

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
佐藤慎哉, 嘉山孝正	転移性脳腫瘍に対する治療:最近の動向	鈴木則宏, 祖父江元, 荒木信夫, 宇川義一, 川原信隆	Annual Review 神経 2012	中外医学社	東京	2012	144-149
渋井壮一郎	C-VI 各種脳腫瘍の手術 2.転移性脳腫瘍	河本圭司, 本郷一博, 栗栖薫	イラストレイテッド 脳腫瘍外科学	医学書院	東京	2011	198-201

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sunayama J, Sato A, Matsuda KI, Tachibana K, Watanabe E, Seino S, Suzuki K, Narita Y, Shibui S, Sakurada K, Kayama T, Tomiyama A, Kitanaka C	FoxO3a Functions as a key Integrator of Cellular Signals that Control Glioblastoma Stem-Like Cell Differentiation and Tumorigenicity	Stem Cells	26(7)	696	2011
Hashimoto K, Narita Y, Miyakita Y, Ohno M, Sumi M, Mayahara H, Kayama T, Shibui S	Comparison of clinical outcomes of surgery followed by local brain radiotherapy and surgery followed by whole brain radiotherapy in patients with single brain metastasis: single-center retrospective analysis	Int J Radiat Oncol Biol Phys	81(4)	e475-80	2011
Beppu T, Sasaki M, Kudo K, Kurose A, Takeda M, Kashimura H, Ogawa A, Ogasawara K	Prediction of malignancy grading using computed tomography perfusion imaging in nonenhancing supratentorial gliomas	J Neurooncol	103(3)	619-27	2011
Iwadate Y, Matsutani T, Hasegawa Y, Shinozuka N, Higuchi Y, Saeki N,	Favorable long-term outcome of low-grade oligodendrogliomas irrespective of 1p/19q status when treated without radiotherapy	J Neurooncol	102(3)	443-9	2011
Arai T, Horiguchi K, Saeki N, Oka H, Saito T, Takahashi-Fujigasaki J, Sakamoto H, Kato N, Dobashi H, Tanaka T, Hasegawa Y, Abe T	Surgical treatment of a calcified Rathke's cleft cyst with endoscopic extended transsphenoidal surgery	Neurol Med Chir	51	535-8	2011
寺坂俊介, 小林浩之, 寶金清博	鞍結節髄膜腫に対する手術到達法の選択:高位か低位か?	No Shinkei Geka	39(6)	553-62	2011
栗栖宏多, 鴨嶋雄大, 寺坂俊介, 小林浩之, 久保田佳奈子, 寶金清博	胆管細胞癌よりの脈絡叢転移性腫瘍の1例	No Shinkei Geka	39(10)	991-7	2011
Terasaka S, Kawabori M, Kobayashi H, Murata J, Kanno H, Tanaka S, Houkin K	Neurohypophyseal germinoma with abundant fibrous tissue	Brain Tumor Pathol	29(1)	58-62	2012

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kobayashi H, Kawabori M, Terasaka S, Murata J, <u>Houkin K</u>	A possible mechanism of isolated oculomotor nerve palsy by apoplexy of pituitary adenoma without cavernous sinus invasion: a report of two cases	Acta Neurochir	153(12)	2453-6	2011
Yamaguchi S, Kobayashi H, Narita T, Kanehira K, Sonezaki S, Kudo N, Kubota Y, Terasaka S, <u>Houkin K</u> ,	Sonodynamic therapy using water-dispersed TiO <sub>2</sub> -polyethylene glycol compound on glioma cells: Comparison of cytotoxic mechanism with photodynamic therapy	Ultrason Sonochem	18	1197-204	2011
Liu K-W, Feng H, Bachoo R, Kazlauskas A, Smith EM, Symes K, Hamilton RL, Nagane M, <u>Nishikawa R</u> , Hu B, Cheng S-Y	SHP-2/PTPN11 mediates gliomagenesis driven by PDGFRA and Ink4a/Arf aberrations in mice and humans	J Clin Invest	121	906-17	2011
西川亮, 鈴木智成	松果体腫瘍の総合的な治療	脳神経外科速報	21	368-74	2011
Inoue T, Katoh N, Aoyama H, Onimaru R, Taguchi H, Onodera S, Yamaguchi S, <u>Shirato H</u>	Clinical Outcomes of Stereotactic Brain and/or Body Radiotherapy for Patients with Oligometastatic Lesions	Jpn J Clin Oncol	40(8)	788-94	2010
Sutherland K, Miyajima S, Date H, <u>Shirato H</u> , Ishikawa M, Murakami M, Yamagiwa M, Bolton P, Tajima T	A parameter study of pencil beam proton dose distributions for the treatment of ocular melanoma utilizing spot scanning	Radiol Phys Technol	3	16-22	2010
Yamaguchi S, Ishikawa M, Bengua G, Sutherland K, Nishio T, Tanabe S, Miyamoto N, Suzuki R, <u>Shirato H</u>	A feasibility study of a molecular-based patient setup verification method using a parallel-plane PET system	Phys. Med. Biol	56	965-77	2011
Onodera H, Aoyama H, Katoh N, Taguchi H, Yasuda K, Yoshida D, Sutherland K, Suzuki R, Ishikawa M, Gerard B, Terasaka S, <u>Shirato H</u>	Long-term Outcomes of Fractionated Stereotactic Radiotherapy for Intracranial Skull Base Benign Meningiomas in Single Institution	Jpn J Clin Oncol	41(4)	462-8	2011
Sutherland K, Ishikawa M, Bengua G, Ito YM, Miyamoto Y, <u>Shirato H</u>	Detection of patient setup errors with a portal image - DRR registration software application	J Appl Clin Med Phys	12(3)	3492	2011
Shibahara I, Sonoda Y, Kanamori M, Saito R, Yamashita Y, Kumabe T, Watanabe M, Suzuki H, Kato S, Ishioka C, <u>Tominaga T</u>	IDH1/2 gene status defines the prognosis and molecular profiles in patients with grade III gliomas	Int J Clin Oncol	Oct 6	(Epub ahead of print)	2011
Nakamura T, Saito R, Sugiyama SI, Sonoda Y, Kumabe T, <u>Tominaga T</u>	Local convection-enhanced delivery of chemotherapeutic agent transiently opens blood-brain barrier and improves efficacy of systemic chemotherapy in intracranial xenograft tumor model	Cancer Lett	310	77-83	2011
Saito R, Sonoda Y, Kumabe T, Nagamatsu K, Watanabe M, <u>Tominaga T</u>	Regression of recurrent glioblastoma infiltrating the brainstem after convection-enhanced delivery of nimustine hydrochloride	J Neurosurg Pediatr	7	522-6	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kawaguchi T, Kumabe T, Kanamori M, Saito R, Yamashita Y, Sonoda Y, Watanabe M, <u>Tominaga T</u>	Logarithmic decrease of serum alpha-fetoprotein or human chorionic gonadotropin in response to chemotherapy can distinguish a subgroup with better prognosis among highly malignant intracranial non-germinomatous germ cell tumors	J Neurooncol	104	779-87	2011
Kawaguchi T, Kumabe T, Kanamori M, Nakamura T, Saito R, Yamashita Y, Sonoda Y, Watanabe M, <u>Tominaga T</u>	Early detection of venous thromboembolism in patients with neuroepithelial tumor: efficacy of screening with serum D: -dimer measurements and Doppler ultrasonography	J Neurooncol	101	495-504	2011
Endo H, Fujimura M, Inoue T, Matsumoto Y, Ogawa Y, Kawagishi J, <u>Jokura H</u> , Shimizu H, <u>Tominaga T</u>	Simultaneous occurrence of subarachnoid hemorrhage and epistaxis due to ruptured petrous internal carotid artery aneurysm: association with transsphenoidal surgery and radiation therapy: case report	Neurol Med Chir	51(3)	226-9	2011
Murakami K, <u>Jokura H</u> , Kawagishi J, Watanabe M, <u>Tominaga T</u>	Development of intratumoral cyst or extratumoral arachnoid cyst in intracranial schwannomas following gamma knife radiosurgery	Acta Neurochir (Wien)	153(6)	1201-9	2011
Knisely JP, Yamamoto M, Gross CP, Castrucci WA, <u>Jokura H</u> , Chiang VL	Radiosurgery alone for 5 or more brain metastases: expert opinion survey	J Neurosurg	113 Suppl	84-9	2010
Muraguchi T, Tanaka S, Tamase A, Nakada M, Nakamura H, Hoshii T, Ooshio T, Tadokoro Y, Naka K, Ino Y, <u>Todo T</u> , Kuratsu J, Saya H, Hamada J, Hirao A	NKX2.2 suppresses self-renewal of glioma-initiating cells by induction of oligodendroglial differentiation	Cancer Res	71(3)	1135-45	2011
Ikushima H, <u>Todo T</u> , Ino Y, Takahashi M, Saito N, Miyazawa K, Miyazono K	Glioma-initiating cells retain their tumorigenicity through integration of the Sox axis and Oct4	J Biol Chem	286	41431-41	2011
Ogura M, <u>Todo T</u> , Tanaka M, Nannya Y, Ichikawa M, Nakamura F, Kurokawa M	Temozolomide may induce therapy-related acute lymphoblastic leukemia	Br J Haematol	154(4)	663-5	2011
Watanabe A, Ogiwara H, Ehata S, Mukasa A, Ishikawa S, Maeda D, Ueki K, Ino Y, <u>Todo T</u> , Yamada Y, Fukayama M, Saito N, Miyazono K, Aburatani H	Homozygously deleted gene DACH1 regulates tumor-initiating activity of glioma cells	Proc Natl Acad Sci USA	108 (30)	12384-9	2011
Koga T, Maruyama K, Tanaka M, Ino Y, Saito N, <u>Nakagawa K</u> , Shibahara J, <u>Todo T</u>	Extended field stereotactic radiosurgery for recurrent glioblastoma	Cancer Res	Dec 17	Published Online First	2011
Kida S, Saotome N, Masutani Y, Yamashita H, Ohtomo K, <u>Nakagawa K</u> , Sakumi A, Haga A	4D-CBCT reconstruction using MV portal imaging during volumetric modulated arc therapy	Radiother Oncol	100(3)	380-5	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yoda K, <u>Nakagawa K</u>	Technical note: Extension of Van Herk's treatment margin model for anisotropic systematic positioning errors in cartesian coordinate systema	Med Phys	38(7)	3913-4	2011
Sakumi A, Haga A, Kida S, Saotome N, Okano Y, Shiraishi K, Onoe T, Yoda K, Ohtomo K, <u>Nakagawa K</u>	First in-situ dose calculation report using in-treatment kilovoltage cone-beam ct and in-treatment linac parameters during volumetric modulated arc therapy	J Radiat Res	52(4)	536-7	2011
Okuma K, Yamashita H, Niibe Y, Hayakawa K, <u>Nakagawa K</u>	Abscopal effect of radiation on lung metastases of hepatocellular carcinoma: a case report	J Med Case Reports	5	111	2011
<u>Nakagawa K</u> , Kida S, Haga A, Masutani Y, Yamashita H, Imae T, Tanaka K, Ohtomo K, Iwai Y, Yoda K	Cone beam computed tomography data acquisition during VMAT delivery with subsequent respiratory phase sorting based on projection image cross-correlation	J Radiat Res	52(1)	112-3	2011
Sekine I, <u>Sumi M</u> , Ito Y, Horinouchi H, Nokihara H, Yamamoto N, Kunitoh H, Ohe Y, Kubota K, Tamura T	Phase I Study of Concurrent High-Dose Three-Dimensional Conformal Radiotherapy with Chemotherapy Using Cisplatin and Vinorelbine for Unresectable Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer	Int J Radiat Oncol Biol Phys	82(2)	953-9	2012

