

Fig. 5 Focal somatic copy number alterations are largely confined to *TERT* wild-type SHH medulloblastomas. GISTIC2 analysis indicating focal amplifications/deletions in 108 wild-type (a, c) and 64 mutant (b, d) SHH tumors, respectively. *Star* regions enriched for reported DNA copy number variations

and Group 4 medulloblastomas with distinct prognostic outcomes, while a prognostic impact of this mutation was not observed in glioblastomas [23]. Molecular mechanisms converging on *TERT* up-regulation were recently reported to be associated with dismal prognosis in pediatric brain cancers [4]. Our findings in Group 4 tumors with *TERT* mutations follow this pattern, while SHH tumors with *TERT* mutations comprise a prognostically favorable subgroup. Notably, survival curves of SHH tumors increasingly approximate with extended follow-up. We hypothesize that this pattern might be due to secondary malignancies and late relapses in older SHH tumors [36–38]. Since virtually all of the *TERT* promoter mutations encompass the mutational hotspots C228T and C250T, patient stratification can be carried out using a single PCR followed up with Sanger sequencing or with a single experiment using our newly designed Taqman-based genotyping assay. The latter assay is particularly suitable for routine clinical applications as it is highly sensitive and specific (5 ng DNA input is sufficient). Furthermore, our Taqman-based genotyping assay can be used on DNA derived from fresh-frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tissue, since it only amplifies a short DNA fragment.

Both hotspot mutations C228T and C250T create an E-twenty-six (ETS) binding motif [10, 11] resulting in up-regulation of *TERT* expression at the mRNA level [2], which was not observed at the protein level in glioblastomas [43]. We now demonstrate that SHH tumors with *TERT* mutations are mostly mutually exclusive with those harboring 10q loss ($p = 0.017$). Notably, the relatively favorable prognosis of *TERT*-mutated SHH medulloblastomas may be explained by the relative lack of high-risk biomarkers [17, 18, 24, 44].

In summary, we describe the demographic, clinicopathological, and biological implications of *TERT* promoter mutations in a subgroup-specific fashion. This study underlines the dependence of adult WNT and SHH tumors to reacquire telomerase activity and suggests a potential prognostic utility of *TERT* mutational analysis in an era of individualized therapy.

Acknowledgments We thank Susan Archer for technical writing, and Nick Downey from Integrated DNA Technologies for support with probe/primer design. We acknowledge CRB HCL—Neurobiotec tumor bank (Hospices Civils de Lyon, Lyon, France). MDT is supported by a CIHR Clinician Scientist Phase II award, funds from the Garron Family Chair in Childhood Cancer Research at The Hospital for Sick Children and the University of Toronto, and operating funds

from the Canadian Institutes of Health Research, the National Institutes of Health (R01CA159859 and R01CA148699) and the Pediatric Brain Tumor Foundation. MR is supported by a fellowship from the Dr. Mildred Scheel Foundation for Cancer Research/German Cancer Aid and funds from the Baden-Württemberg Foundation. VR is supported by a CIHR fellowship and an Alberta Innovates-Health Solutions Clinical Fellowship. KZ acknowledges research support from MH CZ-DRO FNBr 65269705. AK was supported by the TAMOP-4.2.2A-11/1/KONV-2012-0025 project and the János Bolyai Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences.

Conflict of interest The authors declare no conflicts of interest.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License which permits any use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.

References

- Aaron RH, Elion GB, Colvin OM, Graham M, Keir S, Bigner DD, Friedman HS (1994) Busulfan therapy of central nervous system xenografts in athymic mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 35(2):127–131
- Arita H, Narita Y, Fukushima S, Tateishi K, Matsushita Y, Yoshida A, Miyakita Y, Ohno M, Collins VP, Kawahara N, Shibui S, Ichimura K (2013) Upregulating mutations in the *TERT* promoter commonly occur in adult malignant gliomas and are strongly associated with total 1p19q loss. *Acta Neuropathol* 126(2):267–276. doi:10.1007/s00401-013-1141-6
- Blasco MA (2005) Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* 6(8):611–622. doi:10.1038/nrg1656
- Castelo-Branco P, Choufani S, Mack S, Gallagher D, Zhang C, Lipman T, Zhukova N, Walker EJ, Martin D, Merino D, Wasserman JD, Elizabeth C, Alon N, Zhang L, Hovestadt V, Kool M, Jones DT, Zadeh G, Croul S, Hawkins C, Hitzler J, Wang JC, Baruchel S, Dirks PB, Malkin D, Pfister S, Taylor MD, Weksberg R, Tabori U (2013) Methylation of the *TERT* promoter and risk stratification of childhood brain tumours: an integrative genomic and molecular study. *Lancet Oncol* 14(6):534–542. doi:10.1016/S1470-2045(13)70110-4
- Cho YJ, Tsherniak A, Tamayo P, Santagata S, Ligon A, Greulich H, Berhoukim R, Amani V, Goumnerova L, Eberhart CG, Lau CC, Olson JM, Gilbertson RJ, Gajjar A, Delattre O, Kool M, Ligon K, Meyerson M, Mesirov JP, Pomeroy SL (2011) Integrative genomic analysis of medulloblastoma identifies a molecular subgroup that drives poor clinical outcome. *J Clin Oncol* 29(11):1424–1430. doi:10.1200/JCO.2010.28.5148
- Dubuc AM, Northcott PA, Mack S, Witt H, Pfister S, Taylor MD (2010) The genetics of pediatric brain tumors. *Curr Neurol Neurosci Rep* 10(3):215–223. doi:10.1007/s11910-010-0103-9
- Forsyth NR, Wright WE, Shay JW (2002) Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again. *Differentiation* 69(4–5):188–197. doi:10.1046/j.1432-0436.2002.690412.x
- Heaphy CM, Subhawong AP, Hong SM, Goggins MG, Montgomery EA, Gabrielson E, Netto GJ, Epstein JI, Lotan TL, Westra WH, Shih Ie M, Iacobuzio-Donahue CA, Maitra A, Li QK, Eberhart CG, Taube JM, Rakheja D, Kurman RJ, Wu TC, Roden RB, Argani P, De Marzo AM, Terracciano L, Torbenson M, Meeker AK (2011) Prevalence of the alternative lengthening of telomeres telomere maintenance mechanism in human cancer subtypes. *Am J Pathol* 179(4):1608–1615. doi:10.1016/j.ajpath.2011.06.018

9. Hiyama E, Hiyama K (2007) Telomere and telomerase in stem cells. *Br J Cancer* 96(7):1020–1024. doi:10.1038/sj.bjc.6603671
10. Horn S, Figl A, Rachakonda PS, Fischer C, Sucker A, Gast A, Kadel S, Möll I, Nagore E, Hemminki K, Schadendorf D, Kumar R (2013) TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science* 339(6122):959–961. doi:10.1126/science.1230062
11. Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov GV, Chin L, Garraway LA (2013) Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science* 339(6122):957–959. doi:10.1126/science.1229259
12. Jones DT, Jager N, Kool M, Zichner T, Hutter B, Sultan M, Cho YJ, Pugh TJ, Hovestadt V, Stutz AM, Rausch T, Warnatz HJ, Ryzhova M, Bender S, Sturm D, Pleier S, Cin H, Pfaff E, Sieber L, Wittmann A, Remke M, Witt H, Hutter S, Tzaridis T, Weischenfeldt J, Raeder B, Avci M, Amstislavskiy V, Zapatka M, Weber UD, Wang Q, Lasitschka B, Bartholomae CC, Schmidt M, von Kalle C, Ast V, Lawerenz C, Eils J, Kabbe R, Benes V, van Sluis P, Koster J, Volckmann R, Shih D, Betts MJ, Russell RB, Coco S, Tonini GP, Schuller U, Hans V, Graf N, Kim YJ, Monoranu C, Roggendorf W, Unterberg A, Herold-Mende C, Milde T, Kulozik AE, von Deimling A, Witt O, Maass E, Rossler J, Ebinger M, Schuhmann MU, Fruhwald MC, Hasselblatt M, Jabado N, Rutkowski S, von Bueren AO, Williamson D, Clifford SC, McCabe MG, Collins VP, Wolf S, Wiemann S, Lehrach H, Brors B, Scheurle W, Felsberg J, Reifenberger G, Northcott PA, Taylor MD, Meyerson M, Pomeroy SL, Yaspo ML, Korbel JO, Korshunov A, Eils R, Pfister SM, Lichter P (2012) Dissecting the genomic complexity underlying medulloblastoma. *Nature* 488(7409):100–105. doi:10.1038/nature11284
13. Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, Bettegowda C, Agrawal N, Diaz LA Jr, Friedman AH, Friedman H, Gallia GL, Giovannella BC, Grollman AP, He TC, He Y, Hruban RH, Jallo GI, Mandahl N, Meeker AK, Mertens F, Netto GJ, Rasheed BA, Riggins GJ, Rosenquist TA, Schiffman M, Shih Ie M, Theodorescu D, Torbenson MS, Velculescu VE, Wang TL, Wentzensen N, Wood LD, Zhang M, McLendon RE, Bigner DD, Kinzler KW, Vogelstein B, Papadopoulos N, Yan H (2013) TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(15):6021–6026. doi:10.1073/pnas.1303607110
14. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266(5193):2011–2015
15. Kool M, Korshunov A, Remke M, Jones DT, Schlanstein M, Northcott PA, Cho YJ, Koster J, Schouten-van Meeteren A, van Vuurden D, Clifford SC, Pietsch T, von Bueren AO, Rutkowski S, McCabe M, Collins VP, Backlund ML, Haberler C, Bourdeaut F, Delattre O, Doz F, Ellison DW, Gilbertson RJ, Pomeroy SL, Taylor MD, Lichter P, Pfister SM (2012) Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. *Acta Neuropathol* 123(4):473–484. doi:10.1007/s00401-012-0958-8
16. Kool M, Koster J, Bunt J, Hasselt NE, Lakeman A, van Sluis P, Troost D, Meeteren NS, Caron HN, Cloos J, Mrcic A, Ylstra B, Grajkowska W, Hartmann W, Pietsch T, Ellison D, Clifford SC, Versteeg R (2008) Integrated genomics identifies five medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features. *PLoS One* 3(8):e3088. doi:10.1371/journal.pone.0003088
17. Korshunov A, Remke M, Kool M, Hielscher T, Northcott PA, Williamson D, Pfaff E, Witt H, Jones DT, Ryzhova M, Cho YJ, Wittmann A, Benner A, Weiss WA, von Deimling A, Scheurle W, Kulozik AE, Clifford SC, Peter Collins V, Westermann F, Taylor MD, Lichter P, Pfister SM (2012) Biological and clinical heterogeneity of MYCN-amplified medulloblastoma. *Acta Neuropathol* 123(4):515–527. doi:10.1007/s00401-011-0918-8
18. Korshunov A, Remke M, Werft W, Benner A, Ryzhova M, Witt H, Sturm D, Wittmann A, Schottler A, Felsberg J, Reifenberger G, Rutkowski S, Scheurle W, Kulozik AE, von Deimling A, Lichter P, Pfister SM (2010) Adult and pediatric medulloblastomas are genetically distinct and require different algorithms for molecular risk stratification. *J Clin Oncol* 28(18):3054–3060. doi:10.1200/JCO.2009.25.7121
19. Liu X, Bishop J, Shan Y, Pai S, Liu D, Murugan AK, Sun H, El-Naggari AK, Xing M (2013) Highly prevalent TERT promoter mutations in aggressive thyroid cancers. *Endocr Relat Cancer* 20(4):603–610. doi:10.1530/ERC-13-0210
20. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavence WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114(2):97–109. doi:10.1007/s00401-007-0243-4
21. Mermel CH, Schumacher SE, Hill B, Meyerson ML, Beroukhi R, Getz G (2011) GISTIC2.0 facilitates sensitive and confident localization of the targets of focal somatic copy-number alteration in human cancers. *Genome Biol* 12(4):R41. doi:10.1186/gb-2011-12-4-r41
22. Morrison SJ, Prowse KR, Ho P, Weissman IL (1996) Telomerase activity in hematopoietic cells is associated with self-renewal potential. *Immunity* 5(3):207–216
23. Nonoguchi N, Ohta T, Oh JE, Kim YH, Kleihues P, Ohgaki H (2013) TERT promoter mutations in primary and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol*. doi:10.1007/s00401-013-1163-0
24. Northcott PA, Hielscher T, Dubuc A, Mack S, Shih D, Remke M, Al-Halabi H, Albrecht S, Jabado N, Eberhart CG, Grajkowska W, Weiss WA, Clifford SC, Bouffet E, Rutka JT, Korshunov A, Pfister S, Taylor MD (2011) Pediatric and adult sonic hedgehog medulloblastomas are clinically and molecularly distinct. *Acta Neuropathol* 122(2):231–240. doi:10.1007/s00401-011-0846-7
25. Northcott PA, Jones DT, Kool M, Robinson GW, Gilbertson RJ, Cho YJ, Pomeroy SL, Korshunov A, Lichter P, Taylor MD, Pfister SM (2012) Medulloblastomics: the end of the beginning. *Nat Rev Cancer* 12(12):818–834. doi:10.1038/nrc3410
26. Northcott PA, Korshunov A, Pfister SM, Taylor MD (2012) The clinical implications of medulloblastoma subgroups. *Nat Rev Neurol* 8(6):340–351. doi:10.1038/nrneuro.2012.78
27. Northcott PA, Korshunov A, Witt H, Hielscher T, Eberhart CG, Mack S, Bouffet E, Clifford SC, Hawkins CE, French P, Rutka JT, Pfister S, Taylor MD (2011) Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *J Clin Oncol* 29(11):1408–1414. doi:10.1200/JCO.2009.27.4324
28. Northcott PA, Nakahara Y, Wu X, Feuk L, Ellison DW, Croul S, Mack S, Kongkham PN, Peacock J, Dubuc A, Ra YS, Zilberberg K, McLeod J, Scherer SW, Sunil Rao J, Eberhart CG, Grajkowska W, Gillespie Y, Lach B, Grundy R, Pollack IF, Hamilton RL, Van Meter T, Carlotti CG, Boop F, Bigner D, Gilbertson RJ, Rutka JT, Taylor MD (2009) Multiple recurrent genetic events converge on control of histone lysine methylation in medulloblastoma. *Nat Genet* 41(4):465–472. doi:10.1038/ng.336
29. Northcott PA, Rutka JT, Taylor MD (2010) Genomics of medulloblastoma: from Giemsa-banding to next-generation sequencing in 20 years. *Neurosurg Focus* 28(1):E6. doi:10.3171/2009.10.FOCUS09218
30. Northcott PA, Shih DJ, Peacock J, Garzia L, Morrissy AS, Zichner T, Stutz AM, Korshunov A, Reimand J, Schumacher SE, Beroukhi R, Ellison DW, Marshall CR, Lionel AC, Mack S, Dubuc A, Yao Y, Ramaswamy V, Luu B, Rolider A, Cavalli FM, Wang X, Remke M, Wu X, Chiu RY, Chu A, Chuah E, Corbett RD, Hoard GR, Jackman SD, Li Y, Lo A, Mungall KL, Nij KM, Qian JQ, Raymond AG, Thiessen NT, Varhol RJ, Birol I, Moore

