

Fig. 1 Kaplan-Meier estimates of overall survival by treatment

- A : A meta-analysis comparing radiotherapy (RT) and RT+chemotherapy (nitrosoureas) (modified from Stewart LA, et al).
 B : Statistically significant survival advantage of patients treated by RT+temozolomide (TMZ) (modified from Stupp R, et al).

放射線照射に ACNU を併用する方法が、少数例であるがランダム化比較試験によって検証された¹²⁾。やはり有意の生存期間延長効果は認められなかったが、腫瘍縮小率が放射線照射単独群に比べて優れていたことから、膠芽腫・退形成性星細胞腫の術後治療には放射線照射と ACNU を併用する方法が、いわば community standard として広く行われることとなった。

これらの臨床試験を後追する形で、いわゆる meta-analysis が行われた。膠芽腫・退形成性星細胞腫における術後放射線照射に化学療法を併用する治療法を検証した meta-analysis は 2 篇発表されている^{3,5)10)}、特に Glioma Meta-analysis Trialists Group の報告によると、12 のランダム化比較試験、3,004 例の症例を集めて解析した結果、化学療法併用による有意の生存期間延長効果が示された。この解析において *p* 値は 0.0001 以下であり hazard ratio (HR) は 0.85 (95%信頼区間 0.78~0.92) であった (Fig. 1)¹⁰⁾。以上のようにして、これまでアメリカあるいはわが国では、膠芽腫・退形成性星細胞腫に対しては、術後放射線照射にニトロソウレアを併用する治療が広く行われてきた。

一般に第Ⅲ相試験における対照アームとなる治療法としては、その時点において最も生存期間の優れている「標準的治療」が用いられる。ヨーロッパでは、上述のように個々の臨床試験で放射線照射に化学療法を併用することによる生存期間延長効果が証明されていなかったことから、膠芽腫・退形成性星細胞腫に対する「標準的治療」は、術後放射線照射単独と考えられていた。したがって temozolomide と放射線照射併用に関する第Ⅲ相試験の対照アームとしては、放射線照射単独が採用された。

Temozolomide はアルキル化剤に分類される抗腫瘍薬で、血漿中など生理的条件下で容易に加水分解され、5-

[(1*Z*)-3-methyltriazene-1-yl]-1*H*-imidazole-4-carboxamide (MTIC) に変換される⁶⁾。この反応は酵素反応ではないために人種差がないと考えられているが、事実わが国において行われた薬物動態試験においても、血中濃度の動態は欧米における報告と同様であった¹⁾。MTIC は速やかに分解され、活性本体であるメチルジアゾニウムイオンを生成し、DNA のアルキル化分子として作用する。Temozolomide は未変化体のまま血液脳関門を通過することが確認されている⁷⁾。そのため、temozolomide の脳腫瘍に対する効果は、血中で生成され循環する MTIC による抗腫瘍作用に加えて、未変化体の temozolomide が血液脳関門を通過し標的部位に移行した後に局所で生成される MTIC による抗腫瘍作用の両者の寄与が考えられている。

The European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) と The National Cancer Institute of Canada は、共同で膠芽腫を対象とし術後放射線照射に temozolomide を併用する治療法を、術後放射線照射単独と比較する第Ⅲ相試験を行った¹¹⁾。Temozolomide は、照射中は 75 mg/m² を連日内服、照射後は 150~200 mg/m² を 28 日ごとに連続 5 日間内服するサイクルを 6 サイクル行う方法で投与された。結果、放射線照射単独群と比較して、統計学的に有意の生存期間延長効果が示され、*p* 値は 0.001 未満、HR は 0.63 (95%信頼区間 0.52~0.75) であった。生存期間中央値は、放射線照射単独群 12.1 カ月に対して、temozolomide 併用群 14.6 カ月であった (Fig. 1)。Grade 3/4 の血液毒性は、放射線照射との併用時期に 7%、temozolomide 単独投与時期に 14%、またその他の有害事象のほとんどは放射線照射群と発生頻度に大きな差はなかったと報告されている。

この報告によって膠芽腫における標準的治療は、術後

退形成性乏突起膠腫に対する化学療法 (PCV) の評価

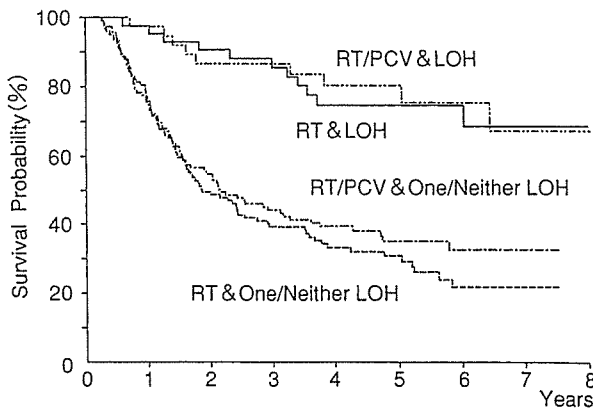


Fig. 2 Overall survival in radiotherapy (RT) and RT+PCV groups with and without combined 1p/19q loss of heterozygosity (LOH).

RT; radiotherapy, PCV; procarbazine, CCNU, and vincristine. (modified from van den Bent MJ, et al)

放射線照射と照射中ならびに照射後の temozolomide 併用となった。ただし対象アームは放射線照射単独であるので、アメリカおよびわが国で、これまで事実上の標準的治療として行われてきた放射線照射ニトロソウレア併用治療との比較を行うべきかどうかという問題が残った。これまでの標準的治療が放射線照射とニトロソウレアの併用治療であるという立場に立つのであれば、temozolomide との第Ⅲ相試験を行うべきである。これまでニトロソウレアを使用してきたのは、いわば実際の臨床現場からの要請によるものであり、科学的には放射線照射単独が標準的治療であったという立場に立つのであれば、また前述のように meta-analysis においてもニトロソウレア併用による HR の差が 15% であるのに対して、temozolomide 併用による HR の差は 37% であり、すでにニトロソウレアとの比較は意味がないという立場に立つのであれば、次に行うべきは、temozolomide 併用放射線照射を標準的治療として、別の新規治療と比較する第Ⅲ相試験であるとも考えられる。また temozolomide と ACNU を比較する第Ⅲ相試験を行うとしても、現在、Japan Clinical Oncology Group (JCOG) の脳腫瘍研究グループが行っている放射線照射+ACNU と放射線照射+ACNU+procarbazine を比較する第Ⅲ相試験終了後に開始するのでは、およそ 5 年後のことになってしまう。これらの点については、JCOG 脳腫瘍研究グループを中心に議論が行われている最中であり、今後の動向を注目していただきたい。

退形成性乏突起膠腫が procarbazine+CCNU+vincristine (PCV) による化学療法に高い感受性を示すこと、さらにその感受性が染色体 1p と 19q の欠失の有無と関連していることは、20 世紀末の大きなトピックであった²⁾。EORTC と Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) は、別個の方法で第Ⅲ相試験を行ったが、その結果が発表された³⁾¹⁴⁾。両者の結果はほぼ同様であるが、RTOG のプロトコールは、放射線照射前に PCV を行う方法で行われ、PCV の dose もやや多くなっているため、ここでは放射線照射後に通常量の PCV を行っている EORTC の結果を中心に紹介し考察する。

まず、予想に反して、放射線照射に PCV を加えることによる生存期間延長効果は、いずれの試験によっても証明されなかった。しかし、再発までの期間においては、PCV を加えた群が有意に延長していた。再発後の治療は、PCV あるいは temozolomide を中心に行われていた。すなわち PCV には一定の効果が認められたが、初回治療は放射線照射単独で行い再発後に化学療法を行っても、初回から化学療法を併用しても、最終的な生存期間の観点からは同等であったということである。PCV を併用した群においては grade 3/4 の有害事象が 65% の症例で見られているので³⁾、PCV が初回から行うべき治療であるかどうかは慎重な検討を要するものと考えられる。染色体 1p と 19q の欠失の有無で解析すると、確かに染色体欠失のある群の生存期間は有意に優れていたが、これは PCV を行っても行わなくても違いがなかった (Fig. 2)。つまり、染色体欠失のある退形成性乏突起膠腫の予後が良いのは PCV が有効だからではなく、腫瘍本来の特徴であるという可能性が指摘された。

Fig. 2 には染色体欠失のない群の生存曲線も描かれているが、その生存期間中央値はおよそ 2 年と読み取れる。これは、退形成性星細胞腫における生存期間中央値とほぼ同等である。病理組織学的にも、退形成性星細胞腫と退形成性乏突起膠腫あるいは退形成性乏突起星細胞腫の区別は、神経病理学者の間においても確定していないといわれている⁴⁾⁹⁾。したがって、むしろこれらを「退形成性神経膠腫」として一括して扱い、「染色体欠失のある退形成性神経膠腫」と「染色体欠失のない退形成性神経膠腫」と分類したほうが臨床的には有用であるのではないかとの考え方が成り立つ可能性がある。

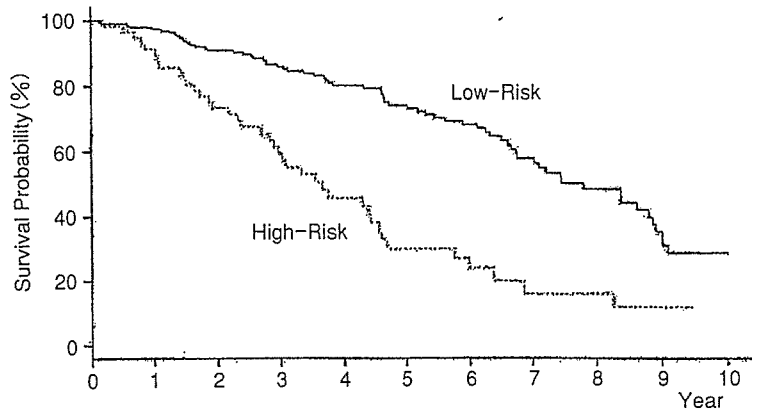


Fig. 3 Overall survival of low-grade glioma in risk groups (modified from Pignotti F, et al).

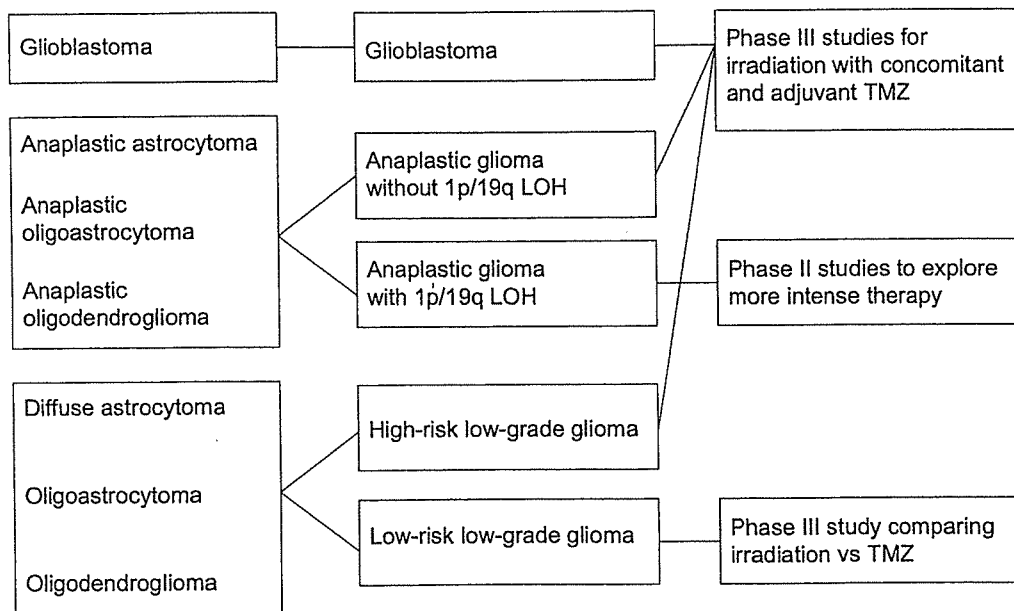


Fig. 4 Proposed treatment strategies for malignant gliomas

星細胞腫の治療をどう考えたらよいか

星細胞腫に対して放射線照射や化学療法をすべきかどうかという議論が古くから行われてきた。悪性度が低く、生存期間が長い腫瘍であるから、放射線照射はともかくとしても、化学療法は必要がないのではないかという主張がある。放射線照射については、やはり EORTC が第 III 相試験を行い、放射線照射を行ったほうが再発までの期間は短い、再発後に放射線照射を行えば最終的な生存期間では変わらないと報告している¹³⁾。実地医療における実感として、比較的小さいうちに発見されればほぼ全摘されたような腫瘍であれば、かなり長い生存期間が期待されよう。一方、いわゆる eloquent area に発生した大きな腫瘍などでは、比較的早期に悪性転化していく症例を

経験する。前者のような状況であれば、照射をしないで経過をみるという選択もありえるであろうし、後者のような状況であれば、むしろ初期治療の段階から積極的に放射線照射と化学療法を行ったほうが長い生存期間を得ることができるような症例も存在するであろう。これをどのようにして判別したらよいかという疑問があった。前述の EORTC の試験のデータを用いて星細胞腫の予後因子を解析し、この疑問への解答を示唆した論文が発表されている⁸⁾。

