

## 신경모세포종에서 Human Endostatin의 지속적 주입 방법에 따른 효과

연세대학교 의과대학 외과학교실

윤찬석 · 박기청 · 박미경 · 손전동 · 최승훈

### Continuous Administration of Human Endostatin in Xenografted Human Neuroblastoma

Chan Seok Yoon, M.D., Ki Chong Park, M.D., Mi Kyoung Park, M.D., Jun Dong Son, M.D. and Seung Hoon Choi, M.D.

**Purpose:** The purpose of this study was to examine whether recombinant human endostatin (rhEndostatin), an antiangiogenic agent, is effective against a human neuroblastoma cell line (designated TNB9). We employed a human neuroblastoma xenograft model, and we investigated whether continuous infusion is more effective than an intermittent administration.

**Methods:** In the first experiment, when the tumors on the backs of nude mice reached a weight of 90 mg, rhEndostatin was administered subcutaneously to the mice (n=5) every day for 10 consecutive days. In the second experiment, the same daily dose of rhEndostatin was administered continuously to the TNB9-bearing mice (n=6) via subcutaneous infusion pumps for 3 consecutive days with the total dose being 30% of the dose given in the first experiment. Nestin and factor VIII expression levels were assessed immunohistochemically to elucidate whether the effects of rhEndostatin was present according to the histologic evidence at day 4 in the second experiment.

**Results:** In the first experiment, the relative tumor weight in treated mice (n=5) was significantly less than that in the controls (n=12) on day 2 after treatment initiation only ( $P < .05$ ). The maximum inhibition rate (MIR) of TNB9 xenograft growth by rhEndostatin was 46.4%, indicating the lack of efficacy. In the second experiment, the effects of rhEndostatin were much more marked than those noted in the first experiment, with the MIR being 60.7%. The mean relative tumor weight in the treated group (n=6) in the second experiment was significantly less than that in the controls

(n=10) on days 2, 4 and 6 ( $P < .01$ ), as well as on days 8 and 10 ( $P < .05$ ). The nestin staining in the endothelium of the control tumors (n=2) was remarkable, whereas the nestin staining showed as a loss of fibrillar structure in the rhEndostatin-treated tumors (n=2). The number of vessels immunostained with antifactor VIII antibody was markedly reduced in the tumors (n=2) from the rhEndostatin-treated mice compared with that from the control mice (n=2).

**Conclusion:** Continuous administration of rhEndostatin resulted in more significant tumor regression than an intermittent administration of the agent. This result suggests that the continuous infusion of rhEndostatin is an effective agent and administration method for treating patients with neuroblastoma in the future. (*J Korean Surg Soc* 2004;67:441-446)

**Key Words:** Neuroblastoma, Angiogenic drug, Human endostatin, Nestin, Factor VIII

**중심 단어:** 신경모세포종, 신생혈관성 약, 네스틴, 인자 VIII

Department of Surgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

### 서 론

신경모세포종은 소아에서 가장 흔한 고형 종양으로서 12개월 이상의 환아에서 높은 악성도와 원격전이 또는 MYCN 종양유전자의 증식을 보인다.(1,2) 최근의 고용량 화학요법, 방사선요법, 수술 및 혈액 모세포 이식 등의 다양한 치료에도 불구하고, 4기 단계의 12개월 이상의 환아에서 오직 30% 미만의 생존율을 기대할 수 있다.(1-3) 임상적 치료 결과를 증진시키기 위해서 새로운 방법 또는 새로운 항종양 치료제가 현재 신경모세포종의 치료 약제에 포함이 되어야만 할 것이다.