- RA, Mungall AJ, Holt R, Kawauchi D, Roussel MF, Kool M, Jones DT, Witt H, Fernandez LA, Kenney AM, Wechsler-Reya RJ, Dirks P, Aviv T, Grajkowska WA, Perek-Polnik M, Haberler CC, Delattre O, Reynaud SS, Doz FF, Pernet-Fattet SS, Cho BK, Kim SK, Wang KC, Scheurlen W, Eberhart CG, Fevre-Montange M, Jouveta A, Pollack IF, Fan X, Muraszko KM, Gillespie GY, Di Rocco C, Massimi L, Michiels EM, Kloosterhof NK, French PJ, Kros JM, Olson JM, Ellenbogen RG, Zitterbart K, Kren L, Thompson RC, Cooper MK, Lach B, McLendon RE, Bigner DD, Fontebasso A, Albrecht S, Jabado N, Lindsey JC, Bailey S, Gupta N, Weiss WA, Bogner L, Klekner A, Van Meter TE, Kumabe T, Tomimaga T, Elbabaa SK, Leonard JR, Rubin JB, Liau LM, Van Meir EG, Fouladi M, Nakamura H, Cinalli G, Garami M, Hauser P, Saad AG, Iolascon A, Jung S, Carlotti CG, Vibhakar R, Ra YS, Robinson S, Zollo M, Faria CC, Chan JA, Levy ML, Sorensen PH, Meyerson M, Pomeroy SL, Cho YJ, Bader GD, Tabori U, Hawkins CE, Bouffet E, Scherer SW, Rutka JT, Malkin D, Clifford SC, Jones SJ, Korbel JO, Pfister SM, Marra MA, Taylor MD (2012) Subgroup-specific structural variation across 1,000 medulloblastoma genomes. *Nature* 488(7409):49–56. doi:10.1038/nature11327
31. Northcott PA, Shih DJ, Remke M, Cho YJ, Kool M, Hawkins C, Eberhart CG, Dubuc A, Guetouche T, Cardentey Y, Bouffet E, Pomeroy SL, Marra M, Malkin D, Rutka JT, Korshunov A, Pfister S, Taylor MD (2011) Rapid, reliable, and reproducible molecular sub-grouping of clinical medulloblastoma samples. *Acta Neuropathol*. doi:10.1007/s00401-011-0899-7
 32. Parsons DW, Li M, Zhang X, Jones S, Leary RJ, Lin JC, Boca SM, Carter H, Samayoa J, Bettegowda C, Gallia GL, Jallo GI, Binder ZA, Nikolsky Y, Hartigan J, Smith DR, Gerhard DS, Fuhrts DW, VandenBerg S, Berger MS, Marie SK, Shinjo SM, Clara C, Phillips PC, Mintum JE, Biegel JA, Judkins AR, Resnick AC, Storm PB, Curran T, He Y, Rasheed BA, Friedman HS, Keir ST, McLendon R, Northcott PA, Taylor MD, Burger PC, Riggins GJ, Karchin R, Parmigiani G, Bigner DD, Yan H, Papadopoulos N, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE (2011) The genetic landscape of the childhood cancer medulloblastoma. *Science* 331(6016):435–439. doi:10.1126/science.1198056
 33. Pfister SM, Korshunov A, Kool M, Hasselblatt M, Eberhart C, Taylor MD (2010) Molecular diagnostics of CNS embryonal tumors. *Acta Neuropathol* 120(5):553–566. doi:10.1007/s00401-010-0751-5
 34. Pugh TJ, Weeraratne SD, Archer TC, Pomeranz Krummel DA, Auclair D, Bochicchio J, Carneiro MO, Carter SL, Cibulskis K, Erlich RL, Greulich H, Lawrence MS, Lennon NJ, McKenna A, Meldrum J, Ramos AH, Ross MG, Russ C, Shefler E, Sivachenko A, Sogoloff B, Stojanov P, Tamayo P, Mesirov JP, Amani V, Teider N, Sengupta S, Francois JP, Northcott PA, Taylor MD, Yu F, Crabtree GR, Kautzman AG, Gabriel SB, Getz G, Jager N, Jones DT, Lichter P, Pfister SM, Roberts TM, Meyererson M, Pomeroy SL, Cho YJ (2012) Medulloblastoma exome sequencing uncovers subtype-specific somatic mutations. *Nature* 488(7409):106–110. doi:10.1038/nature11329
 35. Ramaswamy V, Northcott PA, Taylor MD (2011) FISH and chips: the recipe for improved prognostication and outcomes for children with medulloblastoma. *Cancer Genet* 204(11):577–588. doi:10.1016/j.cancergen.2011.11.001
 36. Ramaswamy V, Remke M, Bouffet E, Faria CC, Perreault S, Cho YJ, Shih DJ, Luu B, Dubuc AM, Northcott PA, Schüller U, Gururangan S, McLendon R, Bigner D, Fouladi M, Ligon KL, Pomeroy SL, Dunn S, Triscott J, Jabado N, Fontebasso A, Jones DT, Kool M, Karajannis MA, Gardner SL, Zagzag D, Nunes S, Pimentel J, Mora J, Lipp E, Walter AW, Ryzhova M, Zheludkova O, Kumirova E, Alshami J, Croul SE, Rutka JT, Hawkins C, Tabori U, Codisposi KE, Packer RJ, Pfister SM, Korshunov A, Taylor MD (2013) Recurrence patterns across medulloblastoma subgroups: an integrated clinical and molecular analysis. *Lancet Oncol*. doi:10.1016/S1470-2045(13)70449-2
 37. Remke M, Hielscher T, Korshunov A, Northcott PA, Bender S, Kool M, Westermann F, Benner A, Cin H, Ryzhova M, Sturm D, Witt H, Haag D, Toedt G, Wittmann A, Schottler A, von Bueren AO, von Deimling A, Rutkowski S, Scheurlen W, Kulozik AE, Taylor MD, Lichter P, Pfister SM (2011) FSTL5 Is a marker of poor prognosis in Non-WNT/Non-SHH medulloblastoma. *J Clin Oncol* 29(29):3852–3861. doi:10.1200/JCO.2011.36.2798
 38. Remke M, Hielscher T, Northcott PA, Witt H, Ryzhova M, Wittmann A, Benner A, von Deimling A, Scheurlen W, Perry A, Croul S, Kulozik AE, Lichter P, Taylor MD, Pfister SM, Korshunov A (2011) Adult medulloblastoma comprises three major molecular variants. *J Clin Oncol* 29(19):2717–2723. doi:10.1200/JCO.2011.34.9373
 39. Robinson G, Parker M, Kranenburg TA, Lu C, Chen X, Ding L, Phoenix TN, Hedlund E, Wei L, Zhu X, Chalhoub N, Baker SJ, Huether R, Kriwacki R, Curley N, Thiruvengadam R, Wang J, Wu G, Rusch M, Hong X, Becksfort J, Gupta P, Ma J, Easton J, Vadodaria B, Onar-Thomas A, Lin T, Li S, Pounds S, Paugh S, Zhao D, Kawauchi D, Roussel MF, Finkelstein D, Ellison DW, Lau CC, Bouffet E, Hassall T, Gururangan S, Cohn R, Fulton RS, Fulton LL, Dooling DJ, Ochoa K, Gajjar A, Mardis ER, Wilson RK, Downing JR, Zhang J, Gilbertson RJ (2012) Novel mutations target distinct subgroups of medulloblastoma. *Nature* 488(7409):43–48. doi:10.1038/nature11213
 40. Rutkowski S, von Hoff K, Emsler A, Zwiener I, Pietsch T, Figarella-Branger D, Giangaspero F, Ellison DW, Garre ML, Biassoni V, Grundy RG, Finlay JL, Dhall G, Raquin MA, Grill J (2010) Survival and prognostic factors of early childhood medulloblastoma: an international meta-analysis. *J Clin Oncol* 28(33):4961–4968. doi:10.1200/JCO.2010.30.2299
 41. Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A, Remke M, Cho YJ, Clifford SC, Eberhart CG, Parsons DW, Rutkowski S, Gajjar A, Ellison DW, Lichter P, Gilbertson RJ, Pomeroy SL, Kool M, Pfister SM (2012) Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol* 123(4):465–472. doi:10.1007/s00401-011-0922-z
 42. Thompson MC, Fuller C, Hogg TL, Dalton J, Finkelstein D, Lau CC, Chintagumpala M, Adesina A, Ashley DM, Kellie SJ, Taylor MD, Curran T, Gajjar A, Gilbertson RJ (2006) Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations. *J Clin Oncol* 24(12):1924–1931. doi:10.1200/JCO.2005.04.4974
 43. Vinagre J, Almeida A, Populo H, Batista R, Lyra J, Pinto V, Coelho R, Celestino R, Prazeres H, Lima L, Melo M, Rocha AG, Preto A, Castro P, Castro L, Pardal F, Lopes JM, Santos LL, Reis RM, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simoes M, Lima J, Maximo V, Soares P (2013) Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. *Nature Commun* 4:2185. doi:10.1038/ncomms3185
 44. Zhukova N, Ramaswamy V, Remke M, Pfaff E, Shih DJ, Martin DC, Castelo-Branco P, Baskin B, Ray PN, Bouffet E, von Bueren AO, Jones DT, Northcott PA, Kool M, Sturm D, Pugh TJ, Pomeroy SL, Cho YJ, Pietsch T, Gessi M, Rutkowski S, Bogner L, Klekner A, Cho BK, Kim SK, Wang KC, Eberhart CG, Fevre-Montange M, Fouladi M, French PJ, Kros M, Grajkowska WA, Gupta N, Weiss WA, Hauser P, Jabado N, Jouveta A, Jung S, Kumabe T, Lach B, Leonard JR, Rubin JB, Liau LM, Massimi L, Pollack IF, Shin Ra Y, Van Meir EG, Zitterbart K, Schüller U, Hill RM, Lindsey JC, Schwalbe EC, Bailey S, Ellison DW, Hawkins C, Malkin D, Clifford SC, Korshunov A, Pfister S, Taylor MD, Tabori U (2013) Subgroup-specific prognostic implications of TP53 mutation in medulloblastoma. *J Clin Oncol* 31(23):2927–2935. doi:10.1200/JCO.2012.48.5052



高度医療(第3項先進医療)制度を用いた 症候性脳放射線壊死の診断と治療

大阪医科大学医学部脳神経外科 宮武伸一、古瀬元雅

1. はじめに

高線量放射線治療は膠芽腫を中心とする悪性脳腫瘍の生命予後を確実に延長している。一方で、これら高線量放射線治療の適応により、症候性脳放射線壊死が問題となっている。しかしながら、この症候性脳放射線壊死に対してはステロイドホルモン等が経験的に投与されているが、有効な治療法は確立されていない。

