

간암 동물모델의 현황 및 전임상 연구에서의 활용

주혜림¹ · 노원상²

¹브리티시 컬롬비아대학교 의과대학 소화기내과, ²연세대학교 의과대학 소화기내과

Animal Models of Liver Cancer: Current Status and Application in Pre-clinical Research

Hye-Lim Ju¹, Simon Weonsang Ro²

¹Division of Gastroenterology, Department of Medicine, The University of British Columbia School of Medicine, Vancouver, Canada;

²Division of Gastroenterology, Department of Internal Medicine, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common cancers worldwide. HCC develops in various causes – Viral hepatitis infection, toxins, or other liver conditions - by activation of oncogenes and/or inactivation of tumor suppressors. Understanding of signal pathways and protein-protein interactions critical in tumor development may lead to novel treatment strategy. To evaluate the progression of HCC and effects of potential therapies, various animal models have been established. Experimental models of HCC provide valuable tools to investigate the risk factors, new treatment modalities and biologic characteristics. Subcutaneous xenograft models have been widely used in the past. However, with the advancement of *in vivo* imaging technology, investigators are more concerned with the orthotopic models nowadays. Genetically engineered mouse models have greatly facilitated studies of gene function in HCC development. Lately, a novel approach for stable gene expression in mouse hepatocytes by hydrodynamic injection has been developed. Each model has its own advantages and disadvantages. Therefore, selecting the optimal models based on study objectives is necessary. In this review, we highlight both the frequently used mouse models and some emerging ones with emphasis on their merits or defects, and give advices for investigators to choose a “best-fit” animal model in HCC research. (**J Liver Cancer 2017;17:1-14**)

Keywords: Hepatocellular carcinoma; Liver cancer animal model

Received Dec. 30, 2016

Revised Feb. 6, 2017

Accepted Feb. 6, 2017

서론

간세포암은 전 세계적으로 가장 많이 발생하는 암종 중 하나이며, 암과 관련된 사망률 중 세 번째로 높다. 간세포암은 이전에는 B형 간염 바이러스 감염률이 높은 아시아와 아프리카 일부 지역에서 주로 발생했으나, 지난 반세기 동안 C형 간

염 감염 환자의 증가로 인해 서구 사회에서도 발생이 증가하는 추세이다.¹ 지속적인 간 손상에 의해 간섬유화나 간경변이 일어나고 이러한 조직 환경에서 종양유전자(oncogene)의 활성화나 종양억제유전자(tumor suppressor)의 비활성에 의해 간세포암이 발생한다고 알려져 있다. 간세포암의 치료법들은 전체 환자의 약 30%에 적용될 수 있지만 이마저도 높은 재발률로 인해 어려움을 겪는다.² 간세포암 발생에 있어 중대한 역할을 하는 신호 전달 경로나 단백질-단백질 간의 상호작용에 관한 이해는 간세포암 치료에 중요한 정보를 제공하게 된다. 몇몇의 중요한 마우스 모델들은 간세포암의 발병에 기여하는 경로들의 유전적 변형을 간 특이적으로 도입함으로써

Corresponding author : Simon Weonsang Ro

Division of Gastroenterology, Department of Internal Medicine, Yonsei University College of Medicine, 50-1 Yonsei-ro, Seodaemun-gu, Seoul 03722, Korea

Tel. +82-2-2228-2722, Fax. +82-2-2228-2722

E-mail; simonr@yuhs.ac

간세포암의 병인을 정의하는 데 도움을 주었다. 그럼에도 불구하고, 만성 염증 환경으로부터 기인하는 자연적인 간세포암의 모델링은 상당한 도전을 필요로 한다. 예를 들어 감염(B형 간염, C형 간염), 독소(알코올), 대사성 질환(비알코올 지방간질환), 선천적 질환(혈색소침착증) 등은 간세포암의 원인들이며 염증과 섬유화 과정을 간세포암의 전조 현상으로 보이는데 어떠한 모델도 아직 이를 제대로 반영하지 못한다. 몇몇의 설치류 간세포암 모델들이 자연적으로 간세포암을 발생시키지만 이는 대부분 간독성 작용제나 발암성 물질의 투여로 재현된 손상-섬유화-악성종양 순환이 원인이 된다. 하지만 이러한 모델들은 모델 간의 종양 발생 편차가 심하며 발생 시점도 매우 길어 간세포암 발생을 예측하기 어렵다는 단점을 가진다. 최근 간세포암의 발생 기전을 이해하기 위해 인간 유전자 비교 연구는 인간의 간세포암의 특징적인 돌연변이, 유전자 발현 프로파일 및 염색체상의 증가 및 감소를 확인하기 시작했다.³ 하지만 간세포암에서 밝혀진 독자적인 분자 병리학적 발생 경로가 없으므로 여러 모델들이 각기 다른 종류의 종양 발생 유형을 모방해야 할 필요가 있음이 점차 분명해지고 있다. 이러한 모델들은 사전 임상 실험의 중요한 도구로서 특정한 분자 경로를 겨냥하는 데 사용될 것이다. 본 종설의 목적은 간경변증과 간세포암에 이용 가능한 다양한 모델들을 이해하기 쉽게 정리하고 평가함으로써 간세포암종의 발병 기전을 이해하기 위한 청사진을 제시하며 약물 검사 전임상 모델을 최적화하는 데 있다.

암 연구 실험 동물 모델

간 생리학에 초점을 맞춘 많은 실험들에서 간섬유화 경향을 보이는 래트(*Rattus*)를 사용해왔지만 실험용 마우스(*Mus musculus*)는 동물의 크기와 번식 능력, 수명, 인간 생물학에 대한 생리학적 및 분자학적 유사성 때문에 종양에 대한 최상의 모델로 인식되고 있다. 현재까지 마우스를 이용한 동물 모델은 간단한 이종 이식 모델에서부터 복잡한 유전자 변형 마우스에 이르기까지 다양한 범위의 스펙트럼을 따라 마우스의 종양 유전학을 모델링하는 데 있어 상당한 진보를 보여 왔다.⁴

1. 화학적 간세포암 유도 모델 (Chemically induced models)

Yoshida가 1932년 Oaminoazotoluene에 의해 래트에서 간

암을 유도한 선구적인 연구 이후로 많은 발암 물질들이 밝혀졌다.⁵ 대부분이 합성 화학 물질로 carbon tetrachloride (CCl₄), diethylnitrosamine (DENA), 2-acetylaminofluorene (AAF), N-nitrosodimethylamine, arsenic, o-aminoazotoluene, N-nitrosomorpholine (NMOR), 1,2-dichloroethane 등이 있으며,⁶ 자연적인 물질로는 Xatoxin, pyrrolizidine alkaloids, safrole가 간에 대한 발암 물질로 알려져 있다.⁷ 이러한 발암 물질들은 보통 사료, 식수, 가스 흡입, 복강 내 혹은 피하 주사법을 통해 주입된다. 간세포암은 또한 방사성 표지물질을 통해서도 유도된다.⁸ 화학적으로 유도된 발암 과정은 개시, 촉진 및 진행이라는 세 단계를 거쳐야 한다고 알려져 있다. 이러한 과정은 각 단계에서 종양유전자나 종양억제유전자의 불균형으로 인한 자연적인 보호 장벽이 붕괴된 결과이다. 화학적 간암 발생 모델은 종종 발암물질(AAF, DENA, CCl₄, 1,2-dichloroethane) 유도 이후에 시행된 간 절제술이나 페노바르비탈(phenobarbital) 치료로 초래된 세포의 증식 촉진이 수반된다.⁷ 간 질환에서 가장 흔하게 사용되는 모델은 CCl₄가 투여 모델이며 CCl₄를 식수, 가스 흡입 또는 복강 내 주사를 통해 투여함으로써 간 손상을 일으킨다.⁹ DENA를 복강 내 주사(10 mg/kg 체중) 투약 18주 후 간경화와 다병소 간세포암을 발생시키고,^{10,11} β-catenin 돌연변이가 빈번히 발견된다.¹² Thioacetamide (TAA)는 0.03% weight/volume (W/V) 농도로 식수 투여 2-3개월 후부터 래트에서 간경화가 유도된다고 알려져 있다.^{13,14} NMOR의 경우 NMOR을 120 ppm 농도로 약 12주간 식수로 섭취할 경우 수컷 F344 래트는 폐 전이를 동반한 간암을 발생시킨다고 알려져 있다.¹⁵ 전이는 발암 물질의 전처리로 유도할 수 있으나 낮은 생존율이 전이 평가를 어렵게 한다. 2005년 Yoshino 등¹⁶은 120 ppm 농도의 DENA 처리 후 낮은 농도의 NMOR (40 또는 80 ppm)을 포함한 식수를 14주간 섭취하게 함으로써 120 ppm 농도 처리 모델보다 유의하게 높은 생존율을 보이는 동물 전이 모델을 수립했다. 이렇게 수립된 40 ppm NMOR 처리 모델은 22주 후에 폐 전이가 없는 간세포암을 발생시키며, 40주 후에는 빈번한 폐 전이를 보여 전이의 메커니즘을 밝히는 데 적합한 모델로 평가된다. 2주 이상의 콜린 결핍(Choline-deficient)과 메티오닌의 적은 섭취는 빠른 간 세포의 사멸을 유도하며, 래트에서 이러한 식이와 함께 DENA, Azaserin, 또는 AAF처리를 조합할 경우 간암 발생을 가속화시킬 수 있다. 이 모델은 각 개체당 콜린 결핍에 대해 보이는 감수성의 편차가 크다는 단점을 가지고 있다. 이러한 화학적 간세포암 유도 모델들은 인간에게 발암 가능성

