

ラットにおけるコリン欠乏アミノ酸食により誘発された 肝結節性肥大と肝細胞癌におけるテロメラーゼ活性

奈良県立医科大学附属がんセンター腫瘍病理学教室

長谷川清彦

TELOMERASE ACTIVITY IN HYPERPLASTIC NODULES AND HEPATOCELLULAR CARCINOMAS INDUCED BY A CHOLINE DEFICIENT L-AMINO ACID DEFINED DIET IN RATS

KIYOHICO HASEGAWA

Department of Oncological Pathology, Cancer Center, Nara Medical University

Received August 26, 1996

Abstract: Telomerase activities in hyperplastic nodules and hepatocellular carcinomas (HCCs) induced by a choline deficient L-amino acid defined (CDAA) diet were examined by TRAP assay in rats. Male F 334 rats, 6 weeks old, received a CDAA diet for 10, 50 or 75 weeks. Hyperplastic nodules and HCCs were noted in rats fed a CDAA diet for 50 and 75 weeks, respectively. As a control, normal livers from 6 week old rats were obtained. Normal liver and background parenchyma of rats fed either of the diets for 10 weeks or 50 weeks showed weak telomerase activities. In contrast, markedly increased telomerase activities were found in hyperplastic nodules and HCCs. These results suggest that increased telomerase activity may be one biological phenomenon of preneoplastic lesions for evolution to HCCs in rat liver.

Index Terms

telomerase, hepatocarcinogenesis, choline deficient L-amino acid defined diet, rats

緒 言

肝癌は、実験的にもヒトにおいても質的に異なる多段階過程を経て発生する事が実証されている。その発生要因としては肝炎ウイルスと環境化学発癌物質の関与が強く示唆されている。コリン欠乏アミノ酸食は、コリンを含むことなく蛋白成分をアミノ酸で置換した半合成食で、既知の発癌物質を含むことなくラットに投与すると酸化的DNA傷害を誘発して、52週間にて、高頻度に肝細胞癌を発生せしめる内因性の有用な肝発癌系である^{1,2)}。この実験系の病理学的な特色は、早期に、肝細胞の脂肪変性と壊死及び結合織の増生が見られ、脂肪性肝硬変を背景とした肝硬変合併肝癌にある。これらの変化は、ヒトの肝癌発生を標的とする基礎的研究にとって重要である。

近年、染色体の末端に位置するテロメアに関する研究は分子生物学的手法の進歩と共に、その生物学的役割が次第に明らかとなりつつある。ヒトを含む脊椎動物のテロメアの構造は、(TTAGGG)_nという6塩基の単純な繰り返し配列からなり^{3,4)}、ヒト体細胞では、約10 kbp、マウスやラットでは、約100 kbpの長さを占める^{5,6)}(Table 1)。テロメアは、染色体の安定化や内部遺伝子の発現に関与していると考えられている⁷⁾。テロメラーゼは、テロメアの反復配列に相補的なRNA配列を含むリボヌクレオ蛋白質で、このRNA配列を鋳型として、染色体末端にTTAGGGの配列を付加する酵素である⁸⁾。

ヒトを含む脊椎動物の体細胞をin vitroで培養して継代を続けると、細胞分裂に伴いテロメアが、短縮し、やがて細胞は、分裂を停止する(老化, M1, Hayflickの限

界). 一方, トランスホームした細胞では, 正常細胞の分裂寿命を越えて分裂を継続するが, テロメア長が限界にまで達すると, 染色体の安定性が保持できなくなり, 死滅する(M 2, crisis). ところが, 稀にテロメラーゼが活性化された細胞では, テロメア長が安定化し, 無限の増殖能を有することになる(不死化). しかしながら, 生殖細胞と癌細胞は, 分裂寿命を確保して, 子孫は, 永遠に生き続けうるし, 細胞自体も無限の増殖能を有することになる. この不死化の過程において, テロメア長の変化とテロメラーゼ活性上昇の相関が指摘されるに至ってい

る⁹⁾(Fig. 1). 本研究は質的に異なる肝の多段階発癌実験系を用い, 前癌病変とされる肝の結節性肥大と肝細胞癌について, 近年, Kim ら¹⁰⁾によって開発されたテロメラーゼ活性測定法(TRAP ASSAY)を改良し, それら細胞の, 不死化を検索すると共に, 前癌病変細胞から癌細胞の不死化を阻害する基礎的情報を得ることを目的とした.