また、そもそもこの放射線壊死の病態が明らかではなく、MRI を中心とする画像では腫瘍進展(再発)と脳放射線壊死の鑑別すら困難であり、腫瘍の治療にも、壊死の治療にも踏み切れない臨床医はかなりの数に上るものと思われる。われわれは本誌のテーマである PET を用いて、腫瘍伸展と脳放射線壊死の鑑別を行ってきた。またその病態解析から抗血管新生薬であるベバシズマブ(商品名アバスタチン)が脳放射線壊死に効果を示すものとの推論により臨床研究を行い、著効を得てきた。そこでこの核医学的診断とベバシズマブを用いた症候性脳放射線壊死に対する治療を厚生労働省に高度医療(第3項先進医療)として申請し承認を得て、現在臨床試験を実施中である。本稿ではその病態、アバスタチンの効果、高度医療のあらまし、今後の展望を概説する。

2. 脳放射線壊死とは

悪性脳腫瘍や頭頸部癌に対して放射線治療を行うと一定の確率で脳壊死が起こることは広く知られている。本誌の特集テーマであるホウ素中性子捕捉療法(BNCT)や強度変調放射線治療(IMRT)、粒子線治療や定位照射(SRS)等の高線量放射線治療により、患者の生命予後が改善するとともに、脳放射線壊死の発生頻度が増加し、大きな問題となっている。図1に膠芽腫に対して陽子線とX線で合計90Gy相当線量の照射を受け、6ヵ月後に画像上の増悪を来した症例を提示する。このMRIのみからでは多くの臨床医は腫瘍再発と診断されるのではないであろうか? 私たちはアミノ酸トレーサによるPETで放射線壊死と診断し、手術による壊死巣除去を行った。

3. 脳放射線壊死の病態

実際にこの患者さんに対して摘出したのはMRI上で造影される部分のみであるが、術1ヵ月後のMRIでは造影域のみならず、周囲の浮腫が著減していることをご理解いただけるものと思われる。なぜ造影域近傍を摘出すればその周囲の脳浮腫も軽快するのか? われわれ脳外科医も明快な解答は持ち合わせていなかった。その答えを図2に提示する。この症例は頭頸部癌の再発(60GyのX線照射後)後にBNCTを2度行い、腫瘍制御には成功したが、1年後に脳壊死を発症した方であり、壊死巣除去の組織像を図2として提示している。H&E染色では壊死巣周囲に脆弱な新生血

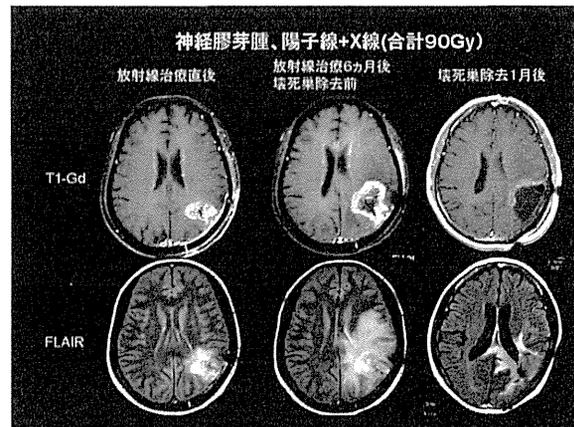


図1 神経膠芽腫に対して陽子線とX線(合計90Gy相当)で治療後放射線壊死を呈した症例

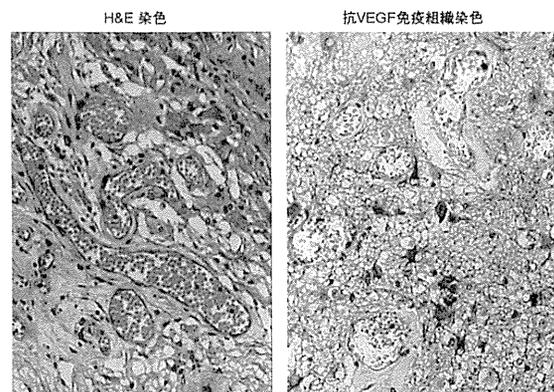


図2 頭頸部癌再発(既に60GyのX線照射済)に対して2度のホウ素中性子捕捉療法後に側頭葉に放射線壊死を呈した症例

管を多数認め、そこから漏出した血漿成分による浮腫を認めている。当然血管内皮増殖因子(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)の関与が示唆されたので、その免疫組織染色を追加すると、新生血管周囲にVEGF陽性のアストロサイトの増生を認め、これが血管新生の原因と考えられた。手術の効果はこの部分を摘出することで血管新生を抑えることができたためと推察できる。われわれが経験し検索した18例の放射線壊死手術摘出標本のすべての病理組織では元々の腫瘍の組織形の違いや用いられた放射線治療法の違いに関わらず、共通してこの組織像を呈し、かつVEGFの発現も共通して認められた¹⁾。この事象よりわれわれが提唱する脳放射線壊死の病態の仮説を図3に示す。

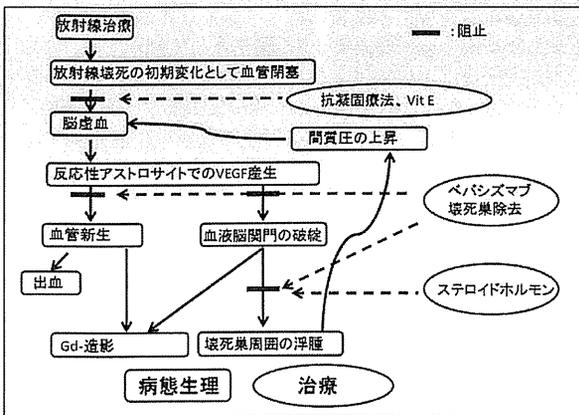


図3 脳放射線壊死の成因と治療の仮説
四角は病態を示し、楕円は治療を示す。

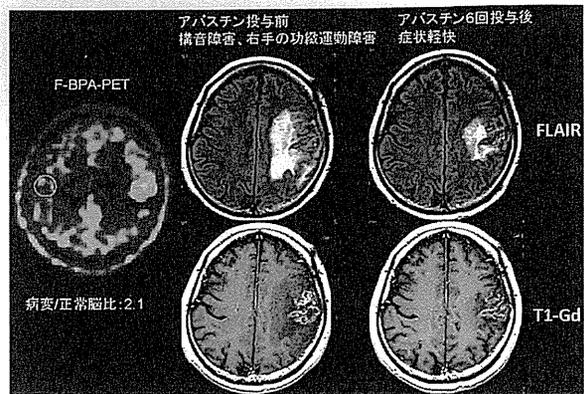


図5 大阪医科大学での臨床研究におけるアバスチンによる症候性脳放射線壊死の治療例

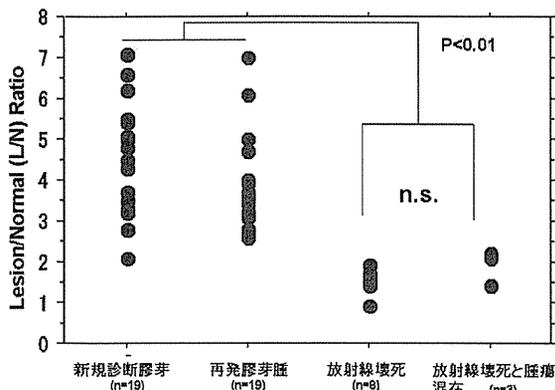


図4 F-BPA-PETの病変/正常脳比による神経膠芽腫と放射線壊死の鑑別

放射線治療により腫瘍はダメージを受けるが、それに伴い照射野内、腫瘍近傍の血管も損傷を受け、血流障害が生じる。これにより虚血が生じ、壊死巣周囲で反応性アストロサイトより VEGF が産生される。この VEGF により脆弱で漏れやすい新生血管が增生し、そこから血漿成分が漏出することで脳浮腫が助長される。この浮腫が更に組織間隙の圧を亢進し、益々血流障害を進行させ、悪循環となる。これがわれわれの仮説である。この仮説に基づいた治療が本稿のメインテーマであるが、それは項をあらためて述べることにし、次項でその診断について紹介する。

4. 脳放射線壊死の診断

図1に示したように、放射線治療後に造影域や浮腫の増大を来した際、MRI では腫瘍の進展(再発)と放射線壊死の鑑別は不可能である。最も信頼の置ける鑑別診断は生検による組織の確認であることは論を待たない。しかしながら、手術困難な部位の腫瘍にこそ放射線治療が適応され、生検はリスクの高さゆえ困難なことが多い。また生検で得られる組織量に限りがあること、前述の反応性アストロサイトと神経膠腫再発の鑑別が難しいこと等問題点も多い。また、生検による組織診断で腫瘍が確認できても、その腫瘍がこれから増殖し、あるいは浮腫の原因となっているのか判断に困ることも多く経験する。

そこで、放射線治療後に浮腫が増大したとき、その浮腫の原因が腫瘍進展にあるのかそれとも放射線壊死にあるのかを判断するため、われわれはアミノ酸トレーサである boronophenylalanine にフッ素標識した F-BPA-PET を用いてきた。図4に神経膠芽腫と放射線壊死症例での同PETによる鑑別のデータ(病変/正常脳比)を挙げる²⁾。両者の間にカットオフラインが引けることをご理解いただけると思われる。ただし、このアミノ酸PETで浮腫の原因が放射線壊死と診断できても、腫瘍細胞の存在を否定しているものではない。

以下に述べるように、大阪医科大学単独で行なってきた臨床研究では放射線壊死の診断にはこの BPA-PET を使用してきたが、全国規模で行なっている高度医療では、より多くの施設で行われているメチオニンをトレーサとしたPETも inclusion criteria に使用している。

5. ペバシズマブによる治療

ここで再度放射線壊死の治療について紹介する。図3で紹介した仮説に基づき、壊死巣周囲の VEGF を減少させることが浮腫の軽減、ひいては症状の改善や使用するステロイドホルモンの減量につながる。手術可能な壊死は摘出術を優先しているが、手術不能と判断した症例には抗 VEGF 抗体製剤であるペバシズマブ(商品名アバスチン)を使用している。図5に大阪医科大学単独で行なってきた臨床研究症例の1例を提示する。BPA-PET で浮腫の原因を放射線壊死と診断し、ペバシズマブ 5mg/kg を2週ごと6回投与した結果を示す。浮腫、臨床症状とも著明に改善している。現在のところ、原因疾患や放射線治療の種類に如何によらず、この効果を観察出来ている³⁾。われわれはこの結果に基づき、「脳放射線壊死に対する核医学的診断とペバシズマブの静脈内投与による治療」を高度医療(第3項先進医療)として厚生労働省に申請し2011年4月1日に認可され、現在実施中である。

6. 高度医療評価制度とは

高度医療評価制度とは、諸事情で治験を組めないものの、有用と思われる医療を将来の保険認可に向けて、当該医療を自費診療とし、これに関連する諸医療を保健医療下に行うものである。厚生労働省に申請し、認可されれば当該医

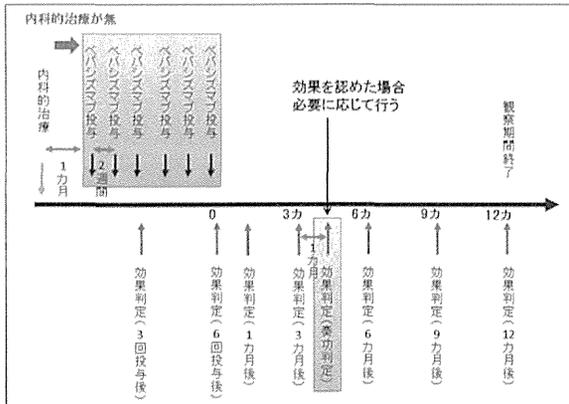


図6 高度医療（第3項先進医療）「脳放射線壊死に対する核医学的診断とペバシズマブの静脈内投与による治療」の治療計画

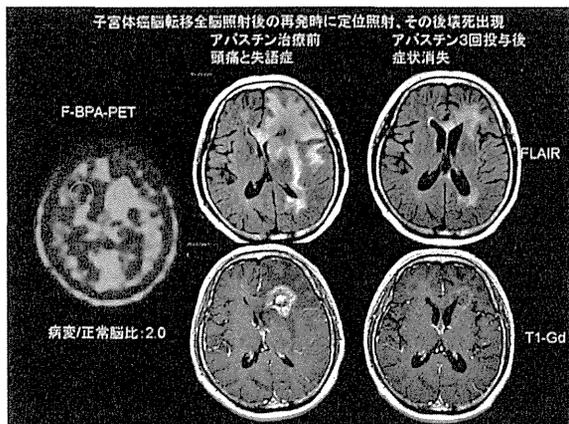


図7 高度医療下でのアバシチンによる症候性脳放射線壊死の治療途中経過

療とそれ以外の医療の「混合診療」を公的認可のもとに臨床試験として行い、最終的には薬事承認を目指す制度である。

本臨床試験の概要を述べる。図6に示すように、症候性脳放射線壊死に対して、ペバシズマブ5mg/kgを2週ごとに6回投与し、浮腫の軽減を主要評価項目として、2年間に40例の症例を登録する予定である。本原稿作成時（2012年1月1日現在）は9施設（大阪医科大学、木沢記念病院、京都大学、杏林大学、熊本大学、千葉県がんセンター、筑波大学、東京都立駒込病院、北海道大学、五十音順）がこの臨床試験に参加中であり、そのほか数施設が追