이 있는 화학 물질을 확인하고 인간 간암의 다단계 개발 및 특성을 포괄적으로 이해하는 데 사용된다(Table 1).^{13,17-28}

2. 간세포암 이식 모델(Transplantation models)

1969년 처음으로 시험관 내에서 증식된 암세포를 면역 결핍 마우스에 피하로 이식 하였을 때 종양을 형성할 수 있음이 확인된 이후로,²⁹ 많은 종류의 세포주나 조직이 마우스나 래트에 이식되어 암 연구를 위해 사용되어 왔다. 이러한 이식 모델의 목적은 종양 세포의 생존에 적합한 조건을 생체 내에서 제공하여 유사한 상호 작용을 확립하고 성장시킬 수 있도록 하는 것이다.³⁰ 간세포암 이식 모델들은 이식되는 종양의 출처(인간 혹은 동물), 샘플의 유형(배양에 의한 종양세포 혹은 수술 후 얻어진 종양 조직) 그리고 이식의 해부학적 위치(피하 혹은 동일한 위치)에 의해 분류된다.³¹ 또한 이식 모델을 크게 동종 이식 모델(Allograft transplantation models)과 이종 이식 모델(Xenograft transplantation models)로 분류할 수도 있다. 동종 이식 모델은 보통 마우스나 래트의 종양 세포주 혹은 종양 조직을 같은 종에 이식하는 것을 말하며 이럴 경우 이식된 종양의 성장에 본래의 면역 체계가 작용하게 된다.³² 이종 이식 모델은 인간의 종양 세포와 종양 조직을 면역 결핍 설치류에 이식하는 것을 말하며,³³ 이러한 이종 이식 모델은 종양을 빠르고 쉽게 유도하고 종양이 피하에 위치하게 함으로써 종양의 성장을 직접적으로 측정할 수 있다는 이점을 가지고 있어 생체 내에서 항종양성 약물의 전임상 연구의 중추적인 역할을 하고 있다.

Ma 등^{34,35}은 CD133을 발현하는 간암세포주들의 특징과 화학 약물에 대한 내성을 시험하기 위해 CD133을 발현하는 간암 세포를 인간 간암 세포주와 이종 이식 마우스 모델에서 각각 분리했으며 이 세포들은 CD133을 발현하지 않는 종양 세포에 비해 높은 비율로 살아 남았다. University Hospital Bonn의 연구진은 CH3 마우스에 알코올과 티오아세트아미드(Thioacetamide)를 투여하여 간 섬유화를 일으킨 후 129 세포를 주사하였다.³⁶ 이를 통해 정상 간에 129 세포를 주사하였을 때보다 섬유화된 간에서의 종양 성장이 더 빠르고 큰 것을 확인할 수 있었다. 또한 섬유화된 간에서 자란 종양 내에서 혈관 내피 성장 인자 vascular endothelial growth factor (VEGF)와 수용기 vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) 그리고 matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), MMP-9의 유전자 발현이 더 큰 것도 밝혔다. 이 모델은 유도 모델과 이식 모델이 결합되어 간섬유화의 상황에서 약물의 효용성을 시험하는 데 유용한 도구로 이용되고 있다.

3. 형질 전환 간세포암 모델 (Genetically engineered model)

인간 암에 대한 가장 정교한 동물 모델은 인간 악성 종양의 병리적 및 분자적 특징을 모방하도록 유전적으로 조작된 동물 모델이다.⁴ 이러한 모델은 종양이 진행되는 동안 암 세포와 암 세포를 둘러싼 주변 환경을 분자적인 단계에서 조사할 수 있도록 하며, 더 나아가 다양한 돌연변이를 갖는 마

Table 1. Chemically induced models

Diet or chemical	Mechanism of action	Phenotype	References
Choline-deficient and ethionine (CDE) diet	Oxidative DNA damage, DNA strand breaks and chromosomal instability	30-35 weeks: 100% HCC	17-20
Ciprofibrate	Synthetic peroxisome proliferators, non-genotoxic carcinogen	60 weeks: 100% HCC	21-23
Diethylnitrosamine (DENA)	Genotoxic hepatocarcinogen	100% HCC in males, 30% in females, Extensive chromosomal damage	21, 23-25
Thioacetamide (TAA)	Metabolites induce oxidative stress	100% HCC	13
2-Acetylaminoflouren (2-AAF)	Genotoxic	Used primarily as promoter in initiation/promotion protocols	23, 26
Phenobarbital	Non-genotoxic	Used as promoter in initiation/promotion protocols: increases HCC by 500%. Can inhibit tumor formation in mice given DEN. Associated with β -catenin activation	27, 28

HCC, hepatocellular carcinoma.

우스의 생체 내에서 신호 전달 경로의 협동성이나 의존성에 관한 정보를 제공한다.³⁷ 형질 전환 마우스는 1980년대에 만들어졌으며 인간의 악성종양의 분자적 특징 연구를 가능케 했다.³⁸⁻⁴⁰ 형질 전환 마우스는 이소성 프로모터(Ectopic promoter)와 인핸서(enhancer)로 인해 비생리학적 방식으로 종양유전자 또는 우성음성종양억제유전자(dominant-negative tumor suppressor)를 발현하도록 조작된 마우스이다.^{4,37} 현미 주입법(microinjection)은 재조합 DNA를 생식핵에 주입하여 형질 전환 마우스를 만드는 전통적인 방법이며,⁴¹ 그 밖에 유전자 타겟팅 방법이나 배아 줄기 세포에서 렌터 바이러스의 형질 도입에 의해 만들어지기도 한다. 지속적인 종양유전자의 발현과 종양억제유전자의 단절은 암을 일으키기 쉬운 마우스 계통을 만드는 데 사용된 첫 번째 접근법이다.^{37,42} 또한 이들 유전자의 발현은 조직 특이적인 프로모터의 사용으로 인해 특정 조직에서만 제한적으로 발현되도록 할 수 있으며,³⁷ 예를 들어 간 특이적인 발현을 위한 모델에서는 알부민(albumin) 프로모터를 사용하기도 한다. 형질 전환 간세포암 모델을 제작하기 위하여 사용되는 유전자들은 대부분 간염 바이러스, 세포주기 혹은 다양한 간암 관련 신호 전달 경로와 연관되어 있다.

1) 바이러스성 간암 모델(Viral model)

간염 바이러스의 감염이나 잠복 또는 만성 간염은 간세포암의 가장 흔한 병인이며 전 세계적으로 간세포암의 요인 중 80%를 차지한다. B형 간염은 중국, 동남아시아 그리고 사하라 이남 아프리카의 풍토병이며 이 지역들에서의 바이러스 수직 감염이 높은 간암 발생률을 가져온다. C형 간염 바이러스는 B형 간염 바이러스나 에이즈 바이러스에 비해 미국과 유럽 등지에 널리 분포되어 있다.⁴³

(1) B형 간염 바이러스(Hepatitis B virus)

B형 간염 바이러스는 간 친화성 DNA를 가진 바이러스로 만성 간염의 급성화, 간경변, 그리고 간세포암의 원인이 된다.⁴⁴ B형 간염 바이러스는 시험관 상에서 세포 배양 시스템을 이용한 바이러스의 증식이 어렵다. 그러므로 간암 발생의 매개체와 반응기를 밝히는 적절한 동물 모델의 개발은 단순히 질병을 이해하는 것을 넘어 새로운 진단 방법을 개발하거나 치료 전략을 위해서도 중요하다.^{44,45} B형 간염 바이러스는 환형 DNA 바이러스이며 네 가지의 각기 다른 B형 간염 바이러스 단백질을 코딩하는 네 개의 개방 판독 프레임(open reading frame)을 가진다. 이 중 간세포암에서 흔히

사용되는 바이러스 표지자는 B형 간염 바이러스 X 단백질(HBx)이다. 1994년 Koike 등⁴⁶은 HBx의 발현이 높은 형질 전환 마우스를 선보였으며 이 모델은 수컷 형질전환 마우스가 13-24개월 안에 84%에서 간세포암이 형성되었다. 이 마우스에서 얻어진 DNA 분석 결과는 HBx의 지속적인 발현이 DNA 합성을 유발하고 많은 간세포에서 이차적인 변형을 일으켜 종양을 일으킴을 밝혔다. 또한 HBx 형질 전환 마우스의 간세포암 발생에 있어 B형 간염 바이러스의 유전자형 간의 차이를 보였으며 간세포암은 유전자형 C HBx 형질 전환 쥐에서 발생하지만 다른 유전형에서는 나타나지 않았다.⁴⁷ HBx 외에도 Chisari 등⁴⁸은 B형 간염 바이러스의 Large envelop 폴리 펩타이드의 과잉 발현과 독성을 나타낼 만큼의 B형 간염 표면 항체의 축적을 보이는 형질 전환 모델을 제작하였다. 이 모델은 단일 구조 바이러스 유전자의 부적절한 발현이 악성 형질 전환을 일으키기에 충분함을 보여주었다. 이러한 간세포 손상은 염증 반응, 재생, 전사 규제 완화, 염색체 이수성 그리고 결국 간세포암으로 이어지는 일련의 프로그램된 반응을 일으킨다. 이로써 본 모델은 지속적인 심각한 간세포 손상이 무제한적인 증식을 일으키는 이차적인 유전적 사건을 유도할 수 있다는 이론을 뒷받침한다.⁴⁹