## IV. 研究成果の刊行物・別刷

## □ II. 本年の動向

### 11) 転移性脳腫瘍に対する治療: 最近の動向

山形大学医学部総合医学教育センター教授 佐藤慎哉

国立がん研究センター理事長/山形大学医学部脳神経外科教授 嘉山孝正

**key words** metastasis, radiosurgery, randomized controlled trial, resection, whole-brain radiation therapy

#### 要 旨

単発性転移性脳腫瘍に対しては、複数のランダム化比較試験の結果より、腫瘍摘出術+全脳照射が標準治療とされている。また、多発性の場合、画像上明らかではない他の転移巣の存在が考えられるため、それらに対する治療も含めて全脳照射が選択される場合が多い。しかし、近年、ガンマナイフを初めとする定位照射が急速に普及しつつある。これには、摘出術と比較した場合の定位照射の侵襲性の低さや、全脳照射後の高次脳機能障害が影響している。残念ながら、これまで単発症例の標準治療である腫瘍摘出術+全脳照射と定位照射を比較したランダム化比較試験が行われておらず、標準治療とし確立するまでには至っていない。また、多発症例に対しても、転移巣の数が何個までであれば、定位照射の適応なのかとの間に答えられるエビデンスは得られていない。今回は特に、転移性脳腫瘍治療における定位照射の意義について最新の知見を概説したい。

#### 動 向

転移性脳腫瘍の治療方針は、転移個数、腫瘍の大きさによって異なるため、従来から、単発と多発の場合を分けて検討されてきた。単発の転移性

脳腫瘍に対しては、腫瘍摘出術や放射線治療、腫瘍摘出術+放射線治療などの治療法が選択されることが多い。1990年に米国のPatchellらは、単発の転移性脳腫瘍に対して、全脳照射単独と腫瘍摘出術+全脳照射の48例のランダム化比較試験を行った<sup>1)</sup>。その結果、平均生存期間(MST)は腫瘍摘出術+全脳照射群の40週に対して、全脳照射群で15週と、腫瘍摘出術+全脳照射群で統計学的に有意にMSTの延長を認め、局所再発割合(20% vs 52%)、治療後のKarnofsky performance status (KPS) などでも腫瘍摘出術+全脳照射群で優っていたと報告した。それに引き続いて、欧州(オランダ)のVechtらも1993年に、全脳照射 vs 腫瘍摘出術+全脳照射のランダム化比較試験の結果、生存期間で有意に腫瘍摘出術+全脳照射群が上回っていたと報告した<sup>2)</sup>。また、前出のPatchellらは、単発の転移性脳腫瘍に対して、腫瘍摘出術単独と腫瘍摘出術+全脳照射のランダム化比較試験を行った結果も1998年に報告している<sup>3)</sup>。この試験では、全生存期間に有意差はみられなかったが、脳内の再発抑制効果が腫瘍摘出術+全脳照射群で高かった。これらのランダム化比較試験の結果より、単発の転移性脳腫瘍に対しては、腫瘍摘出術+全脳照射が標準治療と

えている国が多い。実際、最近まとめられた転移性脳腫瘍治療における全脳照射の意義を検討したレビューでも、少数転移例に対しては腫瘍摘出術+全脳照射がエビデンスレベルIで推奨されている<sup>4)</sup>。

しかしながら、近年、最大径が3cm以下の病変に対しては、ガンマナイフを初めとする定位照射が急速に普及しつつある。特に日本においてその傾向が強い。これには、原発巣も含めた他臓器病変の治療法の向上により生存期間が延長し、全脳照射による高次脳機能障害が問題視されるようになってきたことも影響している。しかし残念ながら、これまで標準治療である腫瘍摘出術+全脳照射と、定位照射単独あるいは定位照射+全脳照射を比較し、定位照射の有効性を報告した論文は存在するが、ランダム化比較試験が行われていないため、標準治療とし確立するまでには至っていない。

一方、多発性の転移性脳腫瘍では、画像上明らかではない他の転移巣が存在すると考えられるため、それらに対する治療も含めて全脳照射が選択される場合が多い。しかし、多発性であってもその中の1つ以上の腫瘍の径が大きい場合(3cmを超える)や、放置すると致死的と考えられる場合、症状がある場合などでは大きな病変に対して手術が適応となる場合がある。また、最近の傾向として、腫瘍径が3cm以下の場合には、数個程度であれば単発の場合と同様に定位照射が選択されるようになりつつある。ただし、この場合も転移巣の数が何個までであれば、定位照射の適応なのかとの間に答えられるエビデンスは得られていない。

## A. 転移性脳腫瘍治療における定位照射の意義

前述のごとく、現在の転移性脳腫瘍治療のト

ピックスは、定位照射の適応をどのように考えるかにある。本稿では、最近報告された定位照射に関する臨床試験を取り上げながら、転移性脳腫瘍治療の最新の動向を概説したい。

動向のところでは、転移性脳腫瘍の治療方法を単発と多発に分けて紹介したが、最近の傾向としては、単発vs多発ではなく1~3、4個の少数転移と5個以上の多数転移に分けて検討することが多い。これは、エビデンスがあるわけではないが、従来、定位照射の適応が転移巣数4個以下とされることが多かったことが影響している。そのため、以下に紹介する臨床研究も、そのような対象の設定になっていることが多い。

## B. 腫瘍摘出術+全脳照射vs定位照射+全脳照射

前述のごとく現在の単発転移に対する標準治療は「腫瘍摘出術+全脳照射」であるため、正攻法としては「定位照射+全脳照射」とのランダム化比較試験が望ましいが、定位照射が普及しつつある現在、この2つのアームでのランダム化比較試験は、侵襲性の観点から患者の同意が得難い。そのため、エビデンスレベルの高い比較試験はなされてこなかった。

そのような中、Radesら(2009)はドイツ3施設、オランダ1施設、米国1施設の5施設で1998年から2008年までに治療を行った症例の後方視的matched pair analysisを報告している<sup>5)</sup>。本試験は、最大径4cm以下、転移個数1~3個の症例で、全脳照射スケジュール、年齢、性別、PS(performance status)、転移個数、脳外転移病巣、Recursive partitioning analysis(RPA) classesを一致させた「定位照射+全脳照射群52例」、「腫瘍摘出術+全脳照射52例」の合計104例で検討された。結果は、1年全生存率が定位照射+全脳照射群で56%、腫瘍摘出術+全脳照射

群が47% ( $p = 0.034$ ). 1年頭蓋内制御率が定位照射+全脳照射群で66%, 腫瘍摘出術+全脳照射群が50% ( $p = 0.003$ ). 1年局所脳制御率が定位照射+全脳照射群で82%, 腫瘍摘出術+全脳照射群が66% ( $p = 0.006$ ). といずれも定位照射+全脳照射が有意に高かった. 以上の結果から, ランダム化比較試験ではないため断定はできないが, 少なくとも定位照射+全脳照射は, 標準治療である腫瘍摘出術+全脳照射に劣らないと結論づけている.

### C. 全脳照射単独 vs 全脳照射+定位照射

多発脳転移症例に対する標準治療を全脳照射と考えると, 全脳照射に追加して定位照射を加えることにより局所制御率が向上し, さらに生命予後が改善するか否かを検討することは重要である.