加施設申請を厚生労働省に行っている。本臨床試験中に経験した症例の途中経過を一例、図7として提示する。なお、本高度医療においては、上述のごとく、用いるアミノ酸トレーサは、われわれが主として用いているフッ素標識BPAのほか、より広い施設で利用可能な炭素の同位元素（¹¹C）標式のメチオニン（C-Met）も利用可能としている⁴⁾。放射線壊死と腫瘍進展（再発）の鑑別に用いるPETにおけるカットオフ値に関しては別著を参照いただきたい⁵⁾。

7. 最後に

我が国の厚生労働行政下では、いまだアミノ酸トレーサを用いたPETは認可されていない。薬事承認ではあるがアミノ酸PETを厚生労働省に高度医療として認可頂いた意義は大きく、将来の薬事承認への道を切り開いたものと考えている。しかしながら、高度医療評価制度からの公知申請により「ペバシズマブによる症候性脳放射線壊死の治療」の薬事承認が得られたとしても、アミノ酸PET自体の薬事承認が別途必要になることが予想され、現在関連学会の御指導を頂きながら、アミノ酸PETの薬事承認への戦略を別途構築中である。

文献

- 1) Nonoguchi N, Miyatake S, et al : The distribution of vascular endothelial growth factor-producing cells in clinical radiation necrosis of the brain. - Pathological consideration of their potential roles -. J Neurooncol, in press.
- 2) Miyashita M, Miyatake S, et al : Evaluation of fluoride-labeled boronophenylalanine-PET imaging for the study of radiation effects in patients with glioblastomas. J Neurooncol 89:239-246, 2008.
- 3) Furuse M, Miyatake S, et al : Repeated treatments with bevacizumab for recurrent radiation necrosis in patients with malignant brain tumors: a report of 2 cases. J Neurooncol 102:471-475, 2011.
- 4) Terakawa Y, Tsuyuguchi N, et al : Diagnostic accuracy of ¹¹C-Methionine PET for differentiation of recurrent brain tumors from radiation necrosis after radiotherapy. J Nucl Med 49: 694-699, 2008.
- 5) 宮武伸一、他：脳放射線壊死の成因と治療 高度医療（第3項先進医療）の申請。脳神経外科ジャーナル、印刷中

PET ニュース1

フィリップス、PET と MRI の融合で画像診断の新世界を切り拓く 初のPET/MR装置「Ingenuity TF PET/MR」を発売

（株）フィリップス エレクトロニクス ジャパンは4月13日より、PET/MR装置「Ingenuity TF PET/MR」の販売を開始した。本装置はグローバルで開発した、フィリップス初のPET/MR装置。

この「Ingenuity TF PET/MR」は、PET装置とMR装置双方の最高水準の性能と画質を損なうことなく融合させた、新しいハイブリッドシステム。PET部分はAstonish TF Time-of-Flight technologyを搭載し、高速スキャン、ポジトロン核種投与量低減/低被曝、高画質を実現し、MRI部分は、フィリップス独自のMultiTransmit技術で3.0T高磁場の不均一さを向上させた高性能MRI装置「Achieva 3.0T TX」をベースとしている。

「Ingenuity TF PET/MR」は、すでに欧米で全身を対象にNeurology, Cardiology, Oncology分野での臨床を開始している。また、従来のPET/CTに比べ低被曝を実現しながら、MRIによる形態画像と機能画像が可能な新しい分子イメージングシステムとして、より高い診断能を引き出す研究も行われている。

脳放射線壊死の成因と治療

—高度医療（第3項先進医療）の申請—

宮武 伸一¹⁾, 古瀬 元雅¹⁾

1) 大阪医科大学医学部脳神経外科

Pathogenesis and Treatment of Radiation Necrosis in the Brain : Application of Investigational Medical Care System approved by Ministry of Health, Welfare and Labor

Shin-Ichi Miyatake, M.D., Ph.D.¹⁾ and Motomasa Furuse, M.D., Ph.D.¹⁾

1) Department of Neurosurgery, Osaka Medical College

Symptomatic radiation necrosis is a serious problem after high-dose irradiation for brain tumors. We studied the pathogenesis of radiation necrosis in 18 surgically excised specimens obtained at Osaka Medical College by Hematoxylin and Eosin (H&E) staining and immunohistochemistry. H&E staining showed marked angiogenesis, telangiectasia at the boundary between the necrotic core and normal brain tissue, the so-called peri-necrotic area. Reactive astrocytosis at the peri-necrotic area produced Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) abundantly. These findings are irrespective of original tumor types and radiation modalities. Therefore, we demonstrated the crucial role of VEGF in the pathogenesis of radiation necrosis.

Thereafter, we reported the potent effects of bevacizumab, an anti-VEGF antibody, for the treatment of symptomatic radiation necrosis. In a single-institute clinical trial, we applied intravenous administration of bevacizumab to 12 consecutive cases of symptomatic radiation necrosis in the brain. All cases responded well to this treatment, with marked shrinkage of peri-lesional edema. These treatments were effective irrespective of the original tumor types and radiation modalities.

Based on these observations, we applied for an Investigational Medical Care System Grant from the Ministry of Health, Labor, and Welfare (MHLW) to study "Intravenous administration of bevacizumab for the treatment of symptomatic radiation necrosis in the brain with the diagnosis based on amino acid PET". MHLW approved the grant on April 1, 2011, and the clinical trial is ongoing. Five institutes are now included in the study, and other several institutes will join it this year for a nationwide multi-institutional clinical trial. The final goal of this clinical trial is to determine the on-label use of bevacizumab for the treatment of symptomatic radiation necrosis in the brain.

(Received October 31, 2011 ; accepted November 16, 2011)

Key words : angiogenesis, bevacizumab, positron emission tomography (PET), radiation necrosis, vascular endothelial growth factor (VEGF)

Jpn J Neurosurg (Tokyo) 21 : 472-480, 2012

連絡先：宮武伸一，〒569-8686 高槻市大学町 2-7 大阪医科大学医学部脳神経外科

Address reprint requests to: Shin-Ichi Miyatake, M.D., Ph.D., Department of Neurosurgery, Osaka Medical College, 2-7 Daigaku-machi, Takatsuki-shi, Osaka 569-8686, Japan

はじめに

高線量放射線治療は膠芽腫を中心とする悪性脳腫瘍の生命予後を確実に延長している²⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹⁵⁾。一方で、これら高線量放射線治療の適応により、症候性脳放射線壊死が問題となっている。また、転移性脳腫瘍に対しては積極的な定位放射線治療が適応され、良好な成績を上げているが、これも症候性脳放射線壊死の原因となっている¹⁴⁾。この症候性脳放射線壊死に対してはステロイドホルモン等が経験的に投与されてはいるが、有効な治療法は確立されていない。

2007年 Gonzalez ら⁵⁾は、「再発悪性脳腫瘍の化学療法として、血管内皮増殖因子 (VEGF) に対する抗体製剤であるベバシズマブ投与を行った症例で画像上顕著な浮腫および造影域の減少を認めた症例を見直すと、脳放射線壊死が疑われた症例が多かった」と報告しており、脳放射線壊死に対するベバシズマブの有効性の可能性を初めて示唆した。しかしながら、脳放射線壊死における浮腫の成因やその原因分子の報告はなく、あるいはなぜ、放射線壊死に対してベバシズマブを投与すれば効果が期待されるのかはまったく不明であった。

そこでわれわれは、過去5年間に著者らが大阪医科大学で壊死巣除去を行った放射線壊死の18症例の病理組織像を検討し、その病態生理を解析した。次いでこれら検討により放射線壊死の成因が過剰な VEGF の産生にあることを解明し、その所見を基に12例の症候性脳放射線壊死の症例にベバシズマブを投与し、全例で浮腫の軽減を認めた。この経験をもとに、「脳放射線壊死に対する核医学的診断とベバシズマブの静脈内投与による治療」を高度医療 (第3項先進医療) として厚生労働省に申請し、2011年4月1日に認可され、薬事承認を目指した多施設臨床試験として現在実施中である。

本稿では、脳放射線壊死の病理、免疫組織学的な検索とアミノ酸 PET を用いた脳放射線壊死の診断、臨床研究で行ってきたベバシズマブの静脈内投与による症候性脳放射線壊死の治療ならびに、われわれが厚生労働省に提出している高度医療 (第3項先進医療) の概要を紹介し、今後の展望を述べることとする。

脳放射線壊死の病態病理

過去5年間に大阪医科大学で壊死巣除去を行った18例の病理組織を検討した。放射線治療を受ける原因となった腫瘍は、悪性神経膠腫、悪性髄膜腫、転移性脳腫瘍、頭頸部癌などさまざまであり、また用いた放射線治

療も通常の X 線分割照射、ガンマナイフ等の定位放射線治療、陽子線、ホウ素中性子捕捉療法 (boron neutron capture therapy: BNCT) 等である。組織学的検索は通常の hematoxylin and eosin (H&E) 染色、抗 VEGF 抗体、抗 hypoxia inducible factor 1- α (HIF-1 α) 抗体、抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体を用いた免疫組織染色を行った。

もとの腫瘍型や用いた放射線治療法の異なる壊死巣の手術標本の H&E 染色を Fig. 1 に示す。どの標本にも壊死巣周囲の壊死巣辺縁領域に、拡張した毛細血管様の新生血管 (telangiectasia) を認め、共通した組織像を示していた。この拡張した telangiectasia 周囲間質には血漿成分の漏出によると思われる浮腫を認め、これが脳放射線壊死における脳浮腫の原因と考えられた。Fig. 2 に同じ標本での抗 VEGF 抗体による免疫組織染色像を示す。壊死巣辺縁領域では形態的に反応性アストロサイトと思われる細胞が VEGF を産生し、その周囲に血管新生を認めている。これらの変化は18例全例で認め、もともとの腫瘍型や放射線治療の種類を問わなかった。さらには、虚血性転写因子 HIF-1 α の発現も壊死巣辺縁領域で亢進していた (Fig. 3)¹³⁾。VEGF 産生細胞は抗 GFAP 抗体との二重染色でも陽性を呈し、やはり反応性アストロサイトが VEGF を産生していることが確認できた (データ未提示)。

以上の所見より、われわれの考えている、脳放射線壊死の病態とそれに応じた治療の仮説を Fig. 4 に示す。放射線治療により腫瘍はダメージを受けるが、それに伴い照射野内、腫瘍近傍の血管も損傷を受け、血流障害が生じる。これにより虚血が生じ、壊死巣周囲の壊死巣辺縁領域で反応性アストロサイトより VEGF が産生される。この VEGF により脆弱で漏れやすい新生血管が増生し、そこから血漿成分が漏出することで脳浮腫が助長される。この浮腫がさらに組織間隙の圧を亢進し、ますます血流障害を進行させ、悪循環となる。これがわれわれの仮説である。この仮説に基づき、各ステップで有効な治療法が異なると考える。虚血が誘導される前なら、抗凝固療法や、ビタミン E による血流の確保が虚血の予防につながるが⁴⁾¹²⁾、いったん虚血が誘導され、VEGF が産生されれば、このような治療では十分な効果はえられず、VEGF を産生する反応性アストロサイトを手術により除去するか、ベバシズマブにより直接 VEGF の効果を打ち消すことが効果の発現に寄与するものと考えられる。ステロイドは治療初期には効果を示すことも経験するが、副作用のため長期にわたる投与は難しい⁶⁾⁷⁾。

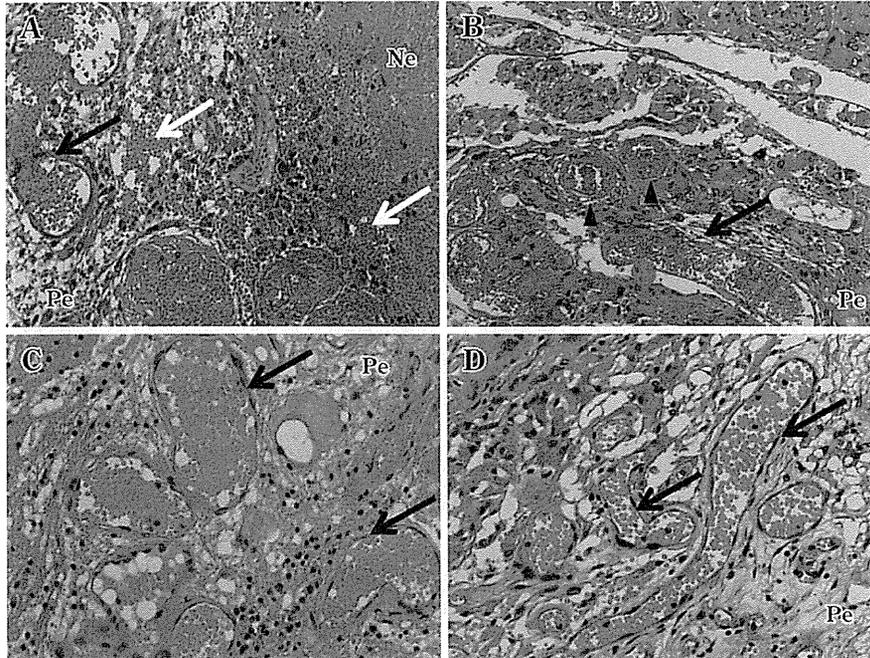


Fig. 1 Typical H&E staining of the surgical specimens from cases 1, 2, 3, and 4

A : Case 1, Radiation necrosis (RN) derived from glioblastoma (GB) caused by X-ray treatment (XRT) and boron neutron capture therapy (BNCT).