材料および方法

1. 動物とその処理

Table 1. Sequence of telomeric repeats in various species

Holotrichous	Ciliates Tetrahymena	TTGGGG
Flagellates	Trypanosoma	TTAGGG
Fungus	Candida	ACGGATGTCTAACTTCTTGGTGT
	Cryptococcus	TTA (G) ₄₋₆
Nematoda	Ascaris	TTAGGC
	C. elegance	TTAGGC
Insect	Moth	TTAGG
Vertebrata	Human	TTAGGG
	Mouse	TTTAGGG

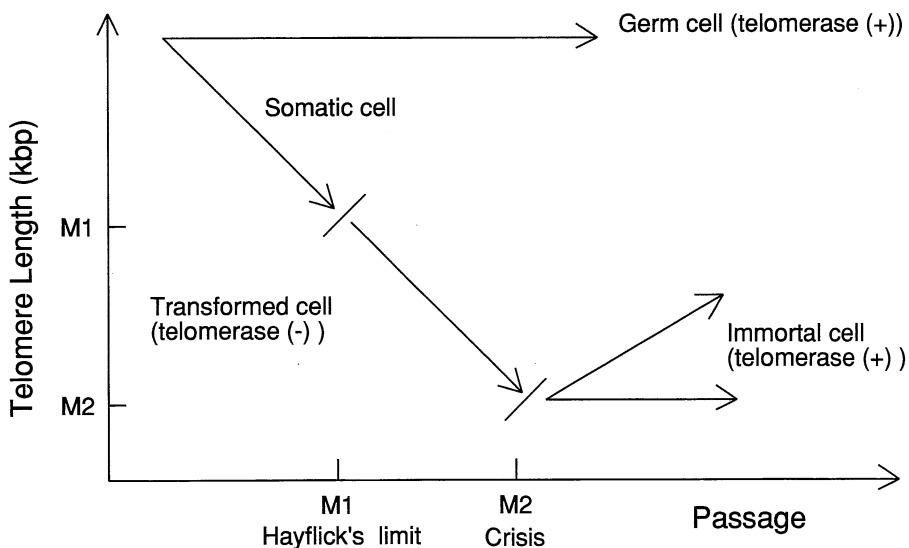


Fig. 1. Hypothesis about telomere shortning and activation of telomerase.

動物は6週令の雄にF344ラット(日本エスエルシー,
静岡)を用いた。実験開始前に、基礎食で、6週間飼育し
た。コリン欠乏アミノ酸食又は、コリン添加アミノ酸食

(生産番号518753又は518754)はDyets株式会社(Beth-
lehem, PA, 米国)より購入した。それらの食餌の組成の
詳細については、既に発表している^{1,2)}。実験は、第一群

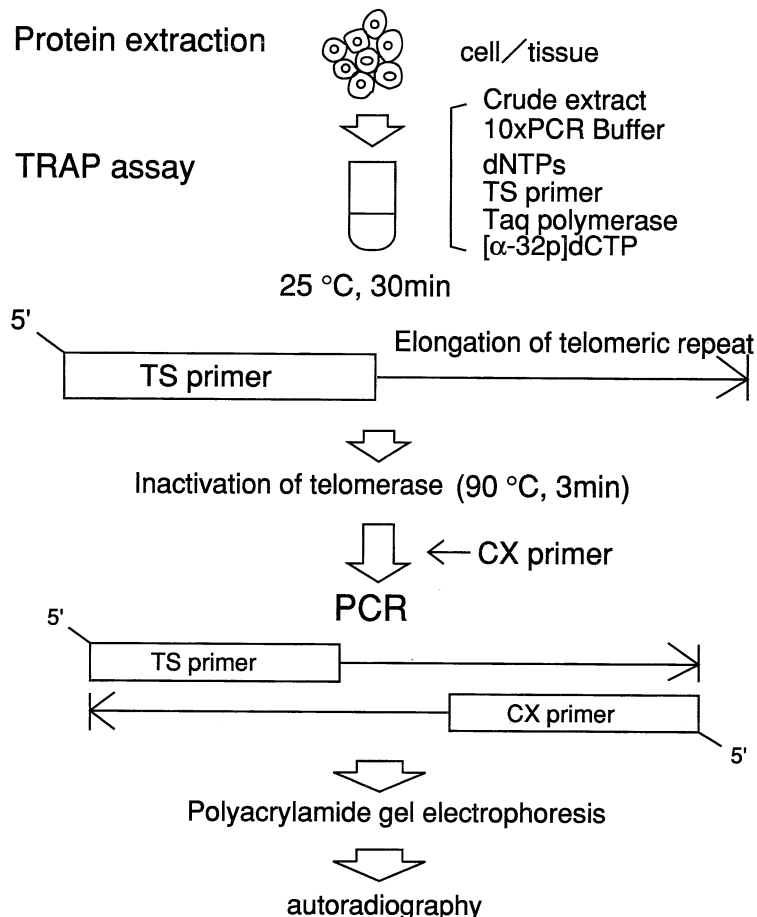


Fig. 2. TRAP assay protocol.

