20.6–24.0). 5-year survival was 51.3% (29.2–73.4) for the high-dose group and 14.7% (0.0–30.0) for the conventional group. Median survival in patients with glioblastoma was 16.2 months (12.8–19.6) for the high-dose group and 12.4 months (10.0–14.8) for the conventional group. 2-year survival was 38.4% (23.5–53.3) for the high-dose group and 11.4% (0.0–25.3) for the conventional group. Survival did not differ between those that received 80 Gy radiotherapy and those that received 90 Gy (hazard ratio 0.94 [95% CI 0.42–2.12]). The higher frequency of radiation-induced white matter abnormality in the high-dose group compared with the conventional radiotherapy group did not lead to increased disability.

Interpretation High-dose, standard-fractionated radiotherapy shows potential as the main postoperative treatment for patients with supratentorial malignant glioma.

Introduction

Common treatment for newly diagnosed malignant glioma is resection to the maximum extent possible, followed by chemoradiotherapy.^{1,2} Temozolomide has become a standard chemotherapeutic agent in Europe, Canada, and the USA,^{3,4} whereas use of nimustine has been standard practice in Japan, despite the lack of definitive evidence.⁵

Malignant glioma cells are somewhat resistant to radiation and are highly invasive to surrounding healthy tissue.^{6,7} Recurrence after initial radiotherapy is inevitable; the most common pattern of recurrence is regrowth at the primary location.^{8,9} Undoubtedly, local tumour control is important for improving the survival of patients with malignant glioma.

Several reports^{2,10,11} have suggested that survival of patients with malignant glioma depends on the total dose of the initial radiotherapy. An early report¹⁰ showed that patients who received a median of 75 Gy (range 70–80) had significantly longer survival than did those who received a median of 50 Gy (50–55). A randomised control study¹¹ showed that 60 Gy lengthened survival by

about 3 months compared with 45 Gy. However, a total dose of 60 Gy is regarded the limiting dose for the brain when delivered by the standard fractionation of 2 Gy per day.¹² Attempts to safely increase the total dose to beyond 70 Gy by use of hyperfractionation have not improved survival.^{13–16}

Use of stereotactic radiosurgery before conventional radiotherapy did not improve the outcome of patients with glioblastoma,¹⁷ and accelerated radiotherapy, in which 2-Gy fractions are given three times a day to a total dose of 30–60 Gy, or 1.5-Gy fractions are given twice a day to a total of 60 Gy, did not improve the outcome of patients with malignant glioma compared with those given conventionally fractionated radiotherapy.^{18–20} These results, and the assumption that radiotherapy doses of higher than 60 Gy with standard fractionation would significantly increase morbidity, have prevented neuro-oncologists from using high-dose radiotherapy for patients with glioma in large-scale studies.²¹

Technological advances such as three-dimensional conformal radiotherapy have allowed minimum involvement of surrounding healthy tissue. Results of several

Lancet Oncol 2005; 6: 953–60

Published online

October 27, 2005

DOI:10.1016/S1470-2045(05)

70395-8

See Reflection and Reaction
page 915

Department of Neurosurgery
(M Tanaka MD, T Todo MD),
Department of Neuro-
oncology and Molecular
Therapeutics (Y Ino MD,
T Todo MD), and Department of
Radiation Oncology
(K Nakagawa MD, M Tago MD),
University of Tokyo, Tokyo,
Japan

Correspondence to:

Dr Tomoki Todo, Department of
Neurosurgery, University of
Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku,
Tokyo 113-8655, Japan
toudou-nsu@umin.ac.jp

	Conventional radiotherapy		High-dose radiotherapy	
	Glioblastoma (n=60)	Anaplastic astrocytoma (n=34)	Glioblastoma (n=61)	Anaplastic astrocytoma (n=29)
Age				
Median (range), years	47 (15-77)	41 (15-71)	55 (15-76)	46 (15-73)
<50 years	32	25	25	19
≥50 years	28	9	36	10
Sex				
Women	24	13	21	7
Men	36	21	40	22
Karnofsky performance scale				
60-70	22	15	20	8
80-100	38	19	41	21
Tumour diameter				
Mean (SD), cm	4.3 (1.3)	4.4 (1.2)	4.6 (1.6)	4.5 (1.2)
<4 cm	36	19	29	14
≥4 cm	24	15	32	15
Tumour location				
Frontal	22	16	21	15
Temporal	16	10	24	7
Parietal	14	2	8	3
Occipital	5	1	7	3
Thalamus	3	5	1	1
Extent of resection				
<95%	39	17	35	14
≥95%	21	17	26	15
Chemotherapy				
Nimustine and vincristine	34	21	57	27
Nimustine	18	8	3	2
Carmustine	7	0	0	0
None	1	5	1	0
Repeat resection				
Yes	4	3	6	6
No	56	31	55	23
Salvage chemotherapy				
Interferon beta	1	5	3	0
Cisplatin and interferon beta	1	0	1	0
Intrathecal methotrexate	1	0	0	1
None	57	29	57	28

Data are number of patients unless otherwise indicated.

Table 1: Patient and tumour characteristics

small-scale studies²²⁻²⁴ have suggested that high-dose radiotherapy (70-90 Gy) is tolerated well in patients with malignant glioma, and the frequency of cognitive impairment or necrosis was not notably raised in long-term survivors. Since 1990, we have been using radiotherapy with a total dose of 80-90 Gy, given with standard fractionation of 2 Gy per day, for all patients with supratentorial malignant glioma. We aimed to compare the outcomes of these patients with those who received the conventional 60 Gy radiotherapy given before 1990 at our institution.

Methods

Patients

We investigated 240 consecutive patients who had been newly diagnosed with glioblastoma or anaplastic astrocytoma according to WHO classification at University of Tokyo Hospital from 1979 to 2002, who met the inclusion criteria. Patients were included if they had histopathologically confirmed glioblastoma or anaplastic astrocytoma,

were at least 15 years old, and had a Karnofsky performance scale of 60% or higher at the start of radiotherapy. Patients were excluded if they had secondary glioblastoma, chronic renal failure, restrictive pulmonary disease, or infratentorial or brainstem glioma (n=55), or chronic heart failure (n=1; died 2 months after surgery). All patients had maximum possible resection that avoided neurological worsening. Of 94 patients that received 60 Gy radiotherapy (conventional radiotherapy), 87 had craniotomy and seven had a biopsy; of the 90 patients that received high-dose radiotherapy, 87 underwent craniotomy and three had a biopsy before radiotherapy. The proportion of tumour volume resected was calculated from postoperative CT or MRI scan. With the exception of seven patients who refused chemotherapy, all patients received intravenous nimustine (Nidran®; Sankyo, Tokyo, Japan) or carmustine (BiCNU®; Bristol-Myers Squibb, New York, NY, USA) with or without vincristine (Oncovin®; Nippon Kayaku, Tokyo, Japan) during radiotherapy. All patients were assessed for the presence of radiation-induced toxic effects at follow-up examination by neurosurgeons. Written informed consent was obtained from all patients and from a member of their family before radiotherapy.

Radiotherapy

All treatments were planned on the basis of preoperative images, and done with a standard fractionation of 2 Gy per fraction per day for 5 days a week. Conventional radiotherapy started 7-21 days after surgery, and high-dose radiotherapy started 11-21 days after surgery. No patient died before the start of radiotherapy.

From 1979 to 1989, 60 patients with glioblastoma and 34 patients with anaplastic astrocytoma received conventional 60 Gy radiotherapy. Until 1984, patients received external-beam radiotherapy of 40 Gy to the whole brain followed by a local boost of 20 Gy (48 patients with glioblastoma and 18 patients with anaplastic astrocytoma). In 1984, a three-step cone-down technique was introduced, which was used in the remaining 12 patients with glioblastoma and 16 patients with anaplastic astrocytoma. Gross tumour volume was defined as the contrast-enhanced lesion depicted by contrast-enhancing CT scan or T1-weighted MRI (contrast-enhancing materials manufactured by Schering AG, Berlin, Germany, or Daiichi Pharmaceutical, Tokyo, Japan). Clinical target volume I was defined as the tumour, II as the tumour and surrounding oedema (high-intensity area on T2-weighted MRI) plus a 2-cm margin, and III as the whole brain. Planning target volume was defined as clinical target volume plus 0.5 cm for setup errors; thus, the margin with a setup error for planning target volume II was 2.5 cm. Planning target volume III was the whole brain plus 0.5 cm. The doses for planning target volumes I, II, and III were 60 Gy, 40 Gy, and 26 Gy, respectively.