(2) C형 간염 바이러스(Hepatitis C virus)

C형 간염 바이러스는 숙주의 유전체에 통합되지 않는 RNA 바이러스이지만 C형 간염 바이러스의 단백질들은 바이러스 상에서의 역할에서 벗어나 많은 숙주 세포의 인자들과 상호작용을 함으로써 넓은 범위의 활성에 기여한다.⁵⁰ 여러 모델들이 C형 간염 바이러스의 발암성을 이해하기 위해 노력했고, 그중 세포 배양 시스템을 이용한 실험은 C형 간염 바이러스의 핵심 단백질 자체가 다양한 세포 기능을 조절할 수 있으며 C형 간염 바이러스 관련 간세포암의 발달과 직접적으로 연관될 수 있다는 가능성을 제시했다.⁵¹ C형 간염 바이러스 핵심단백질은 렛트 배아 섬유아세포에서 H-ras 종양유전자와 협력하고, c-Myc와 관련된 세포사멸과 P53 유전자의 전사를 억제하며, peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)이 다양한 단백질들과 상호작용하게 하여 발암성의 표현형을 띠도록 변형시킨다.⁵²⁻⁵⁶ Kamigaya 등⁵⁷은 hepatitis C virus (HCV)의 구조적 단백질이 간암 발생에 대한 기여도를 측정하기 위하여 C형 간염 바이러스 핵심 단백질 및 E1, E2 단백질 모두를 발현하는 형질 전환 마우스(HCV core-E1-E2)와 C형 간염 바이러스 핵심 단백질만을 발현하는 형질전환 마우스(HCV core)를 제작

하였다. 두 그룹 간 간암 세포 증식률은 큰 차이를 보이지 않았지만 HCV core-E1-E2 형질전환 마우스에서 형성된 간세포암은 HCV core 형질전환 마우스의 간세포암보다 유의성 있게 낮은 세포사멸 지수를 보였다. 또한 HCV core-E1-E2 형질전환 마우스의 종양 크기는 HCV core 형질전환 마우스에 비해 더 크게 형성되었다.

(3) 우드척 간염 바이러스(Woodchuck hepatitis virus)

우드척 간염 바이러스는 헤파드나바이러스 과에 속하며 지속적인 감염은 결과적으로 만성 간염과 변형된 간세포로부터 형성된 병소가 나타나게 한다. 궁극적으로 거의 모든 우드척 간염 바이러스 감염은 원격 전이가 결여된 좋은 분화도를 가지는 간세포암으로 발전한다. 우드척 간염 바이러스에 의한 간세포암은 일반적으로 우드척 간염 바이러스가 특정한 부위에 위치하여 c-Myc과 N-Myc 유전자의 과발현을 유발시켜 발생된다.^{58,59}

바이러스성 간세포암 모델은 간세포암에 대한 화학적인 예방 전략을 장기적으로 검사하거나 이미 발생한 간세포암에 대한 유전자 치료를 평가하기에 가치가 있다. 반면에 이런 모델들은 각 개체 간 유전적 배경의 차이, 2년 이상 걸리는 간암의 발생, 한정적인 바이러스성 모델 및 값비싼 비용 등의 한계점들을 가지고 있다(Table 2).^{46-49,51,57,60-66}

2) 조건적 유전자 발현 모델

(Conditional gene expression model)

조건적 발현 시스템에서는 알부민,^{57,62} 메탈로티오네인,⁶⁷ 트랜스티레틴,⁶⁸ 그리고 간 활성화 단백질 liver activator protein (LAP)⁶⁹을 발현을 위한 몇몇의 프로모터들이 사용되었다. 따라서 특정 유전자들이 단독으로 혹은 다양하게 조합되어 간 특이적으로 발현될 수 있다. Sandgre 등⁷⁰은 알부민 인핸서/프로모터를 사용해 c-Myc의 발현을 간 특이적으로 제한한 형질전환 마우스를 제작하였다. 이 실험에서 c-Myc의 발현은 어린 마우스에서는 가벼운 상태에서부터 심각한 수준에 이르는 간 형성 장애를 일으켰으며 15개월이 지난 마우스에서는 간선종을 보였다. 더 나아가 c-Myc이 β -catenin 유전자 내 돌연변이를 일으킬 수 있음도 보여주었다. 이러한 돌연변이는 β -catenin의 신호 전달 기능에 변화를 가져오고 결국 간세포암으로 연결되었다.⁷¹ 또한 간암 발생에 있어 c-Myc과 transforming growth factor alpha (TGF- α)의 상호작용 역시 연구하기 위해 알부민 인핸서/프로모터를 이용해 c-Myc을 발현시키고 메탈로티오네인 1 (metallothionein 1)

프로모터를 이용해 TGF- α 를 발현시키는 이중 형질 전환 마우스 모델이 고안되었다.^{67,72-75} 이 모델은 c-Myc과 TGF- α 를 단독 발현시킨 형질전환 마우스에 비해 간암 형성을 현저히 단축시켰다. c-Myc과 TGF- α 를 동시 발현시킨 마우스는 지속적인 간세포의 증식을 유도했으며 이는 두 달 후 종양 병변을 나타냈다.⁷² 10주 후 c-Myc 단독 발현에서 얻어진 병변과 비교했을 때 c-Myc과 TGF- α 를 동시 발현시킨 경우에서 활성산소의 생산이 현저히 증가되었고,⁷⁶ 유전적 불안정률이 높아졌으며 이형접합체의 빈도가 낮아졌다.⁷⁷ Factor 등⁷⁴은 이 모델에서 NF- κ B에 의해 유도된 생존 신호가 활성화되어 있음을 밝혔다. 반면 간암에서 흔하게 발견되는 β -catenin활성은 cmyc/TGF- α 마우스에서 발생한 간세포암종에서는 드물었다.⁷⁸ 이후로 c-Myc/E2F1 이중형질 전환 마우스와 c-Myc/EGF 이중형질 전환 마우스가 성공적으로 제작되었다.^{75,79,80} 조건적 유전자 발현 시스템은 배아 초기 사망을 상당 부분 피할 수 있다. 그러나 이러한 조건적 유전자 발현 시스템은 유전자가 발현된 후로는 돌이킬 수 없는 전략이며 종양 진행의 여러 단계에서 종양유전자의 역할을 정확하게 모방할 수 없다는 단점을 가진다.

3) 유전자 발현 유도 모델

(Inducible gene expression model)

유전자 발현 유도 시스템은 유전적 변화를 일시적으로 제어할 수 있다. 현재까지 널리 쓰이는 유도 시스템 타입으로는 테트라사이클린(Tetracycline, Tet) 조절 시스템, 타목시펜(Tamoxifen) 조절 모델, 바이러스를 이용한 Cre 전달 시스템(virus-mediated Cre delivery system)이 있다. 테트라사이클린 조절 시스템은 테트라사이클린 조절 활성체(tTA)을 발현하는 Tet-Off 시스템과 테트라사이클린 역조절 활성체(rtTA)를 발현하는 Tet-On 시스템으로 나뉘어진다(Fig. 1A, B). Tet-Off 시스템에서는 독시사이클린(Dox)이 tTA가 프로모터에 붙는 것을 억제함으로써 유전자의 전사를 막는다. 반면에 Tet-On 시스템은 Dox가 rtTA를 프로모터에 붙여 활성화시키고 결과적으로 유전자의 전사를 촉진하는 역할을 한다. 이러한 유전자 발현 유도 시스템들은 c-Myc에 의해 유도된 간암 연구에 사용되어 왔다. Catherine 등은 테트라사이클린 프로모터에 의해 c-Myc이 조절 받게 한 마우스와 LAP 프로모터에 조절받는 tTA를 가지는 마우스를 교배하였다.⁶⁹ 그리하여 tTA와 c-Myc 모두를 보유한 마우스는 c-Myc을 발현했지만, 이에 Dox를 처리했을 때 c-Myc은 발현되지 않았다. 본 모델에서 약 12주 후 c-Myc이 과발현된 모든 형질전환 마

Table 2. Viral models of HCC

Gene	Enhancer/promoter	Characteristics	References
HBV large envelope protein	Albumin-HBV	Necrosis, inflammation, and HCC in 72% males, no metastases, rare local invasion	48, 49
HBV X protein	X protein	HCC in 84% after 13-24 months in mice with high HBx expression. Lung metastasis	46, 60, 61
HCV	Core	Incidences of HCC in the male transgenic mice of the C21 and C48 lines, between the ages of 16 and 19 months, were 25.9% (7 of 27) and 30.8% (4 of 13)	51
HCV Core-E1-E2	Albumin	Core transgenics: 32% HCCs in male mice at 16-23 months;	47
HCV	Core-E1-E2 transgenic under albumin promoter and HCV core transgenic under HBV X promoter	DENA: 100% HCC at 32 weeks; HCV core-E1-E2 with largest tumors	57
HCV	Polyprotein Alpha I antitrypsin Albumin	Transgenic C57BL/6 mice with viral polyprotein (FL-N transgene) or viral structural proteins (S-N transgene). The abundance of viral proteins was sufficient for detection only in S-N transgenic animals. Incidence of HCC reached statistical significance only in FL-N animals	62
Woodchuck	No	Cell line derived from a woodchuck HCC serially transplanted in athymic nude mice has been established and named WH257GE10	63
Woodchuck	No	Establishment and characterization of a woodchuck hepatocellular carcinoma cell line (WH44KA)	64
Woodchuck	No	Establishment and characterization of a diethylnitrosamine-initiated woodchuck hepatocyte cell line (WLC3)	65
Woodchuck	No	Establishment of a new cell line from a woodchuck hepatocellular carcinoma (T3-HEP-W1)	66

HCC, hepatocellular carcinoma; HBV, hepatitis B virus; DENA, diethylnitrosamine.