항암화학요법 약제에 추가하여 endostatin, angiostatin, TNP-470, antivascular endothelial growth factor (VEGF), epifalocatechin gallate 등의 항신생혈관 물질의 효과가 실제로 생물체에서 종양소실에 어떤 영향을 주는지는 지금까지 연구

책임저자 : 최승훈, 서울시 서대문구 신촌동 134번지  
☎ 120-752, 연세대학교 의과대학 외과학교실  
Tel: 02-361-5553, Fax: 02-313-8289  
E-mail: shchoi@yumc.yonsei.ac.kr

접수일 : 2004년 5월 3일, 게재승인일 : 2004년 10월 30일

되어 왔었다.(1-17) 신생혈관이 종양성장에 관여하는 것은 이미 잘 알려져 있다.(10,18,19)

항신생혈관 물질 중 Endostatin은 20 kDa인 교원질 18의 C-terminal 조각으로서 이전부터 실험적으로 다양한 인체종양을 이식한 설치류에서 종양 성장을 억제하는 사실을 보여주었다.(4-8) 최근에는 재조합된 인체 Endostatin (rhEndostatin)이 제조되어(20) 성인 악성종양 환자에게 1상 임상 시험에 사용되었다.(21) 이러한 악성종양에서의 항신생혈관 물질인 Endostatin의 임상적 시도에서 이 단백질은 매일 약 20~30분간 정맥으로 주입되었다.(4,9) 이러한 protocol은 동물실험에서 하루에 한번 단번에 피하 주입한 실험적 연구에 근거한 것이었다. 이전 연구에서 이러한 주입 일정이 최대효과를 나타내지 않는다는 가설로 지속적 주입방법이 시도되었고, 최근 인체 채장암과 신경교종 cell-line에서 지속적 주입방법이 간헐적 주입방법보다 더욱 효과적이라는 사실을 보여주었다. 이에 본 저자는 TNB9 명명된 이종 인체 신경모세포종에 대한 rhEndostatin의 주입방법에 따른 효과에 대한 실험 결과를 보고한다. 신생혈관의 억제의 조직학적 표식자로는 내피전구세포의 표식자인 nestin의 면역염색(25)과 성숙된 내피세포 표식자인 VIII인자(26)를 이용하였다.

**방 법**

인간 신경모세포종, TNB9은 15개월 된 MYCN 증식을 가지고 있는 4기 복부 신경모세포종을 환자에서 채취하여 세포주를 제작하였다.(24) 이전 연구에서 MYCN 증식과 염색체는 이식시 생물학적 변화가 없이 유지되는 것을 확인하였다. 지름이 약 2.5 mm로 잘려진 종양을 6주된 암컷 BALB/C-nu/nu 흉선을 제거한 쥐에 피하로 주사하였다. 처치는 종양이 약 90~95 mg이 될 때 시작하였다. 종양을 가지고 있는 쥐들은 임의로 5, 12 마리 또는 8, 12마리씩 분리되었다. rhEndostatin은 Calbiocam (SanDiego, CA)에서 구입하였다. rhEndostatin의 효과는 이전 연구에서 확인된 바 있다.(27) 첫 번째 실험으로 10 mg/kg/d의 rhEndostatin을 O'Reilly 등의 성공적인 실험결과를 토대로 연속 10일 동안 5마리의 쥐에게 피하로 주입하였고 대조군 12마리는 10 mL/kg/d 의 생리식염수를 주입하였다.(4) 두 번째 실험에서는 첫 번째 실험에서와 같은 용량의 rhEndostatin을 8마리의 쥐에게 3일간 그림 1에서와 같이 피하 이식한 삼투압 펌프를 이용하여 지속적으로 투여하였다. 따라서, 두 번째 실험에서 투여된 rhEndostatin의 총량은 첫 번째 실험의 30%이었다. 12마리의 대조군에서 0.9 N 생리식염수를 펌프를 이용 투여하였다.

