

▶ 図2 直腸の部位とがんの治療戦略

除術), 場合により外肛門括約筋の一部の切除を追加することで肛門の温存が可能となった。つまり、現在、肛門温存ができない直腸がんは、外肛門括約筋に明らかに浸潤しているがんのみで、ほとんどの直腸がんが肛門温存が可能である。ただし、この内肛門括約筋切除術の問題は、①近年になって直腸がんに応用された手術で、まだ長期的な治療成績が不明であるため、現在、国内の専門施設で臨床試験中であること、②肛門括約筋を部分的にせよ切除するわけであるので肛門機能が低下すること、である。ほとんどの患者は肛門温存を希望するので、以上の2点を十分説明し、インフォームド・コンセントを得てから手術に臨まなければならない。また高齢者であったり、肛門機能が低下している場合には、むしろ人工肛門のほうがQOLが良いので、そのことも説明する必要がある。

直腸の両脇に排尿、性機能を司る下腹神経ならびに骨盤神経叢が存在するために、直腸の手術では常に問題となる。拡大手術が主流の時代には、かなりの頻度でこれらの神経の切除を行っていたため、多数例で排尿障害、性機能障害が生じた。しかし、その反省から、現在では、自律神経を温存する手術が主流となり、これらの障害は大幅に減少した。自律神経を完全に温存した場合には、一過性の排尿障害が生ずる可能性はあるが、永続する障害はほとんど生じていない。性機能は神経だけの問題ではないため10%程度の症例に障害が生じることがある。がんの進行程度によっては、自律神経を切除しなくてはならない症例もあるが、神経は両側にあるため、片方の一部でも残していれば、性機能の完全な温存は困難であるが、排尿機能に関しては保

たれていることが多い。

直腸がんにおいては、結腸がんとは異なり、術前、術後に補助療法として放射線療法を行うことがある。この補助療法は、すでに世界的に広く行われている治療法であるが、わが国では局所再発率が低く直腸がんの治療成績が良いため、あまり普及していない。ただし、今後の臨床試験の結果で変化して行く可能性はある。また、直腸の粘膜下層がんで追加の切除が必要となった場合、結腸の追加手術と異なり、人工肛門となる可能性がある上、術前よりも排便機能は低下する。このため追加切除を拒否した場合に、放射線化学療法を加えて切除の代わりとする方法もある。しかしながら手術と同等の成績がどうか不明のため、患者にはそのことを十分説明し、インフォームド・コンセントを得なければならない。

肛門管がんのなかに、扁平上皮がんと呼ばれる通常の大腸がんとは異なる組織のがんがあり、このがんは、これまで述べてきた直腸がんの治療法とは大きくことなり、診断がついた後は、放射線化学療法が第1選択の治療となる。この治療だけで消失してしまうものもあるが、この治療の後、腫瘍が残存していれば、外科的切除を考える。

## 大腸がんガイドラインと臨床試験

現在、胃がん、食道がん、肺がん、乳がん、卵巣がんにおいて学会あるいは研究会レベルでガイドラインが作成され公表されているが、大腸がんでは、大腸がん研究会の委

▼表 1 臨床的根拠レベル

レベル	臨床的根拠の源
I	少なくとも1つの大規模ランダム化比較試験 複数のランダム化比較試験を統合して解析したもの (メタアナリシス)
II	小規模ランダム化比較試験
III	ランダム化されていない比較試験 比較研究以外の良くデザインされた臨床試験
IV	過去の症例のまとめ、観察研究
V	ケースレポート、専門家の経験

員会で検討中の段階である。ガイドラインの作成の目的は、現時点における最善の治療法を示し、どこの病院、どの医師でも根拠に基づいた医療(EBM)を容易に行えるようにし、ひいては患者の安全、治療成績の向上を目指すものである。したがって、最善と考えられる治療が複数あるのであれば、すべて列挙し、さらにその治療がどの程度の根拠に基づいているのかを示すのが望ましい(表1)。なぜならば、現段階では、最善の治療といっても、確固とした根拠に基づく治療もあれば、根拠の希薄なものまでであるため、治療の根拠レベルを示すことで、治療選択上の目安となるからである。

医学に必要な根拠のなかでもヒトを対象として得られる根拠を得る手段が、臨床試験である。臨床試験は、その目的に応じて、第I相試験、第II相試験、第III相試験がある。第I相試験は、新規治療の毒性や危険性を確認する試験で、有効性の評価は付随的なものである。第II相試験は、新規治療の有効性を短期で評価するもので、それを次の第III相試験で標準治療との比較検討しうる治療なのかを決める試験である。第III相試験は、これまでにある標準治療と比較して、どちらがより有効であるかを決める試験である。このため、第I相、第II相試験は、その試験の性格上、専門病院のなかで行われるもので、一般病院には、あまりなじみのないものである。しかし、第III相試験は、多数症例の登録がなければ、治療法の優劣の決定ができないため、一定レベル以上の一般病院の参加が必要となる。したがって、一般病院で経験する臨床試験は、第III相試験であると思っ

てまず間違いない。  
現在、本邦で大腸がんに関する臨床試験で最大規模のものは、JCOGのなかの大腸がん外科研究グループが行って

いるもので、全国47施設が参加し、

(1) Stage III大腸がんの補助化学療法の5FUとロイコポリンの静注療法と経口の5FU製剤(UFT<sup>®</sup>)と経口のロイコポリン製剤(ユーゼル<sup>®</sup>)の比較試験

(2) Stage II, IIIの下部進行直腸がんに対する骨盤内リンパ節郭清の必要性を検討する試験

(3) 進行がんに対する腹腔鏡下手術と開腹手術との治療成績の比較試験

以上の3つを行っており、いずれも第III相試験である。今年中には、大腸がん肝転移切除後の補助化学療法の有効性を検討する試験が開始される予定である。

このような臨床試験が行われているということは、試験中の項目は、まだ十分な臨床的な根拠がないということであり、たとえば、進行がんに対して腹腔鏡下手術で行う場合には、腹腔鏡手術が開腹術と同等の治療成績が得られるかどうかは不明であり、現在臨床試験で検討中であることを患者に説明し、インフォームド・コンセントを得たあと行われるべきものである。しかしながら、そのような配慮がなされていない場合が多数みられ、日本のがん治療の問題の1つである。その意味では、単に医療従事者のガイドラインを作成するだけでなく、患者あるいはその家族が容易に理解できる治療ガイドラインも作成し、広く公開することは、安全で有効な治療を行う上で大変重要なことであり、大腸がん治療ガイドラインの早急な完成が待たれる。

## おわりに

現在の大腸がんの治療戦略の概略を述べたが、この10年では、腹腔鏡手術の導入、内肛門括約筋切除による肛門温存手術、新規抗がん剤による治療成績の向上が大きな変化である。しばらく前まで、医師の個人的な経験(表1のレベルV)で治療戦略がつくられていたが、現在は臨床試験(表1のレベルI, II, III)で治療戦略がつくられる時代となった。最善の医療を提供するために、いまある治療を安全、確実に行うとともに、臨床試験の結果にも注目してほしい。

●EBM：根拠に基づいた医療 evidence based medicine

●JCOG：日本臨床腫瘍研究グループ Japan Clinical Oncology Group

## 外科治療

## 側方郭清

## —— 予防的側方郭清と治療的側方郭清 ——

*Lateral pelvic lymph node dissection : Prophylactic dissection and therapeutic dissection*

藤田 伸 山本聖一郎 赤須 孝之 森谷 宜皓

Shin Fujita, Seiichiro Yamamoto, Takayuki Akasu and Yoshihiro Moriya

■国立がんセンター中央病院外科

key words : 側方郭清, 直腸癌, 閉鎖リンパ節, 自律神経

## はじめに

本邦では中・下部進行直腸癌に対して、側方郭清を行うことが標準術式と考えられてはいるものの、その適応、手術手技、郭清範囲に関しては、未だ完全なコンセンサスは得られていない。また、明らかな側方転移を認めない症例においての、自律神経を原則温存した側方郭清（予防的側方郭清）と、側方転移が疑われる、あるいは明らかな症例においての、自律神経を原則全切除し、必要であれば内腸骨血管も合併切除する側方郭清（治療的側方郭清）とでは、その手技、意義が当然異なる。本稿では、それぞれの手技、意義について考察してみたい。