우스에서 간암이 발생되었으며, 간암 발생 이후로 Dox를 처리하였다. Dox 처리 4일 후, 간암은 세포자멸을 동반한 정상 간세포로 분화되었으며 2주 안에 거의 모든 간암이 크게 감소되었다. 동일한 모델이 miRNA-26a와 miRNA-122의 간암에서의 역할을 연구하기 위해서도 사용되었다.⁸¹ 결과적으로 miRNA-26a와 miRNA-122는 c-Myc에 의해 유도된 간암에서 억제되어 있는 것이 알려졌다. 이러한 테트라사이클린 조절 시스템은 매우 정교한 조절을 할 수 있으며 넓은 범위의 조절이 가능하다는 이점을 가지고 있다.

타목시펜 조절 시스템에서는 Cre의 중재에 의한 DNA 재조합에 따라 간에서 HCV 구조 단백질이 발현되도록 한 형질전환 마우스가 제작되었다. 이때 Cre-에스트로젠 수용체 융합 단백질(Cre-estrogen receptor fusion protein, Cre-ER)

이 사용되었다. Cre-ER은 복강 내 주사로 주입된 타목시펜에 반응하여 Cre를 핵 내로 이동시킴으로써 C형 간염 바이러스 구조 단백질의 발현이 간에서 일어나도록 했다(Fig. 1C).⁸²⁻⁸⁴ 본 시스템에서 주의할 점은 사용되는 타목시펜과 Cre-ER의 독성이다. 다량의 타목시펜은 치명적일 수 있고 자궁과 같은 특정 조직에 손상을 줄 수 있다.⁸⁵ 또한 Cre-ER 융합 단백질은 조혈 시스템에서 독성을 가진다.⁸⁶ 따라서 두 물질 사용의 적정량을 검토해야 한다.

바이러스를 매개로 한 Cre 전달 시스템은 또 다른 유전적 조작 방법이다. 이 시스템에서는 복제가 제한된 재조합 아데노바이러스(Adenovirus)를 사용해 loxP를 가진 마우스의 간에서 간 특이적으로 Cre유전자가 발현되도록 한다(Fig. 1D).^{87,88} Colnot 등은 종양억제유전자인 adenomatous polyp-

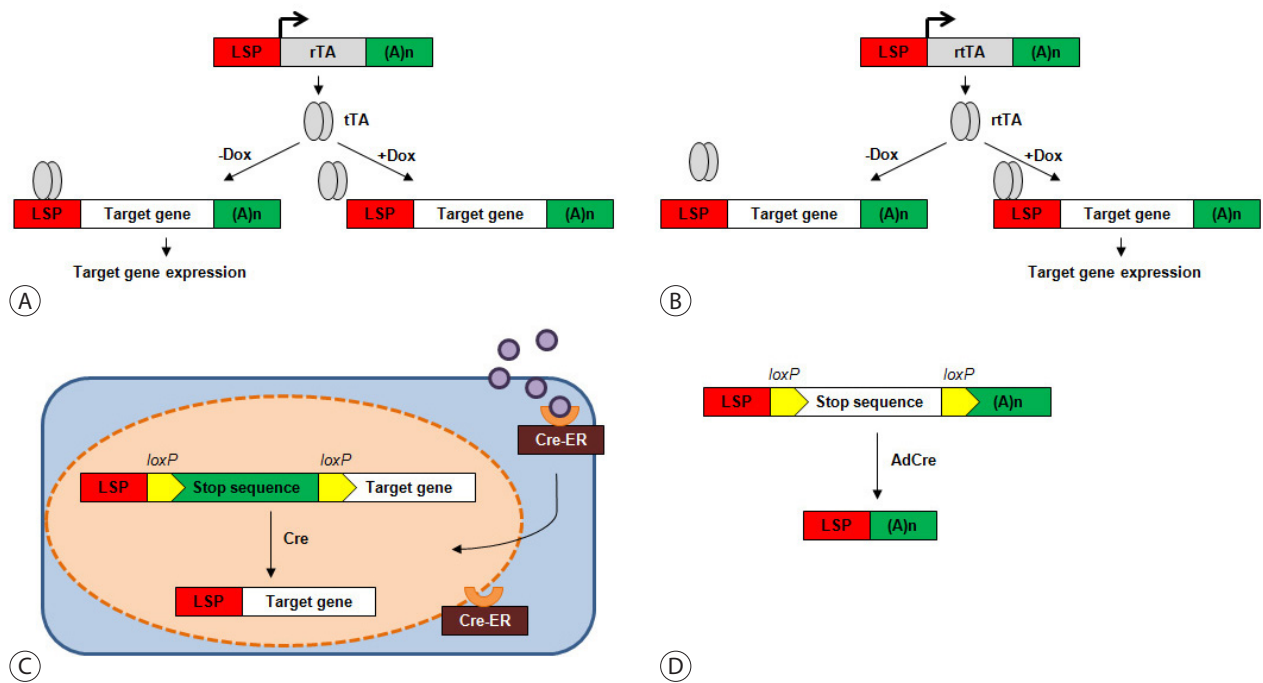


Figure 1. Inducible gene expression system. (A) Tet-Off system. (B) Tet-On system. (C) Tamoxifen-controlled system. (D) Virus-mediated Cre delivery system.

osis coli (APC)가 loxP 사이에 위치하도록 한 돌연변이 마우스를 제작하였고 Cre 유전자 재조합 아데노바이러스를 정맥 주사함으로써 APC유전자 억제를 간 특이적으로 일으켰다. 8개월 후 67%의 마우스에서 간암이 발생하였으며 APC 유전자가 비활성화된 간세포암에서 β -catenin의 신호경로가 강하게 활성화되었음이 밝혀졌다.⁸⁹⁻⁹¹ 다른 유도 시스템들과 비교했을 때, 아데노바이러스를 매개로 한 유도 시스템은 기술적인 어려움 없이 쉽게 사용할 수 있으며 특정 유전자의 발현 정도를 정확하게 조절할 수 있다. 하지만 아데노바이러스는 숙주의 염색체 내로 삽입되지 않기에 유전자 발현의 안정화되고 지속되는 발현에는 적당하지 않다. 언급된 형질 전환 간세포암 마우스 모델들은 인간의 암과 가장 흡사하게 모방하지만 경제적으로 시간적으로 많은 투자가 필요하다는 단점을 가지고 있다(Table 3).^{21,67,68,79,80,90,92-107}

4) DNA 혈관 주입 형질 전환 마우스 모델 (Hydrodynamics-based transfection)

최근 형질 전환 마우스 모델의 단점을 극복하는 DNA 혈관 주입 형질 전환 마우스 모델이 만들어졌다. 본 모델은 DNA 혈관 주입 방법과 함께 Sleeping Beauty Transposase 시스템을 조합하여 마우스 모델을 만든다. DNA 혈관 주입 방

Table 3. Genetically engineered mouse models for HCC

Genes	Incidence rate (%)	Latency (weeks)	References
AAT	100	52-90	92
APC ^{-/-}	67	38	90
c-Myc	55	65-90	93
E2F-1	33	52	21, 79, 94
EGF	100	24-36	95, 80
NEMO ^{-/-}	100	52	96-98
P53 ^{-/-}	10.9	60	99
PTEN ^{-/-}	66	44	100
SV40 T-antigen	100	20	68
TAK1 ^{-/-}	80	39	101
TGF- α	50	>52	67, 102
c-Myc + E2F1	100	26-39	79, 103
c-Myc + EGF	100	12-18	80
β -catenin(Δ ex3) + HRAS ^{G12V}	100	8	104
KRAS ^{G12V} + HBx	62.5	34	105
P53 ^{-/-} + c-Myc	75	21	106
PTEN ^{-/-} + GRP94 ^{-/-}	80	25	107

HCC, hepatocellular carcinoma.