この疑問に対して Andrew ら (2004) は, 1996年から2001年まで行われた米国の RTOG (Radiation Therapy Oncology Group) の多施設共同ランダム化比較試験の結果を報告している<sup>6)</sup>. この臨床試験の対象は, 最大径4cm以下, 転移個数3個までの症例. 55施設から合計331例が登録された. 単変量解析では, 単発症例において定位照射併用群の生存期間中央値が6.5カ月と全脳照射単独群の4.9カ月に比較して有意に長かった ( $p = 0.0393$ ). 6カ月の時点でのKPSの温存・回復率は, 定位照射併用群が43%なのに対して, 全脳照射単独群は27%であり, 定位照射併用群の割合が大きかった ( $p = 0.03$ ). 以上から, 全脳照射+定位照射は, 単発症例に関しては標準的治療として, また2~3個の転移巣をもつ症例に関しては考慮すべき治療法であると結論づけている.

最近の報告としては, Patil ら (2010) が, 358例を集めたメタアナリシスにより全脳照射単独と全脳照射+定位照射の有効性を比較した<sup>7)</sup>. この

結果, 全症例を対象とすると, 生存期間に関しては二群間に有意差はないが, 単発症例に限ると定位照射併用群の平均生存期間6.5カ月, 全脳照射単独群4.9カ月で有意に定位照射併用群の生存期間が長いことが示された ( $p = 0.04$ ). また, 定位照射併用群では, 局所制御率も有意に高いことが示された. さらに6カ月の時点でのKPS低下の割合は, 定位照射併用群57%, 全脳照射単独群72%と, 定位照射併用群で有意にKPSが保たれていた ( $p = 0.03$ ). 以上から, 全脳照射+定位照射は, 全脳照射に対して有意に有効と結論付けている.

### D. 定位照射単独 vs 定位照射+全脳照射

先に述べたように, 全脳照射による高次脳機能障害が問題視されるようになってきたことも影響し, 全脳照射を行わず定位照射単独で治療する試みがなされている. この検討は, 10年以上前から試みられており, 例えば Aoyama ら (2006) は, 1999年から2003年まで行われた JROG (Japanese Radiation Oncology Group) の多施設共同ランダム化比較試験の結果として, ①定位照射に全脳照射を併用しても4個までの多発転移の症例においては, 生存率を改善しない, ②しかしながら全脳照射を併用しなければ, 頭蓋内再発が高率に認められ追加治療が必要になる場合が多くなる, と結論づけている<sup>8)</sup>.

同様の検討は, 最近になっても行われており, Kocher ら (2011) が EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer) の第三相試験の結果を報告している<sup>9)</sup>. この試験は, 定位照射だけでなく腫瘍摘出術も含めて, 全脳照射を引き続き行う群と, まず経過観察を行う群の比較をしたものである. 対象は定位照射199例 (全脳照射99例, 経過観察100例), 腫瘍摘出術160例 (全脳照射81例, 経過観察79例) の計



359例である。結果として、定位照射後、腫瘍摘出術後ともに、全生存期間、PSの維持期間に関して全脳照射併用の効果は認められなかった。しかし2年時の再発割合が、初期病巣、新規病巣ともに全脳照射併用群で低かった。さらに定位照射および腫瘍摘出術合わせて頭蓋内病変の悪化により死亡した割合は、全脳照射180例中50例(28%)に対して、経過観察群179例中78例(44%)と経過観察群で高かった。これまでの多くの報告では、全脳照射の効果は、局所制御に限定されるものがほとんどであるため、この報告の結果は注目すべきものである。

一方、Changら(2009)は、2001年から2007年までMD Anderson Cancer Center単独で行われたランダム化比較試験の結果を報告している<sup>10)</sup>。実はこの臨床試験は、4カ月後の評価で認知機能障害出現の事後確率が定位照射単独群24%に対して全脳照射併用群で52%と有意に高かったため、定位照射群30例、全脳照射併用群28例、合計58例の時点で中止された。以上から、初期治療としては全脳照射を併用せず、定位照射と注意深い経過観察が勧められると結論づけている。先にも述べたが、全脳照射併用の意義は、高次脳機能も含めた機能予後も考慮して検討すべきである。

## E. ガンマナイフ(定位照射)単独治療成績

我が国では、定位照射とくにガンマナイフ治療施設の中で全脳照射の併用可能な施設は必ずしも多くはない。そのため、ガンマナイフ単独での治療成績を報告した論文も多い。これらの中には、ランダム化比較試験ではないが、豊富な症例を解析した論文もあり、転移性脳腫瘍の治療を考える上で、重要である。

Serizawaら(2007)は、1998～2006年までの9年間にガンマナイフ単独で治療した連続1386

例の成績を報告している<sup>11)</sup>。照射方法は、3.5cm以上の腫瘍には、開頭摘出術あるいはガンマナイフによる低分割定位放射線照射(一回線量10Gy/2週間ごと/3回)、3.5cm以下の腫瘍に対しては全例20Gyを目標に治療を行った。初回治療後、予防的全脳照射は行わず、2～3カ月ごとに試行した造影MRIで新病変出現時には、頭蓋外病変の進展度や闘病意欲を加味し、ガンマナイフの再照射を行った。結果、中央生存期間は9.4カ月、1年における神経死予防率、神経機能温存率、新規病変非出現率は、それぞれ88.5%、81.5%、56.3%であった。追加照射の回数は、0回67.9%、1回17.6%、2回6.3%、3回3.2%、4回以上5%であった。初回治療時の転移個数と平均追加照射回数は、単発が0.36回、2～4個0.68回、5～10個0.84回、11個以上1.00回といずれも1回以下であった。以上から、予防的全脳照射を併用しないガンマナイフ単独治療は、容認できる範囲の新規病変の出現頻度と追加照射の施行状況で、神経死予防、神経機能温存が期待できると報告している。

これに関連して、現在、日本ガンマナイフ研究会が日本脳神経財団の援助を受け、転移巣が10個以下で、最大径の病変が3cm以下かつ腫瘍体積が10cc未満、腫瘍総体積が15cc以下の症例を対象に多施設共同観察研究「転移性脳腫瘍に対するガンマナイフ単独治療成績前向き多施設共同研究(JLKG0901)(UMIN:UMIN000001812)」を行っている。

この研究の目的は、「一定の治療適応、治療計画、経過観察により、どの程度のガンマナイフ治療成績を期待できるか、前向きに多施設共同研究を行い、本邦における転移性脳腫瘍に対するガンマナイフ治療成績を明らかにする」とされている。2009年に登録が開始され、目標参加者数1200名で、現在も登録継続中である。これまで5個以上の転移性脳腫瘍に対する定位照射の有効性を検

討した研究は世界的にみてもほとんどない。一方、我が国では5個以上の転移巣を有する症例に対しても日常的に定位照射が行われていると考えられることから、10個までの多発症例における定位照射の有効性を観察研究ではあるが、前方視的に多施設共同で評価する意義は大きい。

## F. 日本発の新たな転移性脳腫瘍治療プロトコール

現在、厚生労働科学研究費補助金がん臨床研究事業「放射線による認知機能障害を回避する転移性脳腫瘍の治療法に関する研究（研究代表者 嘉山孝正）」を基に「転移性脳腫瘍に対する、摘出術＋全脳照射と摘出術＋Salvage Radiation Therapyとのランダム化比較試験（JCOG0504）（UMIN: C000000307）」が行われている。JCOG（Japan Clinical Oncology Group）とは、厚生労働省がん研究助成金指定研究班および厚生労働省科学研究費補助金研究班を中心とする多施設共同臨床研究グループである。この試験の目的は、全脳照射による遅発性高次脳機能障害を回避するために、標準治療とされる腫瘍摘出術＋全脳照射に対して、摘出術後に全脳照射を行わず、残存病変、および新病変に対して定位照射の追加を行うことの有効性の比較（非劣性）を行うものである。対象は、転移巣が4個以下で、最大径3cmを超える病変に対して腫瘍摘出術が行われた症例である。プロトコール治療は、A群（術後全脳照射）とB群（残存・新規病変に対しての逐次定位照射）である。エンドポイントは、全生存期間、有害事象、PS非悪化割合、MMSE非悪化割合である。この試験は、2005年に登録が開始され、現在も継続中である。このプロトコールによる臨床試験は、世界初のユニークなものであると同時に、この研究で新たな治療プロトコールの有効性が示されれば、全脳照射に係る入院期間の短縮と

放射線障害によって引き起こされるADLの低下を抑制でき、患者の自宅復帰・家庭介護の可能性を高めることが期待されている。

### むすび

日本においては転移性脳腫瘍の治療法として定位照射の比重がきわめて大きい。一方、これまで定位照射の比重の低かった欧米でも、例えば、米国のNational Comprehensive Cancer Networkの転移性脳腫瘍治療ガイドラインでは、1～3個の少数転移例の治療アームとして、2003年度版、2006年度版、最新の2009年度版と年度を重ねるたびに定位照射の比重が高くなっている。今後の転移性脳腫瘍の治療は、いかにうまく定位照射を利用するかが世界共通のテーマではないだろうか。

この定位照射の活用のように、転移性脳腫瘍の治療に関して我が国は、けして遅れをとっていただけではない。しかしながら新たな治療法を導入する際に常に標準的治療を意識して、国際的評価に耐えうる臨床試験を行ってこなかったために、折角の先進性が国際的に評価されてこなかったように思われる。