## 側方郭清の適応

腫瘍占居部位に関しては、側方転移率の検討から占居部位がRa以下、またRaであっても腫瘍の下縁が腹膜臓転部以下にあるものを側方郭清の適応としている施設が多い。深達度に関しては、MP以深とする施設もあればA<sub>1</sub>以深とする施設もあるが、われわれは腫瘍の下縁が腹膜臓転部以下にあり、臨床病期がⅡまたはⅢであるものを適応としている。大腸癌研究会の「直腸癌に対する側方郭清の適応基準に関するプロジェクト研究」では、腫瘍下縁が腹膜臓転部より肛門側にあるA<sub>1</sub>以深の直腸癌を適応とすることを推奨している<sup>1)</sup>。ただし、これらの適応は、あくまでも予防的な側方郭清の適応であって、明らかな側方転移が認められるのであればこの限りではない。まれではあるが、Rsの腫瘍やSM癌でも明らかな側方転移を示す

消化器外科, 28:799-805, 2005<sup>2)</sup>

症例もあり、このような症例は治療切除が可能と判断されれば、治療的側方郭清の適応である。

## 側方転移の診断

側方転移の有無により、予防的側方郭清か治療的側方郭清かに分かれるため、側方転移の術前・術中診断は重要である。側方転移の診断には、thin slice CTとMRIが有用であるが、側方郭清症例においてthin slice CTで6mm以上のリンパ節を転移陽性として検討したところ、感度50%、特異度95%、陽性的中率70%、陰性的中率85%、正診率85%であった。これはリンパ節サイズによる画像診断の限界を示しており、文献的にも同様の結果が示されている<sup>2)3)</sup>。ただし、MRIでリンパ節の辺縁不整像や信号強度の不均一をリンパ節転移の所見とすると、感度85%、特異度97%とかなりよい結果が報告されてはいる<sup>2)</sup>。しかしながら、まだ追試が必要な段階であり、現時点では、画像だけでなく術中の所見も加味し、必要に応じて側方リンパ節の迅速診断も行い、予防的側方郭清か治療的側方郭清かを決定することが望まれる。

## 予防的側方郭清（自律神経温存側方郭清）

側方転移が明らかでない症例に対して、原則的に自律神経温存側方郭清を行う。その際の側方郭清の範囲であるが、大腸癌取扱い規約により、262, 272, 273, 282番リンパ節を郭清する。その他の280, 293番リンパ節は、必ずしも郭清する必要はない。

詳細は他稿に委ねるが、側方郭清の前にまずTME (total mesorectal excision)<sup>4)</sup>またはME (mesorectal

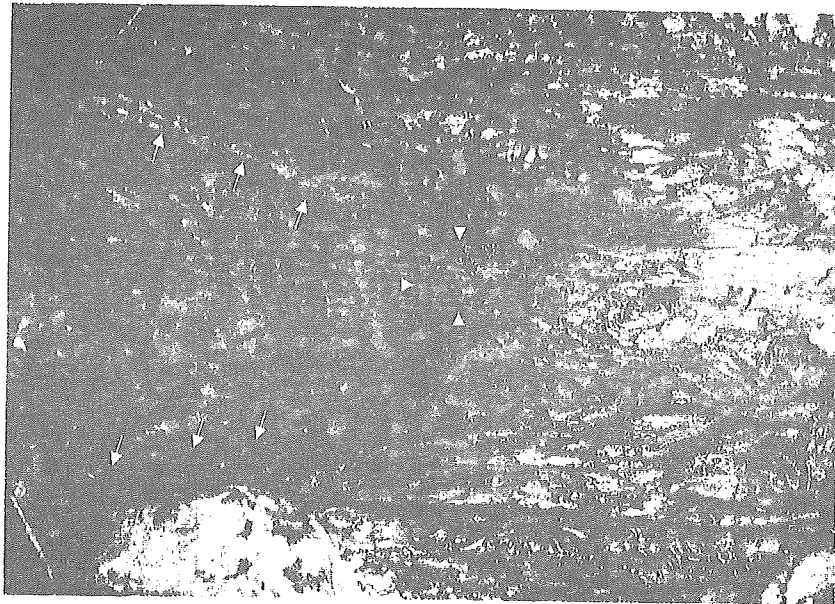


図1 温存された自律神経  
矢が左右の下腹神経。矢頭が下腹神経叢

excision) を行い、直腸切除後に側方郭清に入る。ME とは、全直腸間膜を切除するのではなく、腫瘍下縁から 4 cm までの直腸間膜を切除するものをいう<sup>5)</sup>。tumor-specific mesorectal excision とよばれる<sup>6)</sup>。これは、これまでの研究で腫瘍下縁から 4 cm 以上癌が進展することがほとんどないことによる<sup>4)7)-9)</sup>。

直腸を剝離、切除する段階で腰内臓神経、下腹神経叢、左右の下腹神経、骨盤神経叢は確認できているので、まず、下腹神経叢、左右の下腹神経にテーピングして、自律神経の走行がわかるようにしておく(図1)。ついで、尿管をテーピングして側方郭清を開始する。

まず腹部大動脈の分岐部より総腸骨動静脈の腹側面と尾側面を露出、確認しながら郭清する(273番郭清)。この郭清は、血管の直上の層に入れば、ほとんど出血しないので、クーパー、メッチェン剪刀でも、電気メスでもよい。総腸骨動静脈から内・外腸骨動静脈への分岐部まできたら、内腸骨動静脈に移り、その内側、腹側、外側の郭清を上膀胱動脈が分岐するところまで行う(272番郭清)。ここで上膀胱動脈をテーピングしておく。ここまできると、腹膜がじゃまとなってくるので、腹膜を外腸骨血管に沿って尾側に切開すると、視野が展開される。外腸骨動静脈をそれぞれテーピングし、外側に展開し、内外腸骨血管の分岐部から外側の郭清を行うと内閉鎖筋が確認でき、それに沿って下方に郭清を進めると、閉鎖神経が確認できる。この周囲で電気メスを使用すると、大腿内転筋群の収縮が起るので、電気メスで郭清を行う際には、閉鎖神経に27G 針で直接局麻剤を注入すると郭清が容易となる。

閉鎖神経が大腰筋の下方から出現するところを側方郭清の上限として、内閉鎖筋に沿って、閉鎖腔外側の郭清を行う。ここは、腹腔側からアプローチすると腹膜を外腸骨血管に沿って切り上げていく必要があり、視野展開が難しくなることもあるので、膀胱側腔を開放して腹膜外からアプローチするのも一つの方法であり、そのようにしている施設も多い。内閉鎖筋に沿って外側から尾側に郭清を進めていくと、閉鎖神経の末梢側が確認され、その周囲に閉鎖動静脈が確認できる。これらの血管は、郭清のじゃまには必ずしもならないが、じゃまになるようであれば結紮切離してもよい。ここまできたら、膀胱下腹筋膜(内腸骨動脈、上膀胱動脈から膀胱外側に連なる筋膜)に沿って郭清を進めると、最終的に閉鎖神経周囲にこれまで郭清してきた脂肪織が集まるので、神経を確認しながら脂肪織を切離すると、側方の脂肪織が一塊として切離できる(282番郭清)。最後に、骨盤神経叢を損傷しないように内腸骨血管内側の郭清を進め、中直腸動脈があれば結紮切離する。このまま下方に進むと、下膀胱動脈が確認できるので、その周囲を郭清し、郭清が困難であれば結紮切離する。下膀胱動脈より末梢で Alcock 管となるので、ここで内腸骨血管内側、尾側の郭清は終了となる(262番郭清)。

摘出された側方脂肪織を図2に示す。この組織を触診して転移が疑われるようであれば、迅速病理に提出して転移の有無の確認をし、もし転移があるのであれば次に述べる治療的側方郭清に切り替える。郭清終了時の状態を図3、4に示す。