법은 간단한 방법으로 연구자가 발현코자 하는 유전자를 가진 DNA 플라스미드를 물리적인 힘에 의해 세포 내로 삽입시키는 방법이다.¹⁰⁸ 하지만 이 방법은 플라스미드로부터 일시적인 발현만을 가능케 하며, Sleeping Beauty Transposase 시스템이 지속적인 유전자 발현을 보장한다. 애초에 플라스미드에 발현시키고자 하는 유전자를 특정한 반복서열(IRs) 사이에 위치하게 함으로써 Sleeping Beauty Transposase가 이 부위를 인지하여 염색체 내로 발현코자 하는 유전자를 삽입하게 한다.¹⁰⁹⁻¹¹¹ 근래에 이 방법을 이용하여 종양 발생 경로가 활성화되거나 종양 억제 경로가 비활성화된 다양한 DNA 혈관 주입 형질 전환 마우스 모델을 구현하였다(Table 4).¹¹²⁻¹²⁸

DNA 혈관 주입 형질 전환 마우스 모델을 제작하는 방법은 정상적인 마우스에 DNA 혈관 주입 방법을 통한 유전자의 삽입이다. c-Myc은 매우 잘 알려진 종양유전자로서 인간의 간세포암과 간모세포종에서 빈번하게 증폭되거나 과발현된다고 알려져 있다.^{129,130} 본 방법을 통해 만들어진 c-Myc 발현 형질전환 마우스는 유전자 삽입 5-8주 사이에 간암이 형성되는 결과를 보였다.¹²³ 결과적으로 이렇게 형성된 암세

포는 인간의 간모세포종과 비교했을 때 매우 유사한 조직학적 결과를 보였다. 또한 앞서 언급된 현미 주입법으로 제작되었던 c-Myc 발현 형질 전환 마우스의 결과와 비교했을 때 매우 유사한 결과를 보였다.⁶⁹ 간세포암에서는 세포의 대사와 증식, 성장 및 생존에 깊이 관여하는 AKT/mTOR 신호 경로의 활성화가 좋지 않은 결과와 동반된다고 알려져 있다.¹³¹ 활성화된 AKT를 지속적으로 발현토록 DNA 혈관 주입 방법을 이용해 제작된 형질전환 마우스에서는 주입 6개월 후 결과적으로 간지방증이 간암으로 발전하기도 하였다.¹²¹ 이러한 과정은 phosphatase and tensin homolog (PTEN) 유전자를 간 특이적으로 Knock-out시킨 형질전환 마우스 모델을 매우 유사하게 모방하였다.¹³² 이러한 연구들은 DNA 혈관 주입 방법을 사용한 형질전환 마우스 모델이 전통적인 방법의 형질전환 마우스 모델과 비교했을 때 믿을 만한 결과를 보임을 입증했으며 또한 기술적, 비용적 측면에서 높은 효율성을 증명했다.

하지만 간세포암은 복잡한 과정을 거쳐 발생되며 일반적으로 다양한 신호전달 경로의 활성화를 통해 이루어진다. 인간의 간세포암 중 15-30%에서 활성화된 돌연변이가 발견

Table 4. Mouse liver cancer models generated using hydrodynamic transfection

Genes	Tumor type	Mouse strain	Latency	References
NRAS-FAH + shP53	HCC	Fah-/-	~10 weeks	112
HBx-FAH + shP53	HCC	Fah-/-	~10 weeks	113
Rtl1 + FAH	HCC	Fah-/-	~9 months	114
NRAS ^{G12V}	Mixed HCC and ICC	Ink4A/Afr-/-	~7 weeks	115
c-Met + ΔN90 β-catenin	HCC	WT FVB/N	~3 months	116
NRAS ^{G12V} + ΔN90 β-catenin	HCC	WT FVB/N	~6 months	117
Spry2 ^{Y55F} + ΔN90 β-catenin	HCC	WT FVB/N	~6 months	117
Cyclin D1 + c-Met	HCC	WT FVB/N	~6 months	118
Bmi1 + NRAS ^{G12V}	HCC	WT FVB/N	~6 months	119
c-Met + Spry2 ^{Y55F}	HCC	WT FVB/N	~6 months	120
myr-AKT	HCC	WT FVB/N	~6 months	121
myr-AKT + NRAS ^{G12V}	Mixed HCC and ICC	WT FVB/N	3-4 weeks	122
c-Myc	HB	WT FVB/N	~6 weeks	123
myr-AKT + ΔN90 β-catenin	HCC	WT FVB/N and C57BL/6	~4 weeks	124
myr-AKT + Spry2 ^{Y55F}	HCC with emperipolesis	WT FVB/N	~3 to 4 months	125
HRAS ^{G12V} + shP53	Undifferentiated liver tumors	WT C57BL/6	~1 week	126
NICD1	ICC	WT FVB/N	~5 months	127, 128
myr-AKT + NICD	ICC	WT FVB/N	~ 3 weeks	127

HCC, hepatocellular carcinoma; ICC, intrahepatic cholangiocarcinoma; HB, hepatoblastoma.

된다고 알려진 β -catenin은^{71,133} DNA 혈관 주입 방법을 이용해 단독 발현했을 때 간세포암을 형성하지 못했다.¹¹⁶ 또한 전통적인 형질 전환 마우스 제작 시에도 같은 결과를 보여 종양유전자 단독 발현이 간암의 효과적인 발생에 충분치 않음을 알렸다.^{104,134}

DNA 혈관 주입 방법은 화학적 유도 모델이나 현미 주입법 형질전환 마우스 모델과 함께 사용될 수 있다. 예를 들어, Spry2는 정상적인 간 조직과 비교하여 간세포암에서 현저히 낮은 발현을 보였음이 처음으로 유전적 분석에 의해 확인되었다.¹³⁵ 또한 거의 절반에 달하는 인간 간세포암에서 Spry2의 소실을 보였다.¹¹⁷ Spry2는 종전의 생화학적인 연구에 있어서 Ras 신호 전달 경로를 억제하며 간암 발생 시에는 종양억제유전자 역할을 한다고 알려져 있다.¹³⁶ 이러한 종양억제유전자 역할을 보이는 Spry2를 연구하기 위해 knock-out 마우스가 만들어졌으나 생후 한 달을 생존하지 못하였다.¹³⁷ 이후 생존율을 높이고자 간 특이적으로 Spry2를 knock-out 하는 마우스 모델을 아데노바이러스를 매개로 한 Cre 단백질을 이용하여 제작하였지만 Spry2의 단독적인 발현은 생체 내에서 간세포암의 형성에는 충분하지 않았다.¹¹⁷ 이때 Spry2 유전자와 협력하여 간세포암을 발생시킬 다른 형질전환 마우스와 교배하는 방법 대신에 DNA 혈관 주입 방법을 이용함으로 β -catenin, AKT 혹은 c-Met을 추가 발현하게 함으로써 효과적인 간세포암을 발생하는 모델을 제작하였다.^{117,120,125} 이렇듯 DNA 혈관 주입 방법은 새로운 유전자나 신호전달 경로에 이상적인 접근법으로 평가된다.

결론

간세포암 연구에 있어서 이상적인 간세포암 모델을 만드는 것은 매우 중요하다. 성공적인 간세포암 실험 모델은 간세포암의 생물학적 행동의 충실하고 안정적인 모방을 보이고, 실제 암의 생물학적 문제를 반영해야 한다. 더 나아가 신뢰할 수 있으면서 높은 재현성을 보이고 기술적으로 간단하며 경제적으로 합리적이어야 한다. 종양 주변 환경과 다른 장기로의 전이 그리고 면역 체계의 변화는 종양의 성장과 심지어는 성질에도 영향을 끼칠 수 있기 때문에 종양 모델의 전반적인 목표는 종양과 종양을 둘러싼 환경 간의 관계에 초점을 맞추어야 한다. 현재까지 암을 모델링하는 노력은 종양유전자와 종양억제 유전자의 작용, 종양과 숙주 세포 간의 상호작용, 화학요법 제제에 대한 세포의 반응 그리고 종양 진행 단계에 따른 줄기 세포의 역할 등과 같은 간세

포암의 다양한 측면에 대한 통찰력을 창출했다. 앞으로 컴퓨터를 이용한 유전체 기능의 비교 분석은 전임상 연구를 위한 간세포암의 모델들의 정확성을 확인하고 평가하기 위한 강력한 도구가 될 것으로 보인다. 연구자들은 간세포암 모델들을 다룰 때에 어떠한 간세포암 모델도 간세포암에 대한 모든 질문에 답할 수 있는 것은 아니라는 것을 인식해야 하며, 연구 목적에 맞는 이상적인 모델을 선택하는 데 많은 노력을 기울여야 한다.

REFERENCES

1. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007;132:2557-2576.
2. Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer* 2006;6:674-687.
3. Chiang DY, Villanueva A, Hoshida Y, Peix J, Newell P, Minguez B, et al. Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2008;68:6779-6788.
4. Frese KK, Tuveson DA. Maximizing mouse cancer models. *Nat Rev Cancer* 2007;7:645-658.
5. Barnes JM, Schoental R. Experimental liver tumours. *Br Med Bull* 1958;14:165-167.
6. Gold LS, Slone TH, Manley NB, Bernstein L. Target organs in chronic bioassays of 533 chemical carcinogens. *Environ Health Perspect* 1991;93:233-246.
7. Newell P, Villanueva A, Friedman SL, Koike K, Llovet JM. Experimental models of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2008;48:858-879.
8. Hahn FF, Muggenburg BA, Boecker BB. Hepatic neoplasms from internally deposited ¹⁴⁴CeCl₃. *Toxicol Pathol* 1996;24:281-289.
9. McCay PB, Lai EK, Poyer JL, DuBose CM, Janzen EG. Oxygen- and carbon-centered free radical formation during carbon tetrachloride metabolism. Observation of lipid radicals in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 1984;259:2135-2143.
10. Goldfarb S, Pugh TD, Koen H, He YZ. Preneoplastic and neoplastic progression during hepatocarcinogenesis in mice injected with diethylnitrosamine in infancy. *Environ Health Perspect* 1983;50:149-161.
11. Koen H, Pugh TD, Goldfarb S. Centrilobular distribution of diethylnitrosamine-induced hepatocellular foci in the mouse. *Lab Invest* 1983;49:78-81.
12. Tsujiuchi T, Tsutsumi M, Sasaki Y, Takahama M, Konishi Y. Different frequencies and patterns of beta-catenin mutations in hepatocellular carcinomas induced by N-nitrosodiethylamine and a choline-deficient L-amino acid-defined diet in rats. *Cancer Res* 1999;59:3904-3907.