B : Case 2, RN derived from GB caused by proton beam and XRT. Proliferation of arterioles is observed as well as telangiectasia.

C : Case 3, RN derived from metastatic brain tumor caused by stereotactic radiosurgery (SRS).

D : Case 4, RN derived from adenocarcinoma in temporal bone, caused by XRT and repetitive BNCT.

In A, B, C, and D: Black arrows show telangiectasia. White arrows show bleeding in the interstitial space. Black arrowheads show the proliferation of arterioles.

Ne : necrotic center, Pe : peri-necrotic area, Int : intact brain.

In A, B, C, and D: The original objective magnification is $\times 20$, $\times 20$, $\times 40$, and $\times 40$, respectively.

ベバシズマブの静脈内投与による 症候性脳放射線壊死の治療 (大阪医科大学単一施設での臨床試験)

以上の仮説と Gonzalez らの文献⁵⁾に基づき、抗 VEGF 抗体であるベバシズマブによる脳放射線壊死の治療を大阪医科大学倫理委員会に申請し、単一施設による臨床研究を開始した。なお、ベバシズマブは、わが国では大腸癌、肺癌の一部にしか保険適応はなく、全例私費による治療を行った。代表症例を Fig. 5 に示す。この症例は肺癌からの転移性脳腫瘍が原因疾患であり、定位放射線治療 1 年後に症候性脳放射線壊死を発症した症例である。症状は左下肢に強い片麻痺であり、F-BPA-PET により

放射線壊死と診断し (Fig. 6)¹⁰⁾、ベバシズマブ 5 mg/kg を 2 週に 1 度 6 回投与を行った。この F-BPA-PET とは BNCT 用化合物 boronophenylalanine をフッ素の同位元素 (^{18}F) で標式した F-BPA をトレーサとして用いた PET である。投与 3 回目より、下肢有意の片麻痺は改善した。われわれの経験した 12 例では若干の程度の差は認められたものの、全例で壊死巣周囲の脳浮腫は改善し、その臨床効果に驚かされた³⁾。

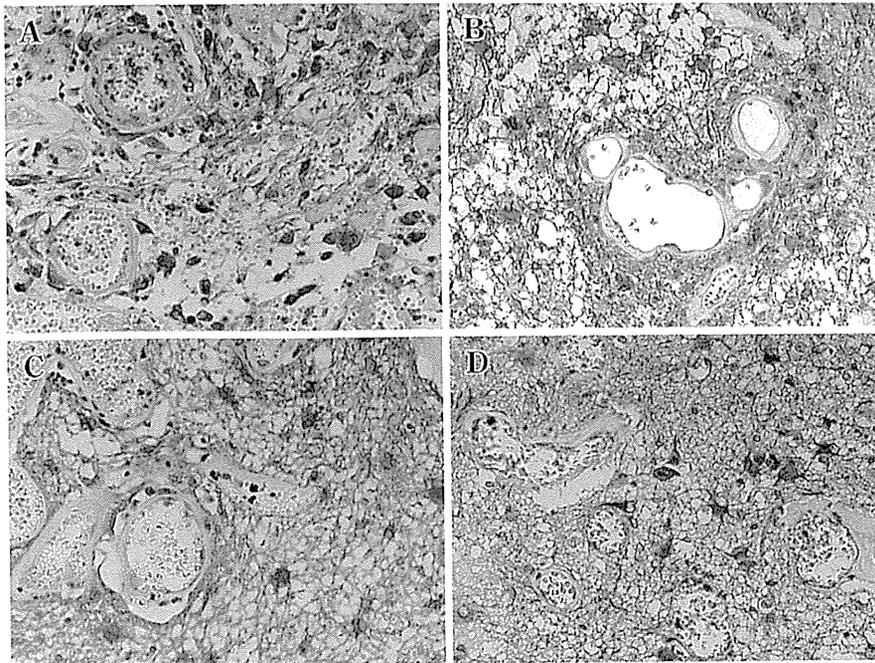


Fig. 2 Immunohistochemistry for VEGF of the peri-necrotic area from cases 1, 2, 3, and 4

A, B, C, and D are the same specimens depicted in Fig. 1.

Strong immunoreactivity to VEGF and angiogenesis was observed in the peri-necrotic area in A to D. In A to D, the original objective magnification is $\times 40$.

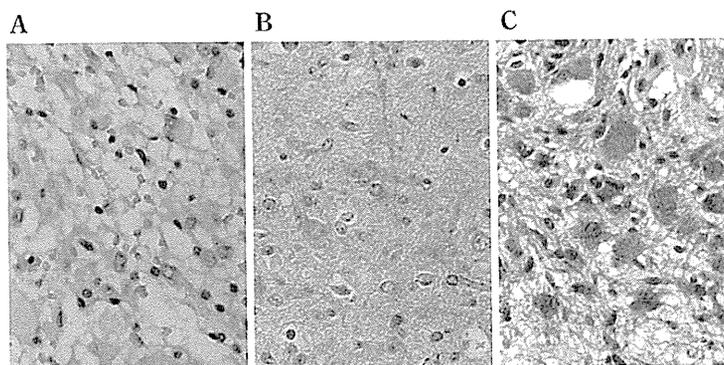


Fig. 3 Immunohistochemistry (IHC) for HIF-1 α in a typical radiation necrosis (Case 1)

We applied IHC for HIF-1 α , for the detectoin of hypoxia at the peri-necrotic area.

A : Negative control of IHC in peri-necrotic area. Normal mouse serum was used instead of primary mouse monoclonal antibody for human HIF-1 α .

B : IHC of HIF-1 α in intact brain tissue.

C : IHC of HIF-1 α in peri-necrotic area.

In A to C, the original objective magnification is $\times 40$.

Abundant expression of HIF-1 α is observed not in normal brain tissue, but in peri-necrotic area.

Hypothesis of radiation necrosis and its treatments

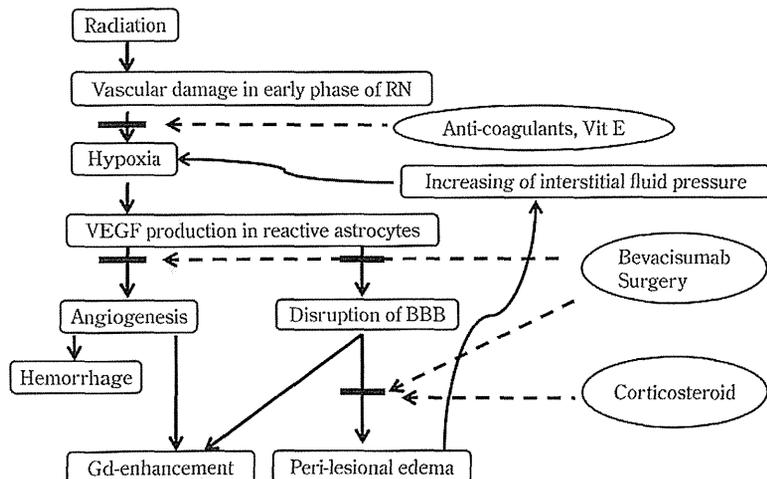


Fig. 4 Hypothesis of the patho-physiology and proposed treatments in radiation necrosis in the brain

Rectangulars and ovals include some patho-physiology and treatments, respectively. Bold lines show inhibition.

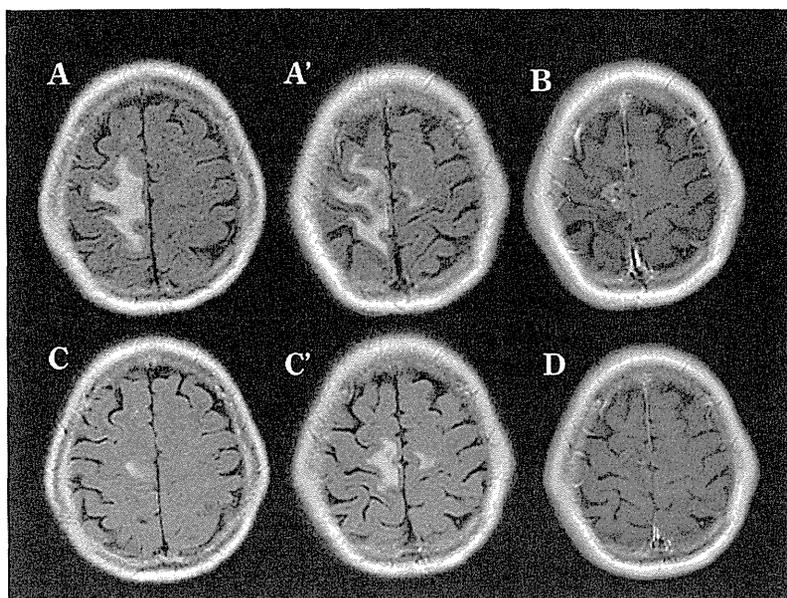


Fig. 5 One of the RN cases treated with bevacizumab

The original tumor was lung cancer and treated by SRS.

A, A': Pre-treatment, FLAIR MR images.

B: Pre-treatment, T1-weighted gadolinium-enhanced MRI.

C, C': Post-treatment, FLAIR MR images.

D: Post-treatment, T1-weighted gadolinium-enhanced MRI.

高度医療（第3項先進医療） 「脳放射線壊死に対する核医学的診断と ベバズマブの静脈内投与による治療」

前項で述べた単一施設での臨床研究をもとに、厚生労働省と2年にわたる交渉を行い、表記臨床試験が高度医療（第3項先進医療）として平成23年4月1日付けで承認され、多施設共同試験として開始している。高度医療評価制度とは、諸事情で治験を組めないものの、有用と思われる医療を、将来の保険認可に向けて、当該医療を自費診療とし、これに関連する諸医療を保険医療下に

行うものである。厚生労働省に申請し、認可されれば当該医療とそれ以外の医療の「混合診療」を公的認可のもとに臨床試験として行い、最終的には薬事承認を目指す制度である。

本臨床試験の概要を述べる。Fig. 7に示すように、症候性脳放射線壊死に対して、ベバズマブ5 mg/kgを2週ごとに6回投与し、浮腫の軽減を主要評価項目として、2年間に40例の症例を登録する予定である。本稿作成時（2011年11月1日現在）は5施設（大阪医科大学、木沢記念病院、京都大学、千葉県がんセンター、筑波大学、五十音順）がこの臨床試験に参加中であり、そのほか数

施設が追加施設申請を厚生労働省に行っている。本臨床試験の主な特徴を2つ紹介する。第一は本臨床試験での放射線壊死の診断および試験への参加基準 (inclusion criteria) は、生検による組織診断ではなく、アミノ酸トレーサによる PET を用いることである。微小な組織片を用いた生検では反応性のアストロサイトの増殖とグリオーマの腫瘍伸展の鑑別が困難であり、また、たとえ腫瘍細胞が壊死巣周囲に存在したとしても、活動性が低く脳浮腫の原因でないと判断されれば、積極的に放射線壊死を治療するべくこの診断基準を採用した。用いるアミノ酸トレーサはわれわれが主として用いている F-BPA のほか、より広い施設で利用可能な炭素の同位元素 (^{14}C) 標式の methionine (C-Met) も利用可能としている。放射線壊死と腫瘍進展 (再発) の鑑別に用いる PET におけるカットオフ値に関しては次のように定めている。F-BPA-PET に関しては、当施設の研究からのデータに基づいている¹⁰⁾。われわれは 38 例の神経膠芽腫に対して F-BPA-PET を行った。F-BPA-PET における正常組織と病変部の関心領域におけるトレーサの取り込み値の比 (lesion/normal tissue ratio: L/N 比) は、組織診断と相関を示した。ここでいうトレーサの取り込み値は関心領域での平均値を用いている。組織所見が壊死のみの場合、L/N 比の平均値は 1.5、腫瘍細胞を含むも主体が壊死である場合は 2.5 以下であった。一方、腫瘍組織の場合は平均値 4.2 であった。放射線壊死の場合はほとんどが L/

N 比が 2.0 以下であり、腫瘍再発の場合は 3.0 以上であることから、本試験の適応として、L/N 比が 2.0 以下のものは絶対適応、2.0~2.5 のものは相対適応とした。C-Met PET に関しては、Terakawa ら¹⁶⁾の報告を引用した。彼らは組織診断および臨床経過にて診断のついた転移性

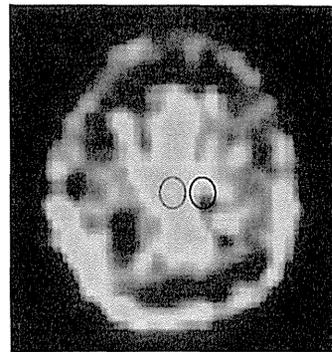


Fig. 6 BPA-PET image of the same patient in Fig. 4, just prior to bevacizumab treatment

The red oval shows the region of interest for radiation necrosis.

