

## มะเร็งท่อน้ำดี: แนวทางการรักษาด้วย molecular targeting strategies

อนุชา พัวไพโรจน์

ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ และ

ศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

### Cholangiocarcinoma: How to Treat by Molecular Targeting Strategies

Anucha Puapairoj

Department of Pathology, Faculty of Medicine and Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Khon Kaen University

มะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma, CCA) เป็นมะเร็งที่ถือว่าร้ายแรงที่สุดชนิดหนึ่ง มีการพยากรณ์โรคไม่ดีเพราะอัตราการเกิดโรคและอัตราการตายมีจำนวนพอๆกัน ประเทศไทยจัดเป็นประเทศที่มีอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งชนิดนี้สูง โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จากการทำทะเบียนมะเร็งชุมชนของจังหวัดขอนแก่น<sup>1</sup> พบอัตราป่วยในเพศชายเท่ากับ 94.8 ต่อประชากรชาย 100,000คนต่อปี และในเพศหญิงเท่ากับ 39.4 ต่อประชากรเพศหญิง100,000คนต่อปี และพบว่า ร้อยละ89 ของมะเร็งตับเป็นมะเร็งท่อน้ำดี Sriamporn et.al.<sup>2</sup> ได้รายงานอุบัติการณ์ในจังหวัดขอนแก่นระหว่างปี 2533-2543 ในกลุ่มที่มีอายุมากกว่า 35 ปีอยู่ที่ 93.8 ถึง 317.6 ต่อประชากร100,000 คนต่อปี การรักษาส่วนใหญ่ยังต้องพึ่งการผ่าตัด แต่ผลการรักษายังไม่เป็นที่น่าพอใจ Uttravichien & Buddhiaswasdi<sup>3</sup> รายงาน 5 year survival มีเพียง 8% เท่านั้น

ในประเทศไทยมีการการศึกษาทั้งทดลองในสัตว์ทดลองและการศึกษาทางระบาดวิทยา พบความสัมพันธ์ระหว่างพยาธิใบไม้ตับชนิด *Opisthorchis viverrini* (OV) และCCA<sup>4,5,6</sup> Sripa & Kaewkes<sup>7</sup> ได้ทำการวิจัยพบว่าสามารถตรวจพบ *Opisthorchis antigens* ในเยื่อท่อน้ำดีที่พยาธิใบไม้ตับอาศัยอยู่นอกจากนั้นยังพบว่ารอบท่อน้ำดีนั้นๆมีการอักเสบรุนแรงและ antigens ยังสามารถตรวจพบ antigens ได้ในท่อน้ำดีขนาดเล็กที่มีการอักเสบแม้จะไม่พบตัวพยาธิ นอกจากนี้ใน macrophagee, epithelioid cell, และ giant cell ก็ยังสามารถตรวจพบ antigens ดังกล่าวด้วย

นักวิทยาศาสตร์เชื่อว่า CCA เกิดจากmalignant transformation ของเซลล์เยื่อท่อน้ำดี(cholangiocyte)<sup>7,8,9</sup> ของท่อน้ำดีภายใน

และภายนอกตับ นอกจากนี้ยังมีสมมุติฐานว่าhepatic stem cell อาจเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของ intrahepatic CCA<sup>10</sup> แต่ยังคงการพิสูจน์หลักฐานที่ชัดเจน อย่างไรก็ตามการตรวจพบ CCA ชนิด intestinal type ที่มีทั้ง hepatocellular และ CCA อยู่ในก้อนเดียวกันน่าจะสนับสนุนสมมุติฐานความคิดดังกล่าว เป็นที่แน่ชัดว่ากระบวนการก่อเกิด CCA ประกอบไปด้วยการเปลี่ยนแปลงหลายขั้นตอน(multistep process) เริ่มตั้งแต่พบภาวะ early hyperplastic, (อาจพบ metaplasticได้ในบางครั้ง) แล้วตามด้วย dysplasia จนกระทั่งเป็นมะเร็ง ซึ่งคาดว่าเป็นผลจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ การอักเสบเรื้อรัง และการบาดเจ็บของเซลล์เยื่อท่อน้ำดี โดยอาจเกิดร่วมกับการมีการอุดตันของท่อน้ำดี การเกิดภาวะ primary sclerosing cholangitis (PSC), hepatolithiasis, Caroli's disease และ congenital choledochal cysts เป็นต้น

นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อมีการอักเสบทำให้ inflammatory cytokines (eg. TNF- $\alpha$ , IL-6) ไปจะกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ iNOS เพิ่มขึ้นทำงานมีผลทำให้

1. มีการสร้าง endogenous nitric oxide (NO)<sup>8,11</sup> NO เป็นสารที่ก่อให้เกิด DNA บาดเจ็บ, ยับยั้งการซ่อมแซม DNA repair, และยับยั้งกระบวนการ apoptosis ทำให้เกิดการคั่งของน้ำดีในท่อน้ำดีขนาดเล็กโดยมีการยับยั้งผ่าน cyclic-AMP-dependent ion transport functions<sup>12</sup>
2. มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ iNOS Cyclooxygenase-2 ((COX-2) upregulation)<sup>13</sup> ส่งเสริมให้มีการเจริญของเซลล์และยับยั้งกระบวนการ apoptosis

มีผลการศึกษาที่พบว่า bile acid และ deoxycholic acid กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ COX-2 ใน human H69 และ KMBC cell lines ผ่าน transactivation ของการกระตุ้นทาง epidermal growth factor receptor (EGFR)<sup>14,15</sup> และยังพบว่า bile acid ยังมีคุณสมบัติอีกด้านหนึ่งคือยับยั้ง การสลายตัวของ myeloid cell leukemia1 (Mcl-1) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ยับยั้ง apoptosis ในกลุ่ม Bcl-2<sup>16</sup>

ในรอบ 10 ปีที่ผ่านมาพบการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งท่อน้ำดีจำนวนมาก (ดูตารางที่ 1) สรุปที่สำคัญๆ ได้ดังนี้ (ดูบทความเพิ่มเติม การแสดงออกและการทำงานของจีนที่มีความสัมพันธ์กับโรคมะเร็งท่อน้ำดี ในฉบับเดียวกันนี้)

1. *K-ras mutations* ที่ codon 12 พบบ่อยใน CCA ชนิด hilar มากกว่าชนิด peripheral<sup>17,18</sup> โดยเฉพาะ มะเร็งที่เกิดในส่วนล่างของ common bile duct พบในชนิด periductal infiltrating มากกว่าชนิด mass forming<sup>19,20</sup> และพบในรายที่มีการกระจายไปต่อมน้ำเหลืองมากกว่ารายที่ไม่มีการกระจาย

2. *DCP4/Smad4* mutational inactivation *DCP4/Smad4* เป็น tumor suppressor genes พบว่ามีการผ่าเหล่า (mutation) ได้บ่อยใน CCA ที่เกิดใน distal bile duct มากกว่ามะเร็งที่เกิดในส่วน proximal และ intrahepatic<sup>21,22</sup>

3. *p53* และ *p16* mutation มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (overexpression) พบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ *p53* พบบ่อยใน distal CCA มากกว่าบริเวณ proximal และพบในชนิด intrahepatic nonpapillary มากกว่าชนิด intraductal papillary<sup>23</sup> มีข้อสันนิษฐานว่า *p53* dysregulation น่าจะเกิดในชั้นกลางหรือชั้นตอนท้ายๆ ของการ เกิดมะเร็ง<sup>23</sup> ส่วน point mutation ของ *p16* พบว่าน่าจะเกิดใน ตอนต้นของการเกิดมะเร็ง<sup>24</sup>

4. พบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ receptor tyrosine kinase (RTKs), ErbB-2, Met, upregulation of และ COX-2 ซึ่งพบว่าน่าจะเกิดในชั้นตอนต้นๆ<sup>7</sup>

5. การแสดงออกที่เพิ่มขึ้น (strong expression) ของ ErbB-2, Met, COX-2, Fas ligand<sup>25</sup> พบมากในการเกิดมะเร็งที่มี well-differentiation เปรียบเทียบกับ moderate หรือ poorly differentiation<sup>7</sup>