まず予後因子の解析から、① 40 歳以上、② 腫瘍径 6 cm 以上、③ 腫瘍が正中を越える、④ 組織学的に乏突起膠腫成分を含まない、⑤ 神経学的症状を呈する、という 5 つの予後不良因子が抽出された。次に、それぞれの因子に 1 点ずつを与え、0~2 点の腫瘍を low-risk 群、3~

5点の腫瘍を high-risk 群と分類し、それぞれの生存曲線を描くと、両群はきれいに分離され、low-risk 群の生存期間中央値は 7.8 年、high-risk 群の生存期間中央値は 3.67 年、HR=1.83 (95%信頼区間 1.48~2.26) であった。すなわちこの high-risk 群の生存期間は退形成性神経膠腫に匹敵する (Fig. 3)。したがって、high-risk の星細胞腫・乏突起膠腫・乏突起星細胞腫は、「染色体欠失のない退形成性神経膠腫」と同様に扱って放射線照射と化学療法を行うべきであるという仮説が提唱され、これは現在欧米で検証中である。また low-risk の星細胞腫・乏突起膠腫・乏突起星細胞腫においては、放射線照射を行う群と照射せずに temozolomide で治療する群を比較する第Ⅲ相試験が EORTC によって進行中である。

まとめ

以上に述べたようなエビデンスに基づき、臨床的見地に立った悪性神経膠腫の再分類と治療方針を図に示した (Fig. 4)。膠芽腫は放射線照射と temozolomide の併用治療が標準的治療となり、今後はこの治療法に対して新しい治療法を比較していく方向に進むものと考えられる。退形成性乏突起膠腫に対する PCV 療法は、再発までの期間を延長する効果は認められるが副作用が強く、また初期治療は放射線照射単独で行って置いて再発後に化学療法を行っても生存期間は変わらないことが示された。退形成性星細胞腫・退形成性乏突起膠腫・退形成性乏突起星細胞腫はあえて区別せずに、染色体 1p と 19q の欠失の有無によって、欠失のある退形成性神経膠腫と染色体欠失のない退形成性神経膠腫の 2 群に分けて方針を立てることが提唱されつつある。前者については膠芽腫と同様の放射線照射と temozolomide 併用治療の有効性が検証中であり、後者は予後の良い疾患単位と考え、より適切で強力な治療方法が第Ⅱ相試験のレベルで検証される必要があると考える。星細胞腫は、予後因子の解析から high-risk 群と low-risk 群に分けて扱うべきであるとの考え方があり、前者はやはり膠芽腫と同様の放射線照射と temozolomide 併用治療の有効性が検証されつつあり、後者については放射線照射単独と放射線照射はせずに temozolomide 単独で治療する方法を比較する第Ⅲ相試験が進行中である。

最後に、ここに示した治療方針は、あくまで確立した治療方針ではなく、今後の臨床試験の方向性を示したものであること強調しておきたい。わが国の臨床試験が、このような最先端の動向に寄与できるようにエビデンスを作ることができるようになる日を切に希望している。

- 1) Aoki T, Nishikawa T, Mizutani T, Nojima K, Ishikawa M, Mishima K, Adachi J, Matsutani M: Pharmacokinetics of temozolomide in the Japanese patients with relapsed glioma. (in preparation)
- 2) Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR, Silver JS, Satrk PC, Macdonald DR, Ino Y, Ramsay DA, Louis DN: Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst* 90: 1473-1479, 1998.
- 3) Cairncross G, Berkey B, Shaw E, Jenkins R, Scheithauer B, Brachman D, Buckner J, Fink K, Souhami L, Laperierre N, Mehta M, Curran W: Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group trial 9402. *J Clin Oncol* 24: 2707-2714, 2006.
- 4) Coons SW, Johnson PC, Scheithauer BW, Yates AJ, Pearl DK: Improving diagnostic accuracy and interobserver concordance in the classification and grading of primary gliomas. *Cancer* 79: 1381-1393, 1997.
- 5) Fine HA, Dear KBG, Loeffler JS, Black PM, Canellos GP: Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults. *Cancer* 71: 2585-2597, 1993.
- 6) Newlands ES, Stevens MF, Wedge SR, Wheelhouse RT, Brock C: Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treat Rev* 23: 35-61, 1997.
- 7) Ostermann S, Csajka C, Buclin T, Leyvraz S, Lejeune F, Decosterd LA, Stupp R: Plasma and cerebrospinal fluid population pharmacokinetics of temozolomide in malignant glioma patients. *Clin Cancer Res* 10: 3728-3736, 2004.
- 8) Pignatti B, van den Bent M, Curran D, Debruyne C, Sylvester R, Therasse P, Afra D, Cornu P, Bolla M, Vecht C, Karim ABMF: Prognostic factors for survival in adult patients with cerebral low-grade glioma. *J Clin Oncol* 20: 2076-2084, 2002.
- 9) Smith JS, Alderete B, Minn Y, Borell TJ, Perry A, Mohapatra G, Hosek SM, Kimmel D, O'Fallon J, Yates A, Feuerstein BG, Burger PC, Scheithauer BW, Jenkins RB: Localization of common deletion regions on 1p and 19q in human gliomas and their association with histological subtype. *Oncogene* 18: 4144-4152, 1999.
- 10) Stewart LA, Glioma meta-analysis Trialists Group: Chemotherapy in adult high-grade glioma: A systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet* 359: 1011-1018, 2002.
- 11) Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer R, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross G, Eisenhauer E, Mirimanoff RO: Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352: 987-996, 2005.
- 12) Takakura K, Abe H, Tanaka R, Kitamura K, Miwa T, Takeuchi K, Yamamoto S, Kageyama N, Handa H, Mogami H, Nishimoto A, Uozumi T, Matsutani M, Nomura K: Effects of ACNU and radiotherapy on malignant glioma. *J Neurosurg* 64: 53-57, 1986.
- 13) van den Bent MJ, Afra D, de Witte O, Ben-Hassel M,

- Schraub S, Hoang-Xuan K, Malmstrom PO, Collette L, Pierart M, Mirimanoff R, Karim ABM: Long-term efficacy of early versus delayed radiotherapy for low-grade astrocytoma and oligodendroglioma in adults: The EORTC 22845 randomised trial. *Lancet* 366: 985-990, 2005.
- 14) van den Bent MJ, Carpentier AF, Brandes AA, Sanson M, Taphoorn MJB, Bernsen HJJA, Frenay M, Tjissen CC, Grisold W, Sipos L, Haaxma-Reiche H, Kros JM, von Kouwenhoven MCM, Vecht CJ, Allgeier A, Lacombe D, Gorlia T: Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine improves progression-free survival but not overall survival in newly diagnosed anaplastic oligodendrogliomas and oligoastrocytomas: A randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase III trial. *J Clin Oncol* 24: 2715-2722, 2006.
- 15) Walker MD, Alexander E Jr, Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley Ms Jr, Mealey J Jr, Norrell HA, Owens G, Ransohoff J, Wilson CB, Gehan EA, Strike TA: Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. *J Neurosurg* 49: 333-343, 1978.
- 16) Walker MD, Green SB, Byar DP, Alexander E Jr, Batzdorf U, Brooks WH, Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MS Jr, Mealey J Jr, Owens G, Ransohoff II, Robertson JT, Shapiro WR, Smith KR Jr, Wilson CB, Strike TA: Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. *N Engl J Med* 303: 1323-1329, 1980.

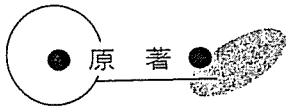
要 旨

悪性神経膠腫の治療戦略 2006

西川 亮

放射線照射に temozolomide を併用する方法を検証した第Ⅲ相試験により、初めて膠芽腫における化学療法による有意の生存期間延長効果が示された。退形成性乏突起膠腫においては、放射線照射に PCV 療法を併用する治療法は、有意の生存期間延長効果を示さなかった。また染色体 1p と 19q の欠失を有する場合は、別個の腫瘍群として扱うべきであることが示唆された。Low-grade の神経膠腫では、年齢、組織型、腫瘍径、神経学的症候などが予後因子として抽出され、これらの組み合わせにより low-risk 群と high-risk 群に大別できることが示された。これらのエビデンスに基づいて、現時点における悪性神経膠腫の治療方針を考察した。

脳外誌 15: 694-699, 2006



初回再発の退形成性星細胞腫患者に対する Temozolomide 単剤投与の有効性および安全性の検討

—多施設共同第II相試験—

西川 亮*¹ 渋井壮一郎*² 丸野 元彦*³ 杉山 一彦*⁴ 佐藤 慎哉*⁵
 藤巻 高光*⁶ 高橋 英明*⁷ 若林 俊彦*⁸ 高橋 潤*⁹ 河内 正人*¹⁰
 中村 英夫*¹¹ 澤村 豊*¹² 池田 潤*¹³ 堀 智勝*¹⁴ 青木 友和*¹⁵
 松谷 雅生*¹

[*Jpn J Cancer Chemother* 33(9): 1279-1285, September, 2006]

Efficacy and Safety of Monotherapy with Temozolomide in Patients with Anaplastic Astrocytoma at First Relapse—A Phase II Clinical Study: Ryo Nishikawa*¹, Soichiro Shibui*², Motohiko Maruno*³, Kazuhiko Sugiyama*⁴, Shinya Sato*⁵, Takamitsu Fujimaki*⁶, Hideaki Takahashi*⁷, Toshihiko Wakabayashi*⁸, Jun Takahashi*⁹, Masato Kochi*¹⁰, Hideo Nakamura*¹¹, Yutaka Sawamura*¹², Jun Ikeda*¹³, Tomokatsu Hori*¹⁴, Tomokazu Aoki*¹⁵ and Masao Matsutani*¹ (*¹Dept. of Neurosurgery, Saitama Medical University, *²Neurosurgery Division, National Cancer Center Hospital, *³Dept. of Neurosurgery, Osaka University Graduate School of Medicine, *⁴Dept. of Neurosurgery, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, *⁵Dept. of Neurosurgery, Yamagata University Faculty of Medicine, *⁶Dept. of Neurosurgery, Teikyo University School of Medicine, *⁷Dept. of Neurosurgery, Brain Research Institute, Niigata University, *⁸Center for Genetic and Regenerative Medicine, Nagoya University Hospital, *⁹Dept. of Neurosurgery, Kyoto University Graduate School of Medicine, *¹⁰Dept. of Neurosurgery, Faculty of Medical and Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University (currently with San-ai Hospital), *¹¹Dept. of Neurosurgery, Faculty of Medical and Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, *¹²Dept. of Neurosurgery, Hokkaido University Faculty of Medicine, *¹³Dept. of Neurosurgery, Hokkaido University Faculty of Medicine (currently with Hokkaido Cancer Center Hospital), *¹⁴Dept. of Neurosurgery, Neurological Institute, Tokyo Women's Medical University, *¹⁵Dept. of Neurosurgery, Brain Tumor Center, Kitano Hospital)

Summary

The efficacy and safety of temozolomide were evaluated in 32 patients with anaplastic astrocytoma at first relapse. Temozolomide was administered orally once daily for the first five days of a 28-day cycle, at a dose of 150 or 200 mg/m²/day. The response rate determined by independent central review of MRI was 34% (95% confidence interval: 18.6%-53.2%), with 3 complete response and 8 partial response. The rate of "no change or better" was 91% (95% confidence interval: 75.0%-98.0%). Progression-free survival (PFS) at 6 months was 40.6%, and the median PFS was 4.1 months.

The incidence of constipation (50%) and nausea (25%) was high, but these events were all mild or moderate in severity except in one subject with constipation, and could be managed with standard laxatives and antiemetics. The main laboratory test abnormalities (total incidence and incidence of grade 3/4 change) were lymphocytopenia (50%, 25%), neutropenia (47%, 6%), leukopenia (38%, 3%), thrombocytopenia (31%, 9%), and increased GPT

*² 国立がんセンター中央病院・脳神経外科
 *³ 大阪大学大学院医学系研究科・脳神経外科
 *⁴ 広島大学大学院医歯薬学総合研究科・脳神経外科
 *⁵ 山形大学医学部・脳神経外科
 *⁶ 帝京大学医学部・脳神経外科
 *⁷ 新潟大学脳研究所・脳神経外科
 *⁸ 名古屋大学医学部附属病院遺伝子・再生医療センター
 *⁹ 京都大学大学院医学研究科・脳神経外科

*¹⁰ 熊本大学大学院医学薬学研究部・脳神経外科学分野
 (現 医療法人社団三愛会三愛病院・脳神経外科)
 *¹¹ 熊本大学大学院医学薬学研究部・脳神経外科学分野
 *¹² 北海道大学医学部・脳神経外科
 *¹³ 北海道大学医学部・脳神経外科
 (現 北海道がんセンター・脳神経外科)
 *¹⁴ 東京女子医科大学脳神経センター・脳神経外科
 *¹⁵ 財団法人田附興風会北野病院・脳神経外科脳腫瘍センター

(25%, 3%)。

Temozolomide was shown to have good efficacy and tolerability in patients with anaplastic astrocytoma at first relapse. Key words: Anaplastic astrocytoma, Temozolomide, Phase II study (Received May 26, 2006/Accepted Jul. 18, 2006)