今後は、この反省に立ち、転移性脳腫瘍治療に関しても日本発のエビデンスを発信する努力が求められている。

### 文献

- 1) Patchell RA, Tibbs PA, Walsh JW, et al. A Randomized trial of surgery in the treatment of single metastases to the brain. *N Engl J Med.* 1990; 322: 494-500.
- 2) Vecht CJ, Haaxma-Reiche H, Noordijk EM, et al. Treatment of single brain metastasis: radiotherapy alone or combined with neurosurgery? *Ann Neurol.* 1993; 33: 583-90.
- 3) Patchell RA, Tibbs PA, Regine WF, et al. Postoperative radiotherapy in the treatment of single brain metastases to the brain. *JAMA.*

- 1998; 280: 1485-9.
- 4) Gaspar LE, Mehta MP, Patchell RA, et al. The role of whole brain radiation therapy in the management of newly diagnosed brain metastases: a systematic review and evidence-based clinical practice guideline. *J Neurooncol.* 2010; 96: 17-32.
  - 5) Rades D, Kueter JD, Veninga T, et al. Whole brain radiotherapy plus stereotactic radiosurgery (WBRT+SRS) versus surgery plus whole brain radiotherapy (OP+WBRT) for 1-3 brain metastases: results of a matched pair analysis. *Eur J Cancer.* 2009; 45: 400-4.
  - 6) Andrews DW, Scott CB, Sperduto PW, et al. Whole brain radiation therapy with or without stereotactic radiosurgery boost for the patients with one to three brain metastases: phase III results of the RTOG9508 randomised trial. *Lancet.* 2004; 363: 1665-72.
  - 7) Patil CG, Pricola K, Garg SK, et al. Whole brain radiation therapy (WBRT) alone versus WBRT and radiosurgery for the treatment of brain metastases. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010; 6: CD006121.
  - 8) Aoyama H, Shirato H, Tago M, et al. Stereotactic radiosurgery plus whole-brain radiation therapy vs stereotactic radiosurgery alone for treatment of brain metastases: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2006; 295: 2483-91.
  - 9) Kocher M, Soffiatti R, Abacioglu U. et al. Adjuvant whole-brain radiotherapy versus observation after radiosurgery or surgical resection of one to three cerebral metastases: results of the EORTC22952-26001 study. *J Clin Oncol.* 2011; 29: 134-41.
  - 10) Chang EL, Wefel JS, Hess KR. Neurocognition in patients with brain metastases treated with radiosurgery or radiosurgery plus whole-brain irradiation: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2009; 10: 1037-44.
  - 11) Serizawa T, Nagano O, Higuchi Y, et al. Results of gamma knife surgery alone for brain metastases: indications for and limitations of local treatment protocol without prophylactic whole brain radiation therapy. *Jpn J Neurosurg(Tokyo).* 2007; 16: 833-9.

## 5

## 転移性脳腫瘍

metastatic brain tumor

## 術前解剖知識

転移性脳腫瘍の多くは脳実質内に発生するが、原発は脳実質外起原の悪性腫瘍であることはいうまでもない。時に硬膜転移症例も経験するが、髄膜腫や他の良性腫瘍などと異なり増殖速度が速く浸潤傾向があるために、通常は脳実質内への伸展があるものとして治療方針を立てる必要がある。転移病巣切除の際

は、発生起源が脳実質の細胞でないため、周囲の脳組織から剝離することが可能と考えられるが、実際には周囲への浸潤部分があるため、脳実質をわずかず含めて摘出することが必要である。つまりできるだけ腫瘍自体を露出や破壊をせずに周囲との境界をつくることにより、腫瘍細胞を拡散させることなく摘出することを心がけるべきである。これは先人がいう「転移性脳腫瘍の手術の際は、腫瘍を見ないで摘出すること」との言葉と共通するものである(図1)。

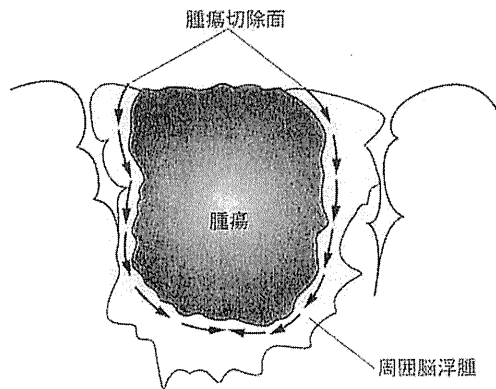


図1 腫瘍摘出面作製時の原則

浸潤部を含めて腫瘍を摘出するために、腫瘍の数mm外側に切除面を置く。

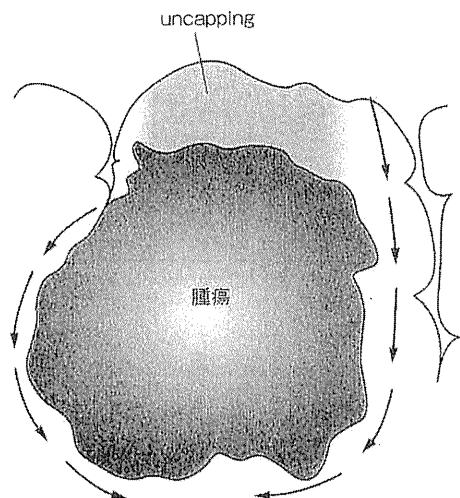


図2 uncapping

腫瘍表面の脳組織を切除(uncapping)することで、周囲の脳損傷を軽減できる場合もある。

## ●メモ1

転移性脳腫瘍は一塊として摘出することが原則であるが、大きな腫瘍では部位により周囲の脳実質に余計な牽引、圧迫が加わり、不必要な血管損傷、脳損傷を招く危険性がある。状況によっては適切な内減圧あるいは小塊に分けての摘出が有効である。これらの操作は一塊として腫瘍を摘出するという方針に反するが、現実には嚢胞性腫瘍での内容物の流出や術中の術野洗浄の操作により、少なからず腫瘍細胞は周囲に拡散しているものと思われる。術後の放射線治療や細胞流出を防ぐために綿片による堤防を形成するなどの工夫はもちろん必要である。

## ●メモ2

脳表に腫瘍が露出していない場合や、腫瘍の手前にある脳実質が、腫瘍の上に薄く存在しているだけのときの摘出に際しては、脳の解剖生理を理解して、電気生理学的検査や覚醒下手術の手法などにより、一部この脳実質を切除(uncapping)することで逆に余計な脳損傷を防ぐことが可能な場合もある。またこの際、表面を走行する動静脈がどのような血管支配となっているかを確認してから、温存すべきか、犠牲にしてよいかを判断しなければならない(図2)。

## 手術適応

転移性脳腫瘍は致命的な病態であるが、適切な治療が行われた場合、患者の70~80%は脳病巣よりもむしろ原発巣により、その生命予後が決定されるといわれている。治療方針決定の際は、原発巣の組織診断、進行状態、年齢、performance status(PS)、脳転移巣の大きさ、部位、個数など様々な要素を考慮することが必要である。放射線治療は、全脳照射、定位照射ともに一定の効果が認められており、特に直径3cm以下の小さな腫瘍に対しては第1選択となる。通常は直径3cm以上のもの(後頭蓋窩では若干それより小さなもの)が手術適応となる。

放射線治療のみによる転移性脳腫瘍患者の予後は、PS、原発巣再発の有無、年齢、頭蓋外転移の有無によりクラス1~3に分けられ、それぞれ7.1か月、4.2か月、2.3か月と報告されている(図3)<sup>1)</sup>。これらの生存期間から考えても手術侵襲を加えるからには少なくとも6か月程度の予後が見込める症例を対象とすべきである。腫瘍が単発で3cm以上のとき、もしくは多発性であってもそのひとつが意識障害をきたすときや、予後に影響を及ぼすほど大きいときは摘出術を行い、術後に全脳照射を基本とした放射線治療を追加する<sup>2)</sup>。単発、多発にかかわらず、いずれの腫瘍も3cm以下の場合には、組織診断を行ったのちに、もしくは明らかに転移をきたす活動性のがんが存在する場合には、臨床的に転移性脳腫瘍と診断をして放射線治療を行う。単発性脳転移の手術に関するランダム化比較試験では、有意に手術+放射線照射群が放射線単独群の成績を上回っている<sup>3)</sup>。

### ●メモ3

原則として、6か月以上の生命予後が見込める場合に手術対象とすべきと考える。しかし適切な手術を行うことで麻痺や失語症、意識障害など生活制限の原因となっている臨床症状の改善が期待でき、QOLの改善が見込めるのであれば、必ずしもその限りではない。

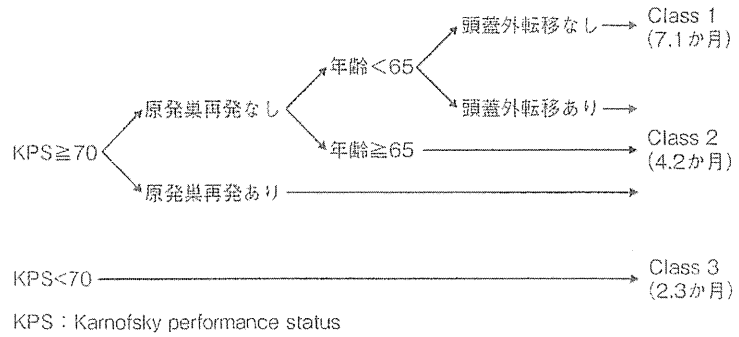


図3 転移性脳腫瘍に対する放射線治療成績の再帰分割分析

(Gaspar L, Scott C, Rotman M, et al : Recursive partitioning analysis(RPA) of prognostic factors in three Radiation Therapy Oncology Group(RTOG) brain metastases trials. Int J Radiat Oncol Biol Phys 37 : 745-751, 1997より改変)