종양의 크기와 실험쥐와 대조군 쥐의 무게는 rhEndostatin이 투여된 날부터 16일째까지 2일마다 기록되었다. 직각을 이룬 종양의 두 지름은 slide caliper로 측정되었다. 종양무게는 공식에 의해 계산되었는데: 무게(mg)=길이(mm)×폭

(mm)<sup>2</sup>×0.5이고 여기서 길이는 상대적으로 가장 긴지름, 폭은 가장 짧은 지름으로 정했다. 종양무게는 실험군과 대조군에서 2일마다 비교하였고 통계처리는 Mann Whitney U test를 사용하였다. 또한 결과는 Batelle Columbus Laboratory의 protocol에 따라 평가되었다.(28,29) 처치의 효과는 최고 억제율(MIR), (1-TRW/CRW) \* 100 (%)로 표현되고 TRW는 처치군에서, CRW는 대조군에서 각각 시작시 종양 무게와 비교하여 상대적인 평균 종양 무게를 나타낸다. 우리는 종양 억제가 있을 때(TRW < 1.0) '매우 효과적'이라고 평가하였고, 종양 성장이 지체되었을 때(MIR ≥ 58%)를 '효과적', MIR이 58% 미만일 때 '효과 없음'이라고 평가했다.(24, 28,29)

첫 번째 실험에서 각 군에서 2마리씩 16일째 이산화탄소로 질식시킨 후 종양 표본을 얻어 10% 포르말린에 고정 후 파라핀을 이용 H&E 염색 후 조직 검사를 시행하였다. 각 표본마다 3,019에서 5,000개의 세포수를 mitosis-keryorrexis index (MKI)와 mitosis수를 결정하기 위해 세었다.

두 번째 실험에서는 각 군에서 2마리씩 같은 방법으로 4일째 종양 표본을 채취하여 조직검사와 면역조직화학 검사를 시행하였다. 4µm 두께로 잘라 통상적인 조직 검사를 위해 항 nestin(25)과 항VIII인자(26) 항체와 함께 H&E 염색을 하였다. 인체 nestin 항체는 토끼에서 17개의 C-terminal amino acid: 1602-KFTQREGDRESWSSGED-1618를 포함하는 합성 oligopeptide를 이용하여 만들었다.(30) 조직 절편과 소의 대동맥 내피세포(대조군)가 처음에 nestin에 대한 항체로 1 : 5,000으로 희석되어 배양되었다. LSAB2/HRP 염색 kit (DAKO Corporation) 이 두 번째 반응을 위해 사용되었다. 두 번째 항체반응에 이어 horseradish 과산화 표식자에 의한 streptavidin 시스템의 효소반응이 시행되었다. 핵은 4, 6-diamino-2-phenylindole에 의해 청색으로 염색되었다.(25)

3% 과산화수소수로 슬라이드를 처치후 항VIII인자와 관계된 항원 항체(DAKO Corporation)를 1 : 80으로 희석하여 점적하였다. LSAB+ kit과 EnVision kit (DAKO)도 사용되었다. 그 후 슬라이드는 완충 생리식염수로 헹구고 두 번째 항체(1 : 100)가 60분간 적용되었다. 다음 순서로 substrate-chromogen 용액(1 : 50)이 10분에서 20분간 점적되었고 Hematoxylin 염색을 하였다.(26)

**결 과**

실험일로부터 10일까지의 종양 무게를 Table 1에 나타냈다. 첫 번째 실험에서 종양무게는 2일째 대조군에 비해 의미 있게 감소되었으나, 4일부터 10일째까지는 큰 차이가 없었다(Fig. 1). TNB9 모델에서 rhEndostatin의 MIR은 46.4%이었다. 실험기간 중 rhEndostatin 그룹 5마리와 대조군 12마리 중 죽은 실험쥐는 없었다. 또한 체중이 줄지도 않았다.