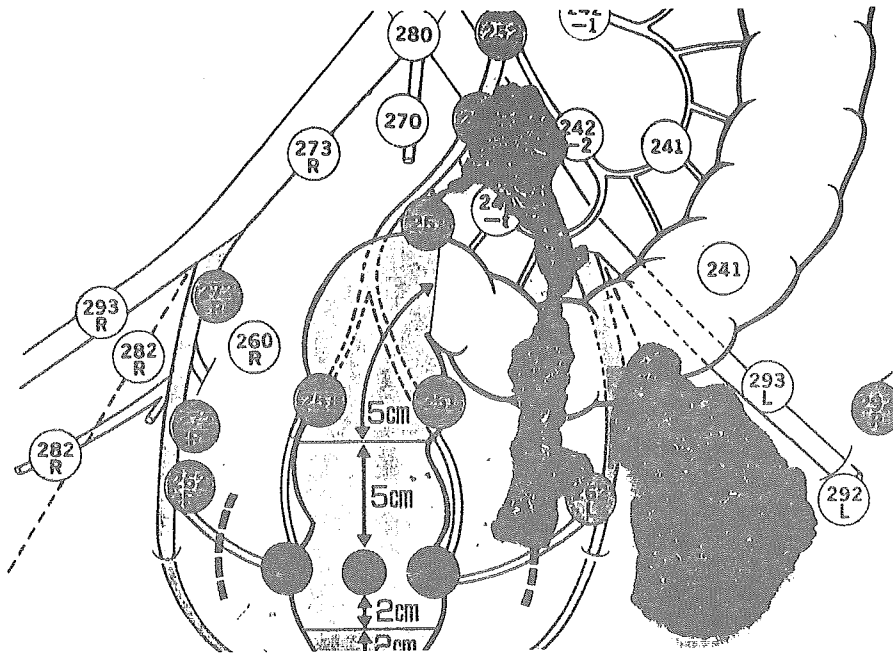


図2 郭清された側方脂肪織

リンパ節番号に該当する場所に郭清した脂肪織を配置している。きっちり  
りと郭清すれば、だいたいこの程度の組織が摘出されるはずである

閉鎖腔はその外側縁、尾側縁は内閉鎖筋、内側縁は膀胱下腹筋膜、背側は坐骨神経、梨状筋で囲まれたコンパートメントで、この真ん中を貫くように閉鎖神経が存在すると認識して手術を行うと理解しやすい。閉鎖脂肪織は本来一塊の脂肪織であるので、その真ん中を貫く閉鎖神経周囲の郭清を先に行くと脂肪織がくずれ、周囲組織との境界がわかりにくくなるので、閉鎖神経を確認してテーピングした後は、閉鎖神経周囲の郭清を最後にするのが脂肪織を一塊として切除するコツである。

自律神経周囲の郭清をどこまで行うかは問題であるが、予防的郭清においては、機能の温存を重視して自律神経周囲の剥離は最低限にとどめている。図3でも自律神経周囲組織が比較的残存しているのがわかるかと思う。このような自律神経温存により、排尿機能はほぼ完全に温存できている<sup>10)</sup>。

### 治療的側方郭清（自律神経非温存側方郭清）

側方転移が疑われる、もしくは明らかな場合には、自律神経の温存はすべきでなく、下腹神経叢から下腹神経、骨盤神経叢まで切除し、場合により内腸骨血管も切除して、郭清の徹底を図る。

自律神経温存術と異なり、262、272、273、282番リンパ節のみならず、280、293番リンパ節も郭清する。また予防的側方郭清と異なり、直腸を切離する際に、

すでに下腹神経叢、左右の下腹神経を切除しながら骨盤神経叢のレベルまで剥離を進める。この層で剥離を行うと、骨盤神経叢をいわゆる側方靭帯として認識される。したがって、もし神経温存しているつもりで側方靭帯と思われる組織を認識した場合には、自律神経を切除する層で入っていることを示している。骨盤神経をどこまで切除するかで、当然、骨盤神経叢の温存程度が異なる。治療的郭清では原則温存しないので、骨盤神経叢に仙骨神経から背側から入ってくる骨盤内臓神経S2、S3、S4（もっともはっきり認識できるのはS3）を確認して、仙骨神経からの起始部ですべて切除する。部分温存する場合は、S3の部分切除か、S3を全切除して、そのレベルで骨盤神経叢を切離、横断すると、神経叢の内側の層に容易に入るため、そこから剥離を進めれば、残りの骨盤神経叢は容易に温存できる。骨盤神経叢を全切除する場合には、側方靭帯の外側、すなわち内腸骨血管の内側から切除することになるので、272番、262番の郭清を行いながら行うほうがよい。このようにして自律神経を切除しつつ直腸の剥離が終了したら、直腸を切離した後、残りの郭清を行う。

まず腹部大動静脈分岐部から尾側に郭清を進めて、280番の郭清を行う。血管直上で剥離すれば、郭清は容易である。仙骨前面部では正中仙骨動静脈があるので、これを損傷しないように注意する。必要であればこの周囲も郭清（270番郭清）するが、実際にはほと



図3 予防的側方郭清

内腸骨血管周囲から閉鎖腔にかけての郭清状況。真ん中に温存された自律神経（下腹神経叢と下腹神経）がみえる

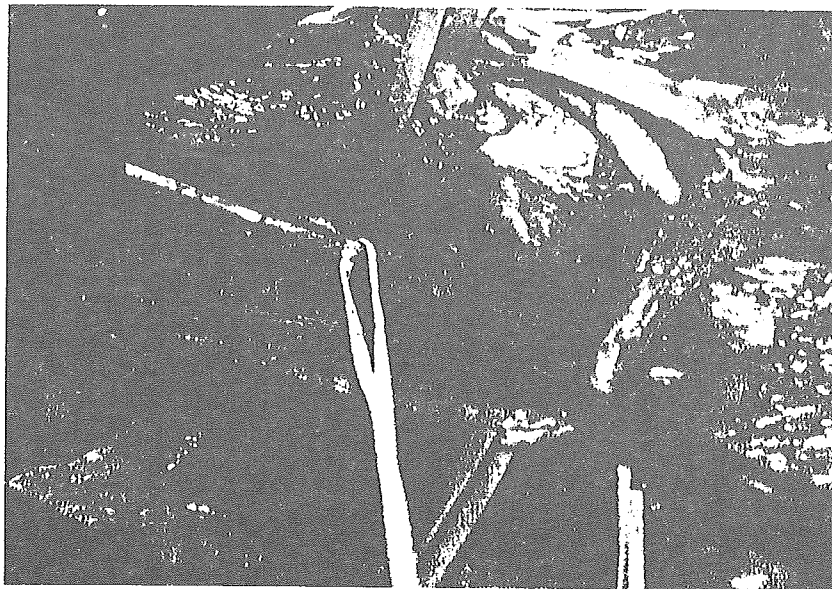


図4 予防的側方郭清

閉鎖腔の郭清状況。左上に黄色テープで牽引されている閉鎖神経がみえる

んど脂肪織はない。引き続き総腸骨血管の郭清を行うと、内外腸骨動脈、静脈の分岐をきれいに確認できる。ついで外腸骨血管の郭清に移り、血管をテーピングしながら、鼠径部近くまで郭清する（293番郭清）。ここからは、神経温存の項で行った方法と同様である。必要であれば内腸骨血管を合併切除をしながら側方郭清を行うと、骨盤側壁は空虚な空間として残るのみで、完全な郭清が可能となる（図5、6）。内腸骨血管の切

除は、上膀胱動脈を温存する場合とそうでない場合があり、血管が Alcock 管に入るところまでを切除している。ただし、内腸骨血管壁側枝の上殿、下殿動静脈を温存して、臓側枝の上膀胱、下膀胱、中直腸、子宮動静脈を切除しても十分な郭清が可能である。図5、6はいずれもそのような切除をしている。治療的郭清を両側に行うと排尿機能は根絶してしまうので、対側の骨盤神経叢は、側方転移が認められなければ完全あ