Table 2. Contents of buffers used for TRAP assay

	Extraction Buffer	PCR Buffer
Human	10 mM Tris-Cl (pH 7.5), 1 mM MgCl ₂ , 1 mM EGTA, 0.1 mM PMSF (or 0.1 mM AEBSF), 5 mM BME, 0.5% CHAPS, 10% glycerol	20 mM Tris-Cl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl ₂ , 63 mM KCl, 0.005% Tween 20, 1 mM EGTA
Mouse	10 mM Tris-Cl (pH 7.5), 1 mM MgCl ₂ , 1 mM EGTA, 0.1 mM AEBSF, 5 mM BME, 0.5% CHAPS, 10% glycerol	30 mM Tris-Cl (pH 8.4), 1.5 mM MgCl ₂ , 68 mM KCl, 5 mM BME, 0.5 mM EGTA, 0.05% Tween 20, 0.05% NP 40, 0.01% gelatin
Rat Hamster	23 mM HEPES (pH 7.5), 6.9 mM KCl, 2.3 mM MgCl ₂ , 2.3 mM DTT, 0.23 mM PMSF, RNase inhibitor	30 mM Tris-Cl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl ₂ , 68 mM KCl, 5 mM BME, 0.5 mM EGTA, 0.05% Tween 20, 0.05% NP 40, 0.01% gelatin

は、コリン欠乏アミノ酸食投与群、第二群は、コリン添加アミノ酸食投与群よりなり、3-5匹の動物を実験開始後、10、50、75週にて、屠殺した。なお6週齢の基礎食で飼育した3匹のラットを正常対照動物として、屠殺し、肝を採取した。コリン欠乏アミノ酸食又はコリン添加アミノ酸食を10週間投与した動物においては、屠殺時に、肝全体を摘出し、直ちに、凍結保存とした。また、コリン欠乏アミノ酸食を、50週又は、75週投与した動物にお

いては、肉眼的に、結節と癌及び非腫瘍部を識別し、それらの病変をそれぞれ別個に摘出して、-80℃にて凍結保存した。肝及び病変の一部は、組織学的染色を行い、光学顕微鏡下で観察した。

2. 蛋白抽出液の作製

肝組織からの蛋白抽出は、基本的には、既に報告されている方法に従ったが^{10,11)}、Table 2に示す如く緩衝液の組成を改良して行った。即ち凍結保存された組織を冷

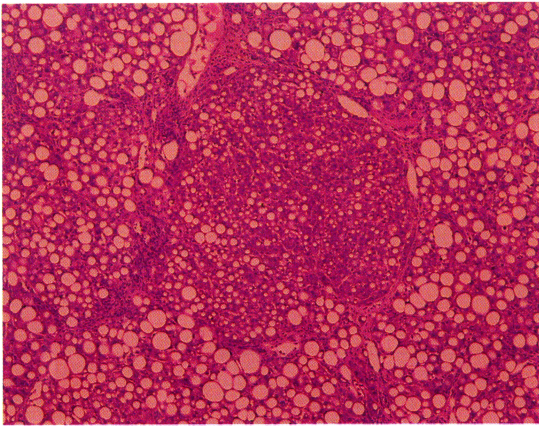


Fig. 3. Histological finding of focus induced by a CDAA diet for 10 weeks in rats (H & E, ×100).

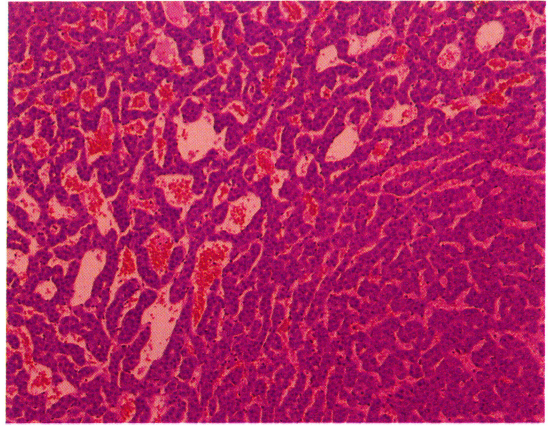


Fig. 5. Histological finding of hepatocellular carcinoma, well differentiated type, induced by a CDAA diet for 75 weeks in rats (H & E, ×200)

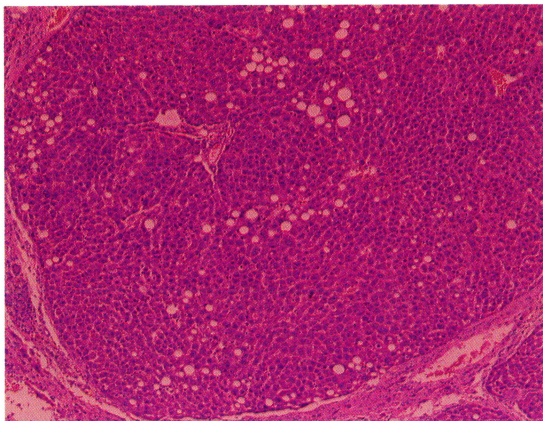


Fig. 4. Histological finding of hyperplastic nodule induced by a CDAA diet for 50 weeks in rats (H & E, ×75).