두 번째 실험에서 둘째날부터 열흘째까지 rhEndostatin 군

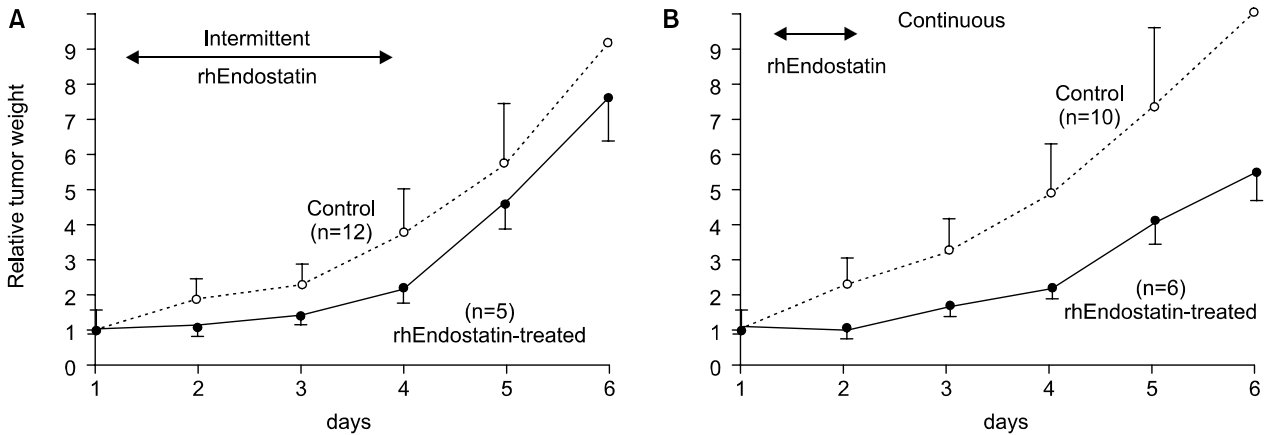


Fig. 1. Tumor weight curve for the group of mice treated with intermittent (A) and continuous (B) administration of rhEndostatin. Arrow and bar, administration of agent; ○, control; ●, rhEndostatin-treated (10 mg/kg MW/d, sc). Bars indicate SEM.

Table 1. Changes in relative tumor weight in experimental and control groups

Days	Relative tumor weight		P value
	rhEndostatin-treated mice	Controls	
First experiment *			
2	0.97±0.24	1.81±0.70	.0112
4	1.32±0.17	2.17±1.01	.0509
6	2.18±0.43	3.74±1.62	.0911
8	4.71±0.59	5.74±1.80	.2249
10	7.73±0.70	9.08±3.30	.5966
Second experiment †			
2	0.90±0.24	2.29±0.68	.0030
4	1.58±0.73	3.18±0.64	.0045
6	2.06±0.80	4.58±1.08	.0030
8	3.97±1.59	7.08±1.80	.0280
10	5.34±1.82	9.50±2.56	.0237

\* = rhEndostatin-treated mice (n=5); control (n=12); † rhEndostatin-treated mice (n=6); control (n=12).

에서 종양 무게가 대조군에 비해 의미 있게 줄었다(Fig. 1, B). rhEndostatin의 MIR은 60.7%이었다. 이는 Battelle Columbus 연구실 프로토콜에 의하면 “효과적”에 해당되고, 종양성장 억제가(TRW < 1.0),은 “매우 효과적”의 뜻이 된다. 두 번째 실험에서도 실험 중 죽은 쥐는 없었다. 3개의 삼투압 펌프는 실험군 및 대조군에서 모두 피하조직에 잘 유지되었다. 또한 양군에서 체중감소도 보이지 않았다.

첫 번째 실험에서 16일째에 대조군 종양에서 작은 괴사가 발견되었다. 하지만 rhEndostatin 괴사는 미미하였다.(27) 평균 mitosis-karyorrhexis index (MKI)는 그 하위군의 것과 동일하였다. rhEndostatin 처치군과 대조군에서 종양에 보이는 괴사의 비율은 의미 있는 차이를 보이지 않았다. 마찬가지로 종양에서 보이는 혈관의 수도 차이는 없었다.(27)

Table 2. Histopathologic changes in tumors on mice in the experimental and control groups (Day 4 of the second experiment, H&E)

Samples	Tumor			
	5*	6*	E†	F†
Necrosis (area %)	1%	5~6%	0%	0%
Mitosis-karyorrhexis index (MKI)‡	3.35%	3.42%	5.30%	6.02%
Mitosis§	2.16%	2.32%	1.66%	2.50%

\* = control tumors; † = rhEndostatin-treated tumors; ‡ = number of cells showing mitosis-karyorrhexis/number of cells counted § = number of cells showing mitosis/number of cells counted.