要旨 初回再発の退形成性星細胞腫患者 32 名を対象とした temozolomide の多施設共同第 II 相試験を行い、有効性と安全性を評価した。temozolomide は 28 日間を 1 クールとし、各クルールの初めの 5 日間に 150 または 200 mg/m²/日を 1 日 1 回連日経口投与した。全登録例における奏効率は 34% (11/32) (95%信頼区間 18.6%~53.2%) で、奏効例の内訳は著効 3 例、有効 8 例であった。不変以上であった症例の割合は 91% (29/32) (95%信頼区間 75.0%~98.0%) であった。また、6 か月無増悪生存率は 40.6%、無増悪生存期間の中央値は 4.1 か月であった。

自覚症状の有害事象においては便秘 (50%)、悪心 (25%) の発現頻度が高かったが、これらは便秘の 1 例を除いてすべて中等度以下の重症度で、標準的な緩下剤あるいは制吐剤でコントロール可能であった。主たる臨床検査値異常変動は、リンパ球数減少 (50%, grade 3 以上 25%)、好中球数減少 (47%, grade 3 以上 6%)、白血球数減少 (38%, grade 3 以上 3%)、血小板数減少 (31%, grade 3 以上 9%)、GPT 増加 (25%, grade 3 以上 3%) であった。temozolomide は初回再発の退形成性星細胞腫に対して優れた奏効率と忍容性を示した。

はじめに

神経膠腫は脳腫瘍の 25% を占める¹⁾。神経膠腫に対する治療方法は確立されているとはいえ、治療成績も 1980 年代からほとんど進歩していない。特に退形成性星細胞腫 (anaplastic astrocytoma: AA) や膠芽腫 (glioblastoma: GBM) といった WHO 脳腫瘍悪性度 grade III/IV に相当するいわゆる悪性神経膠腫の治療成績は不良で、それぞれの 5 年生存率は 24% と 7% でしかない¹⁾。temozolomide は初発膠芽腫患者における生存期間延長効果が、第 III 相試験によって確認されている唯一の薬剤である²⁾。2005 年に発表されたこの第 III 相試験の結果、世界的には悪性神経膠腫の標準治療薬となりすでに 77 か国で承認されている (2005 年 8 月現在) が、本邦では未承認である。

temozolomide はアルキル化剤に分類される抗腫瘍薬で、血漿中など生理的条件下で容易に加水分解され、5-[(1Z)-3-methyltriazen-1-yl]-1H-imidazole-4-carboxamide (MTIC) に変換される³⁻⁷⁾。MTIC は速やかに分解され、活性本体であるメチルジアゾニウムイオンを生成し、DNA のアルキル化分子として作用する^{5,7)}。temozolomide は未変化体のまま血液脳関門を通過することが確認されている⁸⁾。temozolomide の脳腫瘍に対する効果は、血中で生成され循環する MTIC による抗腫瘍作用に加えて、未変化体の temozolomide が血液脳関門を通過し、標的部位に移行した後に局所で生成される MTIC による抗腫瘍作用の両者の寄与が考えられている。

今回、本邦における初回再発 AA の患者を対象として、temozolomide の有効性および安全性を検討するための多施設共同第 II 相試験を 2003~2005 年に、各実施医療機関の治験審査委員会での承認を経た上で実施した。薬剤投与後 6 か月時点における結果を報告する。本試験

実施医療機関、中央病理診断医および効果安全性評価委員会は表 1 のとおりである。

I. 対象と方法

1. 対象

初回手術時に組織学的に AA と確認されている患者で、MRI によって腫瘍の再発または再増大が確認され、登録時の Karnofsky performance status (KPS) が 70% 以上、年齢 18 歳以上の患者を対象とした。組織学的診断は中央病理診断医 (表 1) によって再検討を行った。また、初発時に放射線治療および nitrosourea 系薬剤を含む治療レジメンによる化学療法が施行されていることを必要条件とした。

2. 評価項目

1) 有効性

MRI 画像で腫瘍径が最大であるスライスを用いて 2 方向測定法により腫瘍縮小効果を判定した⁹⁾。MRI 画像上すべての腫瘍が消失したものを著効、測定可能病変の径の積の総和が 50% 以上減少し、新病変の出現が認められないものを有効、測定可能病変の径の積の総和が 25% 以上増大するか新病変が出現したものを進行、これらのいずれにも該当しないものを不変とした。また、ステロイドの使用状況と神経学的改善度を加味して総合的腫瘍縮小効果を判定した (表 2)。腫瘍縮小効果と総合的腫瘍縮小効果は効果安全性評価委員会 (表 1) が判定した。さらに、薬剤投与開始 6 か月後までの無増悪生存 (progression free survival: PFS) を評価した。

2) 安全性

体重、体温、血圧、脈拍数の測定および臨床検査 (血液学的検査、血液生化学検査、尿検査) を施行し有害事象と副作用を調査した。有害事象は可能な限り National Cancer Institute-Common Toxicity Criteria (NCI-

表 1 試験実施医療機関，中央病理診断医および効果安全性評価委員会

試験実施医療機関	国立大学法人北海道大学病院 国立大学法人山形大学医学部附属病院 東京女子医科大学病院 帝京大学医学部附属病院 国立がんセンター中央病院 埼玉医科大学病院 国立大学法人新潟大学医歯学総合病院 名古屋大学医学部附属病院 京都大学医学部附属病院 財団法人田附興風会北野病院 大阪大学医学部附属病院 兵庫医科大学病院 広島大学病院 国立大学法人愛媛大学 愛媛大学医学部附属病院 国立大学法人熊本大学 熊本大学医学部附属病院 国立大学法人鹿児島大学医学部・歯学部附属病院 医療法人医仁会中村記念病院
中央病理診断医	群馬大学大学院医学系研究科病態病理学 中里 洋一
効果安全性評価委員会	国家公務員共済組合連合会大手前病院 佐賀大学医学部 (現在の所属: 医療法人社団博文会小柳記念病院) 名古屋市立大学大学院医学研究科量子放射線医学分野 生塩 之敬 田淵 和雄 芝本 雄太

表 2 総合的腫瘍縮小効果の判定基準

判定	判定基準
著効	1 か月以上の間隔をおいた連続する MRI で、すべての腫瘍が消失し、長期治療により必要とされた生理学的用量のステロイド投与を除いてステロイド投与を中止し、かつ神経学的に安定しているか、または改善している
有効	1 か月以上の間隔をおいて実施された連続する MRI で、2 方向測定可能病変の積の総和が 50%以上 (100%未満) 減少する、かつステロイド使用量が前回の MRI 検査時に投与した用量と同用量または、それより低用量で各 MRI 検査前 7 日間におけるステロイド使用量の安定がみられ、さらに神経学的安定または改善がみられる。新病変の出現が認められないもの
進行	MRI で評価可能な病変について、2 方向測定可能病変の積の総和が 25%以上増大するか、新病変が出現したもの、ステロイド使用量が前回の MRI 検査時に投与した用量と同用量または、それより高用量で各 MRI 検査前 7 日間におけるステロイド使用量の安定がみられる。さらに神経学的増悪を伴うかまたは伴わないもの
不変	その他の状況すべて

CTC) Version 2.0¹⁰⁾に従って判定し、NCI-CTC に規定されていない事象に関しては、症状が認められるが日常的活動が妨げられず処置を要さないものを軽度 (grade 1)、不快感のために日常的活動が妨げられる、または臨床状態に影響が認められるもので、処置を要するものを中等度 (grade 2)、日常的活動が不能となる、または臨床状態に重大な影響が認められるものを重度 (grade 3) と分類した。

3. 試験方法

temozolomide は 5 日間連続で 1 日 1 回空腹時に経口投与し、その後 23 日間休薬する 28 日間を 1 クールとした。第 1 クールでは temozolomide 150 mg/m²/日を投与

し、第 2 クール以降は用量調節判定基準 (表 3) に従い 100, 150 または 200 mg/m²/日から選択した用量を投与した。また、各クールの開始に際して開始を延期する基準を設定した。すなわち、好中球数が 1,500/mm³未満あるいは血小板数が 100,000/mm³未満であった場合、それぞれが 1,500/mm³あるいは 100,000/mm³以上に回復するまで次クールの投与を開始しないこと、grade 2 で temozolomide との因果関係が否定できない有害事象 (悪心・嘔吐、脱毛、血液学的検査値を除く) が出現した場合は投与前の状態に戻るまで、また grade 3/4 で temozolomide との因果関係が否定できない有害事象 (悪心・嘔吐、脱毛、血液学的検査値を除く) が出現した場

表 3 好中球数および血小板数ならびに有害事象の発現に基づく用量調節判定基準

		好中球数または血小板数		
		grade 1	grade 2	grade 3
		好中球数の最低値 ≥1,500/mm ³	好中球数の最低値 1,000~1,500/mm ³	好中球数の最低値 <1,000/mm ³
		血小板数の最低値 ≥100,000/mm ³	血小板数の最低値 50,000~100,000/mm ³	血小板数の最低値 <50,000/mm ³
好中球数と血小板 数以外の有害事象	grade 0~2	1日 50 mg/m ² 増量 あるいは用量変更なし	用量変更なし	1日 50 mg/m ² 減量
	grade 3, 4	1日 50 mg/m ² 減量 あるいは用量変更なし (減量しない理由のコ メントが必要)	1日 50 mg/m ² 減量 あるいは用量変更なし (減量しない理由のコ メントが必要)	1日 50 mg/m ² 減量 あるいは投与中止

合は grade 2 以下に回復するまで次クールの投与を開始しないこととした。

II. 結 果

1. 患者背景

登録症例数は 32 例であった。年齢中央値は 52.5 歳 (31~71 歳) で、18 例 (56%) が男性、薬剤投与開始前の KPS の中央値は 90% であった。中央病理診断によって AA と診断された症例は 22 例 (69%)、AA 以外は 10 例 (31%) で、その内訳は退形成性乏突起星細胞腫 (anaplastic oligoastrocytoma: AOA) 6 例、乏突起星細胞腫 (oligoastrocytoma: OA) 1 例、GBM 1 例、GBM 疑い 1 例、rossetted glioneuronal tumor 1 例であった (表 4)。

2. 有効性

効果安全性評価委員会によって判定された第 6 クール終了時点までの腫瘍縮小効果は著効 3 例、有効 8 例、不変 18 例、進行 2 例、判定不能 1 例で、奏効率 (著効+有効) 34% (95%信頼区間 18.6~53.2%) であった。中央病理診断によって AA と確認された症例に限ってみると著効 2 例、有効 5 例、不変 12 例、進行 2 例、判定不能 1 例で、奏効率は 32% (95%信頼区間 13.9~54.9%) であった。判定不能症例とは神経症状の悪化により状態が悪く効果判定のための MRI が施行できなかった 1 例である。

ステロイド剤の使用状況と神経学的改善度を加味した総合的腫瘍縮小効果 (表 2) では、著効 1 例、有効 9 例、不変 19 例、進行 2 例、判定不能 1 例で、奏効率は 31% (95%信頼区間 16.1~50.0%) であった。中央病理診断で AA と確認された 22 症例においては、総合的腫瘍縮小効果における著効はなく、有効 6 例、不変 13 例、進行 2 例、判定不能 1 例で、奏効率は 27% (95%信頼区間 10.7%~50.2%) であった。腫瘍縮小効果あるいは総合的腫瘍縮小効果が不変以上であった症例はいずれも 29 例

(91%, 95%信頼区間 75.0~98.0%) で、中央病理診断によって AA と確認された 22 例においては、腫瘍縮小効果あるいは総合的腫瘍縮小効果が不変以上であった症例はいずれも 19 例 (86%, 95%信頼区間 65.1~97.1%) であった。

中央病理診断において AA 以外と判定された症例においては、AOA 6 例の奏効率 33% (有効 2 例)、OA 1 例は不変、GBM 1 例は有効、GBM の疑い 1 例が著効、rossetted glioneuronal tumor 1 例は不変であった。

32 症例の PFS の Kaplan-Meier 曲線を図 1 に示した。PFS の中央値は 4.1 か月、6 か月無増悪生存率は 40.6% (95%信頼区間 23.6%~57.6%) であった。これも中央病理診断において AA と確認された 22 例に限ってみると、PFS 中央値 3.9 か月、6 か月無増悪生存率は 31.8% (95%信頼区間 12.4~51.3%) であった。6 か月間に死亡した症例は原疾患の悪化による 1 例のみであった。

3. 安全性

32 症例のうち 25 例で第 2 クール以降のいずれかの時点で 200 mg/m²/日に増量し、第 6 クール終了または治験中止時まで減量しなかった。1 例では第 2 クールから 200 mg/m²/日に増量したが、第 4 クールからは 150 mg/m²/日に減量した。100 mg/m²/日に減量した症例はなかった。第 5 クール終了までに試験中止となった症例は 9 例で、原疾患の悪化 6 例、敗血症 1 例、脳室内出血 1 例、転居による転院 1 例であった。

32 症例すべてにおいて何らかの有害事象を認めたが、56% の症例では軽度または中等度であった (表 5)。生命を脅かすか活動不能に至る重症度 (grade 4) の有害事象は 3 例 (9%) に発現したが、その内容は汎血球減少症に伴う敗血症から播種性血管内凝固症候群、呼吸不全ならびに急性腎不全に至った症例 1 例、脳室内出血 1 例、低血糖と低カリウム血症 1 例であった。発現頻度が 20% 以