The black oval shows the region of interest for contralateral normal brain.

The mean value of the tracer accumulation (standardized uptake value mean, SUV mean) in the red oval and the black oval were 4,745 and 2,775, respectively. Therefore, L/N ratio was calculated as 1.7 in this case.

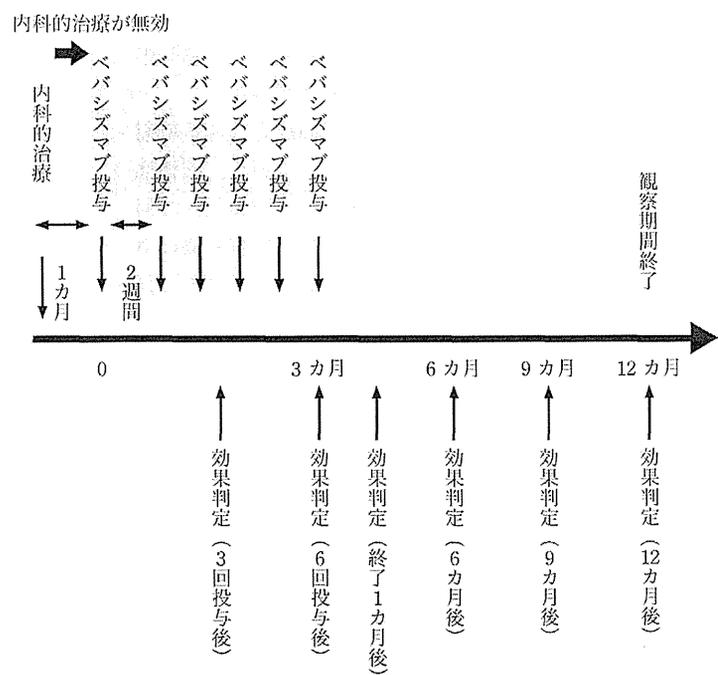


Fig. 7 Scheme of the clinical trial, "Intravenous administration of bevacizumab for the treatment of radiation necrosis in the brain", as an Investigational Medical Care System approved by the Ministry of Health, Labor, and Welfare

薬事承認申請までのロードマップ（公知申請）

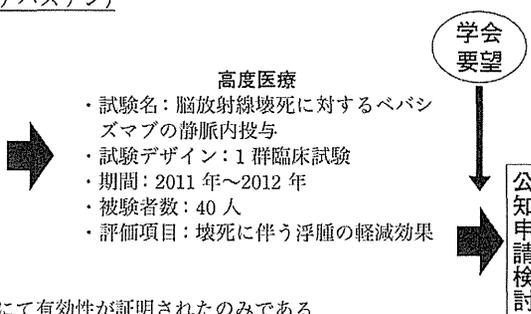
試験薬または試験機器：ベバシズマブ（製品名：アバステン）
 高度医療での適応疾患：症候性脳放射線壊死

臨床研究
 試験名：放射線治療後の中枢神経系放射線壊死に対するベバシズマブによる治療効果に関する研究
 ・試験デザイン：1群臨床試験
 ・期間：2009年～2010年
 ・被験者数：12人
 ・結果の概要：全例にて画像上の効果を認める

欧米での現状

*米国にて14例の無作為二重盲検プラセボ対照試験にて有効性が証明されたのみである
 薬事承認：米国 欧州ともに無
 ガイドライン記載，進行中の臨床試験ともに無

当該高度医療における
選択基準：内科的治療に不応性の症候性脳放射線壊死患者，アミノ酸PETで診断，転移性脳腫瘍の壊死症例を含む，施設内経験必要
除外基準：重篤な合併症や出血疾患の合併例，手術治療可能例など
予想される有害事象：血栓塞栓症，頭蓋内出血など



高度医療承認後は治療費半額補助

混合診療可能

Fig. 8 Roadmap to obtain permission of on-label use of bevacizumab for symptomatic radiation necrosis in the brain

脳腫瘍の再発 24 例，放射線壊死 16 例および神経膠腫の再発 32 例と放射線壊死 16 例に対して PET を行った。放射線壊死の L/N 比の平均値は転移性脳腫瘍で 1.25，神経膠腫で 1.44 であった。これらのデータをもとに，本試験では，L/N 比 1.25 以下を絶対適応，1.25～1.8 を相対適応とした。

いまだ薬事未承認ではあるが，アミノ酸 PET を厚生労働省が高度医療として認可した意義は大きく，将来の薬事承認への道を切り開いたものと考えている。

今一つの特徴は，転移性脳腫瘍を原因疾患とする放射線壊死も本臨床試験の対象に含めたことである。転移性脳腫瘍に対してベバシズマブを使用した米国の報告で何例かの脳内出血をきたしたことより，転移性脳腫瘍に対するベバシズマブの投与は米国では慎重投与，欧州，日本では禁忌とされてきた。最近の論文でこの危険性が否定されたため¹⁾，欧州での禁忌もはずれた。また，実臨床の場で症候性脳放射線壊死のうち，転移性脳腫瘍に対する定位放射線治療後に生じる症例が最多であると予想されることより，厚生労働省と折衝を繰り返し，本病態をもこの臨床試験の対象とすることが認められた。ただし，転移性脳腫瘍そのものも含め，全身での活動性病変の否定等，その適応には十分な注意と配慮を要求されている。

また，参加施設基準として，脳腫瘍もしくは症候性脳

放射線壊死に対する同薬剤の使用経験を厚生労働省からは要求を受けた。本薬剤は必ずしも安全と言い切れるものではなく，脳内出血や血栓塞栓性の合併症の報告も多い。われわれも，おそらくは脳底動脈の塞栓によると思われる死亡例を 1 例経験しており，ある程度の使用経験を要求されることはやむをえないものと考えている。

本臨床試験にかかる経費のうち，薬剤購入用の費用のおよそ半額はわれわれが負担することとしている。体重 60 kg の方で 6 回使用するとして，90～100 万円の薬剤費が必要であるが，そのうちの半額を個人負担いただくことになる。いままでの経験では 6 回投与で半年～1 年くらいは有効であり，その後放射線壊死による浮腫の再燃をきたすこともあるが，ベバシズマブの再投与で軽快をすることが多い。

この臨床試験の成績をもとにした，われわれの描いている薬事承認を目指したロードマップを Fig. 8 に示す。症候性脳放射線壊死は重篤な機能予後および生命予後をきたす疾患ではあるが，母集団となる患者総数はそれほど多くなく，薬事承認を目指した企業主導の臨床試験，すなわち治験は組まれにくい。そこで治験というプロセスを踏まずに薬事承認を目指すシステムとして，高度医療に思い至った次第である。本臨床試験にて万人が認めうる優れた成績を治めることができれば，各種学会からの学会要望を添えて，「公知申請」を行い，厚生労働省に

薬事申請を認可していただくという戦略を厚生労働省の担当官との間で相談し構築した。よっておよそ2年後に、日本定位放射線治療学会、日本脳神経外科学会、日本放射線腫瘍学会、日本核医学会からの学会要望がいただけるよう、臨床試験を行っている次第である。ただし、このシステムにより「ベバシズマブによる症候性脳放射線壊死の治療」の薬事承認がえられたとしても、アミノ酸 PET 自体の薬事承認が別途必要になることが予想され、現在日本核医学会とも相談、ご指導をいただきながら、アミノ酸 PET の薬事承認への戦略を別途構築中である。

おわりに

症候性脳放射線壊死は中長期にわたり、重篤な神経脱落症状をきたし、治療の方法の確立されていない難治性疾患である。是非皆様のご支援をいただき、本臨床試験で有効性を示し、薬事承認を目指していきたいと考えている。

謝辞

本稿作成時における、本臨床試験参加施設は上記5施設であるが、さらなる参加施設拡大、拡充をお願いしている。本臨床試験の申請書作成や厚生労働省との折衝は時間がかかり、肉体的にも精神的にも実にストレスの多い作業である。それらの労を惜みず、参加いただける施設の研究分担者および協力者の諸先生方ならびに事務担当の方に心よりお礼を申し上げる。

文献

- 1) Besse B, Lasserre SF, Compton P, Huang J, Augustus S, Rohr UP: Bevacizumab safety in patients with central nervous system metastases. *Clin Cancer Res* 16: 269-278, 2010.
- 2) Fitzek MM, Thornton AF, Rabinov JD, Lev MH, Pardo FS, Munzenrider JE, Okunieff P, Bussière M, Braun I, Hochberg FH, Hedley-Whyte ET, Liebsch NJ, Harsh GR 4th: Accelerated fractionated proton/photon irradiation to 90 cobalt gray equivalent for glioblastoma multiforme: Results of a phase II prospective trial. *J Neurosurg* 91: 251-260, 1999.
- 3) Furuse M, Kawabata S, Kuroiwa T, Miyatake S: Repeated treatments with bevacizumab for recurrent radiation necrosis in patients with malignant brain tumors: A report of 2 cases. *J Neurooncol* 102: 471-475, 2011.
- 4) Glantz MJ, Burger PC, Friedman AH, Radtke RA, Massey EW, Schold SC, Jr: Treatment of radiation-induced nervous system injury with heparin and warfarin. *Neurology* 44: 2020-2027, 1994.
- 5) Gonzalez J, Kumar AJ, Conrad CA, Levin VA: Effect of bevacizumab on radiation necrosis of the brain. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 67: 323-326, 2007.
- 6) Greenberg MS: "Steroids". *Handbook of Neurosurgery*, Sixth edition. New York, Thieme, 2006, pp8-11.
- 7) Greenberg MS: "Cranial radiation". *Handbook of Neurosurgery*, Sixth edition. New York, Thieme, 2006, pp535-536.
- 8) Iuchi T, Hatano K, Narita Y, Kodama T, Yamaki T, Osato K: Hypofractionated high-dose irradiation for the treatment of malignant astrocytomas using simultaneous integrated boost technique by IMRT. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 64: 1317-1324, 2006.
- 9) Kawabata S, Miyatake S, Kuroiwa T, Yokoyama K, Doi A, Iida K, Miyata S, Nonoguchi N, Michiue, Takahashi M, Inomata T, Imahori Y, Kirihata M, Sakurai Y, Maruhashi A, Kumada H, Ono K: Boron neutron capture therapy for newly diagnosed glioblastoma. *J Radiat Res (Tokyo)* 50: 51-60, 2009.
- 10) Miyashita M, Miyatake S, Imahori Y, Yokoyama K, Kawabata S, Kajimoto Y, Shibata MA, Otsuki Y, Kirihata M, Ono K, Kuroiwa T: Evaluation of fluoride-labeled boronophenylalanine-PET imaging for the study of radiation effects in patients with glioblastomas. *J Neurooncol* 89: 239-246, 2008.
- 11) Miyatake S, Kawabata S, Kajimoto Y, Aoki A, Yokoyama K, Yamada M, Kuroiwa T, Tsuji M, Imahori Y, Kirihata M, Sakurai Y, Masunaga S, Nagata K, Maruhashi A, Ono K: Modified boron neutron capture therapy for malignant gliomas performed using epithermal neutron and two boron compounds with different accumulation mechanisms: An efficacy study based on findings on neuroimages. *J Neurosurg* 103: 1000-1009, 2005.
- 12) 宮武伸一: 悪性脳腫瘍に対する最新放射線治療とその成績—放射線治療における外科治療の役割—, 脳外誌 19: 899-906, 2010.
- 13) Nonoguchi N, Miyatake SI, Fukumoto M, Furuse M, Hiramatsu R, Kawabata S, Kuroiwa T, Tsuji M, Fukumoto M, Ono K: The distribution of vascular endothelial growth factor-producing cells in clinical radiation necrosis of the brain. —Pathological consideration of their potential roles— *J Neurooncol*, in press.
- 14) Ohguri T, Imada H, Kohshi K, Kakeda S, Ohnari N, Morioka T, Nakano K, Konda N, Korogi Y: Effect of prophylactic hyperbaric oxygen treatment for radiation-induced brain injury after stereotactic radiosurgery of brain metastases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 67: 248-255, 2007.
- 15) Tanaka M, Ino Y, Nakagawa K, Tago M, Todo T: High-dose conformal radiotherapy for supratentorial malignant glioma: A historical comparison. *Lancet Oncol* 6: 953-960, 2005.
- 16) Terakawa Y, Tsuyuguchi N, Iwai Y, Yamanaka K, Higashiyama S, Takami T, Ohata K: Diagnostic accuracy of ¹¹C-Methionine PET for differentiation of recurrent brain tumors from radiation necrosis after radiotherapy. *J Nucl Med* 49: 694-699, 2008.