**Table 3.** Number of vessels in tumors on day 4 of the second experiment, immunostained with antifactor VIII antibody

Samples	Tumor			
	5*	6*	E <sup>†</sup>	F <sup>†</sup>
1	13	10	7	10
2	10	21	7	4
3	15	12	11	4
4	12	16	10	8
5	10	10	15	6
6	12	11	4	9
7	6	19	5	9
8	12	21	5	5
9	3	8	8	7
10	11	21	3	8
Mean	10.4	14.9	7.5	7.0
SD	3.50	5.25	3.66	2.16

\* = control tumors; † = rhEndostatin-treated tumors.

그러나, 두 번째 실험에서 4일째 HE 염색에서 rhEndostatin 처치군에서 대조군에 비해 MKI index의 증가를 보였다(Table 2). 또한 항nestin 항체(25)와 항 인자VIII 항체(26)의 면역염색에서 상당한 조직학적 차이를 보였다. Nestin은 대조군 종양(n=2)에서는 종양은 물론 주변 조직의 혈관조직이 주로 염색되었고, rhEndostatin 처치 군(n=2)에서는 종양주위 혈관조직에서는 염색이 잘 안 되는 소견을 보였다. 항 인자VIII 항체(n=2)에 의한 면역 염색에서 종양 내 혈관의 수는 대조군(n=2)에 비해 상당히 감소되었다(Table 3).

**고 찰**

최근 진행성 신경모세포종의 치료는 상당히 진보되어 왔다.(1-3) 하지만 Kawa 등(3)에 의하면 진행성 MYCN 증식의 신경모세포종 환자의 overall survival rate는 66개월에 28.8%로 보고되고 있다. 임상적 치료 결과를 증진시키기 위해 새로운 화학요법 제제의 소개가 필수적인데 저자 그룹은 지난 18년간 많은 실험을 시행하였다.(24-31) 이중 신경모세포종 TNB9에서 다양한 화학요법제의 실험이 이루어져 효과적인 것으로는 cyclophosphamide, cisplatin, dacarbazine, melphalan, carboplatin 및 irinotecan 등이고, 효과가 없는 약제로는 vincristine, cytosine, arabinoside, fotemustine 및 busulfan으로 조사되었다.(24,32) TNB9은 15개월 아이의 복부 신경모세포종으로부터 이종되어 nude mice에 연속적 이식에 의해 유지되었다. TNB9의 염색체 이상소견은 MYCN과 더불어 DDX1 증식소견, 그리고 짧은 doubling time이 신경모세포종에 합당하다.(24)

종양이 진행단계에서 신생혈관 형성이 왕성하기 때문에

현재 임상적으로 시도되고 있는 약제 중 항 혈관신생 약제가 치료에 기대되고 있다.(18) TNB-470, 항VEGF 항체, angiostatin, endostatin, epigallocatechin gallate 등과 같은 항신생혈관 약제 중 O'Reilly 등(4)은 Lewis lung carcinoma, T241 fibrosarcoma, B16F10 melanoma, EOMA hemangioendothelioma에서 endostatin의 항종양 효과를 입증했다. 또한 recombinant mouse endostatin이 Lewis lung carcinoma에서 투여량에 의존적인 것도 밝혀냈다. 즉, 종양을 가지고 있는 실험쥐에게 10일 연속 10과 20 mg/kg MW/d를 피하로 주사한 경우는 종양 억제 효과가 뚜렷한 반면, 2.5 mg/kg MW/d를 주사한 경우 항 종양효과를 보이지 않았다.(4) Perletti 등은 recombinant rat endostatin의 rat의 mammary 종양에서의 항 종양효과를 입증하였다.(33) 이러한 성공적 실험들 후 rhEndostatin이 복제되고 표현되었다.(20,34) 성인 악성종양 환자에서 1상 임상실험을 한 Folkmandml guidance하에 EntreMed Inc. (Rockville, MD)에서 재조합되어 왔다.(21)