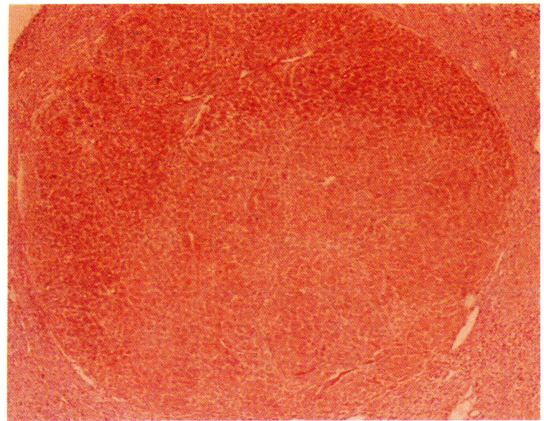


Fig. 6. GGT-positive hyperplastic nodule induced by a CDAA diet for 50 weeks in rats (×100).

緩衝液[23 mM HEPES(pH 7.5), 6.9 mM KCl, 2.3 mM MgCl₂, 2.3 mM DDT, 0.23 mM PMSF, 2 U/ml RNAGuard (Pharmacia, Japan), 2.3 μM ロイペプチン, 2.3 μM Pepstain A)]にて、溶解し10分間氷上にて静置した後、テフロンベッセルを用いてホモジナイズした。30分間、同液にてインキュベートせしめた後、4℃にて12000 rpmで10分間の遠心を行った。その後、1/4容量の5 M NaClをサンプルに添加し、4℃にて10万Gで1時間遠心した。その上清を用いて、テロメラーゼの活性を測定した。なお、蛋白質の定量にDCプロテインアッセイキット(BioRad, USA)を用いた。

3. テロメラーゼ定量法(Fig. 2)

テロメラーゼ活性は、既に報告されている方法に基づき^{10,11)}、Table 2に示す如くPCR緩衝液の組成を改良して測定した。操作はPCR緩衝液[30 mM Tris-Cl(pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 68 mM KCl, 5 mM BME, 0.5 mM EGTA, 0.05 % NP 40, 0.05 % Tween 20], 0.1 μgのTSプライマー(5'-AATCCGTCGAG-CAGAGTT-3'), 50 μM dNTPs, 3単位のTaq DNAポリメラーゼ(Pharmacia, Japan), 0.4 μlのα-³²P-dCTP(3000 Ci/mmol)と6 μgの蛋白抽出液をmixした50 μlを25℃にて、30分間インキュベートし、その後

反応液を90℃、3分間加熱しテロメラーゼを失活させた後、0.1 μgのCXプライマー(5'-CCCTTACCCTTTACCCTTTACCCTAA-3')を加えた。その後、PCR反応を、95℃にて30秒、50℃にて30秒、72℃にて45秒の条件で30サイクル反応を行った。RNaseに対する感受性の決定については、数個のサンプルを用いて、37℃30分、RNase 0.5 μg濃度で、インキュベートし、テロメラーゼ活性の定量を行った。陰性対照として、TSプライマー又は、CXプライマーを添加しない蛋白抽出液を用いた。PCR産物の25 μlを、10%のポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行った後、ゲルを乾燥させオートラジオグラフィーを行い、BAS 1000イメージアナライザーを用いて、定量的に解析した。得られた6 bpのladderは最下段を除いて、下段から2~4の3つのバンドのシグナルを測定し、その合計を活性値とした¹¹⁾。正常肝、コリン欠乏アミノ酸食処理肝、コリン欠乏アミノ酸食に誘導された結節性肝肥大と肝癌及びコリン添加アミノ酸食を投与した肝について、各々比較検索した。