要 旨

脳放射線壊死の成因と治療 —高度医療（第3項先進医療）の申請—

宮武 伸一 古瀬 元雅

当施設で経験した18例の脳放射線壊死病理組織を検討し、壊死巣周囲に反応性アストロサイトが集簇し、血管内皮増殖因子（VEGF）を産生し、これが脆弱な血管新生を惹起し、そこからの血漿成分の漏出が脳浮腫の原因であることを解明した。そこで、12名の症候性脳放射線壊死の症例に抗VEGF抗体であるベバシズマブの静脈内投与を単一施設の臨床研究として行ったところ、全例で脳浮腫の軽減を認めた。以上の結果に基づき、「脳放射線壊死に対する核医学的診断とベバシズマブの静脈内投与による治療」を高度医療（第3項先進医療）として厚生労働省に申請し、2011年4月1日に認可され、薬事承認を目指した多施設臨床試験として現在実施中である。

脳外誌 21:472-480, 2012

Editorial Comment

臨床研究から薬事申請へ向けて

東北大学大学院神経外科学分野 隈部俊宏

臨床の現場で経験する事象に疑問を持ち、その病態の共通点を見出し、発生原因に対して仮説を立て、それを治療する方法を考案し、実行に移す。少数例の明快な結果から、仮説の信憑性を確信し、厚生労働省の高度医療としての認定を受けるための莫大な努力をする。さらに多施設共同試験を開始する。将来的には公知申請を進め、最終段階として薬事申請を許可してもらう。この行動は文章にするとたかだか数行にしかならないが、気が遠くなるような仕事量になる。多施設共同試験を行うまでの段階でも、日々の臨床と書類仕事等に忙殺される中で、特に厚生労働省との折衝においては並々ならぬご努力をなされたものと思われる。今回の一連の仕事は、今後、後に続く人間に大きな指標となることは間違いない。また、こういったノウハウは経験した人間にしか理解できない部分が数限りなく存在するはずで、講演等でさらに詳しくご教授いただきたいと願って

いる。

考察にも記載されているように、今回のアバスタンの高度医療認定に伴って、アミノ酸PETを厚生労働省が高度医療として認可した意義はきわめて大きい。これまで必要な検査だと現場の人間に理解され要望されていたにもかかわらず、使用頻度が少ないというのが一番大きな理由だと推測されるが、アミノ酸PETは薬事承認されてこなかった。炭素に標識する ^{11}C -メチオニンPETは、20分というきわめて短い半減期ゆえに、現実的にはサイクロトロンを有する施設以外で使用することは難しいが、フッ素に標識する場合、半減期は110分と炭素の5.5倍となる。筆者らが用いている ^{18}F -ボロンフェニルアラニンPETは、標識物質の生成効率がより向上すれば、商業ベースで実用化することが十分期待される。この薬事申請に向けての戦略のさらなる進行を祈念するとともに、支援していきたい。

The Impact of Extent of Resection and Histological Subtype on the Outcome of Adult Patients with High-grade Gliomas

Shigeru Yamaguchi¹, Hiroyuki Kobayashi¹, Shunsuke Terasaka^{1,*}, Nobuaki Ishii¹, Jun Ikeda¹, Hiromi Kanno², Hiroshi Nishihara², Shinya Tanaka² and Kiyohiro Houkin¹

¹Department of Neurosurgery, Graduate School of Medicine, Hokkaido University, and ²Department of Pathology, Graduate School of Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido, Japan

*For reprints and all correspondence: Shunsuke Terasaka, Department of Neurosurgery, Graduate School of Medicine, Hokkaido University, North-15, West-7, Kita-ku, Sapporo 060-8638, Japan. E-mail: terasas@med.hokudai.ac.jp

Received July 28, 2011; accepted January 30, 2012

Objective: We reviewed the relationship between extent of resection and survival of patients with high-grade gliomas with special consideration of an oligodendroglial component.

Methods: A retrospective review was performed on 160 adult patients with histological diagnosis of high-grade gliomas since 2000. All histological slides were categorized as high-grade astrocytomas or oligodendroglial tumors. Extent of resection was assessed by early post-operative magnetic resonance imaging and classified as complete resection, incomplete resection and biopsy. Measured outcomes were overall survival and progression-free survival. The independent association of extent of resection and survival was analyzed by the multivariate proportional hazard model adjusting for prognostic factors.

Results: The lesions were classified as high-grade astrocytomas in 93 patients and high-grade oligodendroglial tumors in 67 patients. In high-grade astrocytomas, the median survival after complete resection ($n = 36$), incomplete resection ($n = 36$) and biopsy ($n = 21$) was 23.4, 15.3 and 12.6 months, respectively. Complete resection was independently associated with increased overall survival ($P < 0.001$) and progression-free survival ($P = 0.002$) compared with incomplete resection, while incomplete resection was not associated with survival benefit compared with biopsy by multivariate analysis. On the other hand, in high-grade oligodendroglial tumors, the majority of patients were still alive and there is no significant difference in the survival between complete resection ($n = 24$) and incomplete resection ($n = 33$), while even incomplete resection had a significantly longer overall survival ($P < 0.001$) and progression-free survival ($P = 0.006$) compared with biopsy ($n = 10$).

Conclusions: Maximal cytoreduction improves the survival of high-grade gliomas, although our data indicated that the impact of extent of resection in high-grade astrocytomas is different from that in high-grade oligodendroglial tumors.

Key words: astrocytoma – malignant glioma – multivariate analyses – oligodendroglioma – survival

INTRODUCTION

In recent years, surgery has drawn the most attention as a treatment of high-grade gliomas because surgical adjunctive methods including fluorescence visualization of the tumor by 5-aminolevulinic acid (1,2), navigation-guided fence-post-procedure (3), intraoperative neurophysiological

monitoring (4) and intraoperative magnetic resonance (MR) imaging (5,6) have enabled extensive resection of high-grade gliomas. Extensive resection is associated with prolonged survival in high-grade astrocytomas, especially glioblastoma multiforme (GBM) (2,7–15). Stummer et al. (1,2) clearly demonstrated in retrospective analysis of randomized

prospective trials that complete resection of the enhancing tumor evaluated by early post-operative MR imaging is an independent and overwhelming prognostic factor in patients with newly diagnosed GBMs. Several retrospective volumetric analyses of the extent of resection (EOR) also indicated that the EOR improves survival in patients with GBMs (7,9,12) and anaplastic astrocytomas (AAs) (16). By evaluation of early post-operative MR imaging, the role of the EOR has gradually become evident in high-grade astrocytomas.

On the other hand, studies focused on the association between the EOR and prognosis of high-grade oligodendroglial tumors [anaplastic oligodendrogliomas (AOs) and anaplastic oligoastrocytomas (AOAs)] are limited to a few series (17–20), and the optimal role of surgery for oligodendroglial tumors remains a major controversy. Basically, in both World Health Organization (WHO) Grade II and III gliomas, several studies demonstrated that the presence of an oligodendroglial component (OC) constitute a favorable prognostic factor (21–29). It is apparent that the prognosis of high-grade oligodendroglial tumors is highly influenced by adjuvant therapies, because oligodendroglial tumors are generally chemosensitive and radiosensitive (30–33). In addition, in WHO Grade IV gliomas, some studies found that GBM with an OC tends to have better prognosis than ordinary GBM (12,34–37). Several studies have suggested that the incidence of chromosome 1p and 19q deletions, which have recently been demonstrated to be genetic markers predictive of good chemosensitivity and a better outcome in oligodendroglial tumors (32,33,38), is clearly higher in GBMs with OC than ordinary GBMs (34,36). We assume that GBM with OC belongs to the subgroup of oligodendroglial tumors by these biological characteristics.

In this study, we retrospectively reviewed the relationship between the EOR and survival of adult patients with high-grade glioma treated in our institutions with special consideration of the presence of the OC. The EOR was carefully assessed by early post-operative MR imaging. The aim of our study was to evaluate the hypothesis that the role of surgery for high-grade gliomas with OC is different from that for high-grade astrocytomas.

PATIENTS AND METHODS

ELIGIBILITY AND TREATMENT

A retrospective review was performed at the Hokkaido University Hospital and our affiliated hospitals on patients aged over 20 years with a histological diagnosis of a high-grade glioma (WHO Grade III and IV) between January 2000 and February 2011. Eligible cases for this analysis included all patients who underwent initial biopsy or resection at our hospitals of a histologically confirmed GBM, AA, AOA and AO. In addition, all histological slides were re-evaluated by two neuropathologists (H.K. and H.N.) blinded to clinical background and outcome of patients and

classified according to the 2007 WHO classification. GBMs with OC are defined based on histological specimens that identify tumor parts with features of oligodendroglial differentiation within typical histological findings of GBM. Pathological diagnosis did not refer to genetic information.

In this study, eligible cases included all patients who were treated with conventional external limited field irradiation (2 Gy/day, five days/week, total dose 54–60 Gy) in Hokkaido University Hospital within 6 weeks after surgery. Patients who had received previous radiotherapy for a low-grade glioma were excluded in this study. Patients lost to follow-up, defined as followed less than 6 months after diagnosis, with no progression or death during that interval, were also excluded. Patients with brain stem glioma and gliomatosis cerebri (defined as a diffuse glioma involving more than three cerebral lobes and without obvious tumor mass) were not included. Most patients received adjuvant chemotherapy. The standard chemotherapy regimen changed in 2006; the predominant regimen was nitrosourea (ACNU)-based or platinum [cisplatin (CDDP)]-based before 2006, and temozolomide (TMZ) chemotherapy thereafter.

EOR AND OUTCOME ASSESSMENT

In tumor-debulking surgery, all patients underwent maximum possible resection of the tumor without developing new neurological deficits. The post-operative MR studies were obtained shortly after surgery in all patients (almost all cases were obtained within 24 h post-operatively). Pre- and post-operative T1-weighted MR imaging with contrast enhancement was used to determine the extent of tumor resection. Our patients were usually conducted conventional MR imaging with 5 mm slice thickness of the whole neuraxis, and the extent of tumor resection was estimated by these sequences. ‘Complete resection’ was defined as no evidence of residual pre-operative contrast enhancement as seen from axial, coronal and sagittal images (Fig. 1A), and ‘incomplete resection’ was defined as rim or nodule enhancement of the resection cavity (Fig. 1B and C). ‘Biopsy’ was defined as resection of a small part of the lesion for diagnostic purposes only (including stereotactic needle biopsy). For a small number of non-enhancing tumors, the range of tumor was defined as the area of increased signal intensity on FLAIR images (similar to the assessment of low-grade gliomas).

The following covariates were considered: age at diagnosis, pre-operative Karnofsky Performance Scale (KPS) score, preoperative maximum tumor diameter, tumor location (including whether the lesion had infiltrated eloquent brain areas), histological malignancy according to the WHO criteria and adjuvant post-operative TMZ therapy. The presumed eloquent brain areas consisted of motor strip (precentral gyrus), dominant hemisphere perisylvian language area, basal ganglia/internal capsule, thalamus and calcarine visual cortex (39).