본 실험에서 두 실험군 사이에 종양 크기의 현격한 차이가 관찰되고 특히 두 번째 실험에서 뚜렷하다(Fig. 2). rhEndostatin의 효과가 매우 빨리 시작되는 것으로 보이는데, 이러한 결과는 Kisker 등(22)이 이미 밝혀 낸 바 있는데 복강내 삼투압 펌프에 의해 rhEndostatin 20 mg/kg/d 주입군에서 대조군에 비해 종양 크기가 의미 있게 줄어든 것을 보고한 바 있다.

항신생혈관 제제를 사용한 대상에서의 종양의 혈관은 감소하였다.(35) Nestin은 vimentin, gial fibrillary acidic protein 등과 더불어 intermediate filament 중 하나이고, 뇌종양의 신생혈관구조나 embryonic단계의 neuroepithelial stem/progenitor cells에서 많이 발견되고, mature neuronal tissue에서는 드물다.(25,36) Nestin mRNA는 약 6.2 kilobase의 길이이고, 그 유전자는 3개의 intron을 가지고 있다. 흥미롭게도, neuroepithelium-specific nestin은 nestin 유전자의 두 번째 intron에서 기인한다. 반면 근육은 precursor-specific expression은 첫 번째 intron에서 기인한다.(25,37) Sugawara 등(25)은 hemangioblastoma 4예에서 nestin에 면역염색을 시행하였는데 nestin은 neuroepithelial stem cell과 glioma cell뿐 아니라 성장이 빠른 증식성 endothelial cell의 표식자로도 의미 있다는 가설을 세웠다. 마찬가지로 인자VIII의 존재는 유방암 또는 다른 악성종양에서 미세혈관의 분포를 의미한다고 하였다.(26,38-40) 따라서, nestin과 인자VIII은 항신생혈관 실험에서 혈관형성의 표식자로 쓰인다. 그러나 MKI와 mitosis 연구(41)에서 그 수는 혈관형성의 감소 효과가 MKI의 증가를 유도하는지 여부를 결론짓기엔 적다(Table 2).

좀더 연구해보면 Kisker 등(22)은 췌장암에서 rhEndostatin의 지속적 주입이 항 종양효과가 뚜렷한 것을 알 수 있다. 본 실험에서는 Kisker 등(22)의 것과 유사한 실험으로 우리는 인간 신경모세포종에서 생체 모델로 rhEndostatin의 지속적 주입의 장점을 확인할 수 있었다. Joki 등(23)은 endo-

statin의 glioma에 대한 효과를 연구한 바 있다. Endostatin과 더불어 Cohn 등(42)은 Schwann cell에서 기인한 항신생혈관 제제의 지속적주입이 항종양효과가 뚜렷하다는 사실을 밝혀냈다.

항신생혈관제제의 효과는 종양 크기가 작을 때 효과적이라고 보고되었다. Kuroiwa 등(27)의 이전 실험결과에 의하면 rhEndostatin의 효과는 종양 크기가 작을 때만 효과적이었고 이것은 앞으로 종양 크기가 조금씩 증가할 때의 지속적 주입이 시행되는 임상적 실험적 연구가 필요하겠다. 실험군에서 체중의 변화가 작기 때문에 제제가 많이 필요할 때 더 많이 사용하여야 한다. 항혈관신생 제제의 지속적 주입은 미래에 유전자치료와 병행하여 이루어져야 하겠다.(43)