6. พบการแสดงออกที่ลดลง (down regulation) ของ  $\beta$ -catenin และ E-cadherin<sup>26,27</sup>, มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น ของ

aspartyl  $\beta$ -hydroxylase<sup>28</sup> สำหรับการแสดง ออกที่ลดลง, (decreased expression) ของ Fas receptor และ *p57*<sup>29</sup> พบว่ามีความสัมพันธ์กับมะเร็งที่มี high histologic grade<sup>26,27</sup>

7. การแสดงออกที่เพิ่มขึ้น ของ CyclinD1 พบบ่อยใน intrahepatic CCA ชนิด poor หรือ moderate differentiation ที่มี lymph node metastasis<sup>30</sup>

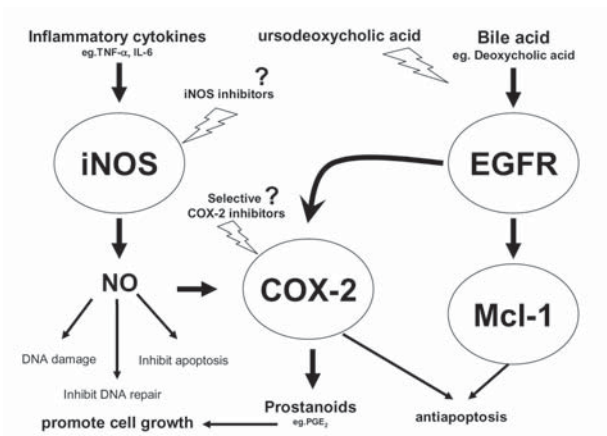
8. WISP1v ที่มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น พบความสัมพันธ์กับ lymphatic และ perineural invasion<sup>31</sup>

9. การแสดงออกของจีน human telomerase reverse transcriptase (hTERT) พบร่วมกับ intrahepatic CCA และมักพบในระยะเริ่มของการก่อมะเร็ง<sup>32</sup>

10. MUC1 apomucin expression พบแสดงออกที่เพิ่มขึ้นใน intrahepatic CCA ทั้งชนิด mass forming และ periductal infiltration การแสดงออกของจีนนี้ในบริเวณช้ำโตพลาสมิซึม high expression cytoplasmic location พบร่วมกับชนิด mass forming ที่มีอัตราการรอดชีพต่ำ<sup>33,34</sup> ส่วน MUC4 พบร่วมกับ มะเร็งชนิด mass forming intrahepatic CCA ที่มีอัตราการรอดชีพต่ำเช่นกัน<sup>35</sup> สำหรับ MUC5AC เป็น mucin อีกชนิดหนึ่งพบในมะเร็งชนิด intrahepatic CCA ที่มีอัตราการรอดชีพต่ำ นอกจากนี้ MUC2 เป็น intestinal type mucin ชนิดเดียวที่พบร่วมกับ well-differentiated และ non-invasive mucinous-type intraductal CCA ผู้ป่วยมีอัตราการรอดชีพสูงกว่าชนิดอื่นๆ<sup>35,36</sup>

## แนวทางการนำไปใช้ประโยชน์ในการรักษา

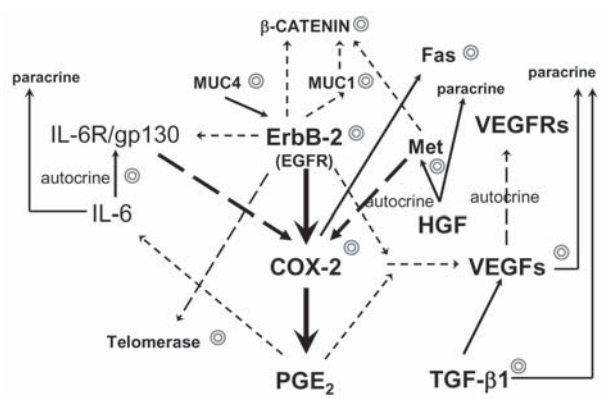
1. ความเข้าใจเกี่ยวกับ iNOS และ COX-2: การเจาะจงไปที่ตำแหน่งที่มีการแสดงออกของ iNOS และ COX-2 ร่วมกับตำแหน่งที่มี hydrophobic bile acid pool ที่มีการสะสมของ deoxycholic acid น่าจะเป้าหมายของการรักษาด้วยเคมีป้องกัน (chemoprevention) ของ PSC-related CCA มีการทดลองให้ hydrophilic bile acid ursodeoxycholic acid ในผู้ป่วย PSC แล้วพบว่าลดอุบัติการณ์ ของ colorectal dysplasia ที่เกิดในผู้ป่วยที่เป็น PSC และ ulcerative colitis ได้<sup>35</sup> หรือการใช้ selective iNOS inhibitors ก็มีลักษณะเป็นยาเคมีป้องกัน ใน colorectal และ esophageal carcinoma<sup>38,39</sup> มีการทดลองใช้ COX-2 inhibitors ใน colorectal carcinoma ทั้งในสัตว์ทดลองและมนุษย์<sup>39</sup> ในขณะนี้ยังไม่มีการศึกษาผลของสารดังกล่าวในมะเร็งท่อน้ำดีทั้งในสัตว์ทดลองและในมนุษย์ (ดูรูปที่ 1)