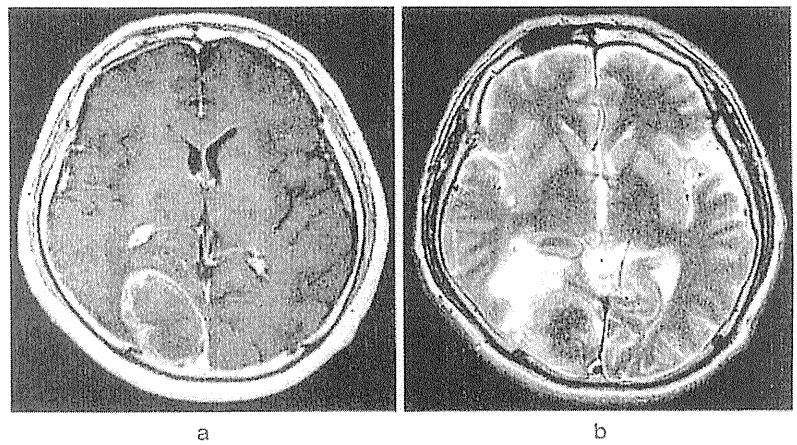


図4 転移性脳腫瘍のMRI

Gd造影T1強調画像(a)にて、リング状の増強がみられ、T2強調画像(b)では腫瘍周囲に広汎な脳浮腫が認められる。

### 症例(図4)

59歳、男性。2年半前に肺癌の手術既往がある。3か月前から視野欠損があり、近医眼科を受診したところ脳腫瘍を疑われ、脳神経外科に紹介された。右後頭葉を中心に直径5.5cmの脳腫瘍を指摘され、転移性脳腫瘍の診断で開頭腫瘍摘出術を行い、術後は全脳照射を行った。

## 手術アプローチ法

### 体位、皮膚切開、開頭、硬膜切開

開頭により腫瘍を摘出する場合、いかなる腫瘍においても、硬膜切開の範囲を決定すれば、おのずと開頭範囲、それを行うために必要な皮膚切開線、そして摘出操作に支障のない体位が決まる。近年、画像誘導下による手術ナビゲーションシステムが普及してきてい

るが、まだどこ施設でも使用できる機器ではないため、骨縫合、骨隆起を含めた外表からシルビウス裂や中心溝などの位置を同定するための基礎知識は習熟しておく必要がある。

転移性脳腫瘍は頻度の差こそあるが、脳内のどの部位にも発生するために、あらゆる部位のあらゆる大きさの開頭を想定することが必要であり、したがって体位も様々である。しかし大脳半球に発生した症例の多くは、運動野よりも前方であれば仰臥位、後方に位置していれば腹臥位で対処することができる。頭部がほぼ真横を向くことが必要な症例では、軀幹に枕を挿入して肩を挙上することで過度な頸部の回転は避ける。担瘤患者が対象であるので、高齢者や呼吸器合併症を伴う場合も少なくないが、呼吸管理を理由に腹臥位をとれないことはほとんどない。

頭部固定の際は、開頭野が頂点となるような体位をとることが原則である。同時に腫瘍に対して顕微鏡の光軸が垂直より手前に倒れるように頭部の固定を行うと、無理なく摘出面に到達することができる。逆に光軸を腫瘍に対して垂直よりも遠くへ倒すことになると術野へ覆いかぶさることとなり、操作が困難となる。

後頭蓋窩に発生した腫瘍を摘出する場合は、水平裂レベルよりも上方に主座があるもの、もしくは小脳テントに接するものは尾側から、水平裂よりも下方であれば頭側へ術者が位置するほうが視野の確保が容易である。しかしこれも、術中に臨機応変に位置を移動してより容易で確実な視野を確保することが肝要である。

### 腫瘍摘出

腫瘍摘出は前述のとおり、できるだけ腫瘍自体を露出しないように、腫瘍のひと回り外側を低圧の吸引管でなでるようにしながら、もしくは小さな綿片で削ぐように腫瘍と正常脳の境界面を形成していく形で進める(図1)。吸引管の操作は腫瘍に対して垂直ではなく、接線方向にして周囲の脳浮腫もしくはグリオーシス部分で境界を作成していくことが大事である。周囲の圧排は腫瘍側を主体とし、正常脳側へは必要最小限にとどめる。適宜形成した境界面へ綿片を挿入して境界を確

保するとともに、腫瘍側からの出血を止めていくことが必要となる。この際に一点に集中して深く剥離を進めるのではなく、顕微鏡の拡大率を適宜変更して、全体の進行具合をみながら進めることも必要である。また、腫瘍全周にわたって剥離を進めるため、固定型の脳へらよりも助手が脳へらを持ち、適宜その位置を変えながら視野の確保ができるようにすることが望ましい。

### ●メモ4

手術操作を進める際、動脈性出血に対しては電気凝固による確実な止血を行うべきであるが、視野を妨げない程度の静脈性出血は、前述のとおり、綿片を置くことでやがて止血が確保できるので、ごくわずかな出血であれば止血操作で無為に時間を費やすことは避ける。

### ●メモ5

腫瘍・正常脳剥離の際に、どのような手術機具を使用するかは各術者、各施設によって少しずつ異なるのは当然のことと思われる。ここで数通りの方法を紹介する。

- ① 左手に吸引管、右手にパイポーラ凝固装置を持ち、凝固装置で綿片をはさみ脳へらの代用として操作空間をつくりながら吸引管で境界を分けていく方法。この方法では凝固装置は止血操作にもすぐ対応ができ、剥離空間への綿片の挿入も同時に行うことができる(図5)。
- ② 左手に超音波吸引装置、右手は凝固装置を持つ方法。この際超音波吸引装置の出力は最小限として、やはり腫瘍の外側を一枚保ちながら剥離形成することで摘出を進める方法である。
- ③ 左手に吸引管、右手に超音波吸引装置を持つ方法。この方法では、手術の進行が早くなるが、止血操作のために凝固装置へ機具を持ち換える必要があるため、易出血性の腫瘍には適切な方法とはいえない。
- ④ 左手に脳へら、右手に吸引管または超音波吸引装置を持つ方法。術野が狭く、助手の器具が入りにくい場合で、しかも出血の少ない腫瘍に対して適している。

### 術後管理

抗脳浮腫薬としてのステロイドは、漸減しながら1週間程度使用することが望ましい。術中に意図しない血管障害が起きていたり、脳の過度の牽引により脳浮腫が増悪したりす

る可能性もあり、他の手術と同様に術後24時間以内にCTやMRIにて摘出範囲の確認と同時に、出血や脳浮腫の有無を確認する。その後も注意深い神経所見の推移を観察して、症状の変化があるときはためらわず画像検査を追加して適切な対処を加えるべきである。特に後頭蓋窩腫瘍の場合は髄液の循環障害による水頭症から突然の意識障害を引き起こす危険があることも想定しておく事項である。

転移性脳腫瘍のうち、手術適応となるのはごく一部にすぎない。特に最近では、ガンマナイフやサイバーナイフなどの定位照射が広く用いられるようになり、いっそうその傾向が強まっている。しかしながら、ごく短時間で腫瘍細胞を除去し、神経症状を改善するには手術に勝るものではなく、適応を考えた確実な腫瘍摘出は、患者のQOLさらには生命予後の改善につながるものである。術後の放射線治療についても一律全脳照射というだけでなく、定位照射との比較試験も行われており、転移性脳腫瘍に対する治療も確実に進歩しているといえる。

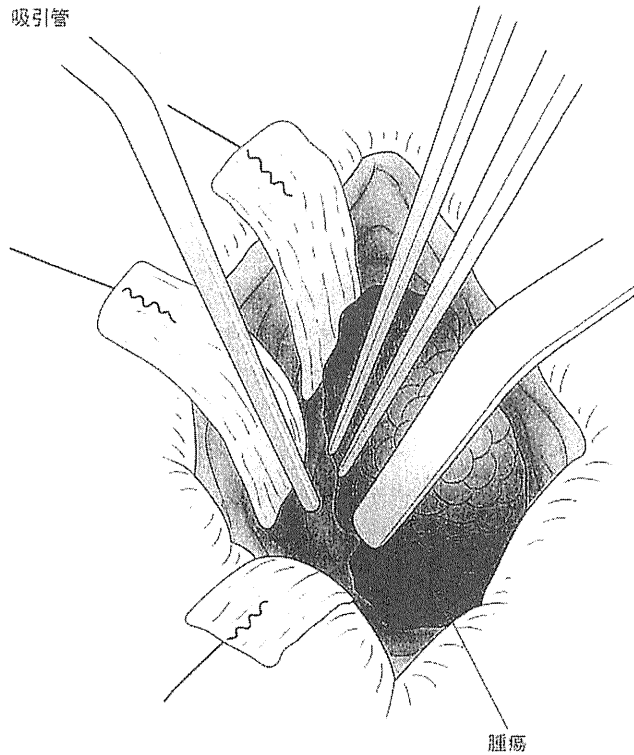


図5 転移性脳腫瘍摘出時の実際  
吸引管とバイポーラ凝固装置を用いて、腫瘍の外側に沿って周囲から剥離する。

参考文献

- 1) Gaspar L, Scott C, Rotman M, et al : Recursive partitioning analysis (RPA) of prognostic factors in three Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) brain metastases trials. Int J Radiat Oncol Biol Phys 37 : 745-751, 1997
- 2) Narita Y, Shibui S : Strategy of surgery and radiation therapy for brain metastases. Int J Clin Oncol 14 : 275-280, 2009
- 3) Patchell RA, Tibbs PA, Regine WF, et al : Postoperative radiotherapy in the treatment of single metastases to the brain : a randomized trial. JAMA 280 : 1485-1489, 1998