表4 主要な被験者背景

年齢 (歳), n=32	平均値±標準偏差	51.5±13.3
	中央値	52.5
	最小値～最大値	31～71
年齢区分, n=32	40歳未満	9 (28%)
	40歳以上 50歳未満	5 (16%)
	50歳以上 65歳未満	11 (34%)
	65歳以上	7 (22%)
性別, n=32	男性	18 (56%)
	女性	14 (44%)
体重 (kg), n=32	平均値±標準偏差	56.23±9.83
	中央値	57.05
	最小値～最大値	35.6～79.8
中央病理判定結果, n=32	退形成性星細胞腫	22 (69%)
	退形成性乏突起星細胞腫	6 (19%)
	乏突起星細胞腫	1 (3%)
	膠芽腫	1 (3%)
	膠芽腫疑い	1 (3%)
	rosetted glioneuronal tumor	1 (3%)
前治療での nitrosourea 系薬剤の使用, n=32	なし	0
	あり	32 (100%)
ステロイド使用, n=32	なし	21 (66%)
	あり	11 (34%)
直近のステロイド使用量* (mg/日), n=11	平均値±標準偏差	19.63±11.76
	中央値	16.7
	最小値～最大値	4.2～50
直近のステロイド使用量*区分, n=11	10 mg/日未満	1 (9%)
	10 mg/日以上 20 mg/日未満	5 (45%)
	20 mg/日以上	5 (45%)
治験薬投与開始前の KPS n=32	平均値±標準偏差	87.5±11.1
	中央値	90
	最小値～最大値	70～100
治験薬投与開始前の KPS 区分, n=32	70	6 (19%)
	80	6 (19%)
	90	10 (31%)
	100	10 (31%)
初発時の手術内容, n=32	全摘出	8 (25%)
	部分摘出	15 (47%)
	生検	9 (28%)
放射線療法の種類, n=32	標準線量	32 (100%)
	過分割照射	0
	加速分割照射	0
初回診断から初回再発までの期間 (か月), n=32	平均値±標準偏差	27.36±30.60
	中央値	17
	最小値～最大値	3.1～128.1
初回診断から初回再発までの期間区分 (か月), n=32	3か月未満	0
	3か月以上 6か月未満	8 (25%)
	6か月以上 9か月未満	1 (3%)
	9か月以上 12か月未満	3 (9%)
	12か月以上	20 (63%)
初回再発時の手術施行の有無, n=32	なし	27 (84%)
	全摘出	0
	部分摘出	4 (13%)
	生検	1 (3%)

*: prednisolone 換算値 (外用剤を除く)

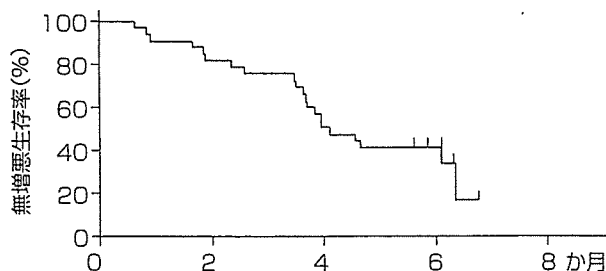


図1 全登録症例32例における無増悪生存期間のKaplan-Meier 曲線
横軸は治療開始からの期間

表5 発現頻度が10%以上の有害事象

	軽度	中等度	重度	生命*1	合計
有害事象発現症例数*2	1 (3%)	18 (56%)	10 (31%)	3 (9%)	32 (100%)
臨床検査*3	4 (13%)	13 (41%)	9 (28%)	2 (6%)	28 (88%)
リンパ球数減少*4	0	8 (25%)	8 (25%)	0	16 (50%)
好中球数減少	5 (16%)	8 (25%)	1 (3%)	1 (3%)*5	15 (47%)
白血球数減少	2 (6%)	9 (28%)	0	1 (3%)*5	12 (38%)
血小板数減少	5 (16%)	2 (6%)	3 (9%)*5	0	10 (31%)
GPT 増加	4 (13%)	3 (9%)	1 (3%)	0	8 (25%)
GOT 増加	4 (13%)	0	1 (3%)	0	5 (16%)
ヘモグロビン減少	2 (6%)	3 (9%)	0	0	5 (16%)
血中ブドウ糖増加	1 (3%)	2 (6%)	1 (3%)	0	4 (13%)
胃腸障害*3	10 (31%)	16 (50%)	1 (3%)	0	27 (84%)
便秘	2 (6%)	13 (41%)	1 (3%)	0	16 (50%)
悪心	6 (19%)	2 (6%)	0	0	8 (25%)
上腹部痛	2 (6%)	2 (6%)	0	0	4 (13%)
下痢	4 (13%)	0	0	0	4 (13%)
嘔吐	3 (9%)	1 (3%)	0	0	4 (13%)
感染症および寄生虫症*3	6 (19%)	9 (28%)	2 (6%)	1 (3%)	18 (56%)
鼻咽頭炎	5 (16%)	6 (19%)	0	0	11 (34%)
神経系障害*3	4 (13%)	8 (25%)	2 (6%)	1 (3%)	15 (47%)
痙攣	0	6 (19%)	0	0	6 (19%)
頭痛	5 (16%)	1 (3%)	0	0	6 (19%)
全身障害および投与局所様態*3	11 (34%)	0	2 (6%)	0	13 (41%)
倦怠感	5 (16%)	0	0	0	5 (16%)
疲労	4 (13%)	0	0	0	4 (13%)
代謝および栄養障害*3	8 (25%)	1 (3%)	0	0	9 (28%)
食欲不振	8 (25%)	1 (3%)	0	0	9 (28%)

*1: 生命を脅かすか、または活動不能に至る重症度

*2: 発現した有害事象の最高 grade による症例数

*3: 各分類の有害事象発現数は、複数の事象を発現した症例があるために示された個別の有害事象数の計とは一致しない

*4: 日和見感染によるものではない

*5: 好中球数減少1件、白血球数減少1件、血小板数減少1件は同一の症例で認められ、これらの異常を含めた播種性血管内凝固症候群および汎血球減少症の有害事象名で報告されたが、ここでは個々の臨床検査値異常を有害事象として記載した

上であった有害事象は便秘 (16例: 50%)、鼻咽頭炎 (11例: 34%)、食欲不振 (9例: 28%)、悪心 (8例: 25%)、リンパ球数減少 (16例: 50%)、好中球数減少 (15例: 47%)、白血球数減少 (12例: 38%)、血小板数減少 (10例: 31%)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (GPT) 増加 (8例:

25%) であった。血液学的検査において grade 3/4 の有害事象の頻度は、好中球数減少 2 例 (6%)、血小板数減少 3 例 (9%)、リンパ球数減少 8 例 (25%)、白血球数減少 1 例 (3%) であった (表5)。死亡に至った有害事象は発現しなかった。

III. 考 察

米国において temozolomide の有効性と安全性が最初に示された再発 AA¹¹⁾を治療対象とし、本邦における有効性と安全性を確認することを目的として本試験を行った。再発 AA において報告されている PFS 中央値は 3~5 か月であるので¹¹⁻¹³⁾、本試験においては 6 か月時点での総合的腫瘍縮小効果と安全性の評価を主要評価項目とし PFS は副次評価項目として解析を行った。

米国の第 II 相試験は再発 AA および再発 AOA を対象とし、本試験とほぼ同じデザインで 1995 年から実施された。腫瘍縮小効果による奏効率は 35%、CR 症例は 8%と報告されているが、これは本試験における奏効率 34%、CR 症例 9%とほぼ同等である。また、PFS 中央値と 6 か月無増悪生存率も米国第 II 相試験ではそれぞれ 5.4 か月 (46%)、本試験では 4.1 か月 (40.6%) で、これもほぼ同等の成績であった¹¹⁾。

本試験では再発 AA として 32 症例が登録されたが、中央病理診断によって AA と確認された症例は 22 例であった。AA 以外と診断された 10 例のうち 6 例は AOA であった。米国のデータは再発 AA と再発 AOA を対象としたものであるから、結果として米国の試験とほぼ同様の腫瘍型を対象とした試験となり、結果も同等であった。中央病理診断によって AA と確認された 22 例における腫瘍縮小効果と総合的腫瘍縮小効果ならびに無増悪生存期間は、全登録症例 32 例における結果と比べていずれもわずかに劣っていた。しかしこれは、全登録症例に含まれていた AOA 6 例の腫瘍縮小効果が優れていたからではなく、GBM の 1 例と GBM 疑いの 1 例がそれぞれ有効と著効を示したことによる差と解釈された。したがって、中央病理診断によって確認された AA の 22 症例と全登録症例 32 例における結果の差は、temozolomide の有効性において意味のあるものとは判断されなかった。

本試験において発現した有害事象も、すでに報告されているものであった。自覚症状においては便秘 (50%) および悪心 (25%) の発現頻度が高かったが、標準的な緩下剤あるいは制吐剤でコントロール可能であった。また、発現頻度が高かった臨床検査値異常の主たる項目は骨髄抑制に関係するものであったが、骨髄抑制は蓄積性ではなく、投与の延期や投与量の減量を要した症例は 17 例 (53%) であったが、投与量を調節することによって投与継続が可能であった。また遅発性の有害事象は認められなかった。

本試験によって、初回再発の退形成性星細胞腫における temozolomide の有効性および忍容性が日本人においても確認され、temozolomide は再発退形成性星細胞腫に対する有効な薬剤となり得ることが示された。本邦においても他の神経膠腫を対象とした臨床試験が積極的に行われ、あるいは海外の臨床試験成績が外挿されていくことが期待される。

文 献

- 1) The Committee of Brain Tumor Registry of Japan: Report of brain tumor registry of Japan (1969-1996), 11th edition. *Neurologia Medico-Chirurgica* 43(Suppl): 1-111, 2003.
- 2) Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, *et al*: Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352(10):987-996, 2005.
- 3) Slack JA, Goddard C, Stevens MFG, *et al*: The analysis and murine pharmacokinetics of a new antitumor agent: CCRG 81045. *J Pharm Pharmacol* 38: 63, 1986.
- 4) Wheelhouse RT and Stevens MFG: Decomposition of the antitumor drug temozolomide in deuterated phosphate buffer: methyl group transfer is accompanied by deuterium exchange. *J Chem Soc Chem Commun* 15: 1177-1178, 1993.
- 5) Denny BJ, Wheelhouse RT, Stevens MFG, *et al*: NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. *Biochemistry* 33: 9045-9051, 1994.
- 6) Stevens MFG, Hickman JA, Langdon SP, *et al*: Antitumor activity and pharmacokinetics in mice of 8-carbomoyl-3-methyl-imidazo [5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4 (3H)-one (CCRG 81045: M & B 39831), a novel drug with potential as alternative to dacarbazine. *Cancer Res* 47: 5846-5852, 1987.
- 7) Newlands ES, Stevens MFG, Wedge SR, *et al*: Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treat Rev* 23: 35-61, 1997.
- 8) Ostermann S, Csajka C, Buclin T, *et al*: Plasma and cerebrospinal fluid population pharmacokinetics of temozolomide in malignant glioma patients. *Clin Cancer Res* 10: 3728-3736, 2004.
- 9) 脳腫瘍全国統計委員会, 日本病理学会: 臨床・病理脳腫瘍取扱規程. 第2版, 金原出版, 東京, 2002, pp 61-64.
- 10) 日本臨床腫瘍研究グループ: National Cancer Institute-Common Toxicity Criteria (NCI-CTC Version 2.0, April 30, 1999) 日本語訳 JCOG 版-第2版. http://www.jcog.jp/SHIRYOU/CTCJ_v20revised2001_09.pdf
- 11) Yung WK, Prados MD, Yaya-Tur R, *et al*: Multicenter phase II trial of temozolomide in patients with anaplastic astrocytoma or anaplastic oligoastrocytoma at first relapse. *J Clin Oncol* 17: 2762-2771, 1999.
- 12) Prados MD, Warnick RE, Mack EE, *et al*: Intravenous carboplatin for recurrent gliomas. A dose-escalating phase II trial. *Am J Clin Oncol* 19: 609-612, 1996.
- 13) Yung WK, Mechtler L and Gleason MJ: Intravenous carboplatin for recurrent malignant glioma: a phase II study. *J Clin Oncol* 9: 860-864, 1991.

Autotaxin Is Overexpressed in Glioblastoma Multiforme and Contributes to Cell Motility of Glioblastoma by Converting Lysophosphatidylcholine TO Lysophosphatidic Acid*

Received for publication, February 24, 2006. Published, JBC Papers in Press, April 19, 2006, DOI 10.1074/jbc.M601803200

Yasuhiro Kishi[†], Shinichi Okudaira[‡], Masayuki Tanaka[‡], Kotaro Hama[‡], Dai Shida[§], Joji Kitayama[§], Takao Yamori[¶], Junken Aoki^{†1}, Takamitsu Fujimaki^{||}, and Hiroyuki Arai[‡]

From the [†]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, the University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, the [§]Graduate School of Medicine, the University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, the ^{||}Division of Molecular Pharmacology, Cancer Chemotherapy Center, Japanese Foundation for Cancer Research, Toshima-ku, Tokyo 170-8455, and the [¶]Department of Neurosurgery, Teikyo University School of Medicine, 2-11-1, Kaga, Itabashi-ku, Tokyo 173-8605, Japan

Autotaxin (ATX) is a multifunctional phosphodiesterase originally isolated from melanoma cells as a potent cell motility-stimulating factor. ATX is identical to lysophospholipase D, which produces a bioactive phospholipid, lysophosphatidic acid (LPA), from lysophosphatidylcholine (LPC). Although enhanced expression of ATX in various tumor tissues has been repeatedly demonstrated, and thus, ATX is implicated in progression of tumor, the precise role of ATX expressed by tumor cells was unclear. In this study, we found that ATX is highly expressed in glioblastoma multiforme (GBM), the most malignant glioma due to its high infiltration into the normal brain parenchyma, but not in tissues from other brain tumors. In addition, LPA₁, an LPA receptor responsible for LPA-driven cell motility, is predominantly expressed in GBM. One of the glioblastomas that showed the highest ATX expression (SNB-78), as well as ATX-stable transfectants, showed LPA₁-dependent cell migration in response to LPA in both Boyden chamber and wound healing assays. Interestingly these ATX-expressing cells also showed chemotactic response to LPC. In addition, knockdown of the ATX level using small interfering RNA technique in SNB-78 cells suppressed their migratory response to LPC. These results suggest that the autocrine production of LPA by cancer cell-derived ATX and exogenously supplied LPC contribute to the invasiveness of cancer cells and that LPA₁, ATX, and LPC-producing enzymes are potential targets for cancer therapy, including GBM.