รูปที่ 1 แสดงผลของ inflammatory cytokines และ bile acids ใน CCA carcinogenesis

หมายเหตุ หมายถึงถึง potential targets for chemoprevention ดัดแปลงจาก Sirica A. Hepatology 2005; 41:5-15.

2. ความเข้าใจเกี่ยวกับปัจจัยที่ทำให้มี tumor growth, apoptosis, invasion และ tumor angiogenesis ทำให้เกิด preclinical study เพื่อหาแนวทางในการรักษาโดยพุ่งเป้าไปที่ MUC<sup>40</sup>, hTERT<sup>41</sup>, β-catenin<sup>42</sup>, VEGF/VEGFR<sup>43</sup>, TGF-β signaling pathways<sup>44</sup> เพื่อรักษา CCA เช่น combinational targeting of select RTK pathways (i.e., ErbB-2/EGFR) ร่วมกับ target อื่นๆ (COX-2) พบว่าได้ผลดีโดยมีผลทั้ง antitumor และ antiangiogenic (ดูรูปที่ 2)



รูปที่ 2 Molecular pathways ที่น่าจะเป็น potential therapeutic targets ใน primary well to moderately differentiated CCA  
หมายเหตุ ⊙ หมายถึงถึง potential molecular therapeutic targets

ตารางที่ 1 Molecular alterations in cCholangiocarcinoma

### Autonomous growth signaling

- HGF/met overexpression and activation
- IL-6, IL-6R/GP130 overexpression and activation
- ErbB-2 overexpression and activation
- K-ras activating mutations
- BRAF activating mutations
- COX-2 upregulation

### Abnormalities of DNA mismatch repair

- Microsatellite instability

### Immortalization

- Increase telomerase

### Inactivation of tumor suppressor genes

- p53: by point mutation; LOH ; mdm2
- APC: by LOH ; methylation
- p16ink4a : by point mutation; promoter methylation; allelic loss
- DPC4/Smad4 : by point mutation ; allelic loss

### Aberrant mucin Ag. Expression & homeodomain gene expression

- MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, CDX1, CDX2

### Cell cycle dysregulation

- increase cyclin D1 & p53
- decrease pRb, p16ink4a, p21waf1/cip1, p27kip1, p57kip2

### Antiapoptosis

- increase Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, COX-2
- decrease Fas

### Angiogenesis & desmoplasia

- Expression of VEGF, COX-2, bFGF, HGF, TGF-β1

### Invasion & metastasis

- decrease E-cadherin, a-catenin, b-catenin
- increase human aspartyl (asparaginyl) b-hydroxylase, WISP1v

ดัดแปลงจาก Sirica A. Hepatology 2005; 41:5-15.

อย่างไรก็ตามการจะนำการรักษาใหม่ๆ ที่ใช้ความรู้ด้านชีววิทยาโมเลกุลกับ CCA ยังต้องการการศึกษาทั้งในหลอดทดลองและในมนุษย์ต่อไป ยานี้ในกลุ่มนี้ ได้แก่

- Neutralizing antibodies
- Small drug RTK inhibitors
- Antisense vectors
- Small interfering RNA therapeutics