(渋井壮一郎・宮北康二)

## FoxO3a Functions as a Key Integrator of Cellular Signals That Control Glioblastoma Stem-like Cell Differentiation and Tumorigenicity

JUN SUNAYAMA,<sup>a,b,c</sup> ATSUSHI SATO,<sup>a,d</sup> KEN-ICHIRO MATSUDA,<sup>a,d</sup> KEN TACHIBANA,<sup>a</sup> ERIKO WATANABE,<sup>a</sup> SHIZUKA SEINO,<sup>a</sup> KAORI SUZUKI,<sup>a,c</sup> YOSHITAKA NARITA,<sup>c</sup> SOICHIRO SHIBUI,<sup>c</sup> KAORI SAKURADA,<sup>d</sup> TAKAMASA KAYAMA,<sup>d</sup> ARATA TOMIYAMA,<sup>a</sup> CHIFUMI KITANAKA<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup>Department of Molecular Cancer Science and <sup>d</sup>Department of Neurosurgery, Yamagata University School of Medicine, Yamagata, Japan; <sup>b</sup>Oncology Research Center, Research Institute for Advanced Molecular Epidemiology, Yamagata University, Yamagata, Japan; <sup>c</sup>Global COE program for Medical Sciences, Japan Society for Promotion of Science, Tokyo, Japan; <sup>e</sup>Department of Neurosurgery, National Cancer Center Hospital, Tokyo, Japan

**Key Words.** FoxO3a • Akt • Extracellular signal-regulated kinase • p70S6K • Glioblastoma stem cells

### ABSTRACT

Glioblastoma is one of the most aggressive types of human cancer, with invariable and fatal recurrence even after multimodal intervention, for which cancer stem-like cells (CSLCs) are now being held responsible. Our recent findings indicated that combinational inhibition of phosphoinositide-3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) and mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathways effectively promotes the commitment of glioblastoma CSLCs to differentiation and thereby suppresses their tumorigenicity. However, the mechanism by which these two signaling pathways are coordinated to regulate differentiation and tumorigenicity remains unknown. Here, we identified FoxO3a, a common phosphorylation target for Akt and ERK, as a key transcription factor that integrates the signals from these path-

ways. Combinational blockade of both the pathways caused nuclear accumulation and activation of FoxO3a more efficiently than blockade of either alone, and promoted differentiation of glioblastoma CSLCs in a FoxO3a expression-dependent manner. Furthermore, the expression of a constitutively active FoxO3a mutant lacking phosphorylation sites for both Akt and ERK was sufficient to induce differentiation and reduce tumorigenicity of glioblastoma CSLCs. These findings suggest that FoxO3a may play a pivotal role in the control of differentiation and tumorigenicity of glioblastoma CSLCs by the PI3K/Akt/mTOR and MEK/ERK signaling pathways, and also imply that developing methods targeting effective FoxO3a activation could be a potential approach to the treatment of glioblastoma. *STEM CELLS* 2011;29:1327–1337

Disclosure of potential conflicts of interest is found at the end of this article.

### INTRODUCTION

Glioblastoma multiforme, the most common primary brain tumor in adults, is highly aggressive with a median survival of less than 2 years despite multimodality treatment consisting of surgical resection followed by radiotherapy and chemotherapy [1]. In recent years, many studies have reported the presence of stem cells in glioblastoma, referred to as cancer stem-like cells (CSLCs) or cancer-initiating cells [2–5]. One important property of glioblastoma CSLCs

is their highly oncogenic potential, generating tumors that reproduce the characteristics of the original tumor on implantation into nude mice, whereas other cells isolated from the same tumors are nontumorigenic. Other properties include self-renewal capacity, i.e., ability to undergo divisions that allow the generation of more glioblastoma CSLCs, and differentiation capacity, which contributes to tumor cellular heterogeneity [6]. Of therapeutic significance, glioblastoma CSLCs also represent a population of radioresistance and chemoresistance that can survive treatment and repopulate the tumors. Therefore, it has been thought that glioblastoma

Author contributions: J.S.: concept and design, collection and assembly of data, data analysis and interpretation and manuscript writing; A.S.: concept and design, collection and assembly of data, data analysis and interpretation; K.-i.M., K.T., S. Seino, and A.T.: data analysis and interpretation; E.W.: collection and assembly of data; K. Suzuki: provision of study material or patients; Y.N. and S. Shibui, K. Sakurada, and T.K.: provision of study material or patients, data analysis and interpretation; C.K.: concept and design, data analysis and interpretation, manuscript writing and final approval of manuscript. J.S. and A.S. contributed equally to this article.

Correspondence: Chifumi Kitanaka, M.D., Ph.D., Department of Molecular Cancer Science, Yamagata University School of Medicine, Yamagata 990-9585, Japan. Telephone: 81-23-628-5212; Fax: 81-23-628-5215; e-mail: ckitanak@med.id.yamagata-u.ac.jp Received April 19, 2011; accepted for publication July 4, 2011; first published online in *STEM CELLS EXPRESS* July 26, 2011. © AlphaMed Press 1066-5099/2009/\$30.00/0 doi: 10.1002/stem.696

STEM CELLS 2011;29:1327–1337 www.StemCells.com



CSLCs play a primary role in tumor maintenance and recurrence [7, 8].

A number of therapeutic strategies directed at CSLCs are emerging and are now undergoing experimental validation, among which is differentiation therapy [9]. The possibility that differentiation of CSLCs within a malignancy may lead to tumor degeneration and increased susceptibility to conventional cytotoxic anticancer therapies has been recognized for some time [9]. In this respect, a number of potential strategies has been reported that can promote differentiation of glioblastoma CSLCs. Bone morphogenetic protein can function as a key inhibitory regulator of glioblastoma CSLCs by regulating their differentiation status [10], and the inhibition of the transforming growth factor- $\beta$ -Sox4 (sex-determining region of Y chromosome-related high mobility group box 4)-Sox2 pathway blocked the tumorigenicity of glioblastoma CSLCs by promoting their differentiation [11]. Knockdown of transformation/transcription domain-associated protein has increased differentiation of glioblastoma CSLCs and suppressed tumor formation *in vivo* [12]. It has been reported that pleiomorphic adenoma gene like 2 (PLAGL2) executes its oncogenic activities through regulation of the cellular differentiation status, and reduction of PLAGL2 represses their tumorigenic potency [13]. All these reports demonstrate that the promotion of glioblastoma CSLC differentiation can markedly reduce their tumorigenic potential and hence the glioblastoma CSLC population *per se*, underscoring the idea that differentiation therapy holds promise as an approach to target glioblastoma CSLCs.

Recently, we have shown that targeted inactivation of the mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway in glioblastoma CSLCs promotes their differentiation into neuronal and glial lineages and this effect is apparently augmented by concurrent inhibition of the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. Importantly, combinational blockade of both pathways more effectively suppressed their tumorigenicity than blockade of either alone [14]. These findings suggest that the PI3K/Akt/mTOR and MEK/ERK pathways coordinately regulate the differentiation and tumorigenicity of glioblastoma CSLCs. However, to date, the critical molecules mediating such effects of these two signaling pathways remain to be identified.

Here in this study, we revealed that FoxO3a receives inputs from the PI3K/Akt/mTOR and MEK/ERK pathways in glioblastoma CSLCs and controls their differentiation and tumorigenicity. Our findings suggest that FoxO3a may function as a key integrator of these cellular signals controlling glioblastoma CSLCs and may as such be a potential therapeutic target in glioblastoma treatment.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell Culture

Patient-derived glioblastoma (SJ28P3 and #38) and A172 CSLCs were isolated and cultured as described previously [14, 15]. Briefly, primary human glioblastoma cells were derived from surgical specimens obtained after informed consent from glioblastoma patients in accordance with a protocol approved by the Institutional Review Boards of the National Cancer Center and Yamagata University School of Medicine. A172 glioblastoma cells were obtained from the RIKEN Bioresource Center. Cells were cultured in the stem cell culture medium (Supporting Information) in the presence of 20 ng/ml epidermal growth factor (EGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF). Under this cul-

ture condition, cell aggregates known as spheres are formed within a few days. Spheres were cultured in the sphere culture condition with EGF and bFGF for a period of time. Subsequently, cells were plated on collagen-coated dishes (IWAKI, Tokyo, Japan, <http://atg.ushop.jp>) for the monolayer culture of stem-like cells. Monolayer-cultured CSLCs were dissociated by Accutase (Sigma, St. Louis, MO, <http://www.sigmaldrich.com>) and reseeded once every 6–7 days. Characterization of the monolayer-cultured CSLCs has been described [14, 15].