From 1990 to 2002, 90 patients received high-dose radiotherapy with a total dose of 80 Gy or 90 Gy. Clinical target

volumes were modified and defined as tumour (I), tumour plus a 2-cm margin (II), and tumour and surrounding oedema plus a 2-cm margin (III). Planning target volume was defined as the clinical target volume plus 0.5 cm for setup errors. All 29 patients with anaplastic astrocytoma received 80 Gy radiotherapy: the doses of planning target volumes were 80 Gy, 60 Gy, and 40 Gy. Initially, patients with glioblastoma received a total of 90 Gy with planning target volumes of 90 Gy, 70 Gy, and 50 Gy ($n=13$). Because one patient showed grade-4 memory impairment, the total dose was reduced to 80 Gy for the subsequent 48 patients with glioblastoma, with planning target volumes similar to those for anaplastic astrocytoma. High-dose radiotherapy was done with the rotational conformal method, which uses a combination of coplanar gantry rotation and movement of a multileaf collimator.²⁵⁻²⁷ The leaves were focused in two dimensions to avoid penumbra and moved independently from each other according to the gantry angles to create a dose distribution confined to the target volume. The area surrounding the target volume had a uniform gradient of dose fall-off.

Treatment lasted for 6 weeks in the 60-Gy group, 8 weeks in the 80-Gy group, and 9 weeks in the 90-Gy group. However, three patients in the 60-Gy group and two patients in the 80-Gy group had a 1-week interruption, and one patient in the 60-Gy group had an interruption of 2 weeks during treatment.

Follow-up

Follow-up CT or MRI scans were obtained at least every 4 months after radiotherapy; tumour progression and white-matter abnormalities were diagnosed on the basis of reports by neuroradiologists. Tumour progression was defined in accordance with MacDonald criteria.²⁸ Karnofsky performance scale was assessed for all patients. White-matter abnormality was defined as radiation necrosis, leucoencephalopathy, or brain atrophy. A contrast-enhanced lesion that appeared after radio-

	Conventional (n=94)	High-dose (n=90)
Follow-up		
Median (range), months	7.7 (1.0-297.0)	15.5 (1.5-183.0)
Anaplastic astrocytoma		
Overall survival, months (median [95% CI])	22.3 (20.6-24.0)	Not reached
Progression-free survival, months (median [95% CI])	17.0 (12.8-21.2)	37.5 (NC)
5-year overall survival, % (95% CI)	14.7 (0.0-30.0)	51.3 (29.2-73.4)
2-year overall survival, % (95% CI)	44.1 (23.3-64.9)	78.1 (61.0-95.2)
Glioblastoma		
Overall survival, months (median [95% CI])	12.4 (10.0-14.8)	16.2 (12.8-19.6)
90-Gy group	NA	19.6 (13.3-25.9)
80-Gy group	NA	16.2 (12.6-19.8)
Progression-free survival, months (median [95% CI])	7.2 (4.0-10.4)	7.0 (5.0-9.8)
90-Gy group	NA	11.1 (3.0-19.2)
80-Gy group	NA	6.9 (5.5-8.3)
2-year survival, % (95% CI)	11.4 (0.0-25.3)	38.4 (23.5-53.3)
90-Gy group	NA	38.9 (8.5-69.3)
80-Gy group	NA	37.6 (20.4-54.8)

NC=not calculable, NA=not applicable.

Table 2: Patient outcomes

therapy on contrast-enhancing CT scan or T1-weighted MRI was diagnosed as radiation necrosis if a biopsy or resection sample showed a pathological diagnosis of radiation necrosis or if no uptake of fluorine-18 fluorodeoxyglucose or L-methyl-carbon-11 methionine could be seen on PET images.²⁹ PET has been done routinely on patients who developed contrast-enhanced lesions since 1990 at our institution.

Radiation-induced toxic effects were scored according to the common terminology criteria for adverse events (version 3.0).³⁰ Neurological symptoms that could not be explained by tumours were regarded as radiation-induced neurological deterioration.

Four independent neuropathologists reviewed the tumour histopathology of patients who survived for more than 20 months after radiotherapy to confirm the original diagnoses of glioblastoma or anaplastic astrocytoma. After tumour recurrence, patients were given further treatment at the discretion of treating doctors.

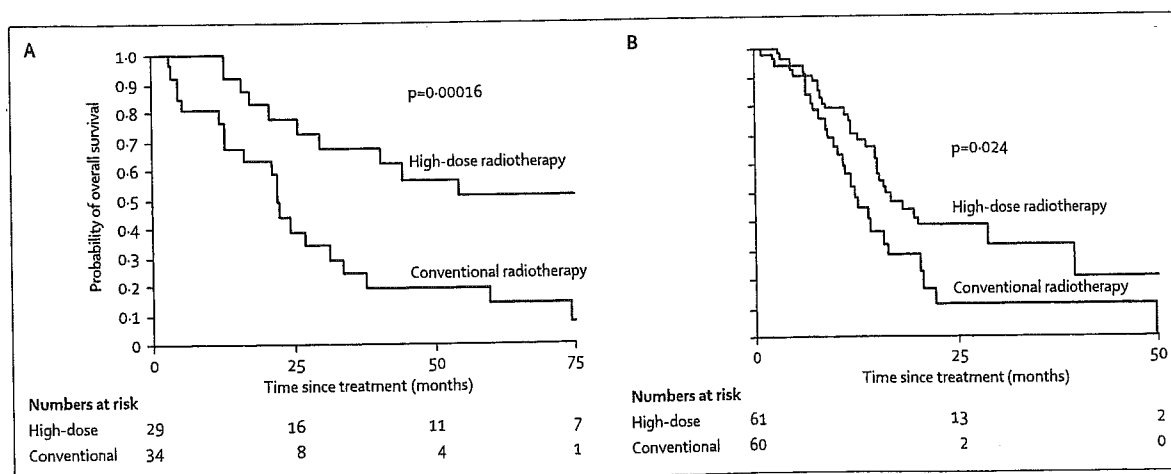


Figure 1: Kaplan-Meier estimates of overall survival according to radiation dose in patients with anaplastic astrocytoma (A) and glioblastoma (B)

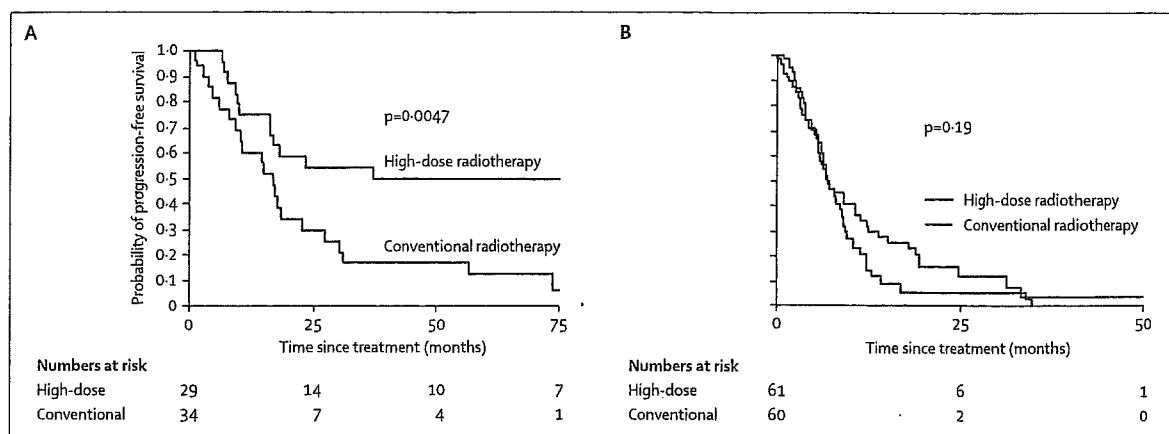


Figure 2: Kaplan-Meier estimates of progression-free survival according to radiation dose in patients with anaplastic astrocytoma (A) and glioblastoma (B)

Statistical analysis

Frequency distributions and summary statistics were calculated for all clinical and histological variables. χ^2 or Fisher's exact test were used for categorical variables, and the Kruskal-Wallis test for categorical continuous variables. Overall survival was calculated from the date of operation until the date of death or last follow-up, and progression-free survival until the date when recurrence was seen or until last follow-up. The Kaplan-Meier method was applied for survival analyses, and significance was calculated by the log-rank test. Cox's proportional hazard model was used to analyse prognostic variables and to ascertain the risk factors associated with time of onset of white-matter abnormality. Adjusted hazard ratios for death were calculated by adjustment for age, Karnofsky performance scale, tumour size, and extent of resection. Univariate and multivariate Cox regression analysis (with the entry cutoff level of $p=0.05$ and the stay cutoff of $p=0.1$) were used to assess the association of variables with survival or time to onset of white-matter abnormality. All data analyses were done with Dr SPSS II version 11.01 for Windows.

Role of the funding source

The funding sources had no role in study design; in collection, analysis, and interpretation of data; or in writing of the report. The corresponding author had full access to all data and had final responsibility for the decision to submit for publication.