ซึ่งอาจจะอาศัย rodent models ที่มีอยู่เดิมเช่น Syrian hamsters-dimethylnitrosamine-*Opisthorchis viverrini*, rat-furan, rat-thiacetamide rat-furan model พบว่าโมเดลเหล่านี้เหมาะในการศึกษา carcinogenesis CCA ที่เกี่ยวกับ overexpression ของ *c-erbB-2*, *c-met* และ COX-2 up-regulation ส่วน rat-thiacetamide model จะพบเพียง over-expression ของ *c-erbB-2*, *c-met* เท่านั้น นอกจากนี้ rodent models แล้ว ยังมี การทดลอง transplant rat C611b CCA cell line syngeneic Fisher 344 rats พบว่าอาจเป็นทางเลือกที่มีประโยชน์ในการวิจัยเกี่ยวกับการรักษาได้<sup>45</sup>

กล่าวโดยสรุปการวินิจฉัยระยะเริ่มแรก การป้องกันและการรักษาด้วยวิธีใหม่ของมะเร็งท่อน้ำดียังเป็นเรื่องท้าทาย การรักษาด้วยการนำความรู้ทางชีววิทยาโมเลกุล molecular ที่มุ่งเน้นจะจัดการกับ malignant cholangiocyte และ tumor stromal cell เป็นแนวทางการรักษาใหม่ที่น่าจะช่วยยืดชีวิตหรือเพิ่มคุณภาพชีวิตให้กับผู้ป่วยได้

### เอกสารอ้างอิง

1. Vatanasapt V, Martin N, Sriplung H, Chindavijak K, Sontipong S, Sriamporn H, Parkin DM, Ferlay J. Cancer incidence in Thailand, 1988-1991, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1995;4: 475-83.
2. Sriamporn S, Pisani P, Pipitgool V, Suwanrungruang K, Kamsa-ard S, Parkin DM.. Prevalence of *Opisthorchis viverrini* infection and incidence of cholangiocarcinoma in Khon Kaen, Northeast Thailand. Trop Med Int Health 2004; 9: 588-94.
3. Uttaravichien T and Buddhisawasdi V. Experience of non-jaundiced cholangiocarcinoma. Hepatogastroenterology 1990; 37: 608-11.
4. Thamavit W, Bhamarapravati N, Sahaphong S, Vajrasthira S, Angsubhakorn S. Effects of dimethylnitrosamine on induction of cholangiocarcinoma in *Opisthorchis viverrini*-infected Syrian golden hamsters. Cancer Res 1978; 38: 4634-39.
5. International Agency for Research on Cancer. Infection with liver flukes (*Opisthorchis viverrini*, *Opisthorchis felinus* and *Clonorchis sinensis*). IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 1994; 61:121-75.

6. Vatanasapt V, Sripa B, Sithithaworn P, Mairiang E. Liver Flukes and Liver Cancer. In: Newton R, Beral V, Weiss RA, editors. Infections and Human Cancer. Bangkok.1999; p 313-43.
7. Sripa B and Kaewkes S. Relationship between parasite-specific antibody responses and intensity of *Opisthorchis viverrini* infection in hamsters. Parasite Immunol 2000.;22: 139-45.
8. Sirica AE, Lai GH, Endo K, Zhang Z, Yoon BI. Cyclooxygenase-2 and ERBB-2 in cholangiocarcinoma: potential therapeutic targets. Semin Liver Dis 2002; 22: 303-13.
9. Gores GJ. Cholangiocarcinoma: current concepts and insights. Hepatology 2003;37: 961-9.
10. Sell S, and Dunsford HA. Evidence for the stem cell origin of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. Am J Pathol 1989; 134: 1347-63.
11. Pascher A, Jonas S, Neuhaus P. Intrahepatic cholangiocarcinoma: indication for transplantation. J Hepatobiliary Pancreat Surg 2003;10: 282-7.
12. Spirlì C, Fabris L, Duner E, Fiorotto R, Ballardini G, Roskams T, Larusso NF, Sonzogni A, Okolicsanyi L, Strazzabosco M. Cytokine-stimulated nitric oxide production inhibits adenylyl cyclase and cAMP-dependent secretion in cholangiocytes. Gastroenterology 2003; 124: 737-53.
13. Ishimura N, Bronk SF, Gores GJ. Inducible nitric oxide synthase upregulates cyclooxygenase-2 in mouse cholangiocytes promoting cell growth. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2004; 287: G88-95.
14. Yoon JH, Higuchi H, Werneburg NW, Kaufmann SH, Gores GJ. Bile acids induce cyclooxygenase-2 expression via the epidermal growth factor receptor in a human cholangiocarcinoma cell line. Gastroenterology 2002;122: 985-93.
15. Werneburg NW, Yoon JH, Higuchi H, Gores GJ. Bile acids activate EGF receptor via a TGF-alpha-dependent mechanism in human cholangiocyte cell lines. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2003; 285: G31-6.
16. Yoon, J. H., N. W. Werneburg, Higuchi H, Canbay AE, Kaufmann SH, Akgul C, Edwards SW, Gores G J. Bile acids inhibit Mcl-1 protein turnover via an epidermal growth factor receptor/Raf-1-dependent mechanism. Cancer Res 2002; 62: 6500-5.
17. Ohashi K, Tstsumi M, Nakajima Y, Nakano H, Konishi Y. K-ras point mutations and proliferation activity in biliary tract carcinomas. Br J Cancer 1996 74: 930-5.
18. Isa T, Tomita S, Nakachi A, Miyazato H, Shimoji H, Kusano T, Muto Y, Furukawa M. Analysis of microsatellite instability, K-ras gene mutation and p53 protein overexpression in intrahepatic cholangiocarcinoma. Hepatogastroenterology 2002;49: 604-8.