13. Li X, Benjamin IS, Alexander B. Reproducible production of thioacetamide-induced macronodular cirrhosis in the rat with no mortality. *J Hepatol* 2002;36:488-493.
14. Kang JS, Morimura K, Salim EI, Wanibuchi H, Yamaguchi S, Fukushima S. Persistence of liver cirrhosis in association with proliferation of nonparenchymal cells and altered location of alpha-smooth muscle actin-positive cells. *Toxicol Pathol* 2005;33:329-335.
15. Futakuchi M, Hirose M, Ogiso T, Kato K, Sano M, Ogawa K, et al. Establishment of an in vivo highly metastatic rat hepatocellular carcinoma model. *Jpn J Cancer Res* 1999;90:1196-1202.
16. Yoshino H, Futakuchi M, Cho YM, Ogawa K, Takeshita F, Imai N, et al. Modification of an in vivo lung metastasis model of hepatocellular carcinoma by low dose N-nitrosomorpholine and diethylnitrosamine. *Clin Exp Metastasis* 2005;22:441-447.
17. Solt DB, Medline A, Farber E. Rapid emergence of carcinogen-induced hyperplastic lesions in a new model for the sequential analysis of liver carcinogenesis. *Am J Pathol* 1977;88:595-618.
18. Yaswen P, Goyette M, Shank PR, Fausto N. Expression of c-Ki-ras, c-Ha-ras, and c-myc in specific cell types during hepatocarcinogenesis. *Mol Cell Biol* 1985;5:780-786.
19. Chandar N, Lombardi B, Locker J. c-myc gene amplification during hepatocarcinogenesis by a choline-devoid diet. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:2703-2707.
20. Nagy P, Everts RP, Marsden E, Roach J, Thorgerisson SS. Cellular distribution of c-myc transcripts during chemical hepatocarcinogenesis in rats. *Cancer Res* 1988;48:5522-5527.
21. Lee JS, Chu IS, Mikaelyan A, Calvisi DF, Heo J, Reddy JK, et al. Application of comparative functional genomics to identify best-fit mouse models to study human cancer. *Nat Genet* 2004;36:1306-1311.
22. Rao MS, Lalwani ND, Watanabe TK, Reddy JK. Inhibitory effect of antioxidants ethoxyquin and 2(3)-tert-butyl-4-hydroxyanisole on hepatic tumorigenesis in rats fed ciprofibrate, a peroxisome proliferator. *Cancer Res* 1984;44:1072-1076.
23. Groos J, Bannasch P, Schwarz M, Kopp-Schneider A. Comparison of mode of action of four hepatocarcinogens: a model-based approach. *Toxicol Sci* 2007;99:446-454.
24. Coulouarn C, Gomez-Quiroz LE, Lee JS, Kaposi-Novak P, Conner EA, Goldina TA, et al. Oncogene-specific gene expression signatures at preneoplastic stage in mice define distinct mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2006;44:1003-1011.
25. Poirier LA. Hepatocarcinogenesis by diethylnitrosamine in rats fed high dietary levels of lipotropes. *J Natl Cancer Inst* 1975;54:137-140.
26. Williams GM, Iatropoulos MJ, Wang CX, Jeffrey AM, Thompson S, Pittman B, et al. Nonlinearities in 2-acetylaminofluorene exposure responses for genotoxic and epigenetic effects leading to initiation of carcinogenesis in rat liver. *Toxicol Sci* 1998;45:152-161.
27. Calvisi DF, Ladu S, Factor VM, Thorgerisson SS. Activation of beta-catenin provides proliferative and invasive advantages in c-myc/TGF-alpha hepatocarcinogenesis promoted by phenobarbital. *Carcinogenesis* 2004;25:901-908.
28. Lee GH. Paradoxical effects of phenobarbital on mouse hepatocarcinogenesis. *Toxicol Pathol* 2000;28:215-225.
29. Rygaard J, Povlsen CO. Heterotransplantation of a human malignant tumour to "Nude" mice. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1969;77:758-760.
30. Céspedes MV, Casanova I, Parreño M, Manges R. Mouse models in oncogenesis and cancer therapy. *Clin Transl Oncol* 2006;8:318-329.
31. Killion JJ, Radinsky R, Fidler IJ. Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer Metastasis Rev* 1998-1999;17:279-284.
32. Kerbel RS. Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans: better than commonly perceived-but they can be improved. *Cancer Biol Ther* 2003;2(4 Suppl 1):S134-S139.
33. Hoffman RM. Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic. *Invest New Drugs* 1999;17:343-359.
34. Ma S, Chan KW, Hu L, Lee TK, Wo JY, Ng IO, et al. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology* 2007;132:2542-2556.
35. Ma S, Lee TK, Zheng BJ, Chan KW, Guan XY. CD133+ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway. *Oncogene* 2008;27:1749-1758.
36. Kornek M, Raskopf E, Tolba R, Becker U, Klöckner M, Sauerbruch T, et al. Accelerated orthotopic hepatocellular carcinomas growth is linked to increased expression of pro-angiogenic and prometastatic factors in murine liver fibrosis. *Liver Int* 2008;28:509-518.
37. Tuveson DA, Jacks T. Technologically advanced cancer modeling in mice. *Curr Opin Genet Dev* 2002;12:105-110.
38. Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:7380-7384.
39. Pattengale PK, Stewart TA, Leder A, Sinn E, Muller W, Tepler I, et al. Animal models of human disease. Pathology and molecular biology of spontaneous neoplasms occurring in transgenic mice carrying and expressing activated cellular oncogenes. *Am J Pathol* 1989;135:39-61.
40. Shuldiner AR. Transgenic animals. *N Engl J Med* 1996;334:653-655.
41. Jaenisch R. Transgenic animals. *Science* 1988;240:1468-1474.
42. Macleod KF, Jacks T. Insights into cancer from transgenic mouse models. *J Pathol* 1999;187:43-60.
43. Rustgi VK. The epidemiology of hepatitis C infection in the United States. *J Gastroenterol* 2007;42:513-521.
44. Singh M, Kumar V. Transgenic mouse models of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Rev Med Virol* 2003;13:243-253.