結 果

1. 組織学的変化

コリン欠乏アミノ酸食を10週間投与した肝において

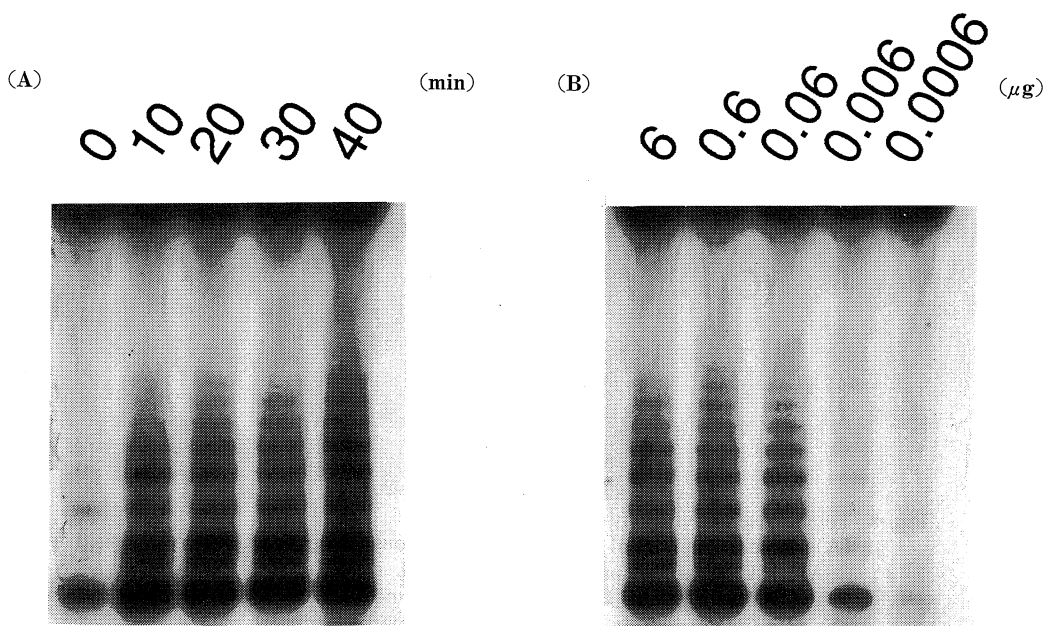


Fig. 7. (A) : Telomerase patterns as a function of incubation period in rat liver.

(B) : Telomerase pattern as a function of protein concentrations.

は、肝細胞の脂肪変性と、線維の増生および肝細胞の増殖巣が観察された(Fig. 3)。コリン欠乏アミノ酸食を50週間投与された肝においては、肝細胞よりなる結節性肥大(Fig. 4)と75週において肝細胞癌の発生を認めた(Fig. 5)。発生した結節性肥大においては、 γ -グルタミ

ールトランスフェラーゼ陽性を示し(Fig. 6)、肝細胞癌は何れも、索状構造を示す高分化の癌であった。結節性肥大と肝細胞癌において明らかなリンパ球浸潤は認められなかった。