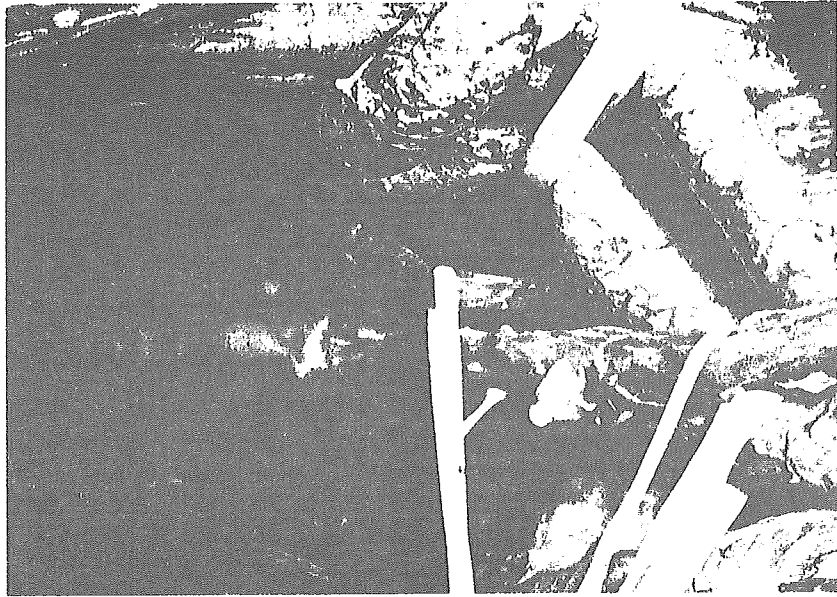


図5 治療的側方郭清

真ん中に温存された閉鎖神経があり，周囲に郭清された外腸骨血管と内腸骨動脈の一部がみえる。その向こうに郭清により空虚となった骨盤側壁がみえる

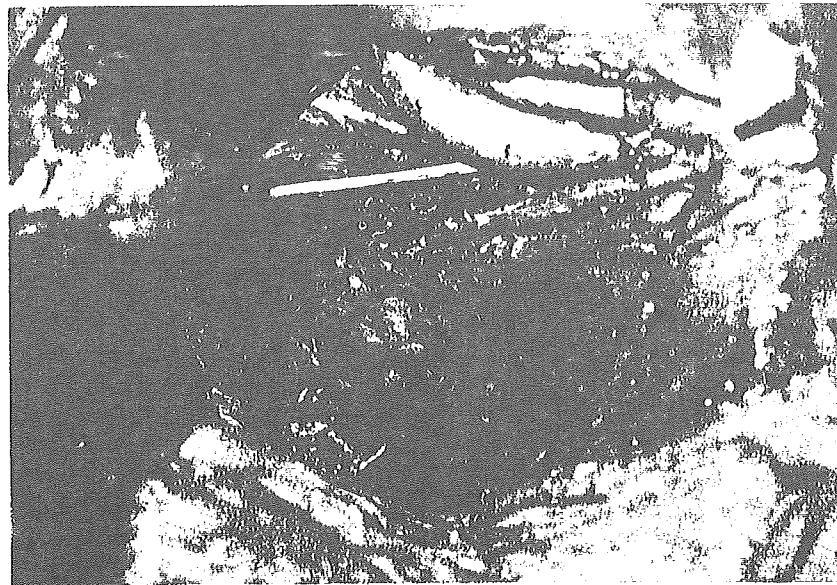


図6 治療的側方郭清

内腸骨血管の臓側枝をすべて切離した郭清状況。白くみえるのが閉鎖神経。骨盤側壁は空虚な空間のみとなっている。この症例は左の自律神経を温存している

るいは部分温存して排尿機能の温存に努める。図5，6の症例も対側の骨盤神経叢は全温存した結果，術後一時期自己導尿を要したが，すぐに回復している。

### 側方郭清の意義

側方転移例の5年生存率は当院の成績を含め，各施設からの報告では30～40%である<sup>11)~14)</sup>。これは肝転

移切除や肺転移切除例の5年生存率の30～40%とほぼ同等であることから，総リンパ節転移個数や側方転移個数にもよるが，治療的側方郭清の意義は十分あると考えられる。2000年に作成されたGuidelines 2000 for Colon and Rectal Cancer Surgery<sup>5)</sup>においても，側方郭清に関しては明らかなリンパ節転移のないものには郭清を推奨する根拠は乏しいが，臨床的に側方リンパ節転移が疑われる場合には，切除可能と判断するなら

表1 側方郭清の局所再発率

	対象期間	対象症例	症例数	stage	局所再発率
国立がんセンター中央病院 <sup>11)</sup>	1980~1994	腹膜臓転部 または以下	448	I 88, II 142	9.4% (全例)
				III 218	3.4% (stage II)
					2.8% (stage II)
					16.1% (stage III)
都立駒込病院 <sup>12)</sup>	1975~1996	腹膜臓転部 以下	157	III 157	7.4%
癌研究会附属病院 <sup>13)</sup>	1975~1995	記載なし	764	I, II 425	7.8% (全例)
				III 339	1.9% (stage I, II) 15.3% (stage III)
弘前大学 <sup>14)</sup>	1988~2000	中・下部直腸	212	記載なし	6.3%

表2 TMEの局所再発率

	対象期間	対象症例	症例数	stage	局所再発率
The North Hampshire Hospital, UK <sup>15)</sup>	1978~1998	AV15cm まで	519	I 102	6% (全例)
				II 167	3% (治癒切除例)
				III 142	
				IV 108	
Memorial Sloan-Kettering Cancer Center and Beth Israel Medical Center, USA <sup>16)</sup>	1979~1998	AV12cm まで	544	I 162	5.2% (全例)
				II 114	2.4% (stage I)
				III 170	2.5% (stage II)
					10.5% (stage III)
Cleveland Clinic Foundation, USA <sup>17)</sup>	1980~1990	AV15cm まで (下部 AV8cm まで)	666	I 223	2.8% (上部)
				II 201	8.6% (下部)
				III 221	
				IV 21	
Mayo Clinic, USA <sup>18)</sup>	1982~1989	AV15cm まで	514	I 272	7% (全例)
				II 111	4% (stage I)
				III 63	9% (stage II)
				IV 68	10% (stage III)

ば郭清を試みるべきであるという評価となっている。

Guidelines 2000 for Colon and Rectal Cancer Surgery では推奨されていない予防的側方郭清であるが、本邦の代表施設の治療成績を表1に示す<sup>11)~14)</sup>。ただし、これは治療的側方郭清例も含む結果であることに注意しなくてはならない。いずれも中・下部進行直腸癌で数%の局所再発率で、TME導入以前の欧米の局所再発率が20~30%であることからすれば、明らかな局所制御効果が認められる。一方、イギリスとアメリカの代表施設のTMEの局所再発率を表2に示す<sup>15)~17)</sup>。上部直腸癌も含まれ、明らかな側方転移例は除外されているため、直接比較することは困難ではあるが、Cleveland Clinicの下部直腸癌の成績は、側方郭清の成績と遜色ないものであることと、術前・術中所見では側方転移が不明で側方郭清してはじめてわかるよう

な側方転移例は、TME例のなかに当然含まれていることから考えると、TMEは局所制御に関しては側方郭清と遜色のない結果を示しており、文献的には予防的側方郭清の意義は不明である。実際、臨床病期II、IIIの下部直腸癌で側方郭清を行った症例と行わなかった症例の検討でも、リンパ節転移が少ない症例において側方郭清の有用性が示唆されたのみであった<sup>18)</sup>。このため、予防的側方郭清が意義あるものかどうかを明らかにする目的で、JCOG (Japan clinical oncology group) 大腸がん外科研究グループ (47施設) で、腹膜臓転部以下の臨床病期II、IIIの進行直腸癌を対象として、MEを行った後、予防的側方郭清を行う群と行わない群に分け、その無再発生存期間を比較する臨床試験が、2003年6月から登録を開始され、現在まで120例が登録がされている。参加施設、研究の概要につい



では、JCOG ホームページ (<http://www.jcog.jp/>) で公開されているので参照してほしい。結果がでるのは10年先の話ではあるが、これまで長い間論争されてきた予防的側方郭清の意義について、一つの結論を示す重要な試験であり、この成果を期待していただきたい。