Results

Table 1 shows the patient and tumour characteristics. The conventional group did not differ from the high-dose group in any of the characteristics listed. Median follow-up was 12.0 months overall (range 1.0–297.0; table 2).

Overall survival (figure 1), and 2-year and 5-year survival (table 2) were significantly improved in patients with anaplastic astrocytoma who received high-dose radiotherapy compared with those who received conventional radiotherapy. Median survival has not yet been reached in patients with anaplastic astrocytoma in the high-dose group. The adjusted hazard ratio for death in the high-dose group compared with the conventional group for patients with anaplastic astrocytoma was 0.30 (95% CI 0.12–0.76, $p=0.011$). These results were confirmed by sensitivity analysis that adjusted for the follow-up ranges.

In patients with glioblastoma, overall survival (figure 1), median survival, and 2-year survival (table 2) were significantly higher in the high-dose group than in the conventional group. The adjusted hazard ratio for death in the high-dose group versus the conventional group for patients with glioblastoma was 0.49 (95% CI 0.28–0.87, $p=0.014$).

However, the extra 10 Gy given to 13 of the 61 patients with glioblastoma who received high-dose radiotherapy did not result in a significant survival benefit compared with patients who received 80 Gy

	60 Gy		80 Gy		90 Gy
	Glioblastoma (n=60)	Anaplastic astrocytoma (n=34)	Glioblastoma (n=48)	Anaplastic astrocytoma (n=29)	Glioblastoma (n=13)
Any recurrence	39	22	37	12	10
Local recurrence only	32	16	26	5	4
Local recurrence and dissemination	7	6	11	6	0
Dissemination only	0	0	0	1	6
Data are number of patients.					

Table 3: Recurrence by radiotherapy dose

	60 Gy (n=94)	80 Gy (n=77)	90 Gy (n=13)
Toxic effects			
Any	4	17	6
Cognitive dysfunction			
Grade 3	1	1	1
Grade 4	0	0	1
Memory impairment			
Grade 2	0	4	1
Grade 3	1	5	1
Grade 4	0	0	1
White-matter abnormality			
Radiation necrosis	0	7	2
Leucoencephalopathy	1	5	1
Brain atrophy	1	2	0
Time to onset (median [95% CI], months)	136.9 (NC)	32.5 (29.7-35.3)	24.8 (7.9-41.7)

Data are number of patients unless otherwise indicated. NC=not calculable. Some patients had more than one toxic effect.

Table 4: Radiation-induced toxic effects

($p=0.89$, table 2). The unadjusted hazard ratio for death in patients with glioblastoma in the 90-Gy group relative to the 80-Gy group was 0.94 (95% CI 0.42–2.12, $p=0.89$) and the adjusted ratio was 0.70 (0.31–1.61, $p=0.70$).

Kaplan-Meier analyses based on the type of chemotherapy received showed that median survival for patients with anaplastic astrocytoma who received high-dose radiotherapy was not yet reached for those that received nimustine and vincristine, and was 40.6 months (95% CI not calculable because of small number of patients) for those who received nimustine alone ($p=0.92$). For the conventional radiotherapy group, median survival was 21.9 months (95% CI 14.2–29.6) for those on nimustine and vincristine, and 27.1 months (19.4–34.8) for those on nimustine alone ($p=0.78$). For patients with glioblastoma, median survival in the high-dose group was 15.8 months (13.4–18.2) for those on nimustine and vincristine, and median survival has not yet been reached in those receiving nimustine alone ($p=0.29$). In the conventional radiotherapy group, median survival was 15.9 months (8.3–23.5) and 12.1 months (7.5–16.7), respectively ($p=0.24$).

Progression-free survival was significantly lengthened by high-dose radiotherapy compared with conventional radiotherapy in patients with anaplastic astrocytoma, but not in those with glioblastoma (figure 2, table 2).

Most recurrences occurred at the primary site in both the conventional and 80-Gy groups (table 3). More local recurrences accompanied dissemination in the cerebrospinal fluid space in the 80-Gy group than in the 60-Gy group ($p=0.14$), and this trend was most notable in patients with anaplastic astrocytoma, although the numbers are small (table 3). Only one of 12 patients with anaplastic astrocytoma and none of 37 patients with glioblastoma who had recurrent disease after receiving 80-Gy radiotherapy had tumour dissemination in the

cerebrospinal fluid space without local recurrence. By contrast, dissemination without recurrence was more frequent in patients with glioblastoma who received 90-Gy radiotherapy than in those who received 80 Gy ($p<0.0001$) or 60 Gy (table 3).

Table 4 shows the frequency and types of radiation-induced toxic effects recorded. The radiation-induced toxic effects that resulted from high-dose radiotherapy were generally tolerable. One patient who received 90-Gy radiotherapy developed grade-4 cognitive dysfunction and memory impairment, which led to reduction of the total dose to 80 Gy for patients with glioblastoma thereafter. None of these patients that received 80-Gy radiotherapy showed grade-4 toxic effects. White-matter abnormalities were significantly more frequent in the high-dose group than in the conventional group ($p=0.0002$, table 4). Nine patients in the high-dose group developed radiation necroses, compared with none in the 60-Gy group: five necroses were confirmed pathologically from surgical samples and four were diagnosed by PET. Four of these nine patients showed no neurological deterioration and maintained their active daily life after the diagnoses of radiation necrosis. One patient showed tumour recurrence 12 months after development of radiation necrosis. Kaplan-Meier analyses showed that, compared with the 60-Gy group, the median time to onset of white matter abnormality was significantly shorter for both the 80-Gy group ($p=0.011$) and the 90-Gy group ($p=0.0043$). Cox analyses showed that lower radiation dose was the only pretreatment clinical variable analysed that lengthened time to onset of white-matter abnormality ($p=0.028$).

	Hazard ratio (95% CI)	p
Univariate analyses		
Sex (women vs men)	1.51 (0.97–2.33)	0.067
Age (<50 years vs ≥50 years)	0.51 (0.32–0.80)	0.003
Histology (anaplastic astrocytoma vs glioblastoma)	0.43 (0.27–0.70)	0.001
Karnofsky performance scale (80–100 vs 60–70)	0.28 (0.18–0.44)	<0.0001
Tumour diameter (<4 cm vs ≥4 cm)	0.64 (0.42–0.98)	0.038
Tumour location		
Temporal vs frontal	1.14 (0.68–1.91)	0.61
Parietal vs frontal	1.22 (0.65–2.31)	0.52
Occipital vs frontal	0.96 (0.46–2.02)	0.92
Thalamus vs frontal	2.06 (0.85–5.00)	0.11
Extent of resection (≥95% vs <95%)	0.34 (0.21–0.55)	<0.0001
Chemotherapy (yes vs no)	0.81 (0.33–1.99)	0.64
Radiation dose (high dose vs 60 Gy)	0.49 (0.33–0.76)	0.001
Repeat resection (yes vs no)	0.39 (0.16–0.69)	0.003
Salvage chemotherapy (yes vs no)	0.72 (0.35–1.49)	0.38
Multivariate analyses		
Histology (anaplastic astrocytoma vs glioblastoma)	0.41 (0.25–0.67)	<0.0001
Karnofsky performance scale (80–100 vs 60–70)	0.39 (0.23–0.66)	<0.0001
Extent of resection (≥95% vs <95%)	0.41 (0.24–0.72)	0.002
Radiation dose (high dose vs 60 Gy)	0.42 (0.26–0.68)	<0.0001
Age (<50 years vs ≥50 years)	0.72 (0.43–1.23)	0.23
Tumour diameter (<4 cm vs ≥4 cm)	0.95 (0.56–1.62)	0.86
Repeat resection (yes vs no)	0.48 (0.22–1.02)	0.055

Table 5: Univariate and multivariate analyses for favourable prognostic factors

Univariate Cox analyses showed that seven of 11 clinical factors analysed were associated with favourable prognosis: age younger than 50 years, anaplastic astrocytoma histology, Karnofsky performance scale of at least 80%, tumour diameter of less than 4 cm, tumour removal of at least 95%, radiation dose of 80 Gy or higher, and repeat resection (table 5). Stepwise multivariate analyses showed that independent factors associated with favourable prognosis were histology of anaplastic astrocytoma, Karnofsky performance scale of at least 80%, tumour resection of at least 95%, and radiation dose of 80 Gy or more (table 5). Age of younger than 50 years was found to be an independent favourable prognostic factor only for the 60-Gy group (hazard ratio 0.32 [95% CI 0.14–0.73], $p=0.007$) when the 60-Gy and high-dose groups were analysed separately.