45. Szabó E, Páska C, Kaposi Novák P, Schaff Z, Kiss A. Similarities and differences in hepatitis B and C virus induced hepatocarcinogenesis. *Pathol Oncol Res* 2004;10:5-11.
46. Koike K, Moriya K, Iino S, Yotsuyanagi H, Endo Y, Miyamura T, et al. High-level expression of hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis in transgenic mice. *Hepatology* 1994;19:810-819.
47. Koike K. Hepatocarcinogenesis in hepatitis viral infection: lessons from transgenic mouse studies. *J Gastroenterol* 2002;37 Suppl 13:55-64.
48. Chisari FV, Filippi P, Buras J, McLachlan A, Popper H, Pinkert CA, et al. Structural and pathological effects of synthesis of hepatitis B virus large envelope polypeptide in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:6909-6913.
49. Chisari FV, Klopchin K, Moriyama T, Pasquinelli C, Dunsford HA, Sell S, et al. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. *Cell* 1989;59:1145-1156.
50. Levrero M. Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. *Oncogene* 2006;25:3834-3847.
51. Moriya K, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Tsutsumi T, Ishibashi K, et al. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* 1998;4:1065-1067.
52. Ray RB, Lagging LM, Meyer K, Ray R. Hepatitis C virus core protein cooperates with ras and transforms primary rat embryo fibroblasts to tumorigenic phenotype. *J Virol* 1996;70:4438-4443.
53. Ray RB, Meyer K, Ray R. Suppression of apoptotic cell death by hepatitis C virus core protein. *Virology* 1996;226:176-182.
54. McLauchlan J. Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat* 2000;7:2-14.
55. Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Aoyama T. Hepatitis C virus core protein induces spontaneous and persistent activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transgenic mice: implications for HCV-associated hepatocarcinogenesis. *Int J Cancer* 2008;122:124-131.
56. Tellinghuisen TL, Rice CM. Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. *Curr Opin Microbiol* 2002;5:419-427.
57. Kamegaya Y, Hiasa Y, Zukerberg L, Fowler N, Blackard JT, Lin W, et al. Hepatitis C virus acts as a tumor accelerator by blocking apoptosis in a mouse model of hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2005;41:660-667.
58. Jacob JR, Sterczar A, Toshkov IA, Yeager AE, Korba BE, Cote PJ, et al. Integration of woodchuck hepatitis and N-myc rearrangement determine size and histologic grade of hepatic tumors. *Hepatology* 2004;39:1008-1016.
59. Pagano JS, Blaser M, Buendia MA, Damania B, Khalili K, Raab-Traub N, et al. Infectious agents and cancer: criteria for a causal relation. *Semin Cancer Biol* 2004;14:453-471.
60. Chisari FV, Pinkert CA, Milich DR, Filippi P, McLachlan A, Palmiter RD, et al. A transgenic mouse model of the chronic hepatitis B surface antigen carrier state. *Science* 1985;230:1157-1160.
61. Toshkov I, Chisari FV, Bannasch P. Hepatic preneoplasia in hepatitis B virus transgenic mice. *Hepatology* 1994;20:1162-1172.
62. Lerat H, Honda M, Beard MR, Loesch K, Sun J, Yang Y, et al. Steatosis and liver cancer in transgenic mice expressing the structural and nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Gastroenterology* 2002;122:352-365.
63. Unoura M, Kobayashi K, Fukuoka K, Matsushita F, Morimoto H, Oshima T, et al. Establishment of a cell line from a woodchuck hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1985;5:1106-1111.
64. Abe K, Kurata T, Yamada K, Okumura H, Shikata T. Establishment and characterization of a woodchuck hepatocellular carcinoma cell line (WH44KA). *Jpn J Cancer Res* 1988;79:342-349.
65. Lee H, Kawaguchi T, Nomura K, Kitagawa T. Establishment and characterization of a diethylnitrosamine-initiated woodchuck hepatocyte cell line. *Hepatology* 1987;7:937-940.
66. Ohnishi S, Aoyama H, Shiga J, Itai Y, Moriyama T, Ishikawa T, et al. Establishment of a new cell line from a woodchuck hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1988;8:104-107.
67. Jhappan C, Stahle C, Harkins RN, Fausto N, Smith GH, Merlino GT. TGF alpha overexpression in transgenic mice induces liver neoplasia and abnormal development of the mammary gland and pancreas. *Cell* 1990;61:1137-1146.
68. Lou DQ, Molina T, Bennoun M, Porteu A, Briand P, Joulin V, et al. Conditional hepatocarcinogenesis in mice expressing SV 40 early sequences. *Cancer Lett* 2005;229:107-114.
69. Shachaf CM, Kopelman AM, Arvanitis C, Karlsson A, Beer S, Mandl S, et al. MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumour dormancy in hepatocellular cancer. *Nature* 2004;431:1112-1117.
70. Sandgren EP, Quaife CJ, Pinkert CA, Palmiter RD, Brinster RL. Oncogene-induced liver neoplasia in transgenic mice. *Oncogene* 1989;4:715-724.
71. de La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, Buendia MA, Soubrane O, et al. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:8847-8851.
72. Murakami H, Sanderson ND, Nagy P, Marino PA, Merlino G, Thorgeirsson SS. Transgenic mouse model for synergistic effects of nuclear oncogenes and growth factors in tumorigenesis: interaction of c-myc and transforming growth factor alpha in hepatic oncogenesis. *Cancer Res* 1993;53:1719-1723.
73. Calvisi DF, Thorgeirsson SS. Molecular mechanisms of hepatocarcinogenesis in transgenic mouse models of liver cancer. *Toxicol Pathol* 2005;33:181-184.
74. Factor V, Oliver AL, Panta GR, Thorgeirsson SS, Sonenshein GE, Arsur M. Roles of Akt/PKB and IKK complex in constitutive induction of NF-kappaB in hepatocellular carcinomas of transforming growth

- factor alpha/c-myc transgenic mice. *Hepatology* 2001;34:32-41.
75. Santoni-Rugiu E, Jensen MR, Thorgeirsson SS. Disruption of the pRb/E2F pathway and inhibition of apoptosis are major oncogenic events in liver constitutively expressing c-myc and transforming growth factor alpha. *Cancer Res* 1998;58:123-134.
76. Factor VM, Kiss A, Woitach JT, Wirth PJ, Thorgeirsson SS. Disruption of redox homeostasis in the transforming growth factor-alpha/c-myc transgenic mouse model of accelerated hepatocarcinogenesis. *J Biol Chem* 1998;273:15846-15853.
77. Calvisi DF, Factor VM, Ladu S, Conner EA, Thorgeirsson SS. Disruption of beta-catenin pathway or genomic instability define two distinct categories of liver cancer in transgenic mice. *Gastroenterology* 2004;126:1374-1386.
78. Calvisi DF, Factor VM, Loi R, Thorgeirsson SS. Activation of beta-catenin during hepatocarcinogenesis in transgenic mouse models: relationship to phenotype and tumor grade. *Cancer Res* 2001;61:2085-2091.
79. Conner EA, Lemmer ER, Sánchez A, Factor VM, Thorgeirsson SS. E2F1 blocks and c-Myc accelerates hepatic ploidy in transgenic mouse models. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;302:114-120.
80. Tönjes RR, Löhler J, O'Sullivan JF, Kay GF, Schmidt GH, Dalemans W, et al. Autocrine mitogen IgEGF cooperates with c-myc or with the Hcs locus during hepatocarcinogenesis in transgenic mice. *Oncogene* 1995;10:765-768.
81. Wang B, Hsu SH, Wang X, Kutay H, Bid HK, Yu J, et al. Reciprocal regulation of microRNA-122 and c-Myc in hepatocellular cancer: role of E2F1 and transcription factor dimerization partner 2. *Hepatology* 2014;59:555-566.
82. Hardouin SN, Nagy A. Mouse models for human disease. *Clin Genet* 2000;57:237-244.
83. Tumurbaatar B, Sun Y, Chan T, Sun J. Cre-estrogen receptor-mediated hepatitis C virus structural protein expression in mice. *J Virol Methods* 2007;146:5-13.
84. Hayashi S, McMahon AP. Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Dev Biol* 2002;244:305-318.
85. Mehassab MK, Bell SC, Habiba MA. The effects of tamoxifen and estradiol on myometrial differentiation and organization during early uterine development in the CD1 mouse. *Reproduction* 2009;138:341-350.
86. Higashi AY, Ikawa T, Muramatsu M, Economides AN, Niwa A, Okuda T, et al. Direct hematological toxicity and illegitimate chromosomal recombination caused by the systemic activation of CreERT2. *J Immunol* 2009;182:5633-5640.
87. Hsieh YJ, Liu RS, Hwu L, Ke CC, Wang FH, Wang HE, et al. Cre/loxP system controlled by specific promoter for radiation-mediated gene therapy of hepatoma. *Anticancer Res* 2007;27:1571-1579.
88. Wang Y, Krushel LA, Edelman GM. Targeted DNA recombination in vivo using an adenovirus carrying the cre recombinase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:3932-3936.
89. Vetter D, Cohen-Naftaly M, Villanueva A, Lee YA, Kocabayoglu P, Hannivoort R, et al. Enhanced hepatocarcinogenesis in mouse models and human hepatocellular carcinoma by coordinate KLF6 depletion and increased messenger RNA splicing. *Hepatology* 2012;56:1361-1370.
90. Colnot S, Decaens T, Niwa-Kawakita M, Godard C, Hamard G, Kahn A, et al. Liver-targeted disruption of Apc in mice activates beta-catenin signaling and leads to hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:17216-17221.
91. Harada N, Miyoshi H, Murai N, Oshima H, Tamai Y, Oshima M, et al. Lack of tumorigenesis in the mouse liver after adenovirus-mediated expression of a dominant stable mutant of beta-catenin. *Cancer Res* 2002;62:1971-1977.
92. Geller SA, Nichols WS, Kim S, Tolmachoff T, Lee S, Dyaico MJ, et al. Hepatocarcinogenesis is the sequel to hepatitis in Z#2 alpha 1-antitrypsin transgenic mice: histopathological and DNA ploidy studies. *Hepatology* 1994;19:389-397.
93. Thorgeirsson SS, Santoni-Rugiu E. Transgenic mouse models in carcinogenesis: interaction of c-myc with transforming growth factor alpha and hepatocyte growth factor in hepatocarcinogenesis. *Br J Clin Pharmacol* 1996;42:43-52.
94. Conner EA, Lemmer ER, Omori M, Wirth PJ, Factor VM, Thorgeirsson SS. Dual functions of E2F-1 in a transgenic mouse model of liver carcinogenesis. *Oncogene* 2000;19:5054-5062.
95. Borlak J, Meier T, Halter R, Spanel R, Spanel-Borowski K. Epidermal growth factor-induced hepatocellular carcinoma: gene expression profiles in precursor lesions, early stage and solitary tumours. *Oncogene* 2005;24:1809-1819.
96. Beraza N, Malato Y, Sander LE, Al-Masaoudi M, Freimuth J, Riethmacher D, et al. Hepatocyte-specific NEMO deletion promotes NK/NKT cell- and TRAIL-dependent liver damage. *J Exp Med* 2009;206:1727-1737.
97. Luedde T, Beraza N, Kotsikoris V, van Loo G, Nenci A, De Vos R, et al. Deletion of NEMO/IKKgamma in liver parenchymal cells causes steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 2007;11:119-132.
98. Seki E, Brenner DA. The role of NF-kappaB in hepatocarcinogenesis: promoter or suppressor? *J Hepatol* 2007;47:307-309.
99. Katz SF, Lechel A, Obenauf AC, Begus-Nahrman Y, Kraus JM, Hoffmann EM, et al. Disruption of Trp53 in livers of mice induces formation of carcinomas with bilineal differentiation. *Gastroenterology* 2012;142:1229-1239.e3.
100. Watanabe S, Horie Y, Kataoka E, Sato W, Dohmen T, Ohshima S, et al. Non-alcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma: lessons from hepatocyte-specific phosphatase and tensin homo-