#### 【文 献】

- 1) 安野正道, 竹下恵美子, 杉原健一: 側方リンパ節郭清と非郭清の遠隔成績とその問題点; 直腸癌に対する側方郭清の適応と効果. 大腸癌研究会直腸癌に対する側方郭清の適応基準に関するプロジェクト研究 (会議録). 日本大腸肛門病学会誌, 57: 506, 2004.
- 2) Brown, G., Richards, C. J., Bourne, M. W., et al.: Morphologic predictors of lymph node status in rectal cancer with use of high-spatial-resolution MR imaging with histopathologic comparison. *Radiology*, 227: 371-377, 2003.
- 3) Branagan, G., Chave, H., Fuller, C., et al.: Can magnetic resonance imaging predict circumferential margins and TNM stage in rectal cancer? *Dis. Colon Rectum*, 47: 1317-1322, 2004.
- 4) Heald, R. J., Husband, E. M. and Ryall, R. D.: The mesorectum in rectal cancer surgery: The clue to pelvic recurrence? *Br. J. Surg.*, 69: 613-616, 1982.
- 5) Nelson, H., Petrelli, N., Carlin, A., et al.: Guidelines 2000 for colon and rectal cancer surgery. *J. Natl. Cancer Inst.*, 93: 583-596, 2001.
- 6) Zaheer, S., Pemberton, J. H., Farouk, R., et al.: Surgical treatment of adenocarcinoma of the rectum. *Ann. Surg.*, 227: 800-811, 1998.
- 7) Scott, N., Jackson, P., al-Jaberi, T., et al.: Total mesorectal excision and local recurrence: A study of tumour spread in the mesorectum distal to rectal cancer. *Br. J. Surg.*, 82: 1031-1033, 1995.
- 8) Reynolds, J. V., Joyce, W. P., Dolan, J., et al.: Pathological evidence in support of total mesorectal excision in the management of rectal cancer. *Br. J. Surg.*, 83: 1112-1115, 1996.
- 9) Hida, J., Yasutomi, M., Maruyama, T., et al.: Lymph node metastases detected in the mesorectum distal to carcinoma of the rectum by the clearing method: Justification of total mesorectal excision. *J. Am. Coll. Surg.*, 184: 584-588, 1997.
- 10) Moriya, Y., Sugihara, K., Akasu, T., et al.: Nerve-sparing surgery with lateral node dissection for advanced lower rectal cancer. *Eur. J. Cancer*, 31A: 1229-1232, 1995.
- 11) Moriya, Y., Sugihara, K., Akasu, T., et al.: Importance of extended lymphadenectomy with lateral node dissection for advanced lower rectal cancer. *World J. Surg.*, 21: 728-732, 1997.
- 12) Mori, T., Takahashi, K. and Yasuno, M.: Radical resection with autonomic nerve preservation and lymph node dissection techniques in lower rectal cancer surgery and its results: The impact of lateral lymph node dissection. *Langenbecks Arch. Surg.*, 383: 409-415, 1998.
- 13) Takahashi, T., Ueno, M., Azekura, K., et al.: Lateral node dissection and total mesorectal excision for rectal cancer. *Dis. Colon Rectum*, 43: S59-S68, 2000.
- 14) Morita, T., Murata, A., Koyama, M., et al.: Current status of autonomic nerve-preserving surgery for mid and lower rectal cancers: Japanese experience with lateral node dissection. *Dis. Colon Rectum*, 46: S78-S87, 2003.
- 15) Heald, R. J., Moran, B. J., Ryall, R. D., et al.: Rectal cancer: The Basingstoke experience of total mesorectal excision, 1978-1997. *Arch. Surg.*, 133: 894-899, 1998.
- 16) Murty, M., Enker, W. E. and Martz, J.: Current status of total mesorectal excision and autonomic nerve preservation in rectal cancer. *Semin. Surg. Oncol.*, 19: 321-328, 2000.
- 17) Lopez-Kostner, F., Lavery, I. C., Hool, G. R., et al.: Total mesorectal excision is not necessary for cancers of the upper rectum. *Surgery*, 24: 612-617, 1998.
- 18) Fujita, S., Yamamoto, S., Akasu, T., et al.: Lateral pelvic lymph node dissection for advanced lower rectal cancer. *Br. J. Surg.*, 90: 1580-1585, 2003.

# 消化器外科 9

好評発売中!

定価 2,100円(税込)

VOL.26, NO.10, 2003

特集・手術助手のすべて; 経験が無駄にしないコツ, 役割, 配慮

This Provisional PDF corresponds to the article as it appeared upon acceptance. The fully-formatted PDF version will become available shortly after the date of publication, from the URL listed below.

## **JTE-522, a selective COX-2 inhibitor, inhibits growth of pulmonary metastases of colorectal cancer in rats.**

*BMC Cancer* 2005, 5:26 doi:10.1186/1471-2407-5-26

Hirotooshi Kobayashi ([koba@ndmc.ac.jp](mailto:koba@ndmc.ac.jp))  
Hiroyuki Uetake ([h-uetake.srg2@tmd.ac.jp](mailto:h-uetake.srg2@tmd.ac.jp))  
Tetsuro Higuchi ([t-higuchi.srg2@tmd.ac.jp](mailto:t-higuchi.srg2@tmd.ac.jp))  
Masayuki Enomoto ([m-enomoto.srg2@tmd.ac.jp](mailto:m-enomoto.srg2@tmd.ac.jp))  
Kenichi Sugihara ([k-sugi.srg2@tmd.ac.jp](mailto:k-sugi.srg2@tmd.ac.jp))

ISSN 1471-2407

**Article type** Research article

**Submission date** 7 Sep 2004

**Acceptance date** 3 Mar 2005

**Publication date** 3 Mar 2005

**Article URL** <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/5/26>

Like all articles in BMC journals, this peer-reviewed article was published immediately upon acceptance. It can be downloaded, printed and distributed freely for any purposes (see copyright notice below).

Articles in BMC journals are listed in PubMed and archived at PubMed Central.

For information about publishing your research in BMC journals or any BioMed Central journal, go to

<http://www.biomedcentral.com/info/authors/>

## **JTE-522, a selective COX-2 inhibitor, inhibits growth of pulmonary metastases of colorectal cancer in rats.**

Hirotoishi Kobayashi, Hiroyuki Uetake, Tetsuro Higuchi, Masayuki Enomoto,  
Kenichi Sugihara

Department of Surgical Oncology, Graduate School, Tokyo Medical and Dental  
University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan

Email addresses:

HK: [koba@ndmc.ac.jp](mailto:koba@ndmc.ac.jp)

HU: [h-uetake.srg2@tmd.ac.jp](mailto:h-uetake.srg2@tmd.ac.jp)

TH: [t-higuchi.srg2@tmd.ac.jp](mailto:t-higuchi.srg2@tmd.ac.jp)

ME: [m-enomato.srg2@tmd.ac.jp](mailto:m-enomato.srg2@tmd.ac.jp)

KS: [k-sugi.srg2@tmd.ac.jp](mailto:k-sugi.srg2@tmd.ac.jp)

Correspondence to: Hirotoishi Kobayashi, Department of Surgical Oncology,  
Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-  
ku, Tokyo 113-8519, Japan.

E-mail: [koba@mc.ndmc.ac.jp](mailto:koba@mc.ndmc.ac.jp)

Tel: +81-4-2995-1637, Fax: +81-4-2996-5205

## Abstract

### Background

Epidemiological studies have shown that individuals who regularly consume NSAIDs have lower rates of mortality associated with colorectal cancer. Because COX-2 inhibitors prevent tumor growth through some mechanisms, we assessed the effect of JTE-522, a selective COX-2 inhibitor, on pulmonary metastases of colon cancer in a rat model.

### Methods

A suspension of  $5 \times 10^6$  RCN-9 (rat colon cancer cells) was injected into the tail vein of 24 anesthetized male F344/DuCrj rats. Oral JTE-522 (0, 3, 10, or 30 mg/kg/day) was administered from the day before RCN-9 injection until the end of the study. Twenty-four days later, the lungs were removed from sacrificed rats and weighed. Pulmonary metastatic tumors were microscopically evaluated in the largest cross sections. We also performed immunohistochemical staining for both COX-2 and VEGF.

### Results

JTE-522 dose-dependently decreased lung weight ( $p = 0.001$ ) and the size of pulmonary metastatic tumors ( $p = 0.0002$ ). However, the differences in the number of metastatic tumors among 4 groups were insignificant. Significant adverse effects of JTE-522 were undetectable. Immunohistochemical staining showed high levels of both COX-2 and VEGF in pulmonary metastatic tumors.

### Conclusions

JTE-522 dose-dependently decreased the size, but not the number of pulmonary metastases. COX-2 inhibitors might block metastatic tumor growth, but not actual metastasis. Selective COX-2 inhibitors might be useful as therapeutic agents that inhibit the growth of metastatic tumors, as well as the tumorigenesis of colorectal cancer.