19. Ohashi K, Nakajima Y, Kanehiro H, Tsutsumi M, Taki J, Aomatsu Y, Yoshimura A, Ko S, Kin T, Yagura K. Ki-ras mutations and p53 protein expressions in intrahepatic cholangiocarcinomas: relation to gross tumor morphology. *Gastroenterology* 1995;109: 1612-7.
20. Kang Y K, Kim WH, Lee HW, Lee HK, Kim YI. Mutation of p53 and K-ras, and loss of heterozygosity of APC in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Lab Invest* 1999; 79: 477-83.
21. Hahn SA, Bartsch D, Schroers A, Galehdari H, Becker M, Ramaswamy A, Schwarte-Waldhoff I, Maschek H, Schmiegel W. Mutations of the DPC4/Smad4 gene in biliary tract carcinoma. *Cancer Res* 1998;58 : 1124-6.
22. Argani PA, Shaukat A, Kaushal M, Wilentz RE, Su GH, Sohn TA, Yeo CJ, Cameron JL. Differing rates of loss of DPC4 expression and of p53 overexpression among carcinomas of the proximal and distal bile ducts. *Cancer* 2001;91: 1332-41.
23. Nakanuma Y, Harada K, Ishikawa A, Zen Y, Sasaki M. Anatomic and molecular pathology of intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003;10:265-81.
24. Tani M, Higuchi H, Burgart LJ, Gores GJ. p16INK4a promoter mutations are frequent in primary sclerosing cholangitis (PSC) and PSC-associated cholangiocarcinoma. *Gastroenterology* 2002;123:1090-8.
25. Shimonishi T, Isse K, Shibata F, Aburatani I, Tsuneyama K, Sabit H, Harada K, Miyazaki K, Nakanuma Y. Up-regulation of fas ligand at early stages and down-regulation of Fas at progressed stages of intrahepatic cholangiocarcinoma reflect evasion from immune surveillance. *Hepatology* 2002;32: 761-9.
26. Ashida K, Terada T, Kitamura Y, Kaibara N. Expression of E-cadherin, alpha-catenin, beta-catenin, and CD44 (standard and variant isoforms) in human cholangiocarcinoma: an immunohistochemical study. *Hepatology* 1998; 27:974-82.
27. Endo K, Ashida K, Miyake N, Terada T. E-cadherin gene mutations in human intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Pathol* 2001;193:310-7.
28. Maeda T, Sepe P, Lahousse S, Tamaki S, Enjoji M, Wands JR, de la Monte SM. Antisense oligodeoxynucleotides directed against aspartyl (asparaginy) beta-hydroxylase suppress migration of cholangiocarcinoma cells. *J Hepatol* 2003;38:615-22.
29. Ito Y, Takeda T, Sasaki Y, Sakon M, Yamada T, Ishiguro S, Imaoka S, Tsujimoto M, Monden M, Matsuura N. Expression of p57Kip2 protein in extrahepatic bile duct carcinoma and intrahepatic cholangiocellular carcinoma. *Liver* 2002; 22: 145-9.
30. Ito Y, Takeda T, Sasaki Y, Sakon M, Yamada T, Ishiguro S, Imaoka S, Tsujimoto M, Matsuura N. Expression and clinical significance of the G1-S modulators in intrahepatic cholangiocellular carcinoma. *Oncology* 2001; 60:242-51.
31. Tanaka S, Sugimachi K, Kameyama T, Maehara S, Shirabe K, Shimada M, Wands JR, Maehara Y. Human WISP1v, a member of the CCN family, is associated with invasive cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2003;37:1122-9.