## REFERENCES

- 1) Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, et al. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. *N Engl J Med* 1999;341:1165-73.
- 2) Ikeda H, Iehara T, Tsuchida Y, et al. Experience with international neuroblastoma staging system and pathology classification. *Br J Cancer* 2002;86:1110-6.
- 3) Kawa K, Ohnuma N, Kaneko M, et al. Long-term survivors of advanced neuroblastoma with MYCN amplification. A report of 19 patients surviving disease-free for more than 66 months. *J Clin Oncol* 1999;17:3216-20.
- 4) O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997;88:277-85.
- 5) Bertolini F, Fusetto L, Mancuso P, et al. Endostatin, An anti-angiogenic drug, induces tumor stabilization after chemotherapy or anti-CD20 therapy in a NOD/SCID mouse model of human high-grade non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2000;96:282-7.
- 6) Boehle AS, Kurdow R, Schulze M, et al. Human endostatin inhibits growth of human non-small-cell lung cancer in a murine xenotransplanted model. *Int J Cancer* 2001;93:420-8.
- 7) Ye C, Feng C, Wang S, et al. Antiangiogenic and antitumor effects of endostatin on follicular thyroid carcinoma. *Endocrinology* 2002;143:3522-8.
- 8) Sorensen DR, Read TA, Porwol T, et al. Endostatin reduces vascularization, blood flow, and growth in a rat gliosarcoma. *Neuro Oncol* 2002;4:1-8.
- 9) O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, et al. Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994;79:315-28.
- 10) O'Reilly MS, Holmgren L, Chen C, et al. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat Med* 1996;2:689-92.
- 11) Nagabuchi E, VanderKolk WE, Une Y, et al. TNP-470 anti-angiogenic therapy for advanced murine neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 1997;32:287-93.
- 12) Wassberg E, Phlman S, Westlin JE, et al. The angiogenesis inhibitor THP-470 reduces the growth rate of human neuroblastoma in nude rats. *Pediatr Res* 1997;41:327-33.
- 13) Katzenstein HM, Salwen HR, Nguyen NN, et al. Antiangiogenic therapy inhibits human neuroblastoma growth. *Med Pediatr Oncol* 2001;36:190-3.
- 14) Matsusaka S, Nakasho K, Terada N, et al. Inhibition by an angiogenesis inhibitor, TNP-470, of the growth of a human hepatoblastoma heterotransplanted into nude mice. *J Pediatr Surg* 2000;35:1198-204.
- 15) Rowe DH, Huang JZ, Li J, et al. Suppression of primary tumor growth in a mouse model of human neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 2000;35:977-81.
- 16) Suganuma M, Okabe S, Kai Y, et al. Synergistic effects of epigallocatechin gallate with epicatechin, sulindac, or tamoxifen on cancer-preventive activity in the human lung cancer cell line PC-9. *Cancer Res* 1999;59:44-7.
- 17) Cao Y, Cao R. Angiogenesis inhibited by drinking tea. *Nature* 1999;398:381.
- 18) Meitar D, Crawford SE, Rademaker AW, et al. Tumor angiogenesis correlates with metastatic disease, N-myc amplification, and poor outcome in human neuroblastoma. *J Clin Oncol* 1996;14:405-14.
- 19) Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1989;82:4-6.
- 20) Boehm T, Pirie-Shepherd S, Trinh LB, et al. Disruption of the KEX1 gene in pichia pastoris allows expression of full-length murine and human endostatin. *Yeast* 1999;15:563-72.
- 21) Herbst RS, Hess KR, Tran HT, et al. Phase I study of recombinant human endostatin in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2002;20:3792-803.
- 22) Kisker O, Becker CM, Prox D, et al. Continuous administration of endostatin by intraperitoneally implanted osmotic pumps improves the efficacy and potency of therapy in a mouse xenograft tumor model. *Cancer Res* 2001;61:7669-74.
- 23) Joki T, Machluf M, Atala A, et al. Continuous release of endostatin from microencapsulated engineered cells for tumor therapy. *Nat Biotechnol* 2001;19:35-9.
- 24) Tsuchida Y, Kanda N, Shimatake H, et al. Clinical significance of gene amplification studied in human neuroblastoma xenografts: Relationship with tumor growth rate, chemotherapeutic sensitivities and levels of neuron-specific enolase. *Exp Cell Biol* 1988;56:277-84.
- 25) Sugawara K, Kurihara H, Negishi M, et al. Nestin as a marker for proliferative endothelium in gliomas. *Lab Invest* 2002;82:345-51.
- 26) Guidi AJ, Fisher L, Harris JR, et al. Microvessel density and distribution in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Natl Cancer Inst* 2002;20:732-42.