- log (PTEN)-deficient mice. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22 Suppl 1:S96-S100.
101. Inokuchi S, Aoyama T, Miura K, Osterreicher CH, Kodama Y, Miyai K, et al. Disruption of TAK1 in hepatocytes causes hepatic injury, inflammation, fibrosis, and carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:844-849.
102. Lee GH, Merlino G, Fausto N. Development of liver tumors in transforming growth factor alpha transgenic mice. *Cancer Res* 1992;52:5162-5170.
103. Calvisi DF, Conner EA, Ladu S, Lemmer ER, Factor VM, Thorgeirsson SS. Activation of the canonical Wnt/beta-catenin pathway confers growth advantages in c-Myc/E2F1 transgenic mouse model of liver cancer. *J Hepatol* 2005;42:842-849.
104. Harada N, Oshima H, Katoh M, Tamai Y, Oshima M, Taketo MM. Hepatocarcinogenesis in mice with beta-catenin and Ha-ras gene mutations. *Cancer Res* 2004;64:48-54.
105. Ye H, Zhang C, Wang BJ, Tan XH, Zhang WP, Teng Y, et al. Synergistic function of Kras mutation and HBx in initiation and progression of hepatocellular carcinoma in mice. *Oncogene* 2014;33:5133-5138.
106. Klocke R, Bartels T, Jennings G, Brand K, Halter R, Strauss M, et al. Lack of p53 accelerates hepatocarcinogenesis in transgenic mice constitutively overexpressing c-myc in the liver. *FASEB J* 2001;15:1404-1406.
107. Chen WT, Tseng CC, Pfaffenbach K, Kanel G, Luo B, Stiles BL, et al. Liver-specific knockout of GRP94 in mice disrupts cell adhesion, activates liver progenitor cells, and accelerates liver tumorigenesis. *Hepatology* 2014;59:947-957.
108. Zhang G, Budker V, Wolff JA. High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum Gene Ther* 1999;10:1735-1737.
109. Ivics Z, Hackett PB, Plasterk RH, Izsvák Z. Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell* 1997;91:501-510.
110. Bell JB, Podetz-Pedersen KM, Aronovich EL, Belur LR, Mclvor RS, Hackett PB. Preferential delivery of the Sleeping Beauty transposon system to livers of mice by hydrodynamic injection. *Nat Protoc* 2007;2:3153-3165.
111. Aronovich EL, Bell JB, Khan SA, Belur LR, Gunther R, Koniar B, et al. Systemic correction of storage disease in MPS I NOD/SCID mice using the sleeping beauty transposon system. *Mol Ther* 2009;17:1136-1144.
112. Wangenstein KJ, Wilber A, Keng VW, He Z, Matise I, Wangenstein L, et al. A facile method for somatic, lifelong manipulation of multiple genes in the mouse liver. *Hepatology* 2008;47:1714-1724.
113. Keng VW, Tschida BR, Bell JB, Largaespada DA. Modeling hepatitis B virus X-induced hepatocellular carcinoma in mice with the Sleeping Beauty transposon system. *Hepatology* 2011;53:781-790.
114. Riordan JD, Keng VW, Tschida BR, Scheetz TE, Bell JB, Podetz-Pedersen KM, et al. Identification of rtl1, a retrotransposon-derived imprinted gene, as a novel driver of hepatocarcinogenesis. *PLoS Genet* 2013;9:e1003441.
115. Carlson CM, Frandsen JL, Kirchoff N, Mclvor RS, Largaespada DA. Somatic integration of an oncogene-harboring Sleeping Beauty transposon models liver tumor development in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:17059-17064.
116. Tward AD, Jones KD, Yant S, Cheung ST, Fan ST, Chen X, et al. Distinct pathways of genomic progression to benign and malignant tumors of the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:14771-14776.
117. Lee SA, Ho C, Roy R, Kosinski C, Patil MA, Tward AD, et al. Integration of genomic analysis and in vivo transfection to identify sprouty 2 as a candidate tumor suppressor in liver cancer. *Hepatology* 2008;47:1200-1210.
118. Patil MA, Lee SA, Macias E, Lam ET, Xu C, Jones KD, et al. Role of cyclin D1 as a mediator of c-Met- and beta-catenin-induced hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 2009;69:253-261.
119. Xu CR, Lee S, Ho C, Bommi P, Huang SA, Cheung ST, et al. Bmi1 functions as an oncogene independent of Ink4A/Arf repression in hepatic carcinogenesis. *Mol Cancer Res* 2009;7:1937-1945.
120. Lee SA, Ladu S, Evert M, Dombrowski F, De Murtas V, Chen X, et al. Synergistic role of Sprouty2 inactivation and c-Met up-regulation in mouse and human hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2010;52:506-517.
121. Calvisi DF, Wang C, Ho C, Ladu S, Lee SA, Mattu S, et al. Increased lipogenesis, induced by AKT-mTORC1-RPS6 signaling, promotes development of human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2011;140:1071-1083.
122. Ho C, Wang C, Mattu S, Destefanis G, Ladu S, Delogu S, et al. AKT (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1) and N-Ras (neuroblastoma ras viral oncogene homolog) coactivation in the mouse liver promotes rapid carcinogenesis by way of mTOR (mammalian target of rapamycin complex 1), FOXM1 (forkhead box M1)/SKP2, and c-Myc pathways. *Hepatology* 2012;55:833-845.
123. Chow EK, Fan LL, Chen X, Bishop JM. Oncogene-specific formation of chemoresistant murine hepatic cancer stem cells. *Hepatology* 2012;56:1331-1341.
124. Stauffer JK, Scarzello AJ, Andersen JB, De Kluyver RL, Back TC, Weiss JM, et al. Coactivation of AKT and β -catenin in mice rapidly induces formation of lipogenic liver tumors. *Cancer Res* 2011;71:2718-2727.
125. Wang C, Delogu S, Ho C, Lee SA, Gui B, Jiang L, et al. Inactivation of Spry2 accelerates AKT-driven hepatocarcinogenesis via activation of MAPK and PKM2 pathways. *J Hepatol* 2012;57:577-583.
126. Ju HL, Ahn SH, Kim DY, Baek S, Chung SI, Seong J, et al. Investigation of oncogenic cooperation in simple liver-specific transgenic mouse models using noninvasive in vivo imaging. *PLoS One* 2013;8:e59869.

127. Fan B, Malato Y, Calvisi DF, Naqvi S, Razumilava N, Ribback S, et al. Cholangiocarcinomas can originate from hepatocytes in mice. *J Clin Invest* 2012;122:2911-2915.
128. Evert M, Dombrowski F, Fan B, Ribback S, Chen X, Calvisi DF. On the role of notch1 and adult hepatocytes in murine intrahepatic cholangiocarcinoma development. *Hepatology* 2013;58:1857-1859.
129. Abou-Elella A, Gramlich T, Fritsch C, Gansler T. c-myc amplification in hepatocellular carcinoma predicts unfavorable prognosis. *Mod Pathol* 1996;9:95-98.
130. Cairo S, Armengol C, De Reyniès A, Wei Y, Thomas E, Renard CA, et al. Hepatic stem-like phenotype and interplay of Wnt/beta-catenin and Myc signaling in aggressive childhood liver cancer. *Cancer Cell* 2008;14:471-484.
131. Zhou Q, Lui VW, Yeo W. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in hepatocellular carcinoma. *Future Oncol* 2011;7:1149-1167.
132. Horie Y, Suzuki A, Kataoka E, Sasaki T, Hamada K, Sasaki J, et al. Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas. *J Clin Invest* 2004;113:1774-1783.
133. Thompson MD, Monga SP. WNT/beta-catenin signaling in liver health and disease. *Hepatology* 2007;45:1298-1305.
134. Cadoret A, Ovejero C, Saadi-Kheddouci S, Souil E, Fabre M, Romagnolo B, et al. Hepatomegaly in transgenic mice expressing an oncogenic form of beta-catenin. *Cancer Res* 2001;61:3245-3249.
135. Fong CW, Chua MS, McKie AB, Ling SH, Mason V, Li R, et al. Sprouty 2, an inhibitor of mitogen-activated protein kinase signaling, is down-regulated in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2006;66:2048-2058.
136. Mason JM, Morrison DJ, Basson MA, Licht JD. Sprouty proteins: multifaceted negative-feedback regulators of receptor tyrosine kinase signaling. *Trends Cell Biol* 2006;16:45-54.
137. Shim K, Minowada G, Coling DE, Martin GR. Sprouty2, a mouse deafness gene, regulates cell fate decisions in the auditory sensory epithelium by antagonizing FGF signaling. *Dev Cell* 2005;8:553-564.