Autotaxin (ATX)² is a 125-kDa glycoprotein and a potent tumor cell motogen that was originally isolated from the conditioned medium of A2058 human melanoma cells as a cell motility-stimulating factor for melanoma cells (1). ATX was subsequently identified as a member of a family of ecto/exoenzymes referred to as nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases (NPPs) (2, 3). The three cloned members of this family (PC-1/NPP1, ATX/NPP2, and B-10/NPP3) share a 47–55% amino acid sequence identity. PC-1/NPP1 and B-10/NPP3 hydrolyze 5'-phosphodiester bonds

in nucleotides *in vitro*, whereas ATX/NPP2 shows only weak activity at hydrolyzing such bonds. ATX is synthesized as a type II membrane protein and is released from cells in a soluble form by an unknown mechanism (3, 4). Enhanced expression of ATX in Ras-transformed NIH3T3 cells greatly enhances their invasive, tumorigenic, and metastatic potentials (5). In addition, enhanced expression of ATX has been repeatedly demonstrated in various malignant tumor tissues including non-small cell lung cancer (6), breast cancer (7, 8), renal cell cancer (9), hepatocellular carcinoma (10, 11), and thyroid cancer (12), suggesting that ATX confers the tumorigenic and metastatic potentials of cancer cells. However, there is no direct evidence to show such a hypothesis so far.

The mechanism by which ATX exhibits its biological activity toward various cancer cells was unknown. An ATX point mutant that is deficient in 5'-nucleotide phosphodiesterase activity was found to abolish the cell motility-stimulating activity of ATX (13), indicating that the migratory response to ATX requires an intact catalytic site. Recently, we and others showed that ATX has lysophospholipase D (lysoPLD) activity, which catalyzes a reaction to produce a bioactive lysophospholipid, lysophosphatidic acid (LPA), from lysophosphatidylcholine (LPC) (14, 15). ATX has a significantly lower K_m for LPC than the K_m for the classical nucleotide substrate. Because LPA has long been defined as a cell motility-stimulating factor for various cell types including glioblastomas (16–18), ATX has been suggested to regulate motility by producing LPA through the G-protein-coupled receptor. Indeed, recent studies have shown that ATX stimulates the cell motility of various cancer cells *in vitro* through one of the LPA receptors, LPA₁ (19–22). Taking account of the fact that elevated ATX expression has been detected in various tumors (6–12), it is possible that certain cancer cells utilize the ATX-LPC-LPA-LPA₁ system for their motility. In these cells, a possible regulatory factor that remains to be characterized is LPC. LPC is always present in plasma. In human plasma, its concentration ranges from 100 to 300 μM . LPC is also detected in other biological fluids such as seminal fluids and cerebrospinal fluids and in tissues and various types of cells but at much lower concentrations than in plasma (23, 24).

Glioblastoma multiforme (GBM) is a highly malignant brain tumor. Removal of the tumor mass transiently improves the condition of the patient, but the ability of GBM cells to infiltrate normal brain tissue invariably almost always leads to tumor recurrence. Thus, most patients experience recurrence within 1 year (25), and less than 20% of the patients survive more than 2 years (26). GBM cells (glioblastomas) are highly motile and invade the normal brain parenchyma diffusely (27). Several factors responsible for their invasive phenotype have been

* The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 81-3-5841-4723; Fax: 81-3-3818-3173; E-mail: jaoki@mol.f.u-tokyo.ac.jp.

² The abbreviations used are: ATX, autotaxin; GBM, glioblastoma multiforme; LPA, lysophosphatidic acid; LPC, lysophosphatidylcholine; lysoPLD, lysophospholipase D; RT, reverse transcription; BBB, blood-brain barrier; NPP, nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases; CNS, central nervous system; siRNA, small interfering RNA; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

reported, such as certain extracellular matrix proteins including laminin, fibronectin, and/or collagen can promote glioma cell migration (28, 29). Secreted matrix metalloproteinases remodel the extracellular matrix, creating pathways more conducive to migration through normal brain tissue (30). Investigations of the factors that affect the motility of glioblastomas are of particular interest because an understanding of these factors is needed for valid GBM therapy. Because the blood-brain barrier (BBB) is disrupted in GBM tissue, some components in plasma might affect the cell motility of glioblastomas (31, 32). In this study, we examined the expression of ATX and LPA₁ in brain tumor tissues and various tumor cell lines and found that both ATX and LPA₁ are predominantly expressed in glioblastomas and GBM tissue. Using glioblastomas as a model system, we evaluated the effects of ATX, LPA₁, LPA, and LPC on the motility of the cells.

MATERIALS AND METHODS

Reagents—1-oleoyl-LPA (18:1) and 1-oleoyl-LPC (18:1) was purchased from Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL). Ki16425 was kindly provided by Dr. Hideo Ohata (Kirin Brewery Co., Takasaki, Japan).

Cell Lines—All human tumor cell lines were maintained in RPMI 1640 (Sigma) supplemented with 2 mM glutamine, 1× penicillin/streptomycin, and 5% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum as described previously (33). The cell lines used in this study were NCI-H23 (lung), NCI-H226 (lung), NCI-H522 (lung), NCI-H460 (lung), A549 (lung), DMS273 (lung), DMS114 (lung), HCC-2998 (colon), HT-29 (colon), WiDr (colon), HCT-15 (colon), DLD1 (colon), SW480 (colon), LOVO (colon), CaR1 (rectum), WiDr (colon), CaCo2 (colon), Colo320 (colon), Colo201 (colon), HCT-116 (colon), KM12 (colon), HT1080 (colon), RXF-631L (renal), ACHN (renal), OVCAR3 (ovary), OVCAR4 (ovary), OVCAR5 (ovary), OVCAR8 (ovary), SKOV-3 (ovary), U251 (CNS), SF295 (CNS), SF539 (CNS), SF268 (CNS), SNB75 (CNS), SNB78 (CNS), MKN45 (stomach), MKN28 (stomach), St4 (stomach), MKN1 (stomach), MKN7 (Stomach), MKN74 (stomach), KatolIII (stomach), MKN28 (stomach), MKN45 (stomach), MKN74 (stomach), MDA-MB231 (breast), HBC4 (breast), BSY1 (breast), MCF7 (breast), DU145 (prostate), PC3 (prostate), HPC5 (others), A2058 (melanoma), and HeLa (uterine cervix). Mouse 203G glioma cells were maintained in RPMI 1640 supplemented with 2 mM glutamine, 1× penicillin/streptomycin, and 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum. This cell line was kindly provided by Dr. Koji Adachi (Nippon Medical School Tokyo, Japan).

Quantitative Real-time RT-PCR—From various cancer tissues and cancer cell lines, total RNA from cells was isolated using ISOGEN (Nippongene, Toyama, Japan) and reverse-transcribed using the SuperScript first-strand synthesis system for RT-PCR (Invitrogen). Oligonucleotide primers for PCR were designed using Primer Express Software (Applied Biosystems, Foster City, CA). The sequences of the oligonucleotides used in PCR were as follows: ATX (human), forward, 5'-GGGTGAAAGCTGGAACATTCTT-3'; ATX (human), reverse, 5'-GCCACCGCAATATGGAATTATAAG-3'; LPA₁ (human), forward, 5'-AATCGGGATACCATGATGAGTCTT-3'; LPA₁ (human), reverse, 5'-CCAGGAGTCCAGCAGATGATAAA-3'; LPA₂ (human), forward, 5'-CGCTCAGCCTGGTCAAGACT-3'; LPA₂ (human), reverse, 5'-TTGCAGGACTCACAGCCTAAAC-3'; LPA₃ (human), forward, 5'-AGGACACCCATGAAGCTAATGAA-3'; LPA₃ (human), reverse, 5'-GCCGTCGAGGAGCAGAAC-3'; LPA₄ (human), forward, 5'-CCTAGTCCTCAGTGGCGGTATT-3'; LPA₄ (human), reverse, 5'-CCTTCAAAGCAGGTGGTGGTT-3'; ATX (mouse), forward, 5'-GGAGAATCACACTGGGTAGATGATG-3'; ATX (mouse), reverse, 5'-ACGGAGGCGGACAAAC-3'; LPA₁ (mouse), forward, 5'-GAGGAATCGGGA-CACCATGAT-3'; LPA₁ (mouse), reverse, 5'-ACATCCAGCAATAA-

CAAGACCAATC-3'; LPA₂ (mouse), forward, 5'-GACCACACTCAG-CCTAGTCAAGAC-3'; LPA₂ (mouse), reverse, 5'-CTTACAGTCCAG-GCCATCCA-3'; LPA₃ (mouse), forward, 5'-GCTCCCATGAAGCTA-ATGAAGACA-3'; LPA₃ (mouse), reverse, 5'-AGGCCGTCCAGCAG-CAGA-3'; LPA₄ (mouse), forward, 5'-CAGTGCCTCCCTGTTTGTCTTC-3'; LPA₄ (mouse), reverse, 5'-GAGAGGGCCAGGTTGGTGAT-3'; GAPDH (human/mouse), forward, 5'-GCCAAGGTCATCCATGAC-AACT-3'; GAPDH (human/mouse), reverse, 5'-GAGGGGCCATCC-ACAGTCTT.

PCR reactions were performed using an ABI Prism 7000 sequence detection system (Applied Biosystems). The transcript number of human GAPDH was quantified, and each sample was normalized on the basis of GAPDH content.

LysoPLD Assay—Samples were incubated with 2 mM LPC (14:0) in the presence of 100 mM Tris-HCl (pH 9.0), 500 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, and 0.05% Triton X-100 during indicated hours at 37 °C. The liberated choline was detected by an enzymatic photometric method as described (14). Briefly, the liberated choline was oxidized by choline oxidase, and the hydrogen peroxide generated was quantified using horseradish peroxidase and TOOS reagent (*N*-ethyl-*N*-(2-hydroxy-3-sulfo-propyl)-3-methylaniline, Dojin, Tokyo, Japan).

SDS-PAGE/Western Blotting—Both cells and cell media were used to test for ATX protein expression. Cells were homogenized in phosphate-buffered saline, and then the cell homogenates were separated into membrane and soluble fractions by centrifugation at 100,000 × *g* for 60 min. Protein samples were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes using the Bio-Rad protein transfer system. The membranes were blocked with 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) containing 150 mM sodium chloride, 5% (w/v) skimmed milk, and 0.05% (v/v) Tween 20, incubated with anti-lysoPLD monoclonal antibody (3D1) (23), and then treated with anti-rat IgG-horseradish peroxidase. Proteins bound to the antibody were visualized with an enhanced chemiluminescence kit (ECL, Amersham Biosciences).

Isolation of Stable ATX Transfectant—The plasmid vector pCAGGS (kindly provided by Dr. Junichi Miyazaki (34)) was utilized to create rat ATX (ATX-t) tagged with the Myc epitope at the C terminus (pCAGGS-rATX-Myc). To establish stable transfectants, 203G glioma cells were transfected with pCAGGS-rATX-Myc using Lipofectamine Plus reagents (Invitrogen) as recommended by the manufacturer and were grown in RPMI 1640 containing 800 μg/ml G418 (Wako). Individual G418-resistant clones were isolated by limiting dilution and screened by immunocytochemistry using Myc antibody and by measuring the lysoPLD activities of the culture media.

Recombinant ATX Preparations—Rat ATX was expressed and partially purified using baculovirus system as described previously (14). The purified ATX was dialyzed in phosphate-buffered saline and used for cell motility assays.

Boyden Chamber Assay—Chemotaxis was assayed as described previously (21). In brief, polycarbonate filters with 8-μm pores (Neuro-Probe, Inc., Gaithersburg, MD) were coated with 0.001% fibronectin (Sigma). Cells (1 × 10⁵ cells in 200 μl/well) were loaded into the upper chambers and incubated at 37 °C for 6 h to allow migration. Cell migration to the bottom of the filter was evaluated by measuring optical density at 590 nm. For Ki16425 treatment, cells were preincubated with 1 μM Ki16425 for 30 min.