2. テロメラーゼ活性

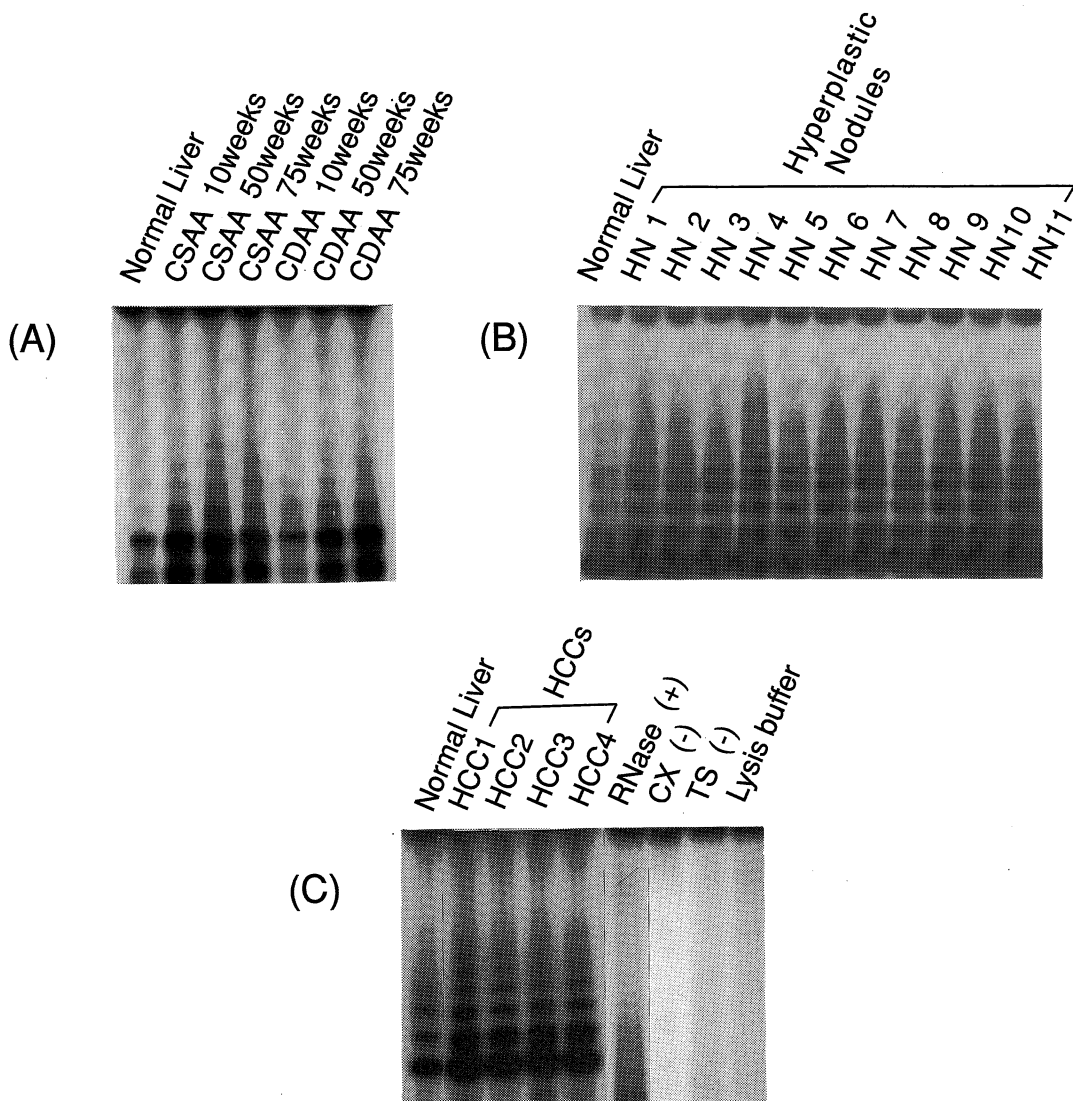


Fig. 8. Telomerase activities by TRAP assay.

(A) : Results for normal liver and noncancerous tissues from rats receiving CSAA or CDAA diets for 10, 50 or 75 weeked.

(B) : Results for normal liver and hyperplastic nodules induced by administration of a CDAA diet for 50 weeks. HN:hyperplastic nodule.

(C) : Results for normal liver and HCCs induced by administration of a CDAA diet for 75 weeks. RNase (+) : HCC1 extract treated with RNaseA ; CX (-) : HCC1 extract without CX primer, TS (-) : HCC1 extract without TS primer, Lysis buffer and primer without tissue extract.

Table 3. Densitometric quantification of telomerase activities in hyperplastic nodules and HCCs induced by a CDAA diet in rats

Samples	Densitometric quantification	
	(P-B) ^{a)} /mm ²	Telomerase activity relative to normal liver ^{b)}
(A)		
Normal liver	17.4	1.00
CSAA 10 wks	20.7	1.19
CSAA 50 wks	25.4	1.46
CSAA 75 wks	23.6	1.36
CDAA 10 wks	20.4	1.17
CDAA 50 wks	22.3	1.28
CDAA 75 wks	23.4	1.34
(B)		
Normal liver	25.6	1.00
HN 1	110.1	4.30
HN 2	132.2	5.16
HN 3	136.0	5.31
HN 4	176.0	6.88
HN 5	125.0	4.88
HN 6	154.9	6.05
HN 7	119.4	4.66
HN 8	96.2	3.76
HN 9	102.2	3.99
HN 10	100.6	3.93
HN 11	84.4	3.30
(C)		
Normal liver	20.5	1.00
HCC 1	129.8	6.33
HCC 2	91.6	4.47
HCC 3	123.5	6.02
HCC 4	100.2	4.89

a) P-B: Photostimulating luminescence-Background

b) Ratios of telomerase activities to the normal liver control value

Fig. 7 はインキュベーション時間と蛋白抽出物の容量に依存したラット肝におけるテロメラーゼ活性を示す。6 bp の ladder が、6 μ g の蛋白濃度で 25°C、30 分処理により、その活性が、明らかに把握されている (Fig. 7A)。抽出物を、6 μ g から 100 倍に希釈しても、テロメラーゼ活性が得られている事により (Fig. 7B)、本実験に関して、ラット肝におけるテロメラーゼ活性の定量法の有効性が判明した。Fig. 8 に正常肝、コリン添加アミノ酸食およびコリン欠乏アミノ酸食を投与した肝及び結節性肥大と肝細胞癌におけるテロメラーゼ活性を示す。Table 3 は、その結果を定量化した結果を示している。Fig. 8 と Table 3 において明らかになく、11 個の結節性肥大病変及び 4 個の肝細胞癌において、正常肝及びコリン添加ア

ミノ酸食、コリン欠乏アミノ酸食の非病変部に対し明らかに、テロメラーゼ活性の上昇がみられた。また、RNase 処理を行ったサンプル、CX または TS プライマーを添加しないサンプルにおいては ladder は検出されなかった。

考 察

近年、種々のヒト悪性腫瘍におけるテロメラーゼ活性の増加が頻繁に報告されている。テロメラーゼ活性は、ヒト正常組織においては、生殖細胞、造血前駆細胞、リンパ球及び表皮組織を除いて、テロメラーゼ活性は認められないのに対し^{10,12,13)}、肺癌¹⁴⁾、乳癌¹⁰⁾、前立腺癌^{10,15)}、大腸癌^{10,16)}、肝細胞癌^{10,17)}、脳腫瘍^{10,18)}、卵巣