### Lentiviral Vectors

The cDNA encoding human wild-type FoxO3a was generated by polymerase chain reaction (PCR) using primers 5'-CCC TCG AGT CAG CCT GGC ACC CAG CTC TGA GAT-3' and 5'-CCC TCG AGT CAG CCT GGC ACC CAG CTC TGA GAT-3' from a human placenta cDNA library and subcloned into the BamHI-XhoI of pENTR (Invitrogen, Carlsbad, CA, <http://www.invitrogen.com>). Site-directed mutagenesis was performed with the QuikChange kit (Stratagene, Santa Clara, CA, <http://www.chem.agilent.com>) to introduce Thr/Ser to Ala changes at T32, S253, S294, S315, S344, and S425 of FoxO3a [16, 17]. A dominant-negative FoxO3a, which contains the DNA binding domain but lacks the transactivation domain [18], was amplified by PCR using pENTR-FoxO3a as a template. Each FoxO3a mutant was inserted into lentiviral expression vector pLenti (Invitrogen). Lentiviruses were produced in Lenti-X 293T cells with packing mix (Lenti-X HT Packaging System, Clontech, Mountain View, CA, <http://www.clontech.com>) according to the manufacturer's instructions.

### Knockdown by RNA Interference

After monolayer-cultured patient-derived and A172 CSLCs were seeded at a density of  $2 \times 10^5$  cells per milliliter in the stem cell culture medium on collagen-coated dishes, they were transfected with siRNAs using Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen). The siRNAs used in this study are described in Supporting Information.

### Generation of Stable Cell Lines

Patient-derived glioblastoma CSLCs (SJ28P3) stably expressing FoxO3a short hairpin RNA (shRNA) were obtained using the BLOCK-iT RNAi expression vector kits (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The shRNA of FoxO3a (Hmi405996) and the nontargeting control sequence were purchased from Invitrogen. Cells were transfected with control and FoxO3a shRNA vectors. The transfectants were selected in the stem cell culture medium containing blasticidin (Invitrogen).

### Subcellular Fractionation

Cells were homogenized in hypotonic buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 150 mM NaCl, and 1 mM EDTA) containing 0.1% Triton X-100. The lysates were centrifuged at 3,000 rpm for 10 minutes at 4°C and separated into pellet and supernatant fractions. The pellet was resuspended in hypotonic buffer containing 0.1% Triton X-100, recentrifuged, and used as the nuclear fraction. The supernatant fraction was recentrifuged at 15,000 rpm for 20 minutes at 4°C and was used as the cytoplasmic fraction.

### Animal Experiments

Intracranial xenografts: monolayer-cultured SJ28P3 or #38 CSLCs ( $1 \times 10^4$ ) in 10  $\mu$ l Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 medium were injected stereotactically into the right cerebral hemisphere of a 5-week-old male BALB/cAJcl-nu/nu mice (CLEA Japan, Inc.) at a depth of 3 mm. All animal experiments were performed under a protocol approved by the Animal Research Committee of Yamagata University.

### Statistical Analysis

Results are expressed as the means  $\pm$  SDs and were analyzed using the unpaired Student's *t* test, while mouse survival was

STEM CELLS

evaluated by the Kaplan-Meier method and analyzed using the log-rank test.

### Sphere Formation Assay, Immunoblot Analysis and Immunoprecipitation, and Immunofluorescence Analysis

These methods are described in Supporting Information.

## RESULTS

### Tight Association Between Upregulation of FoxO3a and Differentiation Induced by the Inhibition of the PI3K/Akt/mTOR and MEK/ERK Signaling Pathways in Glioblastoma CSLCs

As candidate molecules that have been implicated in cellular differentiation and could also be under the control of both the PI3K/Akt/mTOR and MEK/ERK pathways [16, 17], we investigated the possible involvement of Forkhead Box O (FoxO) transcription factors in the regulation of glioblastoma CSLC differentiation. As we reported previously [14], inhibition of either the PI3K/Akt/mTOR (with a dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BE235) or the MEK/ERK (with a MEK inhibitor SL327 or U0126) pathway caused modest, and inhibition of both caused marked, induction of glioblastoma CSLC differentiation as indicated by the increased expression of differentiation markers,  $\beta$ III-tubulin, and glial fibrillary acidic protein (GFAP) (Fig. 1A, 1F). Under these conditions, we found that the expression level of FoxO3a, but not those of FoxO1 and FoxO4, is increased in close association with the expression of the differentiation markers in both glioblastoma patient-derived CSLCs (SJ28P3 CSLCs) as well as in those derived from an established glioblastoma cell line, A172 (A172 CSLCs) (Fig. 1A, 1F; Supporting Information Fig. 1). A subcellular fractionation study further indicated that nuclear FoxO3a expression is closely associated with the differentiation status of glioblastoma CSLCs. FoxO3a, which was localized predominantly in the cytoplasm in the control (vehicle-treated) condition, accumulated in the nucleus as the PI3K/Akt/mTOR and/or MEK/ERK pathways were inhibited (Fig. 1B, 1G). The results of the fractionation study were also confirmed by immunocytochemistry: vehicle-treated cells showed a perinuclear pattern of FoxO3a expression, whereas cells treated concomitantly with the dual PI3K/mTOR inhibitor and the MEK inhibitor showed nuclear accumulation of FoxO3a and became positive for  $\beta$ III-tubulin expression (Fig. 1C, 1H). Consistent with the shift of FoxO3a expression and localization, the expression of p27, a major transcriptional target of FoxO3a, was induced by inhibition of the PI3K/Akt/mTOR and/or MEK/ERK pathways in a FoxO3a expression-dependent manner (Fig. 1D, 1E, 1I, 1J).

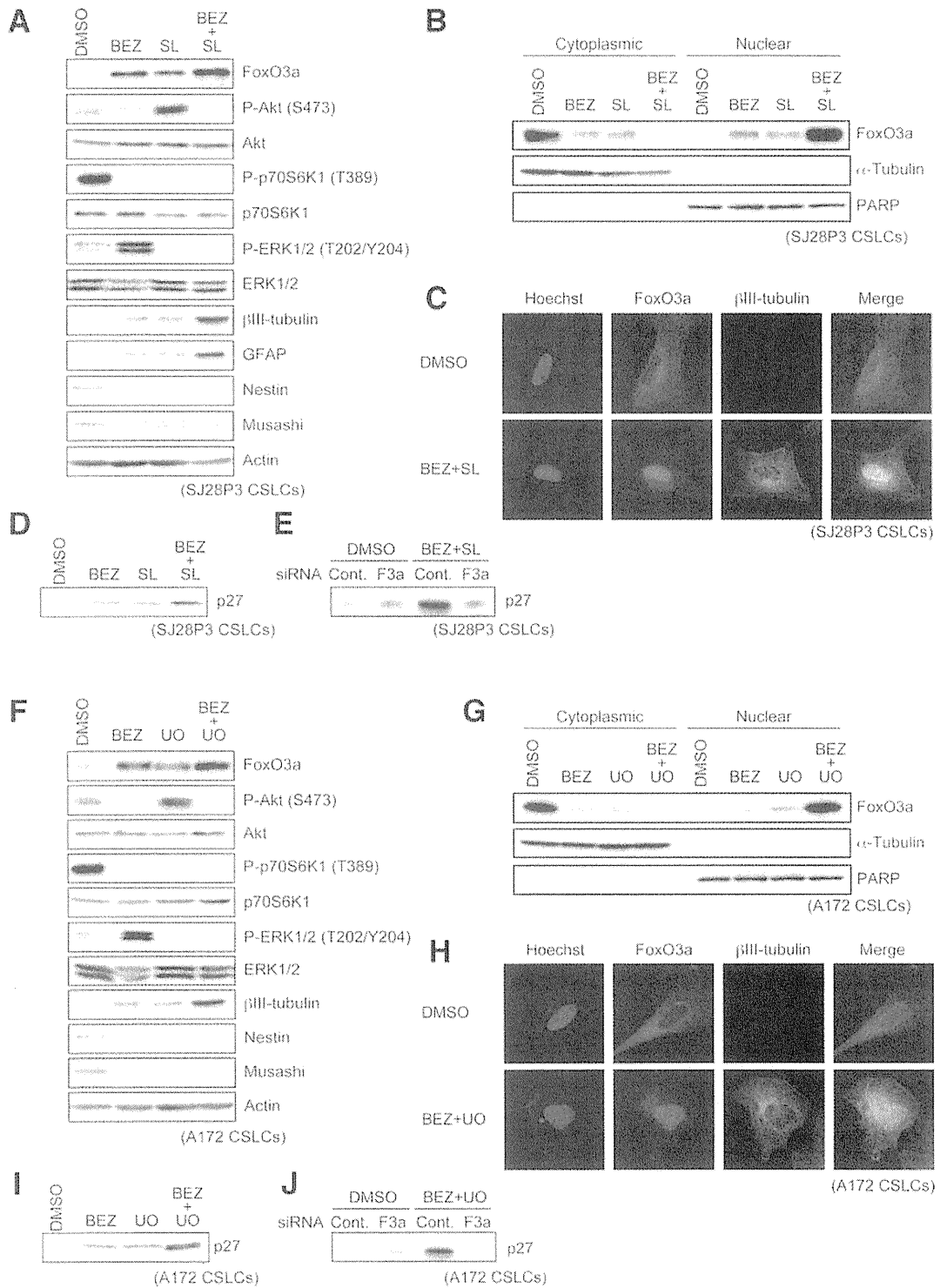
### FoxO3a is Required for Glioblastoma CSLC Differentiation Induced by Inhibition of the PI3K/Akt/mTOR and MEK/ERK Signaling Pathways

Given the close association between FoxO3a function and glioblastoma CSLC differentiation induced by PI3K/Akt/mTOR and/or MEK/ERK pathway inhibition, we next examined whether FoxO3a is required for glioblastoma CSLC differentiation induced by inhibition of the signaling pathways. In patient glioblastoma CSLCs (SJ28P3) in which FoxO3a expression is knocked down, the induction of  $\beta$ III-tubulin and GFAP expression by combinational treatment with NVP-BE235 and SL327 was substantially impaired when