Wound Healing Assay—Cells were plated in cell culture plates (12-well) using cell growth media containing fetal bovine serum. After the cells had reached semiconfluence, fetal bovine serum was removed from the media and replaced with serum-free media. A plastic pipette tip was drawn across the center of the plate to produce a clean wound area 24 h

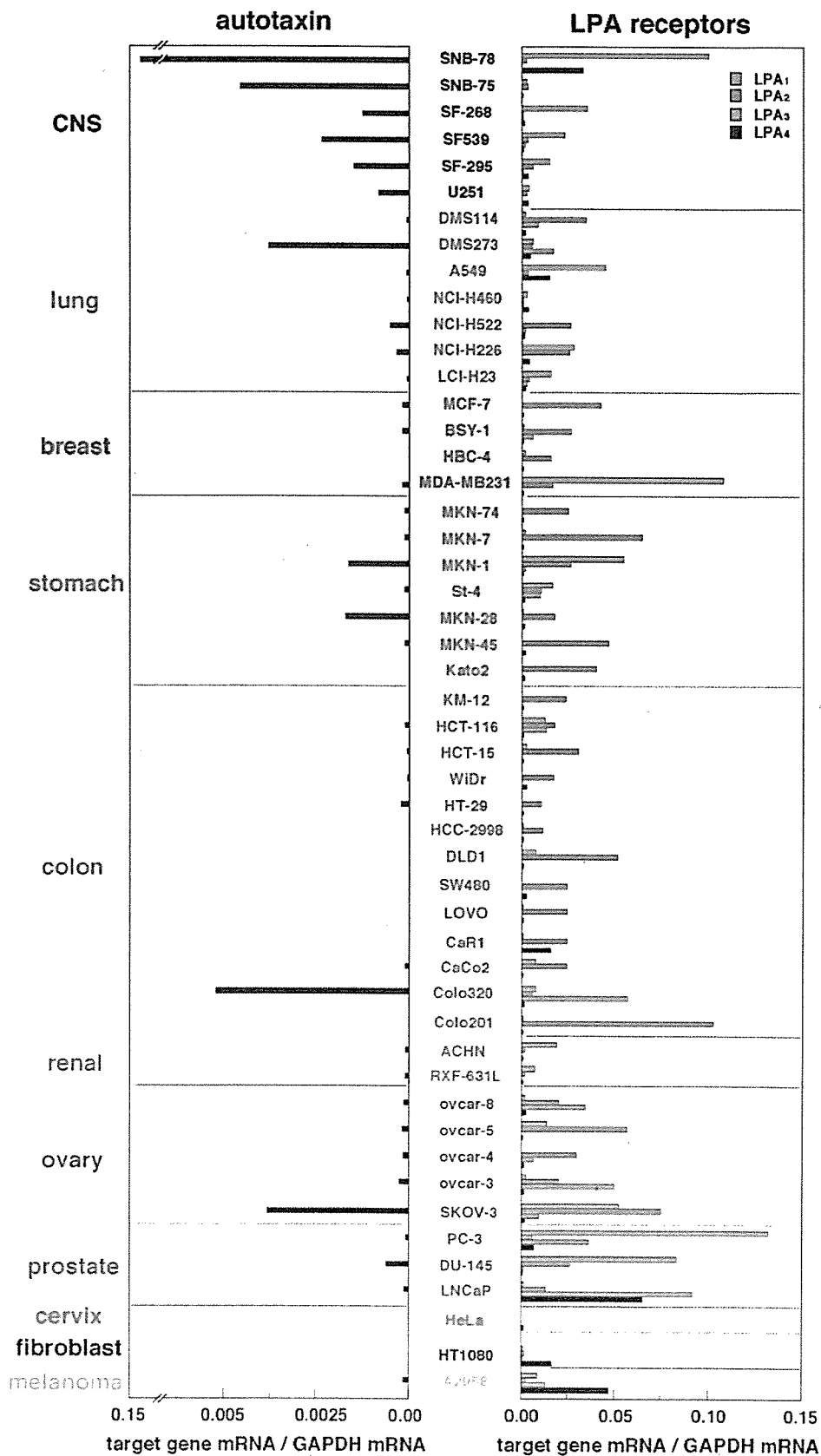


FIGURE 1. Expression profiles of ATX and LPA receptors in tumor cell lines. A quantitative RT-PCR analysis of ATX (left) and LPA receptors (LPA₁, LPA₂, LPA₃, and LPA₄, right) in 50 tumor cell lines from various origins (CNS, lung, breast, stomach, colon, kidney, ovary, prostate, cervix, fibroblast, and melanoma) was performed. Values are expressed relative to the expression of GAPDH mRNA.

after serum depletion. Medium was then replaced with serum-free medium containing different concentrations of 1-oleoyl-LPA, 1-oleoyl-LPC, Ki16425 (1 μ M) and lysoPLD. After the cells were cultured for 12, 24, or 36 h, cell movement into the wound area was examined. The

migration distances between the leading edge of the migrating cells and the edge of the wound were compared.

Quantification of LPC—LPC concentration in cell culture supernatant was determined as described previously (35). Briefly, cells were

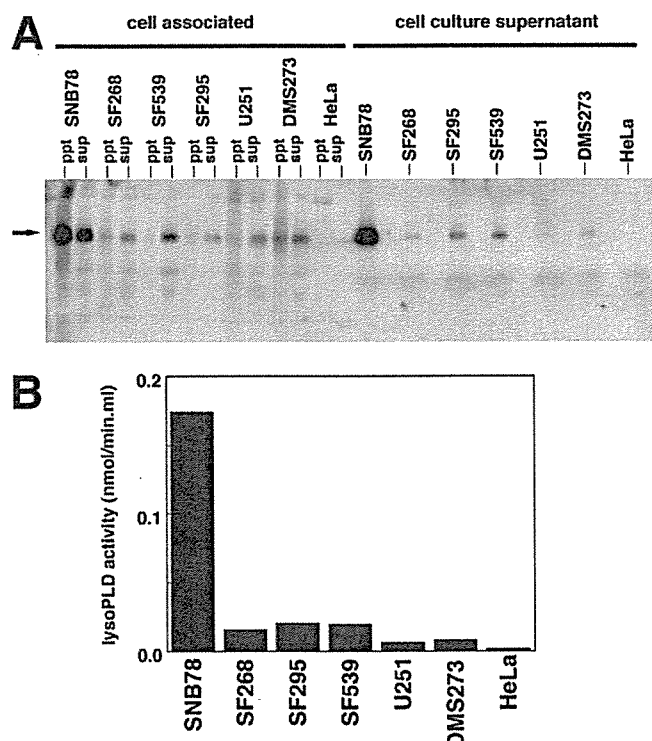


FIGURE 2. ATX protein and lysoPLD activity in glioblastoma cell lines. *A*, Western blot of cell membrane fractions (*ppt*), soluble fraction (*sup*), and cell culture medium using anti-human ATX monoclonal antibody 3D1. *B*, lysoPLD activity of culture media from glioblastoma and other cancer cell lines. LPC was used as the substrate.

cultured in serum-free RPMI 1640 containing 0.1% fatty acid-free bovine serum albumin (Sigma) for 2 days. LPC was extracted from culture media using the Bligh and Dyer method (51) and resuspended in phosphate-buffered saline containing 0.1% bovine serum albumin. LPC concentration was determined by a recently developed enzymatic colorimetric method as described. Briefly, samples were treated with lysophospholipase, glycerophosphorylcholine, phosphodiesterase, and choline oxidase. The resulting hydrogen peroxide generated was quantified using horseradish peroxidase and TOOS reagent.

RNA Interference—SNB-78 glioblastoma cells were transfected with siRNA oligonucleotide duplexes 1 day after confluence (day -1) with trans-it TKO (Takara, Kyoto, Japan) according to the manufacturer's instructions. Generally 20 nm siRNA was transfected with 0.5 μ l of Lipofectamine per well of a 24-well plate with fresh media. Each experiment contained equivalent samples transfected with a non-targeting control siRNA pool and samples not treated with trans-it TKO. siRNA oligonucleotide duplexes for each gene of interest were purchased from WAKO (Osaka, Japan) as optimized single duplexes (ATX1, sense, 5'-gccguuggagucaauaucuGC-3', antisense, 5'-agauaucacuccaaccgcAA-3' and ATX2, sense, 5'-gggagacugcuguaccuauTA-3', antisense, 5'-auugguacagcagucucccCT-3'). Transfection efficiency was monitored using fluorescent (Cy3)-tagged oligonucleotides (Blockit, Invitrogen) transfected as described above and visualized with a mercury lamp fluorescent microscope.

RESULTS

Expression of ATX and LPA Receptors in 50 Tumor Cell Lines—We examined the expression of ATX in 50 cultured human tumor cell lines derived from various tumors using the quantitative RT-PCR technique. We found that some cells expressed a significant amount of ATX at both the mRNA and the protein levels (Figs. 1 and 2). High ATX expression was detected in DMS273 (lung cancer), colo320 (colon cancer), SKOV3

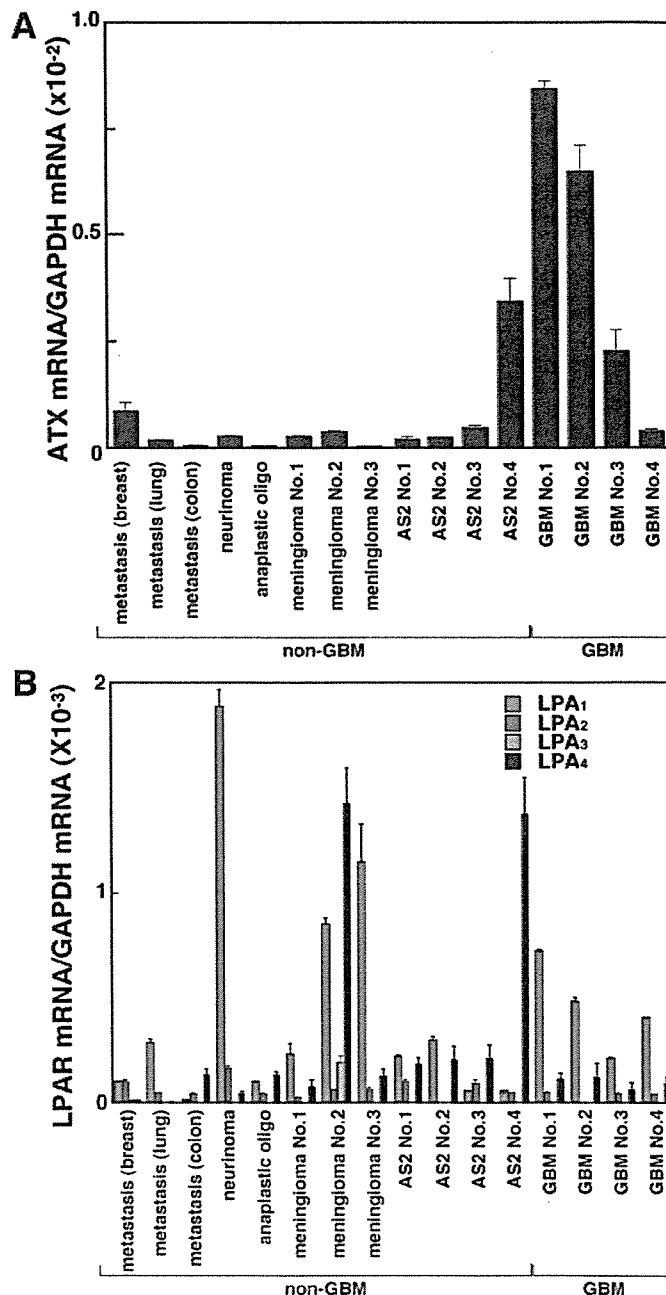


FIGURE 3. Enhanced expression of ATX in GBM tissues. Expressions of ATX and LPA receptors (LPA₁, LPA₂, LPA₃, and LPA₄) (*B*) in various brain tumor tissues as measured by quantitative RT-PCR. Of the three LPA receptors (LPAR), LPA₁ has the highest expression in various brain tumors, possibly reflecting the high LPA₁ expression in normal human brain. Note that tissues AS2 number 4 and GBM number 1 are derived from the same patient. The patient's cancer was initially diagnosed as astrocytoma, and after the recurrence, it was diagnosed as GBM.

(ovarian cancer), MKN1 (stomach cancer), and most of the brain cancer cells (SF295, SF539, SF268, SNB-75, and SNB-78). The expression was highest in SNB-78 cells. In good agreement with this observation, both ATX protein and lysophospholipase D activity were detected in the culture supernatants of these ATX-positive cells (Fig. 2). Most of the protein was detected in the culture cell supernatants, whereas a small amount was detected in cells (Fig. 2A). These results confirm that ATX is secreted from cells, although ATX is initially biosynthesized in cells as a type II membrane protein.