The endpoints of this study were progression-free survival (PFS) and overall survival (OS), which were measured from

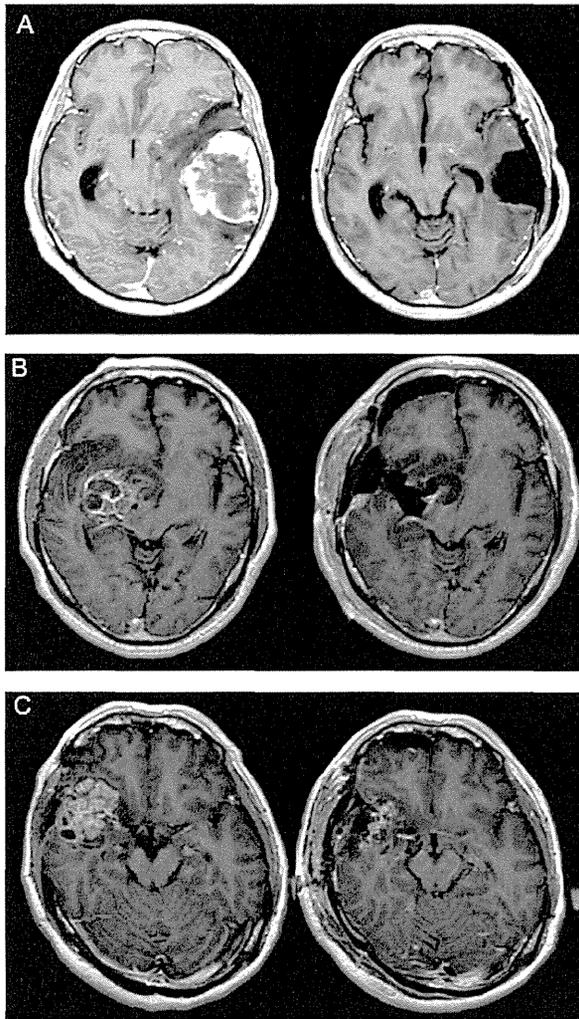


Figure 1. Pre- (left) and post-operative (right) axial T1-weighted magnetic resonance imaging with contrast enhancement in patients who underwent resection of high-grade gliomas. (A) ‘Complete resection’ without any residual pre-operative contrast enhancement lesion. (B and C) ‘Incomplete resection’ with residual small enhancement lesion around the resection cavity (B) or residual nodular contrast enhancement (C).

the time of initial surgical intervention that confirmed the diagnosis of high-grade glioma. All patients were followed in our institutions until death or last visit. Progression was defined as the development of radiographically evident progressive disease.

STATISTICAL ANALYSIS

Parametric data were expressed as mean ± standard deviations. In this study, two separate groups were established, ‘high-grade astrocytomas’, which included ordinary GBMs and AAs, and ‘high-grade oligodendroglial tumors’, which included GBM with OC, AOA and AO. A comparison of patient characteristics between high-grade astrocytomas and

high-grade oligodendroglial tumors was performed by the Student *t*-test for continuous and ordered variables, and the χ^2 test for nominal variables. Age and maximum tumor diameter were analyzed as continuous variables, and pre-operative KPS score was analyzed as an ordinary variable.

Time to death or progression parameters were analyzed with the Kaplan–Meyer method, and comparing them by log-rank tests. The Cox proportional hazards model was used to identify the univariate and multivariate predictors of survival and progression. Two separate Cox’s analyses were performed with OS and PFS for the histological subgroups (high-grade astrocytomas and high-grade oligodendroglial tumors). Variables associated with OS in univariate analysis were included in the multivariate Cox model if $P \leq 0.20$. For all analyses, a *P* value <0.05 was accepted as significant. The statistical calculations were performed in StatView software version 5.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

RESULTS

PATIENT CHARACTERISTICS

The clinical characteristics of the 160 patients who met our inclusion criteria are summarized in Table 1. There were 87 males and 73 females with a mean age ± standard deviation of 55 ± 14 years (median: 57 years, range: 22–79). The histological diagnoses, which were re-evaluated by neuropathologists, were GBM in 73 patients (46%), AA in 20 patients (13%), GBM with OC in 14 patients (9%), AOA in 32 patients (20%) and AO in 21 patients (14%). Fourteen tumors (9%) had no contrast enhancement on MR imaging. Of these 14 cases, three patients were AA, seven were AOA, three were AO and one was GBM with OC. Complete resection, incomplete resection and biopsy were achieved in 60 cases (38%), 69 cases (43%) and 31 cases (19%), respectively. Seventy-two patients (45%) were given post-operative TMZ chemotherapy according to the Stupp regimen (40). Sixty-five patients (41%) received ACNU-based chemotherapy (ACNU by intravenous injection alone or combined with procarbazine and vincristine), and seven patients (four AO and three GBM patients) (4%) received CDDP-based chemotherapy (combined with ifosfamide and VP-16). The remaining 16 patients (10%) were not given any adjuvant chemotherapy.

As shown in Table 1, the patients with high-grade oligodendroglial tumors were statistically younger at diagnosis ($P < 0.001$) and had a better preoperative KPS score ($P = 0.03$) compared with patients with high-grade astrocytomas. In regards to the WHO criteria, high-grade astrocytomas were more advanced than high-grade oligodendroglial tumors ($P < 0.001$) because of the relatively small number of GBM with OC. No differences in gender, laterality of the tumor location, tumor maximum diameter, tumor involving eloquent area and post-operative adjuvant TMZ therapy were observed between high-grade astrocytomas and oligodendroglial tumors. Importantly, there were no statistically

Table 1. Descriptive statistics of study sample by histological subtypes

	All (n = 160)	Astrocytomas (n = 93)	Oligodendroglial tumors (n = 67)	P value ^a
Age (mean ± SD, years)	55 ± 14	59 ± 12	49 ± 14	<0.001
Sex				
Male	87	46	41	0.10
Female	73	47	26	
Side of tumor				
Right	91	51	40	0.33
Left	69	42	27	
Pre-operative KPS (mean ± SD, %)	79 ± 16	77 ± 17	83 ± 15	0.03
Tumor diameter (mean ± SD, cm)	4.6 ± 1.6	4.4 ± 1.5	4.7 ± 1.7	0.54
Eloquent area ^b				
Yes	72	47	25	0.07
No	88	46	42	
WHO grading				
Grade III	73	20	53	<0.001
Grade IV	87	73	14	
Post-operative TMZ				
Yes	72	41	31	0.67
No	88	52	36	
Extent of resection				
Biopsy	31	21	10	0.32
Incomplete	69	36	33	
Complete	60	36	24	
No. of deaths (%)	88 (55)	69 (74)	19 (28)	
No. of recurrences (%)	115 (72)	81 (87)	34 (51)	
Median follow-up (months)	21.1	16.0	38.7	

SD, standard deviation; KPS, Karnofsky performance scale; TMZ, temozolomide.

^aComparison between high-grade astrocytomas and high-grade oligodendroglial tumors.

^bTumor involved eloquent brain area (precentral gyrus, dominant hemisphere perisylvian language area, basal ganglia/internal capsule, thalamus and calcarine visual cortex).

significant differences in the EOR (complete resection, incomplete resection and biopsy alone) between these two groups ($P = 0.32$).

The median follow-up was 21.1 months. Eighty-eight (55%) patients died during the nearly 11-year follow-up period, with a median follow-up period for the remaining patients of 29.6 months. The cause of death in all cases was attributed to glioma. Progressions were identified in 115 (72%) cases. A total of 29 of the 115 cases with progression underwent repeat surgery.

Table 2. Univariate analysis of clinical and tumor parameters with overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) in 93 patients with high-grade astrocytomas

	Overall survival			Progression-free survival		
	Hazard ratio	95% CI	P value	Hazard ratio	95% CI	P value
Age ^a	1.009	0.99–1.03	0.43	1.013	0.99–1.03	0.18
Pre-operative KPS						
<80	1.177	0.72–1.93	0.52	1.260	0.80–1.99	0.32
≥80	1.0			1.0		
Tumor diameter						
>4 cm	0.936	0.58–1.52	0.79	0.820	0.52–1.28	0.39
≤4 cm	1.0			1.0		
Eloquent area						
No	0.585	0.36–0.95	0.03	0.761	0.49–1.20	0.23
Yes	1.0			1.0		
WHO grading						
Grade III	0.674	0.37–1.22	0.19	0.657	0.38–1.31	0.13
Grade IV	1.0			1.0		
Post-operative TMZ						
No	1.211	0.74–1.99	0.45	1.278	0.81–2.01	0.29
Yes	1.0			1.0		

CI, confidence interval.

^aIncreasing variable.

ANALYSIS OF HIGH-GRADE ASTROCYTOMAS

PREDICTORS

Ninety-three patients underwent resection or biopsy of high-grade astrocytomas (73 GBMs and 20 AAs). Univariate analysis using the Cox proportional hazards model of high-grade astrocytomas is presented in Table 2. ‘Tumor involving eloquent area’ was the only significant predictor of shorter survival time in the univariate analysis ($P = 0.03$). Age at diagnosis and preoperative KPS score did not correlate to survival and progression in the patients with high-grade astrocytomas; therefore, these factors were not included in the multivariate analysis of the EOR. In addition, there was no significant difference in either time to death or progression for AAs versus GBMs ($P = 0.19$).

EOR AND PROGNOSIS

Unadjusted OS and PFS curves for patients with high-grade astrocytomas by EOR are illustrated in Fig. 2. The Kaplan–Meier plots of OS revealed that the median survival after complete resection, incomplete resection and biopsy was 23.4, 15.3 and 12.6 months, respectively. The median time to tumor progression after complete resection, incomplete resection and biopsy was 12.9, 7.4 and 6.5 months,

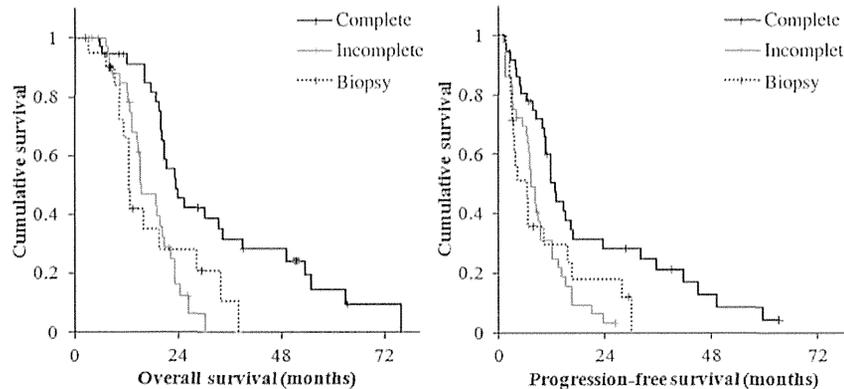


Figure 2. Overall (left) and progression-free (right) survival analysis for patients with high-grade astrocytomas demonstrated as the Kaplan–Meier plots by the extent of surgical resection (complete resection, incomplete resection and biopsy alone).

Table 3. Multivariate analysis of extent of resection (EOR) affecting OS and PFS in 93 patients with high grade astrocytomas^a

	Overall survival			Progression-free survival		
	Hazard ratio	95% CI	P value	Hazard ratio	95% CI	P value
Complete resection	0.356	0.19–0.66	<0.001	0.405	0.23–0.71	0.002
Incomplete resection	1.0			1.0		
Biopsy	1.085	0.53–2.24	0.82	1.158	0.63–2.14	0.64

^aAdjusting for the effect of tumor location (involving eloquent area) and histological WHO grading.

respectively. Differences in both OS and PFS times based on the EOR were significant according to the log-rank test ($P < 0.01$).

The multivariate analysis using the Cox proportional hazard models of the EOR for OS and PFS is listed in Table 3. After adjusting for the effect of tumor location (involving eloquent area) and histological malignancy (WHO grading), complete resection was independently associated with increased OS and PFS compared with incomplete resection ($P < 0.001$ and 0.002 , respectively). Incomplete tumor resection was not associated with a survival benefit compared with biopsy ($P = 0.82$).

ANALYSIS OF HIGH-GRADE OLIGODENDROGLIAL TUMORS

PREDICTORS

Sixty-seven patients were diagnosed as high-grade glioma with OC by a primary surgical specimen. The histological malignancy according to WHO grading was Grade III in 53 patients (32 AOs and 21 AOs) and Grade IV (GBM with OC) in 14 patients.

As shown in Table 4, the significant predictors of shorter survival time in the univariate analysis included advanced age at onset ($P = 0.001$) and WHO Grade IV malignancy ($P = 0.02$). Older age and WHO Grade III malignancy were also associated with a worse rate of PFS ($P = 0.005$ and 0.04 , respectively). There were a trend toward longer OS with larger tumor ($P = 0.08$) and lower preoperative KPS score ($P = 0.08$). Histological malignancy according to WHO grading was significantly correlated with survival in contrast to high-grade astrocytomas. Conversely, there was no significant difference in both OS and PFS for tumors that infiltrated the eloquent brain in high-grade oligodendroglial tumors.

EOR AND PROGNOSIS

The Kaplan–Meier plots of OS by the EOR are demonstrated in Fig. 3. The median survival had not been reached at the time of analysis in patients who underwent tumor-debulking surgery (complete resection or incomplete resection) because the majority of these patients were still alive, whereas the median survival was 19.3 months for patients who underwent biopsy alone. The median time to tumor progression after complete resection, incomplete resection and biopsy was 81.4, 61.3 and 6.5 months, respectively. Differences in both OS and PFS times were significant according to the log-rank test ($P < 0.01$).

Based on the multivariate analysis adjusted for the effect of patient age, pre-operative KPS score, tumor size and WHO grade, complete resection was not associated with survival benefit compared with incomplete resection ($P = 0.85$). There was a trend toward longer PFS with complete resection (hazard ratio: 0.517, compared with incomplete resection), but the difference between complete resection and incomplete resection did not reach statistical significance ($P = 0.16$). Both OS ($P < 0.001$) and PFS ($P = 0.006$) were significantly shorter in patients who underwent biopsy alone than in patients who underwent incomplete resection (Table 5).