Discussion

Our results show that high-dose radiotherapy of 80–90 Gy delivered by a standard fractionation provides a significant survival benefit over standard 60-Gy radiotherapy for patients with supratentorial malignant glioma, without notable increases in radiation-induced disability. The efficacy of conventional radiotherapy of more than 70 Gy for malignant glioma has never been investigated in a multi-institutional randomised-controlled study, because of the general assumption that toxic effects to the brain induced by the radiation dose would outweigh the advantages.²¹ The two groups compared in our study, both of which consisted of consecutive eligible patients, did not vary significantly from each other, with the exception of the radiotherapy approaches, since radiotherapeutic techniques have become more sophisticated over time. The survival benefit was most evident in patients with anaplastic astrocytoma. The survival results we recorded for high-dose radiotherapy are comparable with the best treatment outcomes reported to date for anaplastic astrocytoma.^{31,32}

Furthermore, median survival and 2-year survival were higher for patients with glioblastoma who were given high-dose radiotherapy than for those given conventional radiotherapy. As expected,^{33,34} we noted that radiation-induced white-matter abnormality was significantly more frequent, and the time to onset shorter, with high-dose radiotherapy than with conventional radiotherapy; however, radiation necroses were controllable by steroid administration or surgery. The frequency of impairment to cognition or memory was not significantly increased by the raised dose, and high-dose radiotherapy was generally tolerated well by patients with malignant glioma, which is in agreement with others' findings.^{22–24} In support of our findings, Shrieve and colleagues³⁵ showed that a radiosurgical boost after conventional radiotherapy in 78 patients with glioblastoma resulted in median

survival of 19.9 months (95% CI 18.2–23.0) in patients with glioblastoma, even though 39 (50%) patients needed reoperation and 20 (51%) patients who had a resection had radiation necrosis without evidence of tumour. A concern remains that intensified radiotherapy treatment could lead to long-term effects on cognitive functions that seriously affect quality of life, although this concern is yet to be investigated through careful follow-up of long-term survivors. A randomised trial⁴ in patients newly diagnosed with glioblastoma showed that use of temozolomide during and after conventional radiotherapy improved median survival from 12.1 months (11.2–13.0) in those given radiotherapy alone to 14.6 months (13.2–16.8) in those receiving radiotherapy with temozolomide. In our study, use of nimustine-based chemotherapy did not significantly affect prognosis. Potentially, concomitant chemotherapy with temozolomide could further improve the survival benefit obtained by the high-dose radiotherapy.

As to the mechanism of the favourable outcome with high-dose radiotherapy: more patients in the high-dose group than in the conventional group showed dissemination in the cerebrospinal-fluid space, with six of ten patients with glioblastoma who recurred after 90 Gy radiotherapy showing dissemination without local failure, suggesting that tumour regrowth at the primary site is suppressed more efficiently by high-dose radiotherapy than by 60-Gy radiotherapy. Furthermore, in support of our findings, Nakagawa and colleagues³⁵ showed that 90 Gy radiotherapy in patients with glioblastoma resulted in significantly fewer local failures at the time of recurrence compared with the low-dose radiotherapy group. The high rate of dissemination at recurrence in the high-dose group seems paradoxical, but it should be noted that time to recurrence was significantly longer for patients with anaplastic astrocytoma who received high-dose radiotherapy than for those who received conventional radiotherapy. However, because this finding was from a small number of patients, it could be an artifact. Although many of the patients in our study had extensive removal of the tumour ($\geq 95\%$), the survival benefit from high-dose radiotherapy was also seen in patients that had less than 95% of the tumour removed when Kaplan-Meier analyses were done separately for subtotal and partial resection (data not shown). This finding suggests that extensive tumour reduction is not needed for patients to benefit from high-dose radiotherapy, whereas it is an independent predictor of good prognosis. Patients with glioblastoma who received high-dose radiotherapy had longer overall survival but similar progression-free survival as did those who received conventional radiotherapy, suggesting that recurrent lesions detected by radiological images after high-dose radiotherapy require longer to cause death than do those seen after 60 Gy radiotherapy.

By contrast with our findings, Chan and co-workers²² reported that a dose-escalation from 70–80 Gy to 90 Gy did not change survival or patterns of local failure in 34 patients with malignant glioma. An important feature of our high-dose conformal radiotherapy technique that might have affected outcome was that treatments were planned with preoperative CT or MRI scans, and treatments therefore did not take account of the extent of tumour resection. Furthermore, the initial planning target volume included the surrounding oedema plus a 2-cm margin. Many radiotherapy trials for malignant glioma have restricted their planning target volumes to the contrast-enhanced lesion plus a margin, because most patients who receive treatment have local failure, and to lessen radiation-induced toxic effects.^{20,22,23,36–38} However, glioma cells are known to migrate along myelinated fibre tracts of the white matter and penetrate to the so-called surrounding oedema depicted on CT or MRI scans,³⁹ and proton magnetic-resonance spectroscopy has shown that malignant glioma can extend beyond the areas of T2-weighted signal changes on MRI.⁴⁰ For these reasons and because high-dose radiotherapy is tolerated well by patients with malignant glioma, inclusion of the regions of surrounding oedema plus a margin in the planning target volume could be important to obtain good local control.

Although new therapeutic approaches are being developed, radiotherapy remains the main postoperative treatment for malignant glioma. Our findings suggest that high-dose conformal radiotherapy with standard fractionation results in a significant lengthening of survival of patients with malignant glioma compared with conventional 60 Gy radiotherapy, without significantly increasing radiation-induced disabilities. If confirmed in correctly powered phase III trials with appropriate integration of systemic antitumour agents, 80 Gy conformal radiotherapy should be regarded as a standard postoperative treatment for supratentorial malignant glioma.

Contributors

M Tanaka analysed data and wrote the initial draft. Y Ino, K Nakagawa, and M Tago contributed to data collection. T Todo analysed and interpreted data, and wrote the article.

Conflict of interest

We declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

We thank the neurosurgeons who worked at the University of Tokyo, especially Kintomo Takakura, Masao Matsutani, Nobuyuki Shitara, Akio Asai, and Takamitsu Fujimaki; and radiation oncologists, especially Atsuo Akanuma and Yukimasa Aoki, for their treatment of patients with malignant glioma. We also thank Yoichi Nakazato, Takanori Hirose, Nobuaki Funata, and Junji Shibahara for reviewing the tumour histopathology of long-term survivors, and Junji Kishimoto and Hiroshi Oyama for technical advice on statistical analyses. This study was supported in part by grants from the Ministry of Health, Labour, and Welfare, Japan, and the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Japan.

References

- Walker MD, Green SB, Byar DP, et al. Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. *N Engl J Med* 1980; 303: 1323–29.
- Walker MD, Strike TA, Sheline GE. An analysis of dose-effect relationship in the radiotherapy of malignant gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1979; 5: 1725–31.
- Stupp R, Dietrich PY, Ostermann Kraljevic S, et al. Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1375–82.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352: 987–96.
- Takakura K, Abe H, Tanaka R, et al. Effects of ACNU and radiotherapy on malignant glioma. *J Neurosurg* 1986; 64: 53–57.
- Chakravarti A, Dicker A, Mehta M. The contribution of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathway to radioresistance in human gliomas: a review of preclinical and correlative clinical data. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 58: 927–31.
- Merzak A, Pilkington GJ. Molecular and cellular pathology of intrinsic brain tumours. *Cancer Metastasis Rev* 1997; 16: 155–77.
- Athanassiou H, Synodinou M, Maragoudakis E, et al. Randomized phase II study of temozolomide and radiotherapy compared with radiotherapy alone in newly diagnosed glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2372–77.
- Grossman SA, Wharam M, Sheidler V, et al. Phase II study of continuous infusion carmustine and cisplatin followed by cranial irradiation in adults with newly diagnosed high-grade astrocytoma. *J Clin Oncol* 1997; 15: 2596–603.
- Salazar OM, Rubin P, Feldstein ML, Pizzutiello R. High dose radiation therapy in the treatment of malignant gliomas: final report. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1979; 5: 1733–40.
- Bleehen NM, Stenning SP, for the Medical Research Council Brain Tumour Working Party. A Medical Research Council trial of two radiotherapy doses in the treatment of grades 3 and 4 astrocytoma. *Br J Cancer* 1991; 64: 769–74.
- Emami B, Lyman J, Brown A, et al. Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991; 21: 109–22.
- Nelson DF, Curran WJ Jr, Scott C, et al. Hyperfractionated radiation therapy and bis-chloroethyl nitrosourea in the treatment of malignant glioma: possible advantage observed at 72.0 Gy in 1.2 Gy BID fractions: report of the Radiation Therapy Oncology Group Protocol 8302. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993; 25: 193–207.
- Werner-Wasik M, Scott CB, Nelson DF, et al, for the Radiation Therapy Oncology Group Study 83-02. Final report of a phase I/II trial of hyperfractionated and accelerated hyperfractionated radiation therapy with carmustine for adults with supratentorial malignant gliomas. *Cancer* 1996; 77: 1535–43.
- Coughlin C, Scott C, Langer C, et al. Phase II, two-arm RTOG trial (94-11) of bischloroethyl-nitrosourea plus accelerated hyperfractionated radiotherapy (64.0 or 70.4 Gy) based on tumor volume (>20 or ≤20 cm³, respectively) in the treatment of newly-diagnosed radiosurgery-ineligible glioblastoma multiforme patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 48: 1351–58.
- Prados MD, Wara WM, Sneed PK, et al. Phase III trial of accelerated hyperfractionation with or without difluoromethylornithine (DFMO) versus standard fractionated radiotherapy with or without DFMO for newly diagnosed patients with glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 49: 71–77.
- Souhami L, Seiferheld W, Brachman D, et al. Randomized comparison of stereotactic radiosurgery followed by conventional radiotherapy with carmustine to conventional radiotherapy with carmustine for patients with glioblastoma multiforme: report of Radiation Therapy Oncology Group 93-05 protocol. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 60: 853–60.
- Simpson WJ, Platts ME. Fractionation study in the treatment of glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1976; 1: 639–44.
- Horiot JC, van den Bogaert W, Ang KK, et al. European Organization for Research on Treatment of Cancer trials using radiotherapy with multiple fractions per day. *Front Radiat Ther Oncol* 1988; 22: 149–61.