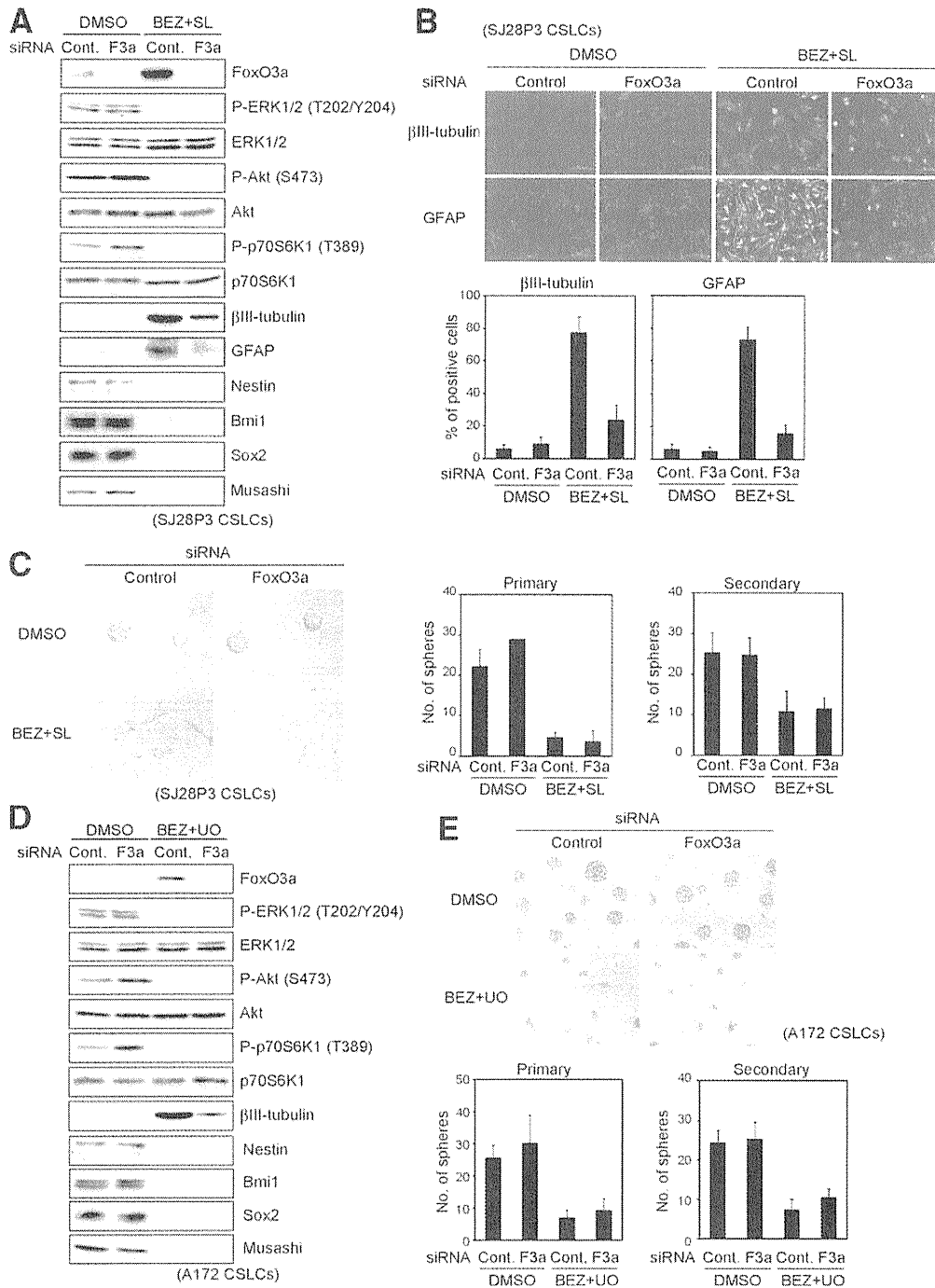
compared with the control cells (Fig. 2A). Immunocytochemical analysis also revealed that  $\beta$ III-tubulin- and GFAP-positive cells increased markedly after the combinational inhibitor treatment in control cells but only marginally in FoxO3a knockdown cells (Fig. 2B). Essentially identical results were obtained from A172 CSLCs (Fig. 2D), except that A172 CSLCs, like the original A172 cells from which they were derived, did not express GFAP under any culture condition [15]. In addition, we noted that FoxO3a knockdown also suppressed the increase of  $\beta$ III-tubulin and GFAP expression induced by individual inhibition of either the PI3K/Akt/mTOR or MEK/ERK pathway (Supporting Information Fig. 2). Together, these data indicate that the promotion of glioblastoma differentiation by inhibition of the PI3K/Akt/mTOR and/or MEK/ERK pathways requires FoxO3a expression. However, in contrast to the differentiation markers, FoxO3a knockdown had no appreciable effect on the expression change of the stem/progenitor markers (Nestin, Musashi, Bmi1, and Sox2) induced by the combinational inhibitor treatment (Fig. 2A, 2D). In line with these results, sphere formation by FoxO3a knockdown cells was inhibited as efficiently as that by control cells in the presence of the inhibitors (Fig. 2C, 2E), suggesting that, in contrast to its essential role in differentiation, FoxO3a may not necessarily be required for "initial" inhibition of self-renewal by concurrent inhibition of the PI3K/Akt/mTOR and MEK/ERK pathways (see Discussion section).

### FoxO3a is Controlled by Akt- and ERK-Mediated Phosphorylation and is Under the Influence of mTOR/p70S6K-Mediated Negative Feedback in Glioblastoma CSLCs

Although the data presented thus far clearly indicate that FoxO3a, essential for glioblastoma CSLC differentiation, is under the control of the PI3K/Akt/mTOR and MEK/ERK pathways, it remains to be shown whether these signaling pathways control FoxO3a indirectly or directly through Akt and/or ERK-mediated phosphorylation of FoxO3a in glioblastoma CSLCs. To address this issue, we first examined the phosphorylation status of FoxO3a at sites presumed to be phosphorylated by Akt and ERK. In support of the idea that FoxO3a is under the control of the PI3K/Akt/mTOR and MEK/ERK pathways through direct phosphorylation by Akt and ERK, the dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BE235 inhibited FoxO3a phosphorylation at Ser253, known to be phosphorylated by Akt [16], and the MEK inhibitors SL327 and U0126 inhibited its phosphorylation at consensus sequences for ERK phosphorylation [17] (Fig. 3A, left; Supporting Information Fig. 3A, left). We next examined whether Akt- and ERK-mediated phosphorylation has a functional role in the control of FoxO3a. To this end, we exogenously expressed in glioblastoma CSLCs three types of FoxO3a mutants, 3A (Akt), 3A (ERK), and 6A, in which the Akt phosphorylation sites (T32/S253/S315), ERK phosphorylation sites (S294/S344/S425), and both (T32/S253/S315, S294/S344/S425) are substituted for alanine residues, respectively [16, 17] (Supporting Information Fig. 4). Of note, FoxO3a phosphorylation at ERK consensus sequences was abolished in the 3A (ERK) mutant, indicating that ERK does phosphorylate FoxO3a at these serine residues mutated in the 3A (ERK) mutant (Fig. 3B). Subcellular fractionation and immunocytochemical studies clearly demonstrated that the mutations at the Akt and ERK phosphorylation sites had effects on FoxO3a localization equivalent to the inhibition of PI3K/mTOR and MEK, respectively: the 6A mutant was localized predominantly in the



**Figure 1.** The expression and activity of FoxO3a are closely correlated with glioblastoma cancer stem-like cell (CSLC) differentiation induced by concurrent inhibition of the PI3K/Akt/mammalian target of rapamycin and MEK/extracellular signal-regulated kinase pathways. SJ28P3 (A–E) and A172 (F–J) CSLCs were cultured in the absence or presence of NVP-BEZ235 (BEZ, 1  $\mu$ M) and/or SL327 (SL, 10  $\mu$ M)/U0126 (UO, 10  $\mu$ M) for 3 days. (A, D, F, I): Cell lysates were subjected to immunoblot analysis with the indicated antibodies. Alternatively, the cells were subjected to subcellular fractionation, with the amount of FoxO3a in the cytoplasmic and nuclear fractions being assessed by immunoblot analysis (B, G) or immunocytochemistry (C, H) with the indicated antibodies. (E, J): CSLCs transfected with the control or FoxO3a (F3a) siRNAs were treated, 10 hours after transfection, with BEZ (1  $\mu$ M) and SL (10  $\mu$ M)/UO (10  $\mu$ M) for 3 days, and then the cell lysates were subjected to immunoblot analysis with the indicated antibodies. Abbreviations: CSLC, cancer stem-like cell; DMSO, dimethyl sulfoxide; PARP, poly(ADP-ribose) polymerase; siRNA, short-interfering RNA.



nucleus, whereas the two 3A mutants were present both in the cytoplasm and the nucleus. Importantly, the 3A (Akt) mutant accumulated in the nucleus in the presence of the MEK inhibitor, whereas the 3A (ERK) mutant did so in the presence of the PI3K/mTOR inhibitor (Fig. 3C–3E), indicating that the

lack of Akt and ERK phosphorylation sites, respectively, mimics the effect of PI3K/Akt/mTOR and MEK/ERK pathway inhibition. Collectively, these results suggest that direct phosphorylation of FoxO3a by Akt and ERK controls its subcellular localization and that FoxO3a efficiently