We also examined the expression of the LPA receptors (LPA₁, LPA₂, LPA₃, and LPA₄) in the 50 human tumor cell lines using quantitative

LPC Stimulates Motility of Glioblastoma

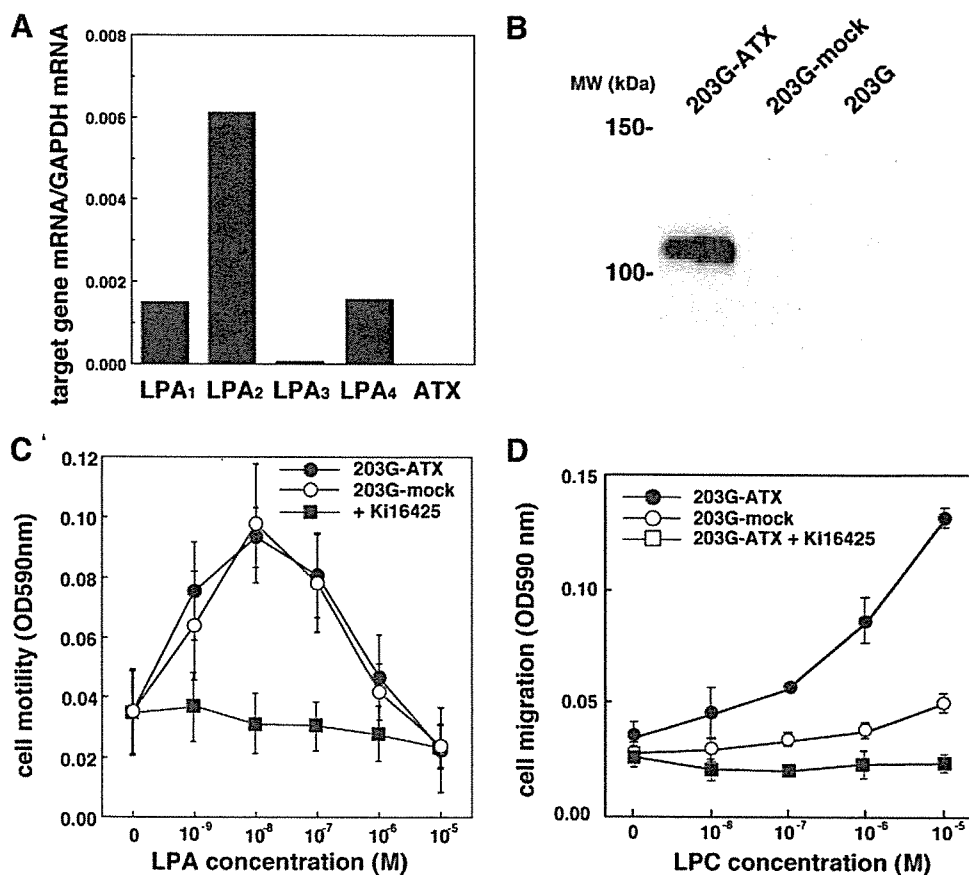


FIGURE 4. Overexpression of ATX in combination with LPC induces a migratory response in glioma cells in Boyden chamber assay. *A*, expression profiles of LPA receptors (LPA₁, LPA₂, LPA₃, and LPA₄) and ATX in mouse glioma cell line 203g as measured by quantitative RT-PCR. *B*, expression of ATX in stably transfected 203g-ATX cells as measured by Western blotting. *mock*, mock-transfected; *MW*, molecular mass markers. *C*, migratory responses of 203g-ATX (closed circles) and mock-transfected cells (open circles) to LPA and the effect of LPA₁ antagonist, Ki16425, on the migratory response (closed squares). *D*, migratory responses of 203g-ATX cells (closed circles) and mock-transfected cells (open circles) to LPC and the effect of Ki16425 on the migratory response (closed squares).

RT-PCR. Although the expression pattern of the four LPA receptors does not necessarily reflect the tissue origin of the tumor cells, restricted LPA receptor expression patterns were obtained (Fig. 1). LPA₂ was predominantly expressed in cells from colon, stomach, and breast cancers (36, 37). LPA₃ expression was relatively low. However, LPA₃ was expressed by certain ovarian and prostate cancer cell lines. Expression of LPA₄ was fairly low. By contrast, LPA₁ was dominant in brain tumor cells (Fig. 2).

Expression of ATX and LPA Receptors in GBM—Because SF295, SF539, SF268, SNB-75, and SNB-78 are defined as glioblastomas (gliomas derived from GBM), we attempted to examine the expression of ATX and LPA receptors in tissues from various brain tumors. We found that expression of ATX was markedly high in GBM tissues (Fig. 3). Three of four GBM tissue samples showed extremely high ATX expression. ATX expression is apparently lower in tissues from other brain tumors. One exception is a patient of astrocytoma (case AS2 number 4) whose tissue showed high ATX expression. He experienced early recurrence after only 16 months, and the tumor progressed to GBM at recurrence (case GBM number 1). Among the four LPA receptors, LPA₁ was dominantly expressed in most brain tumor tissues tested including GBM with low expression of LPA₂, LPA₃, and LPA₄, which may reflect the expression pattern in normal brain tissues (38, 39). The expression pattern of ATX and LPA receptors in GBM tissues indicates that ATX contributes to the invasive property of glioblastomas by producing LPA.

LPC Stimulates Cell Motility of ATX-expressing Cells—To test the possibility that glioblastomas acquire their high invasiveness through autocrine production of LPA by ATX, we first examined the effect of enhanced ATX expression on cell motility. We used mouse glioma cell line 203G that expressed LPA₁ (Fig. 4A) but not a detectable amount of ATX (Fig. 4B). 203G glioma cells that stably express ATX (203G-ATX)

were established by transfecting ATX cDNA and by selecting neomycin-resistant clones. The established three lines expressed significant levels of ATX as judged by both lysoPLD activity (data not shown) and Western blotting (Fig. 4B). In addition, these cell lines showed similar expression pattern of LPA receptors to the parental 203G cells (data not shown). The effects of LPA on the motility of transfected cells and mock-transfected 203G cells in the Boyden chamber were similar (Fig. 4C). LPA had a similar effect on the motility of parental 203G cells (not shown). The effect of LPA on the motility of these cells was abolished by the LPA₁ antagonist, Ki16425 (Fig. 4C). By contrast, these cells showed quite distinct responses to LPC. LPC significantly stimulated the migration of 203G-ATX cells in Boyden chamber assay (Fig. 4D). However, a similar response was not induced in mock-transfected 203G cells (Fig. 4D) or in parental 203G cells (not shown). In addition, the stimulatory effect of LPC in 203G-ATX cells was completely abolished by the addition of Ki16425 (Fig. 4D), showing that LPA mediates the LPC-stimulated cell migration of the cells through LPA₁. We confirmed that platelet-derived growth factor induced similar migratory response in ATX-overexpressing, mock-transfected, and parental 203G cells (data not shown).

We further examined the role of endogenously expressed ATX in the cell motility of ATX-expressing cells, which has not been previously demonstrated so far. For this experiment, we used SNB-78, which has the highest ATX expression among the 50 tumor cell lines (Fig. 1). As shown in Fig. 5A, SNB-78 cells, like other LPA₁-positive cells, showed a migratory response to exogenous LPA in the Boyden chamber. LPC also stimulated the migration of SNB-78 (Fig. 5B). Ki16425 blocked not only the LPA-induced migratory response but also the LPC-induced migratory response (Fig. 5). This indicates that: 1) LPC is converted to LPA by the lysoPLD activity of endogenous ATX, 2) the LPA generated subse-

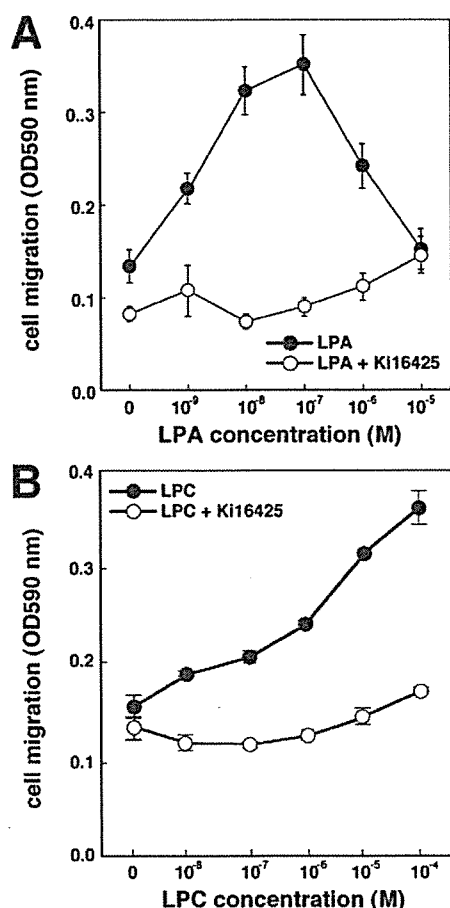


FIGURE 5. Effects of LPA and LPC on migration of glioblastoma cells. Migration of SNB-78 glioblastoma cells in response to LPA (A, closed circles) and LPC (B, closed circles) was measured with a Boyden chamber. Both responses were abolished by Ki16425 (open circles).

quently stimulates cell migration through LPA₁, and 3) LPC behaves as a chemotactic factor toward ATX-expressing cells.

We previously showed that LPC is released from cells and could be converted to LPA to induce cell migration by exogenously added ATX (14). In fact, SNB-78 was found to release a small amount of LPC into the cell culture medium, and the amount gradually increased during the culture (data not shown). However, we were unable to evaluate the effect of cell-derived LPC on cell motility in the Boyden chamber since LPC is lost during preparation of the cells for the Boyden chamber assay. Accordingly, to evaluate the effects of cell-derived LPC and ATX on cell migration, we used a wound healing assay, which takes a relatively long period. As expected, exogenously added LPA was able to induce migration of SNB-78 cells in the wound healing assay (Fig. 6A). The migratory response was abolished by Ki16425, which shows that LPA₁ is involved in this system, as was observed in Boyden chamber assay (Fig. 6A). In the absence of exogenous LPC, we observed a weak migratory response, which was also blocked by Ki16425 (Fig. 6B), showing that endogenous LPC and ATX, to a lesser extent, contribute to the migration of SNB-78 cells. By contrast, strong migratory responses were observed when LPC (10 μ M) was added to the cells. The migratory response induced by LPC was again inhibited by Ki16425 (Fig. 6C). The amount of LPC released from SNB-78 was \sim 50 nM as judged by the enzymatic colorimetric method for determination of LPC. This indicates that the amount of endogenous LPC released from SNB-78 is insufficient to induce a full migratory response in the cells and that exogenous LPC is potentially a

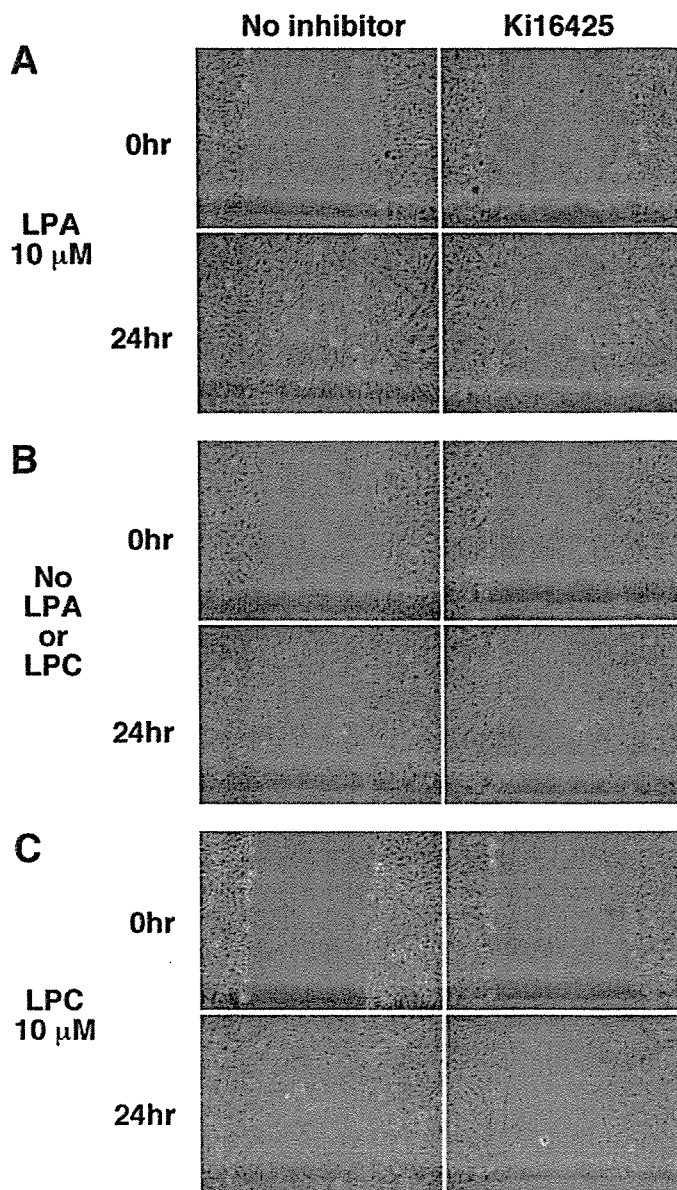


FIGURE 6. Glioblastoma migrates in response to LPA and LPC in wound healing assay. A clean wound area was produced on a monolayer of semiconfluent SNB-78 cells, seeded in 12-well plates. The wound was then allowed to heal for 24 h in serum-free media in the presence of LPA (10 μ M, A) or LPC (10 μ M, C) or in the absence of exogenous lipids (B). Cell morphologies before (0 h) and after (24 h) the treatment are shown in the upper and lower panels, respectively. The effect of Ki16425 (1 μ M) on the cell migration is also shown in the right panels.

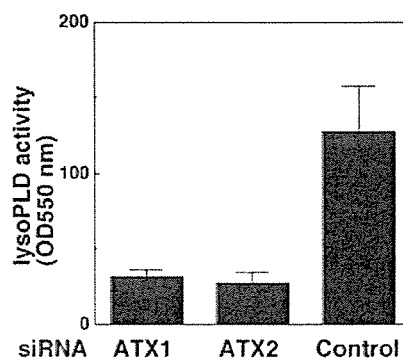


FIGURE 7. Down-regulation of ATX in SNB-78 cells using siRNA. One-day postconfluent SNB-78 cells were transfected with ATX (ATX1 and ATX2) or control siRNA duplexes. Forty-eight hours later, down-regulation of ATX in the cell supernatants was analyzed by measuring lysoPLD activity in the cell culture supernatant of the cells.