## Background

Colorectal cancer is a widespread fatal malignancy in the West [1] and its incidence in Japan is increasing [2]. Epidemiological studies have shown that regular doses of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are associated with lower rates of colorectal polyps, colorectal cancer, and colorectal cancer-associated mortality. Waddell and Loughry initially reported that sulindac decreased the number of polyps in patients with familial adenomatous polyposis (FAP) [3]. The largest study of aspirin and colon cancer was undertaken by Thun *et al.* in 1991 [4]. They found that colon cancer mortality decreased among those who used aspirin, and that the protective effect was increased by increasing doses. NSAIDs inhibit prostaglandin production mainly by inhibiting cyclooxygenase (COX) that is expressed as COX-1 and COX-2 isoforms. Cox is a key enzyme, which converts arachidonic acid to prostaglandins. COX-1 is constitutively expressed in most tissues and is thought to be responsible for homeostatic functions. On the other hand, COX-2 expression is induced by various factors including cytokines, growth factors, and

tumor promoters [5, 6]. Many studies have indicated that COX-2 expression is associated with both the carcinogenesis and growth of colon cancer. COX-2 is overexpressed in 85% of human colorectal cancers [7]. Oshima *et al.* disclosed that COX-2 gene knockouts and a COX-2 inhibitor decreased the number of polyps of *apc* $\Delta$ 716 knockout mice [8]. In addition, several studies have shown that the selective inhibition of COX-2 reduces colorectal tumorigenesis in various models of carcinogenesis. Reddy *et al.* found that the COX-2 inhibitor, SC-58635 (celecoxib), significantly suppressed colonic aberrant crypt foci and crypt multiplicity in rats [9]. This supports the hypothesis that COX-2 inhibitors are chemopreventive. Kawamori *et al.* showed that celecoxib inhibited both the incidence and multiplicity of colon tumors in a rat model [10], and another study showed that COX-2 expression in colon cancer cells increased metastatic potential [11]. We reported that increased COX-2 levels in human colorectal carcinomas correlated with both the size and invasiveness of tumors [12]. Tomozawa *et al.* demonstrated a correlation between COX-2 overexpression and the recurrence of colorectal cancer [13].

It is well known that colorectal metastasis occurs primarily in the liver and secondarily in the lung [14]. A laparotomy is necessary for making experimental model of liver metastasis in rats, but it is also a stressful event. On the other hand, it is less invasive to make lung metastasis by injection of tumor cells into the tail vein of rats. Thus, we considered that the experimental model of pulmonary metastasis was appropriate for the evaluation of the real effect of JTE-522, a selective COX-2 inhibitor, on hematogenous metastasis of colon cancer in rats. The aim of this study was to examine the effect of JTE-522 on hematogenous metastasis of colon cancer in a rat model.

## Methods

### Preparation of JTE-522

The selective COX-2 inhibitor, JTE-522 [15], was suspended in 0.5% carboxymethyl cellulose sodium salt (Wako Life Science Reagents, Osaka, Japan).

### Animals

Twenty-four 4-week-old male F344/DuCrj rats, weighing 50 to 70 g purchased from SLC (Shizuoka, Japan) were acclimatized for one week before use in this study. The rats were maintained in an environment with a controlled temperature (22 to 24°C), humidity (40 to 50%), and lighting (12 hours light-dark cycle) with free access to tap water and standard rodent chow (CE-2, Nihon Clea, Tokyo, Japan).

### Tumors

The RIKEN CELL BANK donated the rat colon cancer cell line, RCN-9, which was established by Inoue *et al.* after inbred F344/DuCrj rats were subcutaneously injected with neutralized 1, 2- dimethylhydrazine (DMH) [16]. The tumor cells were stored at -80°C. After thawing, tumor cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended in RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) medium containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Sigma) and 0.05% penicillin-streptomycin (Sigma). After repeated subculture, cell viability was assessed by Trypan blue dye exclusion and the cells were counted using a hemocytometer.

### Induction of lung metastases

F344 male rats were anesthetized with ether and then a tumor suspension containing  $5 \times 10^6$  RCN-9 cells in 0.4 ml of PBS was injected into the tail vein.

### Pulmonary metastases of colon cancer in rats

Twenty-four rats were divided into four groups. Group 1 (control) was not given JTE-522. The other three groups all orally received daily doses of 3, 10 and 30 mg/kg JTE-522 (groups 2, 3 and 4, respectively) by gavage from the day before RCN-9 injection until the end of the study. The rats were sacrificed 24 days after injection and the lungs were removed and weighed. After 3-day formalin fixation, lungs were embedded in paraffin. Paraffin-embedded sections were cut into 3- $\mu$ m serial sections, which stained with hematoxylin and eosin to evaluate the pharmacological effects of JTE-522 on pulmonary metastases. The number and the largest diameter of metastatic tumors were examined microscopically in the largest sagittal cross section. The largest metastatic tumor was selected after measuring the diameter of 10 tumors in each slide.

### **Immunohistochemistry**

Slides were immunohistochemically examined using the Universal Immuno-enzyme Polymer (UIP). Sections of 3  $\mu$ m thick were cut from formalin-fixed and paraffin-embedded blocks of rat tissues. The slides were deparaffinized in xylene, rehydrated through a graded series of ethanols and washed with distilled deionized water. Antigen was retrieved by incubating the sections in 10 mmol/L citrate buffer (pH 6.0) in an autoclave (120°C) for 5 minutes. Thereafter, slides were cooled to room temperature and then washed with distilled deionized water. To quench endogenous peroxidase activity, slides were immersed in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol for 20 minutes. After a short rinse in phosphate-buffered saline (PBS), non-specific binding was blocked by incubating the sections in 10% normal goat serum for 10 minutes at room temperature. Thereafter, the slides were incubated with primary antibodies directed against COX-2 (rabbit polyclonal, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI; dilution 1:250) for 2 hours or vascular endothelial growth factor (VEGF) (rabbit polyclonal, VEGF A-20: sc-152; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; dilution 1:200) for 1 hour at room temperature. The slides were washed in PBS (3 X 5 minutes) and incubated with secondary antibody (N-Histofine® Simple Stain MAX PO, Nichirei, Tokyo, Japan) for 30 minutes at room temperature. After washing in PBS, color was developed using 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma) in 50 mmol Tris-HCl (pH 7.5) for 5 minutes and counterstaining with 1% Mayer's hematoxylin. Sections known to show intense immunostaining for COX-2 and VEGF were included in each experiment, having been incubated with either primary antibody or PBS as positive and negative controls, respectively. The positive controls were always obviously stained and negative controls were never stained.

### **Evaluation of immunostaining**

The specimens immunostained for COX-2 and VEGF were independently scored by two blinded investigators. Both the distribution (the percentage of positive cells) and the intensity of staining were assessed in a semiquantitative fashion. Sections were scored, according to the method of Yukawa *et al* [17]. Both the number of positive cells and the intensity of staining were evaluated as follows. The number of positive cells: none, 0; focal (one third of cells stained), 1; multifocal (two third of cells stained), 2; and diffuse (most cells stained), 3. The intensity of staining: none, 0; mild (between 0 and 2), 1; and strong (clearly identified by x 40 magnification), 2. The score for distribution and intensity were added and graded as follows: 0, 1, and 2: negative; and 3, 4, and 5: positive.

### **Statistical analysis**

The effects of JTE-522 on pulmonary metastasis were analyzed by the Kruskal-Wallis test and are expressed as means  $\pm$  standard deviation. A correlation

between COX-2 and VEGF expression was analyzed by Spearman's rank test. In all instances, statistical significance was established at  $p < 0.05$ .

## Results

### Pulmonary metastases

Each group consisted of 6 rats. JTE-522 significantly and dose-dependently decreased the weight of the lungs ( $p = 0.0001$ , Figure 1A). Cross sections contained many metastatic tumors that were not visible on the surface (Figures 2). The size of the metastatic tumors was significantly and dose-dependently decreased ( $p = 0.0002$ , Figure 1B), although the number of metastases did not differ (Figure 1C). JTE-522 appeared to have no significant adverse effects.

### Immunohistochemistry

Immunohistochemical staining showed that both COX-2 and VEGF were expressed at high levels in pulmonary metastatic tumors of all groups (Figures 3). The large airways and vascular structures were stained for both proteins, as were tumor cells in all groups. However, there was no correlation between COX-2 score and VEGF score ( $p = 0.60$ , Figure 4). The degree of COX-2 and VEGF immunohistochemical staining in tumor cells did not significantly differ among groups (Table 1).