- 27) Kuroiwa M, Ikeda H, Hongo T, et al. Effects of recombinant human endostatin on a human neuroblastoma xenograft. *Int J Mol Med* 2001;8:391-6.
- 28) Ovejera AA, Houchens DP, Barker AD. Chemotherapy of human tumor xenografts in genetically athymic mice. *Ann Clin Lab Sci* 1978;8:50-6.
- 29) Geran RI, Greenberg NH, MacDonald MM, et al. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and biological systems. *Cancer Chemother Rep* 1972;3:51-61.
- 30) Messam CA, Hou J, Major EO. Coexpression of nestin in neural and glial cells in the developing human CNS defined by a humanspecific anti-nestin antibody. *Exp Neurol* 2000; 161:585-96.
- 31) Choi SH, Tsuchida Y, Yang HW. Oral versus intraperitoneal administration of innotecan in the treatment of human neuroblastoma in nude mice. *Cancer Lett* 1998;124:15-21.
- 32) Ikeda H, Tsuchida Y, Wu JG, et al. Antitumor effects of fotemustine and busulfan against a human neuroblastoma xenograft. *Oncol Rep* 2000;7:1265-8.
- 33) Perletti G, Concaro P, Giardini R, et al. Antitumor activity of endostatin against carcinogen-induced rat primary mammary tumors. *Cancer Res* 2000;60:1793-6.
- 34) Dhanabal M, Volk R, Ramchandran R, et al. Cloning, expression, and in vivo activity of human endostatin. *Biochem Biophys Res Comm* 1999;258:345-52.
- 35) Sorensen DR, Read TA, Porwol T, et al. Endostatin reduces vascularization, blood flow, and growth in a rat glioma. *Neuro Oncol* 2002;4:1-8.
- 36) Kurihara H, Zama A, Tamura M, et al. Glioma/glioblastoma specific adoviral gene expression using the nestin gene regulator. *Gene Ther* 2000;7:686-93.
- 37) Lothian C, Lendahl U. An evolutionarily conserved region in the second intron of the human nestin gene directs gene expression to CNS progenitor cells and to early neural crest cells. *Eur J Neurosci* 1997;9:452-62.
- 38) Guidi AJ, Berry DA, Broadwater G, et al. Association of angiogenesis and disease outcome in node-positive breast cancer patients treated with adjuvant cyclophosphamide, doxorubicin, and fluorouracil: A Cancer and Leukemia Group B correlative science study from protocols 8541/8869. *J Clin Oncol* 2002;20:732-42.
- 39) Tomita M, Matsuzaki Y, Edogawa M, et al. Correlation between tumor angiogenesis and invasiveness in thymic epithelial tumors. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;124:493-8.
- 40) Denkler Y, Koren R, Kugel V, et al. Significance of angiogenesis and microvascular invasion in renal cell carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2002;8:129-32.
- 41) Ikeda H, Hirato J, Akami M, et al. Massive apoptosis detected by in situ DNA Nick end labeling in neuroblastoma. *Am J Surg Pathol* 1996;20:649-55.
- 42) Cohn S, Chlenski A, Crawford SE, et al. Schwannian stroma plays an important role in the regulation of neuroblastoma angiogenesis. *Med Pediatr Oncol* 2002;39:230.
- 43) Davidoff AM, Leary MA, Ng CY, et al. Gene therapy-mediated expression by tumor cells of the angiogenesis inhibitor flk-1 results in inhibition of neuroblastoma growth in vivo. *J Pediatr Surg* 2001;36:30-6.