Table 4. Reports about telomerase activity in malignant neoplasms

	Tissue	Telomerase activity	
		Non-tumor tissue or normal tissue	Tumor tissue
Human	testis	100%	—
	ovary	100%	100%
	lung	4.4%	80.1%
	colon	0%	95.6%
	stomach	6.1%	84.8%
	prostate	0%	88%
	kidney	0%	72.7%
	liver	3.8%	84.8%
	mammary gland	3.2%	92.9%
	adrenal	0%	94%
	head and neck	37.5%	87.5%
	brain	—	65.6%
	blood	80.6%	91.3%
	Mouse	skin	—
Rat	colon	+	++

癌¹⁹⁾, 悪性リンパ種¹⁰⁾, ウイルムス腫瘍¹⁰⁾, 頭頸部腫瘍¹⁰⁾, 横紋筋肉腫¹⁰⁾, 平滑筋肉腫¹⁰⁾で, その増加が見られる。一方, マウスやラットの正常組織においては, ヒトと異なりテロメラーゼの活性が検出されている^{20,21)}。これらのヒトとマウス, ラット間における正常組織のテロメラーゼ活性化の差異は, ヒトの培養細胞より齧歯類の培養細胞のほうが不死化しやすいという現象と関係があるのかもしれない²⁰⁾。動物腫瘍におけるテロメラーゼ活性を検索した報告は極めて少なく, 発癌過程におけるテロメラーゼの関与を, 明らかにした報告は, マウスの皮膚発癌系とラットの大腸癌での報告のみである^{11,21)}。Bednarek ら¹¹⁾は, マウスの皮膚におけるイニシエーション・プロモーションの発癌系にて, 初期の乳頭腫から後期の乳頭腫へ進展する過程へのテロメラーゼの活性上昇を報告している。本研究で用いた結節性肥大組織は, 肝細胞癌の前癌病変として受け入れられており, γ -グルタミールトランスフェラーゼ陽性を示すことより, 不可逆的病変として考えられる²²⁾。本研究で用いた 11 個の結節性肥大のサンプルは, 直径 3~5 mm の大きさで, γ -グルタミールトランスフェラーゼは, びまん性に, 陽性を示し, 全ての結節において, テロメラーゼ活性の上昇が見られた。この結果は, コリン欠乏アミノ酸食により誘発された γ -グルタミールトランスフェラーゼが陽性を示す結節性肥大細胞が, 既に, 不死化され, 永遠の増殖能を獲得していることを示唆するものである。この事実は, ヒト肝癌細胞におけるテロメアの短縮とテロメラーゼ活性の上昇の報告とを考え合わせると, 興味深く肝癌

発癌過程における悪性増殖能獲得に関するテロメア長の変化と酵素活性上昇との関与が明かとなった。更に, 興味深いことは, 北川ら²³⁾, ラットに 2 アセチルアミノフロレンを投与した肝の結節性肥大より細胞を培養し, フェノバルビタールで, プロモートすることにより, 可移植系の実験系を確立している。この実験系は, 発癌物質で誘発された結節性肥大細胞が, 強い増殖能を有していることを示すもので, 本実験結果は, 結節性肥大細胞の不死化を裏づけるものである。

ラットの肝では, ヒトの肝に比べて, 正常においてもテロメラーゼ活性が検出された。更に, 結節性肥大細胞と肝癌細胞においては明らかな活性上昇があり, ヒトと同様テロメラーゼ活性上昇は, 細胞の不死化と増殖能を判断しうる有用な指標となるものと考えられる。テロメア長の変化との関連においては, 本実験系において, 新たな研究が必要であろう。

結 語

ラットにおけるコリン欠乏アミノ酸食で誘発した結節性肥大と肝細胞癌におけるテロメラーゼ活性を, TRAP 法を用いて検索し以下の結果を得た。

- (1) ラット正常肝細胞においては, ヒトと異なりテロメラーゼの活性が検出された。
- (2) 結節性肥大と肝細胞癌においては, 正常肝組織に比してテロメラーゼ活性の著明な上昇が検出された。

以上の結果より, ラット肝発癌過程における結節性肥大の肝細胞癌への生物学的特性が示された。さらに, 本

実験モデルがヒト悪性腫瘍におけるテロメラーゼの活性化をtargetとした新たな癌治療に有用な情報源となりうることを示された。

本研究は、文部省科学研究補助金がん重点研究1, および厚生省がん研究助成金による補助を受けたものであることを付記する。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導、御校閲を賜りました奈良県立医科大学附属がんセンター腫瘍病理学教室小西陽一教授に深謝を捧げるとともに、御助言、御校閲を賜った生化学教室 吉原紘一郎教授、口腔外科学教室杉村正仁教授に深謝いたします。さらに本研究に直接御指導賜った同腫瘍病理学教室辻内俊文助手、堤雅弘講師に感謝の意を表します。また終始御協力いただきました腫瘍病理学教室の諸兄に感謝いたします。