## Discussion

JTE-522 dose-dependently reduced the weight of the lung with metastases and the size of metastatic tumors. These observations are consistent with those of other studies of selective COX-2 inhibitors. In the present study, however, the number of metastatic lesions determined microscopically was not reduced by JTE-522, which conflicts with the earlier findings. Masferrer *et al.* described the inhibition of tumor growth and lung metastasis of Lewis Lung carcinoma in mice by continuous dietary celecoxib (160-3200 ppm) supplied from the date of implantation [18]. Celecoxib at a dose of 160 ppm did not affect the number and size of lung metastases, but doses between 480 and 3200 ppm reduced the number of metastatic nodules by >50%. Histopathological analysis revealed that celecoxib dose-dependently reduced the size of the metastatic lung tumors. Masferrer *et al.* evaluated the pharmacological effects of celecoxib on lung metastasis by counting the metastatic tumors using a stereomicroscope and by histochemical analyses of consecutive lung sections. Tomozawa *et al.* investigated the effect of JTE-522 on lung metastasis of colon cancer in mice [19]. Their study showed that JTE-522 significantly reduced the number of metastatic nodules and lung weight. They macroscopically counted the metastatic tumors on the lung surface. Our study using cross sections disclosed that many nodules were not visible on the surface and could not be seen by the naked eye. These observations may indicate that JTE-522 blocks the growth of metastatic tumors, but does not inhibit the process of metastasis. On the other hand, a recent study *in vitro*, using cancer cell lines preincubated with celecoxib, suggests that COX-2 is involved in adhesion of cancer cells to vascular endothelium [20]. If the cancer cells had been pretreated with JTE-522 for an appropriate period in the present study, it might reduce the number of the lung metastases.

Here, we immunohistochemically stained COX-2 and VEGF because some reports indicate that prostaglandins regulate VEGF expression [21, 22] and that COX-

2 inhibitors directly affect angiogenesis [23]. Other recent studies have confirmed the notion that tumor growth and metastasis are dependent on angiogenesis and require the development of new vessels [24-26], and that COX-2 is related to tumor angiogenesis. COX-2 modulates the production of angiogenic factors derived from colon cancer cells, while COX-1 regulates angiogenesis in endothelial cells [27]. COX-2 is also related to tumor angiogenesis in human colorectal cancer. Cianchi *et al.* identified a significant correlation between COX-2 and VEGF, the latter of which might be one of the most important mediators of the COX-2 angiogenic pathway [28]. Immunohistochemical staining in the present study revealed parallel COX-2 and VEGF expression that was mainly localized in the cytoplasm of tumor cells, epithelial cells of the airways, and vascular structures. These findings may indicate that COX-2 is involved in the production of VEGF. Furthermore, the present study supports our previous report that JTE-522 interferes with the growth of metastatic tumors of colon cancer, due to inhibition of neovascularization [29]. Our results showed that high levels of COX-2 were expressed in the groups administered with JTE-522 as well as in controls. This is consistent with the fact that JTE-522 suppresses not the production, but the activity of COX-2 in prostaglandin biosynthesis [15]. VEGF was also highly expressed in all groups. One of the reasons may be hypoxia induced by multiple pulmonary metastases. Christou *et al.* reported that hypoxic animals have significantly higher VEGF concentrations compared with normoxic controls [30]. On the other hand, these findings may indicate that VEGF is produced via a pathway, which does not include COX-2, as well as through a COX-2 pathway.

We reported that COX-2 is related to human colorectal tumorigenesis. COX-2 mRNA expression is obviously increased in sporadic adenomas compared with normal colorectal mucosa and is significantly greater in adenomas with larger diameters [31]. Additionally, COX-2 expression and degree of dysplasia are significantly associated in adenomas [32]. COX-2 levels in human colorectal carcinomas are significantly higher in larger tumors and in those that invade more deeply [12]. We therefore postulated that COX-2 might correlate with metastasis as well as primary colorectal tumor, because hematogenous metastasis is the key for prognostic factor in colorectal cancer. The advances in the treatment for metastasis would improve the prognosis of the patients with colorectal cancer. The present study found that JTE-522 dose-dependently suppressed metastatic tumor growth, although the function to prevent cancer cells from metastasizing might not be so strong. Our recent report has revealed that administration of rofecoxib, a selective COX-2 inhibitor, decreased the number and size of rectal polyps in familial adenomatous polyposis patients, whereas the relapse of rectal polyps was seen 3 months after completion of the treatment [33]. This phenomenon might indicate that COX-2 inhibitors make colorectal polyps invisible, although atypical cells still exist microscopically. This is consistent with the result of the present study.

Recent reports have shown the inhibitory effect of rofecoxib on liver metastases. Yao *et al.* demonstrated that rofecoxib decreased the growth and metastatic potential of colorectal cancer in mice through multiple mechanisms [34]. Fenwick *et al.* reported that rofecoxib negatively regulated angiogenesis in human colorectal cancer liver metastases [35]. It is considered that COX-2 inhibitors can be used as therapeutic agents for hematogenous metastases of colorectal cancer.

## Conclusions

In conclusion, JTE-522, a selective COX-2 inhibitor, dose-dependently inhibited the growth of pulmonary metastasis from colorectal cancer in a rat model.



Selective COX-2 inhibitors may constitute useful therapeutic agents that can interfere with the growth of hematogenous metastasis, as well as with the tumorigenesis of colorectal cancer.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

HK carried out the animal experiment and drafted the manuscript. HK and TH performed immunostaining and its evaluation. IJU performed the statistical analysis. ME and KS participated in the design of the study and its coordination. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgements

Supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan. JTE-522 was donated by Japan Tobacco Inc (Tokyo, Japan). We thank Yoko Takagi and Labile T. Soumaoro for their technical support.

## References

1. Beauchamp RD, Peeler MO, DuBois RN: **Recent advances in the management of colorectal polyps.** *Curr Opin Gastroenterol* 1996, **12**:12-17.
2. Muto T, Kotake K, Koyama Y: **Colorectal cancer statistics in Japan: data from JSCCR registration, 1974-1993.** *Int J Clin Oncol* 2001, **6**(4):171-176.
3. Waddell WR, Loughry RW: **Sulindac for polyposis of the colon.** *J Surg Oncol* 1983, **24**(1):83-87.
4. Thun MJ, Namboodiri MM, Heath CW, Jr.: **Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer.** *N Engl J Med* 1991, **325**(23):1593-1596.
5. Jones DA, Carlton DP, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM: **Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines.** *J Biol Chem* 1993, **268**(12):9049-9054.
6. Williams CS, DuBois RN: **Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms?** *Am J Physiol* 1996, **270**(3 Pt 1):G393-400.
7. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN: **Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas.** *Gastroenterology* 1994, **107**(4):1183-1188.
8. Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM: **Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2).** *Cell* 1996, **87**(5):803-809.