32. Ozaki S, Harada K, Sanzen T, Watanabe K, Tsui W, Nakanuma Y. In situ nucleic acid detection of human telomerase in intrahepatic cholangiocarcinoma and its preneoplastic lesion. *Hepatology* 1999;30:914-9.
33. Higashi M, Yonezawa S, Ho JJ, Tanaka S, Irimura T, Kim YS, Sato E. Expression of MUC1 and MUC2 mucin antigens in intrahepatic bile duct tumors: its relationship with a new morphological classification of cholangiocarcinoma. *Hepatology* 1999;30:1347-55.
34. Matsumura N, Yamamoto M, Aruga A, Takasaki K, Nakano M. Correlation between expression of MUC1 core protein and outcome after surgery in mass-forming intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer* 2002;94:1770-6.
35. Pardi DS, Loftus EV Jr., Kremers WK, Keach J, Lindor KD. Ursodeoxycholic acid as a chemopreventive agent in patients with ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 2003;124: 889-93.
36. Ishikawa A, Sasaki M, Ohira S, Ohta T, Oda K, Nimura Y, Chen MF, Jan YY, Yeh TS, Nakanuma Y. Aberrant expression of CDX2 is closely related to the intestinal metaplasia and MUC2 expression in intraductal papillary neoplasm of the liver in hepatolithiasis. *Lab Invest* 2004;84:629-38
37. Rao CV, Indranie C, Neuhaus P. Chemopreventive properties of a selective inducible nitric oxide synthase inhibitor in colon carcinogenesis, administered alone or in combination with celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Cancer Res* 2002;62: 165-70.
38. Chen T, Nines RG, Peschke SM, Kresty LA, Stoner GD. Chemopreventive effects of a selective nitric oxide synthase inhibitor on carcinogen-induced rat esophageal tumorigenesis. *Cancer Res* 2004;64: 3714-7.
39. Koehne, C. H. and R. N. Dubois. COX-2 inhibition and colorectal cancer. *Semin Oncol* 2004;31: 12-21.
40. Singh AP, Moniaux N, Chauhan SC, Meza JL, Batra SK. Inhibition of MUC4 expression suppresses pancreatic tumor cell growth and metastasis. *Cancer Res* 2004;64: 622-30.
41. Shammas MA, Koley H, Beer DG, Li C, Goyal RK, Munshi NC. Growth arrest, apoptosis, and telomere shortening of Barrett's-associated adenocarcinoma cells by a telomerase inhibitor. *Gastroenterology* 2004;126: 1337-46.



42. Kwong KY, Zou Y, Day, CP, Hung MC. The suppression of colon cancer cell growth in nude mice by targeting beta-catenin/TCF pathway. *Oncogene* 2002;21: 8340-6.
43. Bockhorn M, Tsuzuki Y, Xu L, Frilling A, Broelsch CE, Fukumura D. Differential vascular and transcriptional responses to anti-vascular endothelial growth factor antibody in orthotopic human pancreatic cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 2003;9: 4221-6.
44. Subramanian G, Schwarz RE, Higgins L, McEnroe G, Chakravarty S, Dugar S, Reiss M. Targeting endogenous transforming growth factor beta receptor signaling in SMAD4-deficient human pancreatic carcinoma cells inhibits their invasive phenotype1. *Cancer Res* 2004;64: 5200-11.
45. Sirica AE, Lai GH, Zhang Z. Biliary cancer growth factor pathways, cyclo-oxygenase-2 and potential therapeutic strategies. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16: 363-72.