- 20 Miralbell R, Mornex F, Greiner R, et al. Accelerated radiotherapy, carbogen, and nicotinamide in glioblastoma multiforme: report of European Organization for Research and Treatment of Cancer trial 22933. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3143-49.
- 21 Mornex F, Nayel H, Taillandier L. Radiation therapy for malignant astrocytomas in adults. *Radiother Oncol* 1993; 27: 181-92.
- 22 Chan JL, Lee SW, Fraass BA, et al. Survival and failure patterns of high-grade gliomas after three-dimensional conformal radiotherapy. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1635-42.
- 23 Lee SW, Fraass BA, Marsh LH, et al. Patterns of failure following high-dose 3-D conformal radiotherapy for high-grade astrocytomas: a quantitative dosimetric study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999; 43: 79-88.
- 24 Jason GW, Pajurkova EM, Taenzer PA, Bultz BD. Acute effects on neuropsychological function and quality of life by high-dose multiple daily fractionated radiotherapy for malignant astrocytomas: assessing the tolerability of a new radiotherapy regimen. *Psychooncology* 1997; 6: 151-57.
- 25 Nakagawa K, Aoki Y, Fujimaki T, et al. High-dose conformal radiotherapy influenced the pattern of failure but did not improve survival in glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 40: 1141-49.
- 26 Aoki Y, Akanuma A, Karasawa K, et al. An integrated radiotherapy treatment system and its clinical application. *Radiat Med* 1987; 5: 131-41.
- 27 Takahashi K, Purdy JA, Liu YY. Work in progress: treatment planning system for conformation radiotherapy. *Radiology* 1983; 147: 567-73.
- 28 MacDonald DR, Cascino TL, Schold SC Jr, Cairncross JG. Response criteria for phase II studies of supratentorial malignant glioma. *J Clin Oncol* 1990; 8: 1277-80.
- 29 Glantz MJ, Hoffman JM, Coleman RE, et al. Identification of early recurrence of primary central nervous system tumors by [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Ann Neurol* 1991; 29: 347-55.
- 30 Woodworth TG, Furst DE, Strand V, et al. Standardizing assessment of adverse effects in rheumatology clinical trials: status of OMERACT Toxicity Working Group March 2000: towards a common understanding of comparative toxicity/safety profiles for antirheumatic therapies. *J Rheumatol* 2001; 28: 1163-69.
- 31 Levin VA, Hess KR, Choucair A, et al. Phase III randomized study of postradiotherapy chemotherapy with combination alpha-difluoromethylornithine-PCV versus PCV for anaplastic gliomas. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 981-90.
- 32 Watanabe T, Katayama Y, Yoshino A, et al. Human interferon beta, nimustine hydrochloride, and radiation therapy in the treatment of newly diagnosed malignant astrocytomas. *J Neurooncol* 2005; 72: 57-62.
- 33 Corn BW, Yousem DM, Scott CB, et al, for Radiation Therapy Oncology Group 83-02. White matter changes are correlated significantly with radiation dose: observations from a randomized dose-escalation trial for malignant glioma. *Cancer* 1994; 74: 2828-35.
- 34 Taylor BV, Buckner JC, Cascino TL, et al. Effects of radiation and chemotherapy on cognitive function in patients with high-grade glioma. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2195-201.
- 35 Shrieve DC, Alexander E 3rd, Black PM, et al. Treatment of patients with primary glioblastoma multiforme with standard postoperative radiotherapy and radiosurgical boost: prognostic factors and long-term outcome. *J Neurosurg* 1999; 90: 72-77.
- 36 Sultanem K, Patrocinio H, Lambert C, et al. The use of hypofractionated intensity-modulated irradiation in the treatment of glioblastoma multiforme: preliminary results of a prospective trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 58: 247-52.
- 37 Floyd NS, Woo SY, Teh BS, et al. Hypofractionated intensity-modulated radiotherapy for primary glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 58: 721-26.
- 38 Laperriere N, Zuraw L, Cairncross G. Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiother Oncol* 2002; 64: 259-73.
- 39 Giese A, Westphal M. Glioma invasion in the central nervous system. *Neurosurgery* 1996; 39: 235-52.
- 40 Ganslandt O, Stadlbauer A, Fahlbusch R, et al. Proton magnetic resonance spectroscopic imaging integrated into image-guided surgery: correlation to standard magnetic resonance imaging and tumor cell density. *Neurosurgery* 2005; 56: 291-98.

日本臨牀 63 卷 増刊号 9 (2005 年 9 月 28 日発行) 別刷

脳腫瘍の診断と治療

—最新の研究動向—

VI. 脳腫瘍の治療 化学療法

薬剤耐性関連遺伝子と個別化化学療法

永根基雄

VI. 脳腫瘍の治療 化学療法

薬剤耐性関連遺伝子と個別化化学療法

Chemoresistance-related genes and individualized
adjuvant therapies

永根基雄

Key words

薬剤耐性, MGMT, アポトーシス, 個別化化学療法, グリオーマ

はじめに

近年の医療の進歩にもかかわらず、悪性 glioma の治療予後は依然極めて不良であり、薬剤耐性の存在がその主要な原因の一つとして考えられている。一般に、固形腫瘍は血液系腫瘍に比べ薬剤の到達性の点からも化学療法の感受性が低いことが知られているが、脳腫瘍においても、胚芽腫やリンパ腫などの一部の腫瘍型を除き、悪性 glioma を中心に化学療法の効果が不十分であることが多く、薬剤耐性の機序の解明と対策が予後改善に向けての重要な課題となっている。

薬剤耐性は、細胞レベルのみならず、組織内低酸素や低 pH 状態などの腫瘍レベルや、薬剤の体内での代謝、排泄や腫瘍への到達性などの宿主レベルでも生じると考えられる。本稿では、腫瘍細胞における生化学的作用を担う分子・遺伝子レベルでの耐性機序につき最近の知見を概説し、それらを基盤とした個別化化学療法の可能性について述べる。

1. 薬剤耐性の機序(表 1)¹⁾

a. 薬剤の細胞内外への流入・排出機構

抗癌剤などの薬剤が細胞内へ取り込まれる機序については、いまだ解明されていない点が多い。その中で、葉酸代謝拮抗剤である metho-

trexate (MTX) は、reduced folate carrier (RFC) を介して細胞内へ流入することがよく知られており、その発現低下や遺伝子変異は MTX 耐性の一因となる²⁾。RFC を介した MTX の細胞内取り込みが、MTX 感受性の重要な規定因子との報告もみられている。

細胞外への薬剤排泄機構の中心となるのは、ABC トランスポーター・ファミリー蛋白であり、P-glycoprotein (P-gp) や multidrug resistance proteins (MRPs) などが知られている。これらの蛋白は ATP 結合部と複数の細胞膜貫通部位をもつ膜蛋白で、特に vincristine (VCR), doxorubicin (Dox), etoposide (ETO) などの抗生物質や植物アルカロイドなど天然産物中の抗癌剤を排泄する ATP 依存性のポンプ機能を発揮し、多剤耐性 (multidrug resistance: MDR) の主因と考えられている³⁾。CPT-11, SN-38, cisplatin, MTX なども ABC トランスポーター蛋白の基質となる。P-gp の発現は脳毛細血管の内皮細胞にも認められ、血液脳関門の主たる構成因子をなしている。P-gp は薬剤耐性形質を示す癌細胞株で高発現がみられるのみならず、悪性 glioma を含め白血病や固形腫瘍でも発現が検出されている⁴⁾。しかし、悪性 glioma の臨床例において、P-gp の発現と多剤耐性の相関性を疑問視する報告もあり、その意義については今後の検討が必要である⁵⁾。MRP には計 9 つの isoform