9. Reddy BS, Rao CV, Seibert K: **Evaluation of cyclooxygenase-2 inhibitor for potential chemopreventive properties in colon carcinogenesis.** *Cancer Res* 1996, **56**(20):4566-4569.
10. Kawamori T, Rao CV, Seibert K, Reddy BS: **Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis.** *Cancer Res* 1998, **58**(3):409-412.
11. Tsujii M, Kawano S, DuBois RN: **Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**(7):3336-3340.
12. Fujita T, Matsui M, Takaku K, Uetake H, Ichikawa W, Taketo MM, Sugihara K: **Size- and invasion-dependent increase in cyclooxygenase 2 levels in human colorectal carcinomas.** *Cancer Res* 1998, **58**(21):4823-4826.
13. Tomozawa S, Tsuno NH, Sunami E, Hatano K, Kitayama J, Osada T, Saito S, Tsuruo T, Shibata Y, Nagawa H: **Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with tumour recurrence, especially haematogenous metastasis, of colorectal cancer.** *Br J Cancer* 2000, **83**(3):324-328.
14. Weiss L, Grundmann E, Torhorst J, Hartveit F, Moberg I, Eder M, Fenoglio-Preiser CM, Napier J, Horne CH, Lopez MJ, Shaw-Dunn, RI, Sugar J, Davies JD, Day DW, Harlos JP: **Haematogenous metastatic patterns in colonic carcinoma: an analysis of 1541 necropsies.** *J Pathol* 1986, **150**(3):195-203.
15. Matsushita M, Masaki M, Yagi Y, Tanaka T, Wakitani K: **Pharmacological profile of JTE-522, a novel prostaglandin H synthase-2 inhibitor, in rats.** *Inflamm Res* 1997, **46**(11):461-466.
16. Inoue Y, Kashima Y, Aizawa K, Hatakeyama K: **A new rat colon cancer cell line metastasizes spontaneously: biologic characteristics and chemotherapeutic response.** *Jpn J Cancer Res* 1991, **82**(1):90-97.
17. Yukawa M, Fujimori T, Maeda S, Tabuchi M, Nagasako K: **Comparative clinicopathological and immunohistochemical study of ras and p53 in flat and polypoid type colorectal tumours.** *Gut* 1994, **35**(9):1258-1261.
18. Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM, Edwards DA, Flickinger AG, Moore RJ, Seibert K: **Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors.** *Cancer Res* 2000, **60**(5):1306-1311.
19. Tomozawa S, Nagawa H, Tsuno N, Hatano K, Osada T, Kitayama J, Sunami E, Nita ME, Ishihara S, Yano H, Tsuruo T, Shibata Y, Muto T: **Inhibition of haematogenous metastasis of colon cancer in mice by a selective COX-2 inhibitor, JTE-522.** *Br J Cancer* 1999, **81**(8):1274-1279.
20. Kakiuchi Y, Tsuji S, Tsujii M, Murata H, Kawai N, Yasumaru M, Kimura A, Komori M, Irie T, Miyoshi E, Sasaki Y, Hayashi N, Kawano S, Hori M: **Cyclooxygenase-2 activity altered the cell-surface carbohydrate antigens on colon cancer cells and enhanced liver metastasis.** *Cancer Res* 2002, **62**(5):1567-1572.
21. Cheng T, Cao W, Wen R, Steinberg RH, LaVail MM: **Prostaglandin E2 induces vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor mRNA expression in cultured rat Muller cells.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998, **39**(3):581-591.
22. Hoper MM, Voelkel NF, Bates TO, Allard JD, Horan M, Shepherd D, Tuder RM: **Prostaglandins induce vascular endothelial growth factor in a human monocytic cell line and rat lungs via cAMP.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997, **17**(6):748-756.

23. Jones MK, Wang H, Peskar BM, Levin L, Itani RM, Sarfeh IJ, Tarnawski AS: **Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing.** *Nat Med* 1999, **5**(12):1418-1423.
24. Folkman J: **Endothelial cells and angiogenic growth factors in cancer growth and metastasis. Introduction.** *Cancer Metastasis Rev* 1990, **9**(3):171-174.
25. Mahadevan V, Hart IR: **Metastasis and angiogenesis.** 1990:97-103.
26. Horak ER, Leek R, Klenk N, LeJeune S, Smith K, Stuart N, Greenall M, Stepniowska K, Harris AL: **Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer.** *Lancet* 1992, **340**(8828):1120-1124.
27. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN: **Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells.** *Cell* 1998, **93**(5):705-716.
28. Cianchi F, Cortesini C, Bechi P, Fantappie O, Messerini L, Vannacci A, Sardi I, Baroni G, Boddi V, Mazzanti R, Masini E: **Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression correlates with tumor angiogenesis in human colorectal cancer.** *Gastroenterology* 2001, **121**(6):1339-1347.
29. Kobayashi H, Gonda T, Uetake H, Higuchi T, Enomoto M, Sugihara K: **JTE-522, a selective COX-2 inhibitor, interferes with the growth of lung metastases from colorectal cancer in rats due to inhibition of neovascularization: a vascular cast model study.** *Int J Cancer* 2004, **112**(6):920-926.
30. Christou H, Yoshida A, Arthur V, Morita T, Kourembanas S: **Increased vascular endothelial growth factor production in the lungs of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998, **18**(6):768-776.
31. Hasegawa K, Ichikawa W, Fujita T, Ohno R, Okusa T, Yoshinaga K, Sugihara K: **Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA in human colorectal adenomas.** *Eur J Cancer* 2001, **37**(12):1469-1474.
32. Sato T, Yoshinaga K, Okabe S, Okawa T, Enomoto M, Takizawa T, Sugihara K: **Cyclooxygenase-2 expression in colorectal adenomas.** *Dis Colon Rectum* 2003, **46**(6):786-792.
33. Higuchi T, Iwama T, Yoshinaga K, Toyooka M, Taketo MM, Sugihara K: **A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of the effects of rofecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on rectal polyps in familial adenomatous polyposis patients.** *Clin Cancer Res* 2003, **9**(13):4756-4760.
34. Yao M, Kargman S, Lam EC, Kelly CR, Zheng Y, Luk P, Kwong E, Evans JF, Wolfe MM: **Inhibition of cyclooxygenase-2 by rofecoxib attenuates the growth and metastatic potential of colorectal carcinoma in mice.** *Cancer Res* 2003, **63**(3):586-592.
35. Fenwick SW, Toogood GJ, Lodge JP, Hull MA: **The effect of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib on human colorectal cancer liver metastases.** *Gastroenterology* 2003, **125**(3):716-729.

## Figures

### Figure 1 - Graphs of pulmonary metastases of rats.

(A) Lung weight of control and JTE-522 treated rats injected with RCN-9 (group 1,  $10.70 \pm 0.57$  g; group 2,  $9.14 \pm 0.62$  g; group 3,  $5.61 \pm 0.76$  g; group 4,  $3.52 \pm 0.81$  g). JTE-522 significantly and dose-dependently decreased the lung weight of each group ( $p = 0.0001$ ). (B) Maximal diameter of metastatic tumors in control and JTE-522 treated rats injected with RCN-9 (group 1,  $5067 \pm 499$   $\mu\text{m}$ ; group 2,  $4233 \pm 244$   $\mu\text{m}$ ; group 3,  $2583 \pm 211$   $\mu\text{m}$ ; group 4,  $1990 \pm 96$   $\mu\text{m}$ ). JTE-522 significantly and dose-dependently decreased size of metastases ( $p = 0.0002$ ). (C) The number of metastatic tumors in control and JTE-522 treated rats injected with RCN-9 (group 1,  $203 \pm 26$ ; group 2,  $197 \pm 26$ ; group 3,  $204 \pm 18$ ; group 4,  $165 \pm 33$ ). Microscopy shows no significant differences in the number of metastases ( $p = 0.13$ ).

### Figure 2 - Removed lungs and the largest cross sections.

(A) Representative lungs of rats injected with RCN-9. Removed lungs on the left were those of group 4 (JTE-522; 30 mg/kg/day); and those on the right were group 1 (control). Surface of the lungs of group 1 has more metastatic tumors than that of group 4. (B) The largest cross-sections of group 1 (control) and group 4 (JTE-522; 30 mg/kg/day), which were stained with hematoxylin and eosin. The upper slide shows the largest cross-section of group 1, and the lower one shows that of group 4. Many metastatic tumors are not visible on the surface.

### Figure 3 - Immunohistochemical staining for COX-2 and VEGF.

A, B, and C show immunohistochemical staining for COX-2 in lungs of rats injected with RCN-9. A, group 1 (control group); B and C, group 4 (JTE-522; 30 mg/kg/day). Tumor cells in all groups expressed COX-2. Degree of staining between groups 1 and 4 did not differ. Vascular structures (black arrow, B) and large airways (black arrow, C) in the rat lung were stained for COX-2. White arrow in C shows tumor cells stained for COX-2. Original magnification, A and B, x400, C, x200.

D, E, and F show immunohistochemical staining for VEGF in lungs of rats injected with RCN-9. D and E, group 1 (control); F, group 2 (JTE-522; 3 mg/kg/day). Tumor cells of all groups expressed VEGF. Degrees of staining between groups 1 and 2 did not differ (D and F). Vascular structures (black arrow, E) and large airways (white arrow, F) were stained for VEGF in rat lung. Black arrow in F shows tumor cells stained for VEGF. Original magnification, x400.

### Figure 4 - Immunohistochemical score of COX-2 and VEGF.

Relation between the immunohistochemical score of COX-2 and that of VEGF is shown. The score was defined as positive, if it was 3 or more. The number of each score (COX-2 vs VEGF) was as follows: 3 vs 3, 1; 4 vs 4, 8; 4 vs 5, 4; 5 vs 4, 8; and 5 vs 5, 3. Both COX-2 and VEGF were positive in all groups, however, there was no correlation between COX-2 and VEGF scores ( $p = 0.60$ , Spearman's rank test).