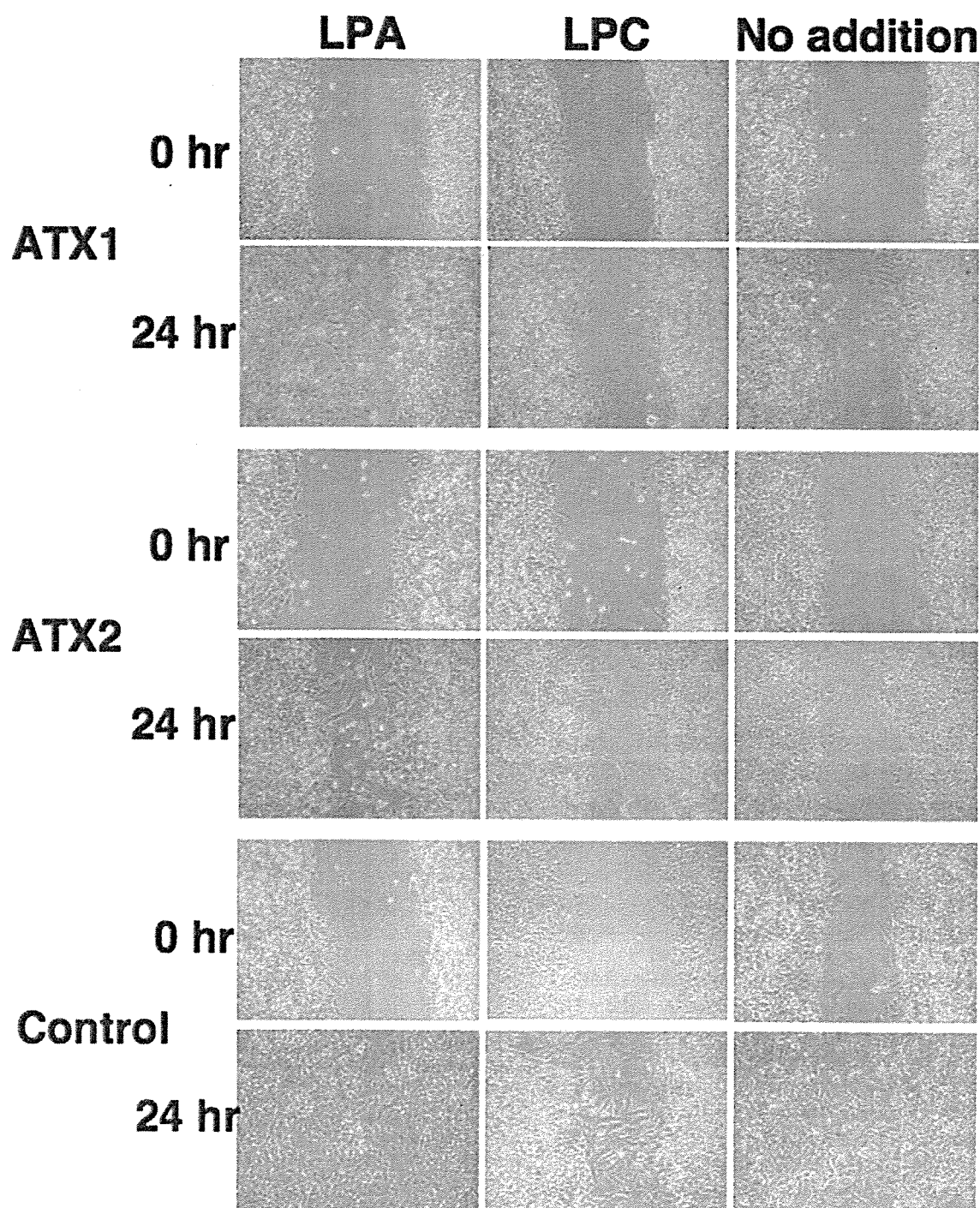


FIGURE 8. ATX produced by SNB-78 cells contributes to the motility of the cells. SNB-78 cells were transfected with ATX or control siRNA duplex to suppress ATX level, and after 24 h, the cells were subjected to wound healing assay both in the presence and in the absence of LPC (10 μ M) for 24 h. The cells were also treated with LPA (10 μ M) as a positive control. Cell morphologies before (0 h) and after (24 h) the treatment are shown in the upper and lower panels, respectively.

key factor in controlling the migratory response of ATX-expressing cells.

ATX Is Responsible for Motility of SNB-78 Cells in Wound Healing Assay—Our data suggest that endogenously expressed ATX in SNB-78 cells plays a key role in the motility of the cells by producing LPA from endogenously or exogenously supplied LPC. To confirm this hypothesis, we used siRNA to down-regulate the expression of ATX in SNB-78 cells. Confluent SNB-78 cells were transfected with varying amounts of siRNA duplexes using scramble siRNA as a control. As shown in Fig. 7, after 48 h of culture, successful down-regulation of ATX in the cell

culture supernatants was confirmed by measuring lysoPLD activity of the culture cell supernatant. We next performed the wound healing assay using the ATX-down-regulated cells. We found that motility of SNB-78 cells was significantly suppressed both in the absence and in the presence of LPC, when the cells were treated with siRNA to suppress ATX expression (Fig. 8). Exogenously added LPA was able to induce migration of ATX-down-regulated cells (Fig. 8), showing that the siRNA-treated cells still retained the migratory activity in response to LPA. Thus, we concluded that ATX contributes to the cell migration of SNB-78 cells in the wound healing assay.

DISCUSSION

GBM is the most malignant brain tumor due to its high invasiveness. In this study, we found that ATX, a cell motility-stimulating factor (4), is overexpressed in GBM tissues and many glioblastoma cell lines. ATX has catalytic activity to produce a potent chemoattractant-like lipid, LPA, and stimulates cell motility through an LPA G-protein-coupled receptor, LPA₁ (14, 21). Interestingly, both GBM tissues and glioblastomas express high levels of LPA₁, and in fact, the glioblastoma, SNB-78, used in this study showed migratory responses not only to LPA but also to LPC (Figs. 5 and 6). In addition, suppression of ATX expression in SNB-78 cells by siRNA resulted in dramatic reduction of migratory response of the cells to LPC but not to LPA (Fig. 8). Furthermore, LPA₁ antagonist, Ki16425, effectively suppressed both LPA- and LPC-induced motility of glioblastoma cells. Thus, the motility of glioblastoma cells appears to depend on ATX and LPA₁. LPA-induced cell motility of glioblastomas was also shown in the previous report by Manning *et al.* (16).

Enhanced ATX expression has been repeatedly demonstrated in various tumors, including non-small cell lung cancer, breast cancer, renal cell cancer, hepatocellular carcinoma, and thyroid cancer (6–12). In breast cancer, ATX expression level strongly correlates with the invasiveness of cancer cells (8). Thus, it is reasonable to assume that ATX expressed by tumor cells is responsible for the motility, and thus, the invasiveness of the cells. However, the spontaneous motility of non-small cell lung cancer cells *in vitro* did not correlate with the levels of ATX mRNA (6), indicating that other factors may influence ATX-induced cell motility. In this study, we used glioblastoma cell lines that endogenously express ATX and cell transformants overexpressing ATX and evaluated ATX, LPA₁, and LPC, a substrate for ATX of lysoPLD activity. Our results show that LPC is a critical factor that regulates ATX-mediated cell motility. We previously showed that LPC is synthesized and released from various tumor cells and that it is a potential substrate for ATX when ATX is added to the cells in the absence of exogenous LPC (14). However, the concentration of cell-derived LPC (~50 nM) is too low to induce full cell motility of SNB-78 cells (Fig. 6). Although a high dose of exogenously added ATX induced cell motility (by converting cell-derived LPC to LPA), the amounts of endogenously expressed ATX in glioblastoma cells and even in ATX-overexpressing glioma cells were insufficient to have an effect on cell motility. We found that the addition of exogenous LPC to the ATX-expressing cells but not ATX-negative cells strongly induced cell motility, although LPA equally promoted the motility of both cell types (Figs. 4–6). Thus, LPC is a chemotactic factor for tumor cells expressing ATX and LPA₁. LPC has previously been shown to act as a chemotactic factor for other cell types, including macrophages (40), monocytes (41), and T-lymphocytes (42). In some cell types, such as macrophages, cell motility appears to be induced by another system (LPC-specific G-protein-coupled receptor, G2A) (43), whereas in other cell types, cell motility appears to be induced by the ATX-LPA₁ system.

In general, the BBB is disrupted in GBM tissue, which leads to exposure of tumor cells to components of plasma that might affect the cell motility of glioblastomas (31, 32). As indicated by Manning *et al.* (16), one such plasma component may be LPA. However, LPA concentration in plasma is quite low (below 50 nM), although in serum, it may be above 1 μM (44, 45). In contrast, LPC concentration in plasma is extremely high (100–300 μM in human and ~500 μM in rats) (35, 44). The concentration of LPC in brain tissue, such as in cerebrospinal fluids, is quite low (several μM level) (46). Thus, when the BBB is disrupted in GBM, it is likely that these tumors are exposed to LPC derived from plasma. LPC is converted to LPA by ATX expressed by glioblastomas, and conse-

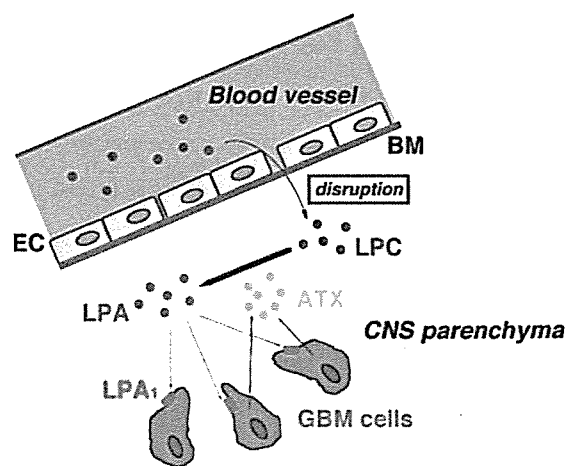


FIGURE 9. A schematic model showing the effects of ATX, LPA₁, LPA, and LPC on the motility of GBM cells upon the disruption of BBB. On disruption of BBB, GBM in CNS parenchyma is likely to be exposed to LPC derived from plasma. Then LPC is converted to LPA by ATX expressed by GBM and subsequently activation of LPA₁, leading to the enhanced motility and high invasiveness of GBM. EC, endothelial cells; BM, basement membrane.

quently, LPA₁ is activated, leading to the enhanced cell motility and high invasiveness of GBM (Fig. 9). This idea is supported by the finding that GBM cells travel along blood vessels (47).

The expression patterns of LPA receptors in the 50 cancer cell lines (Fig. 1) agree with the previous reports on LPA receptor expression. For example, LPA₃ expression is relatively high in cells from ovarian cancer (48) and, markedly, LPA₂ is predominantly expressed in cells derived from colon (37) and thyroid cancer (49). Recently, we also observed similar LPA receptor distribution patterns in human breast cancers (36) in which LPA₂ expression is dramatically enhanced. The present study revealed that LPA₁ is predominantly expressed in GBM cells and tissues. The same is true for ATX. Thus, the expression patterns in cancer cell lines are definitely informative to understand the roles of ATX and LPA receptors in cancer cell biology.

ATX may contribute to cancer cell survival and motility in several ways. In addition to its cell motility-stimulating activity, ATX has a cell proliferation-stimulating activity (14) and an angiogenic factor-like activity that induces new vessel formation by an unknown mechanism (50). GBM is known to induce vascular proliferation, and so ATX might have a role here as well. In summary, our results show that ATX, a potent oncogenic protein, is overexpressed in GBM and stimulates the motility of glioblastomas. Thus, ATX is a potential diagnostic marker for GBM. In addition, ATX, LPA₁ and unidentified LPC-producing enzymes are potential targets for GBM therapy.

REFERENCES

- Stracke, M. L., Krutzsch, H. C., Unsworth, E. J., Arestad, A., Cioce, V., Schiffmann, E., and Liotta, L. A. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 2524–2529
- Goding, J. W., Terkeltaub, R., Maurice, M., Deterre, P., Sali, A., and Belli, S. I. (1998) *Immunol. Rev.* **161**, 11–26
- Stefan, C., Gijssbers, R., Stalmans, W., and Bollen, M. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1450**, 45–52
- Stracke, M. L., Clair, T., and Liotta, L. A. (1997) *Adv. Enzyme Regul.* **37**, 135–144
- Nam, S. W., Clair, T., Campo, C. K., Lee, H. Y., Liotta, L. A., and Stracke, M. L. (2000) *Oncogene* **19**, 241–247
- Yang, Y., Mou, L. J., Liu, N., and Tsao, M. S. (1999) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **21**, 216–222
- Euer, N., Schwirzke, M., Evtimova, V., Burtscher, H., Jarsch, M., Tarin, D., and Weidle, U. H. (2002) *Anticancer Res.* **22**, 733–740
- Yang, S. Y., Lee, J., Park, C. G., Kim, S., Hong, S., Chung, H. C., Min, S. K., Han, J. W., Lee, H. W., and Lee, H. Y. (2002) *Clin. Exp. Metastasis* **19**, 603–608