Motoo Nagane: Department of Neurosurgery, Kyorin University School of Medicine 杏林大学医学部 脳神経外科

表1 抗癌剤耐性に関する薬理学的・生化学的機構(文献¹⁾より一部改変引用)

耐性機構	耐性形質(関連分子)	主要な薬剤
1. 細胞内外への薬剤輸送系 a. 細胞内へ取り込み障害 b. 細胞外への能動的排出	RFC 機能 ↓ 取り込みの減少 P-glycoprotein MRP	methotrexate cisplatin, melphalan anthracyclines, vinca alkaloids doxorubicin, etoposide, VM-26
2. 細胞内薬剤保持能の低下	polyglutamation ↓ (FPGS ↓ or variant FPGS)	methotrexate
3. 活性型代謝産物への変換障害	FdUMP ↓ ara-CTP ↓ HGPRT 活性 ↓	5-fluorouracil ara-C 6-MP, 6-thioguanine
4. 薬剤の解毒化・不活化	glutathione ↑ glutathione-S-transferase metallothionein	アルキル化剤, cisplatin アルキル化剤 cisplatin
5. 薬剤代謝の亢進	polyglutamation ↓ (GGH ↑) aldehyde dehydrogenase ↑ cytidine deaminase ↑ cytochrome P450(CYP3A4) ↑	methotrexate cyclophosphamide ara-C etoposide, vincristine
6. 薬剤標的の変化 a. 標的酵素活性の増加 b. 標的酵素発現の低下 c. 変異標的酵素の誘導 d. 標的の変異	DHFR ↑ thymidylate synthase ↑ topoisomerase I ↓ topoisomerase II ↓ 変異 DHFR 変異 topoisomerase II 変異 α -, β -tubulin	methotrexate 5-fluorouracil CPT-11 etoposide, VM-26, doxorubicin methotrexate VM-1 vincristine
7. DNA修復機構の亢進	MGMT ↑ DNA ミスマッチ修復 ↓ ヌクレオチド除去修復 ↑	nitrosourea, procarbazine, dacarbazine, temozolomide temozolomide, cisplatin cisplatin
8. アポトーシスの抑制	変異 p53 Bcl-2 ファミリー Bcl-2, Bcl-X _L Bax decoy receptors(DcR1, 2, 3) c-FLIP IAP ファミリー(survivin)	
9. 生存シグナルの亢進	protein tyrosine kinase EGFR(変異型含め) Her2 Akt STAT3, 5 NF- κ B	

RFC: reduced folate carrier, MRP: multidrug resistance protein, FPGS: folypolyglutamate synthase, FdUMP: fluorodeoxyuridine monophosphate, ara-CTP: arabinosylcytidine 5'-triphosphate, HGPRT: hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase, GGH: γ -glutamyl hydrolase, DHFR: dihydrofolate reductase, MGMT: O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase.

が存在する。多剤耐性に関与が示唆されている MRP1 は、慢性リンパ性白血病や食道扁平上皮癌、非小細胞肺癌などで高発現が示されているが、悪性 glioma では通常低発現と報告されている⁶⁾。有機アニオンのトランスポーターである MRP2 は VCR や cisplatin の、また MRP3 は ETO や MTX の排泄にも関与していると考えられている。

b. 薬剤の不活化

薬剤の標的となる細胞内分子・器官に結合し得る活性型薬剤を阻害する解毒機能も、耐性の一因となる。Thiol glutathione (GSH) は cisplatin, carboplatin (CBDCA) などのプラチナ系抗癌剤と結合して抱合を形成し、不活化すると考えられている⁷⁾。更に GSH 抱合は ABC トランスポーターの基質となり、細胞外へ排泄が促進される。GSH 抱合は glutathione-S-transferase (GST) 酵素ファミリーにより触媒され、特に GST- π サブタイプの発現と cisplatin 耐性との関連が示唆されている。GST- π は glioma 細胞でも発現が認められるが、他癌腫と同様 cisplatin 感受性との一貫した関連はみられず⁸⁾、むしろ腫瘍の悪性度との相関が認められる⁹⁾。プラチナ系抗癌剤の不活化は metallothionein (MT) との結合によっても生じるが、その臨床上的耐性への役割はいまだ不明である。

薬剤代謝酵素群の中で還元酵素 cytochrome P450 や CYP3A4 などは、それぞれ cyclophosphamide (CPM), CPT-11 や docetaxel, gefitinib などをも不活化し、耐性の原因となることが知られているが、悪性 glioma における意義は明らかになっていない。これらの薬剤代謝酵素には単一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) を示すものがあり、SNPs のタイプにより抗癌剤毒性の程度が異なる場合があることが明らかになってきており、個別化化学療法を行ううえでの一指標として期待されている¹⁰⁾。

逆に、薬剤を活性型に変換する酵素が欠乏しても抗腫瘍効果が低下する。5-FU における dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) や CPT-11 における carboxylesterase (CE), また MTX

の細胞内貯留を増強させるポリグルタミン酸化を触媒する folypolyglutamate synthetase (FPGS) などがこの範疇に入る¹¹⁾。

c. 薬剤標的の変化

抗癌剤が抗腫瘍効果を発揮する標的となる細胞内分子に発現量の変化や遺伝子異常が生じれば、その薬剤の感受性は低下する。5-FU の標的である thymidylate synthase (TS) は、高発現となるほど耐性が増大する¹²⁾。CPT-11 の活性型代謝産物である SN-38 は、DNA 複製の際に二重らせんスーパーコイル構造をほどく DNA topoisomerase-I (topo-I) の強力な阻害剤であり、大腸癌細胞株などの *in vitro* や動物実験腫瘍モデルで、topo-I 発現レベルや遺伝子変異が CPT-11 の感受性に関与していると報告されている¹³⁾。DNA 複製に同じく重要な DNA topoisomerase-II (topo-II) は、Dox や ETO の標的分子であり、CPT-11 と同様に、topo-II の発現量の低下や遺伝子変異が癌細胞株でのこれらの薬剤への耐性と関連していることが示唆されている¹⁴⁾。

細胞骨格構成線維である microtubule は、 α , β などの tubulin サブユニットから形成されており、そのポリマー化および脱ポリマー化のダイナミックな反応は、細胞分裂期における紡錘糸形成・分離過程に必須である。Paclitaxel や docetaxel などの taxane 系薬剤や VCR などのビンカルカロイド剤は、microtubule のポリマー化過程を阻害し、その結果、細胞周期の M 期の進行を停止する作用をもつ。Microtubule ポリマー化の力学的変化や tubulin アイソタイプの発現レベルの変化は、これらの薬剤への耐性と相関することが示されている¹⁵⁾。

d. DNA 傷害修復酵素

癌細胞における DNA 修復能の程度は、DNA 傷害を誘導する抗癌剤に対する耐性度を直接的にせよ間接的にせよ規定する重要な因子と考えられる。DNA 傷害に際し、細胞は修復か死かのいずれかの経路をたどることになるが、その決定は傷害の種類、程度、細胞の種類、形質などにより一様ではない。DNA 修復機構には以下のものがある。

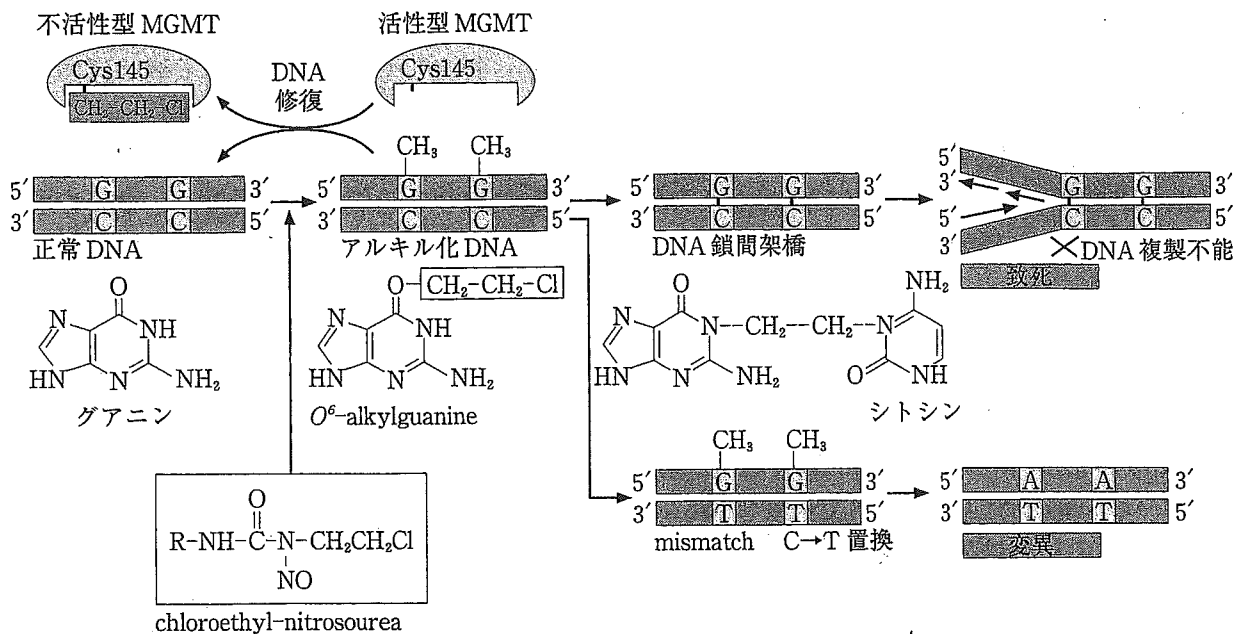


図1 MGMTによるACNU耐性の分子機序(文献¹⁶⁾より引用)

ACNUなどのニトロソウレア剤はDNAのグアニン残基のO⁶位をアルキル化し殺細胞効果を発揮する。MGMTは付加されたアルキル基を除去することでDNAを正常化する作用をもつ。

1) O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT/AGT)

BCNUやACNUなどのニトロソウレア系抗癌剤や、procarbazine(PCZ)やtemozolomide(TMZ)などは、主として核DNA中のguanine残基のO⁶部位を標的に、ニトロソウレアはアルキル基を、PCZやTMZはメチル基を付加し、O⁶-alkylguanine(AG)あるいはO⁶-methylguanine(MG)を形成する。O⁶-AGは更に相補的なDNA鎖のcytosineと不可逆的で致命的なDNA鎖間架橋を形成する。O⁶-MGはDNA複製の際にthymineとミスマッチを生じ、DNAの変異が誘導される。MGMTは単独でO⁶部位のアルキル基を除去し、DNAを正常に復すと同時にMGMT自身は不活化される自殺酵素であり、他のDNA修復機構とは異なる特徴を有している(図1)^{16,17)}。このような作用から、MGMT活性が高ければ、ニトロソウレア剤やTMZへの耐性が生じると考えられる。Gliomaを含め各臓器癌由来の細胞株を用いた実験で、各細胞株のMGMT活性あるいは発現量がACNU耐性度とよく相関することが報告されており¹⁸⁾、またMGMTを高発現しているglioma症例では、有

意に早期の腫瘍再発が認められた¹⁹⁾。Glioma手術標本では70%以上にMGMTの発現が検出されており²⁰⁾、悪性glioma化学療法の第一選択剤であるニトロソウレア剤や最近のランダム化臨床試験において有意な生存率向上効果が報告されたTMZ²¹⁾に対する耐性機序の重要な一因になると考えられる。またMGMT遺伝子プロモーター領域のメチル化とニトロソウレア剤やTMZ治療への反応性に相関がみられ、独立した予後因子となることが示されている²²⁾。

2) DNA ミスマッチ修復機構(DNA mismatch repair: MMR)

MMRに関与する遺伝子の中で、特にhMLH1とhMSH2は、遺伝性非ポリポーシス性大腸癌(HNPCC)などの家族性腫瘍や様々な癌腫において遺伝的に欠失していることが知られている。MMRはDNA複製中に生じた単塩基ミスマッチを検出し除去する作用をもち、その欠失はmicrosatellite instability(MSI)形質を惹起する。MMR欠失は、プラチナ系抗癌剤やTMZなど多くのDNA傷害性抗癌剤に対する耐性の一因となることが実験的に示されており²³⁾、hMLH1やhMSH2の欠失やhMLH1遺伝子プロモーター

領域のメチル化と cisplatin 耐性の関連が報告されている²⁴⁾。ただ新規のプラチナ系抗癌剤である oxaliplatin に対する作用はみられていない。DNA 損傷部を MMR が認識することによるアポトーシス経路の活性化や、MMR による DNA 修復が不完全な形で繰り返されることで致命的 DNA 鎖の切断が生じることなどが MMR 存在下における殺細胞機構とされており、その欠如により耐性が生じる可能性が考えられている。Dox などの topo-II 標的抗癌剤も、MMR 活性の喪失により耐性が生じる²⁵⁾。Glioma を含む脳腫瘍では、小児例を除き成人症例で一般に MMR 欠損や MSI の検出は少なく、成人悪性 glioma では免疫染色により MMR 蛋白の MLH1 や MSH2 の発現が 8 割以上の症例で 60% 以上の腫瘍細胞に陽性となることが報告されている²⁶⁾。自験例でも、ほとんどの症例で MLH1, MSH2, MSH6 の発現が Western blot にて検出され²⁷⁾、glioma における MMR 欠失と TMZ や cisplatin 耐性との関連性については、今後の更なる検討が必要である。

3) ヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair: NER)

比較的大きな付加体や複数塩基にまたがる損傷、すなわち架橋形成など比較的広範な DNA 損傷は NER により修復される。NER は、特にプラチナ系抗癌剤による DNA 傷害の主要な修復機構と考えられている。NER 経路の欠如により cisplatin に対して高度感受性となり、NER 活性を回復させると、ほぼ正常の感受性になることが示された²⁸⁾。NER 機構には少なくとも 17 種類の蛋白が関与しているが、特に律速段階を規定する因子として、excision repair cross-complementing 1 protein (ERCC1) が重要とされている。ERCC1 を高発現する癌細胞では cisplatin 耐性が認められ、また、卵巣癌、胃癌、非小細胞肺癌に対するプラチナ系抗癌剤を用いた化学療法において、反応不良症例と ERCC1 の高発現の間に相関が認められている。同じく NER の主要素である xeroderma pigmentosum group A (XPA) の高発現も cisplatin 耐性と関連がみられている。

e. 細胞周期停止とアポトーシス

近年、細胞死や細胞増殖の分子機序に関する分子生物学的研究が飛躍的に発展し、上記の定型的薬剤耐性関連因子に加え、化学療法への反応性に関与する遺伝子群が明らかとなってきた (図 2)。前述のごとく、抗癌剤治療に反応して、腫瘍細胞には細胞周期停止か細胞死が誘導されるが、この反応に最も関与するのが固形癌で最も遺伝子異常が検出されている TP53 遺伝子である。TP53 遺伝子変異は glioma においても約半数近くの腫瘍標本で悪性度にかかわらず検出されることから、glioma 形成の初期の遺伝子異常であると考えられており、最も悪性度の高い WHO grade IV の膠芽腫 (glioblastoma: GBM) の中では低悪性度の病巣が先行して存在する 'secondary GBM' に高頻度で認められている²⁹⁾。DNA 傷害により ATM, ATR, DNA-PK などの上流の kinase が活性化され、その結果 TP53 遺伝子産物の p53 蛋白が直接的、間接的に活性化される。p53 の転写活性により細胞周期停止に関与する p21^{WAF1}, GADD45 などの蛋白や、アポトーシスに関与する Bax, Noxa, TRAIL-R2 (DR5), Fas, AIP1 などの蛋白群の発現が誘導されるが、どちらの反応が優位になるかは様々な要因により一定ではない。これまでの実験結果から、p53 の機能障害は薬剤耐性や p53 依存性細胞死の誘導能障害をもたらすと考えられている。ところが、5-FU, cisplatin, CPT-11, paclitaxel などを用いた臨床研究では、p53 異常と治療反応性や予後との相関が必ずしも認められておらず、免疫染色での陽性所見 (通常 TP53 遺伝子異常を反映する) と遺伝子異常間の相違や特殊な TP53 genotype との関連などが一因との見方もある。Glioma においても、野生型 p53 の glioma 細胞では化学療法反応性が良好とする報告³⁰⁾がある一方、TP53 遺伝子異常は GBM 症例の予後と相関がみられないとする報告³¹⁾や、p53 免疫染色陽性の anaplastic astrocytoma (AA) で予後の延長がみられたとする報告³²⁾など、一定の見解は得られていない。

乳癌の原因遺伝子の一つとされる BRCA1 も、同様に DNA 傷害の sensor としての機能が注目

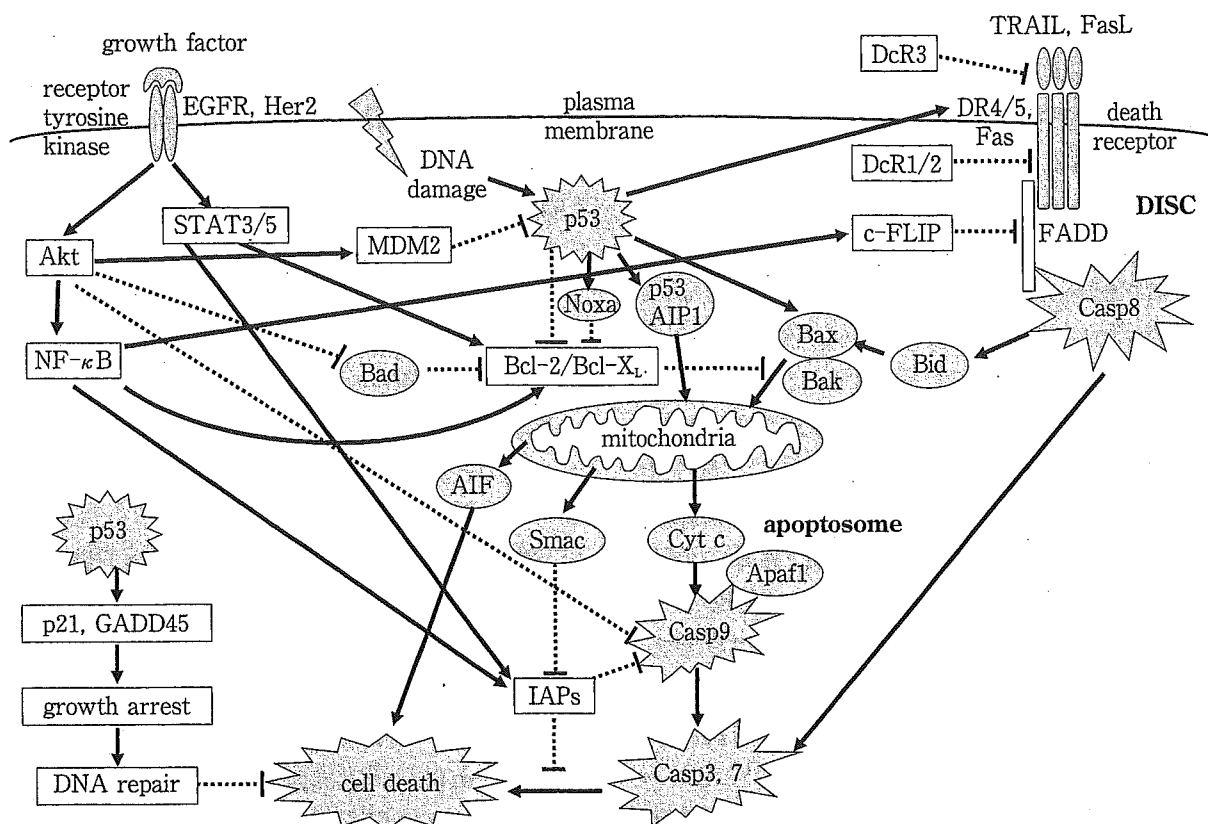


図2 アポトーシスを促進・抑制するシグナル伝達機構

抗癌剤反応性を規定する可能性がある細胞内分子・シグナルを示す。→：促進・亢進，
--|：抑制・阻害を表す。詳細は、本文参照のこと。

Casp3: caspase-3, Casp7: caspase-7, Casp8: caspase-8, Casp9: caspase-9, Cyt c: cytochrome c, DISC: death-inducing signaling complex.

されている。BRCA1は様々なDNA修復過程に関与している可能性が示されており、MMR蛋白と複合体を形成することも報告されたが³³⁾，gliomaにおける意義については明らかではない。

f. アポトーシス制御因子

化学療法の究極目標が腫瘍細胞を死滅させることにあることから、細胞死、特に生体内で誘導されるアポトーシスの制御因子が治療反応性に重要な役割を果たす可能性が考えられる。アポトーシスの細胞内シグナル経路は、主としてミトコンドリアを介し、Bcl-2ファミリー蛋白が関与する内因性経路と、death receptorからの直接的caspase活性化をもたらす外因性経路の2経路がある(図2)。前者は様々な細胞傷害性刺激により活性化され、Bcl-2ファミリー蛋白による制御の下、ミトコンドリアからのcy-

tochrome cの放出とともにcaspase-9, Apaf1, dATPとの複合体(apoptosome)が形成され、下流のeffector caspaseが活性化される。Bcl-2ファミリー蛋白の化学療法反応性への影響は精力的に調べられてきており、一般にアポトーシス抑制作用をもつBcl-2, Bcl-X_Lや促進作用をもつBaxの発現レベルと、化学療法によるアポトーシス誘導とはそれぞれ負と正の相関が*in vitro*で認められている。ところが、臨床研究ではその関係は一定の傾向を示しておらず、その一因として重複する作用をもつメンバー蛋白の存在が指摘されている。予後因子としての臨床応用にはBcl-2ファミリー分子の包括的な発現解析が必要と考えられる。

外因性経路では細胞膜表面に発現しているFas(CD95), TRAIL-R1(DR4), TRAIL-R2(DR5)などのTNF receptorファミリーと呼ばれる

‘death receptor’ から、それぞれ ligand である FasL や TRAIL (Apo2L) との結合により細胞死シグナル伝達が生じ、主に FADD を介して上流 caspase である caspase-8 が活性化され、引き続き下流の caspase-3 などの effector caspase が活性化される。外因性経路と内因性経路の間には Bcl-2 ファミリーの Bid を介したクロストークも存在し、アポトーシスのシグナルが増強される。

通常、化学療法や放射線治療による細胞傷害は内因性経路を介し生じると考えられており、直接的な殺細胞効果を発揮する外因性経路、death receptor を標的とする治療は従来の治療への耐性をバイパスし得る新規の治療法として期待されている。実際、glioma 細胞に対して cisplatin や ETO と可溶性 TRAIL の併用療法は相乗的にアポトーシスを誘導し、強力な抗腫瘍効果を示すことが示されている³⁴⁾。

このようなアポトーシスのシグナル伝達を阻害する因子が存在し、細胞死誘導治療に対する耐性の原因になり得ると考えられている。Death receptor レベルでは、競合的に負の作用をもたらす decoy receptor 群の DcR1, DcR2, DcR3 がある。細胞質内の因子としては、FADD のレベルで阻害する c-FLIP があり、*in vitro* ではその発現により death receptor 由来のアポトーシスが阻害されることが示されているが、臨床上的意義についてはまだ十分な検討が行われていない。Caspase のレベルでの阻害を担うのは IAP ファミリー蛋白で、c-IAP1, c-IAP2, XIAP, survivin が含まれる。特に survivin は多くの癌腫で高発現が検出されており³⁵⁾、更に survivin の低発現と化学療法への反応性や予後の良好な相関が臨床研究でも報告されており、重要な予後因子となる可能性が示唆されている。

g. 生存シグナル

チロシンキナーゼ (protein tyrosine kinase: PTK) は glioma を含む多くの癌腫で活性化をもたらす遺伝子異常が認められており、アポトーシスを抑制する作用をもつため薬剤耐性に重要な役割を果たすと考えられる³⁶⁾。悪性 glioma で高頻度に遺伝子増幅や再配列、高発現がみら

れる EGFR や、特に乳癌で高発現がみられる Her2 (ErbB2/Neu) は薬剤耐性の原因となることが報告されている。著者らは glioma で最も高頻度に認められる変異型 EGFR (EGFRvIII, ΔEGFR) の発現により、抗アポトーシス分子である Bcl-X_L の発現が亢進し、薬剤耐性となることを報告した³⁷⁾。PTK は分子標的治療の対象として注目されており、EGFR に対する小分子阻害剤 gefitinib (Iressa®) や Her2 に対するヒト化抗体 trastuzumab (Herceptin®) は既に我が国でもそれぞれ肺癌や乳癌に対して認可されている。

活性化した PTK の下流で重要な分子は phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) と Akt である。受容体 PTK により PI3K が活性化され、その結果 Akt がリン酸化を受け活性化する。Akt は Bcl-2 ファミリーの Bad や Bcl-X_L, caspase-9 や NF-κB, mTOR, 更には p53 活性にも作用し抗アポトーシス作用を発揮する。GBM で高頻度に欠失・変異が認められる PTEN²⁹⁾ は、Akt の活性化を阻害する作用を有することから、悪性 glioma では Akt 活性が亢進しているものと考えられる。PI3K/Akt 経路の活性化により化学療法耐性となり³⁸⁾、逆にそのシグナルを阻害することで治療効果が高まることが示されており、この経路の阻害剤も、新規の治療薬として期待されている。

PTK の下流で主として JAK キナーゼによるリン酸化で活性化される STAT 蛋白、特に STAT3, STAT5 は、多くの癌腫で恒常的な活性化が示されているとともに、核内に移行して直接転写因子として Bcl-X_L, survivin などの転写することが報告されている。抗アポトーシス作用を有し、その発現・活性度は化学療法反応性に影響することが示されており、今後治療標的として検討されていくであろう³⁹⁾。

転写因子の NF-κB は細胞増殖促進作用とアポトーシス抑制作用を有する発癌関連因子であり⁴⁰⁾、抗アポトーシス分子である IAP 蛋白、c-FLIP, Bcl-2, Bcl-X_L などの転写を促進することが知られている。一方、cisplatin や 5-FU など数々の抗癌剤が NF-κB を活性化することが