文 献

- 1) Nakae, D., Yoshiji, H., Maruyama, H., Kinugasa, T., Denda, A. and Konishi, Y. : Production of 8-hydroxydeoxydeoxyguanosine in live DNA and glutamyltransferase-positive hepatocellular lesions in rats given a choline-deficient, L-amino acid-defined diet. *Jpn. J. Cancer Res.* 81: 1081-1084, 1990.
- 2) Nakae, D., Yoshiji, H., Mizumoto, Y., Horiguchi, K., Shiraiwa, K., Tamura, K., Denda, A. and Konishi, Y. : High incidence of hepatocellular carcinoma in by a choline deficient L-amino acid defined diet in rats. *Cancer Res.* 52: 5042-5045, 1995.
- 3) Moyzis, R. K., Buckingham, J. M., Cram, S., Dani, M., Deaven, L. L., Jones, M. D., Meyene, J., Ratliff, R. L. and Wu, J. J.-R. : A highly conserved repetitive DNA sequence(TTAGGG)_n, present at the telomere of human chromosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 6622-6626, 1988.
- 4) Heyene, J., Raniff, R. L. and Hoyzis, R. K. : Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 86: 7049-7053, 1989.
- 5) Makavov, V. L., Lejnine, S., Bedoyan, J. L. and Angmore, J. P. : Nucleosomal organization of telomere-specific chromatin in rat. *Cell* 73: 775-787, 1993.
- 6) Allshire, R. C., Dempster, M. and Hastie, N. D. : Human telomeres contain at least three types of G-rich repeat distributed non-randomly. *Nucleic Acids Res.* 17: 4611-4627, 1989.
- 7) Wright, W. E. and Shay, J. W. : Telomere positional effects and the regulation of Malar senescence. *TIG* 1992 8: 193-197, 1992.
- 8) Greider, C. W. : Telomerase biochemistry and regulation, *Telomers* (Blackburn EH, Greider CW. eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, p 35-68, 1995.
- 9) Harley, C. B. : Telomere loss mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res.* 256271-28210, 1991.
- 10) Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L. C., Coviello, G. H., Wright, W. E., Weinrich, S. L. and Shay, J. W. : Specific association of human telomerase activity with immortal cell and cancer. *Science* (Washington DC), 266: 2011-2015, 1994.
- 11) Bednarek, A., Budunova, I., Slaga, T. J. and Aldaz, C. M. : Increase telomerase activity in mouse skin premalignant progression. *Cancer Res.* 55: 4566-4569, 1995.
- 12) Hiyama, K., Hirai, Y., Kyoizumi, S., Akiyama, H., Hiyama, E., Piatyzek, M. A., Shay, J. W., Ishioka, S. and Yamakido, M. : Activation of telomerase in human lymphocytes. *J. Immunol.* 155: 3711-3715, 1995.
- 13) Taylor, R. S., Ramirez, R. D., Ogushi, M., Chaffins, M., Piatyzek, M. A. and Shay, J. W. : Detection of telomerase activity in malignant and nonmalignant skin conditions. *J. Invest. Dermatol.* 196: 759-765, 1996.
- 14) Hiyama, K., Hiyama, E., Ishioka, S., Yamakido, M., Inai, K., Gazdar, A. F., Piatyszek, M. A. and Shay, J. W. : Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* 87: 895-902, 1995.
- 15) Sommerfeld, H.-J., Meeker, A. K., Piatyszek, M. A., Bova, G. S., Shay, J. W. and Coffey, D. S. : Telomerase activity: a prevalent marker of malignant human prostate tissue. *Cancer Res.* 56: 218-222, 1996.

- 16) **Chadeneau, C., Hay, K., Hirte, H. W., Gallinger, S. and Bacchetti, S.** : Telomerase activity associated with acquisition of malignancy in human colorectal cancer. *Cancer Res.* **55** : 2533-2536, 1995.
- 17) **Tahara, H., Nakanishi, T., Kitamoto, M., Nakashio, R., Shay, J. W., Tahara, E., Kajiyama, G. and Ide, T.** : Telomerase activity in human liver tissues : Comparison between chronic liver disease and hepatocellular carcinomas. *Cancer Res.* **55** : 2734-2736, 1995.
- 18) **Langford, L. A., Piatyszek, M. A., Xu, R., Scholod, S. C. Jr. and Shay, J. W.** : Telomerase activity in human brain tumors. *Lancet.* **346** : 1267-1268, 1995.
- 19) **Counter, C. M., Hirte, H. W., Bacchetti, S. and Harley, C. B.** : Telomerase activity in human ovarian carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** : 2900-2904, 1994.
- 20) **Prowse, K. R. and Greider, C. W.** : Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** : 4818-4822, 1995.
- 21) **Yoshimi, N., Ino, N., Suzui, M., Hara, A., Nakatani, K., Sato, S., and Mori, H.** : Telomerase activity of normal tissues and neoplasms in rat colon carcinogenesis induced by methylazoxymethanol acetate and its difference from that of human colonic tissues. *Mol. Carcinog.* **16** : 1-5, 1996.
- 22) **Enomoto, K. and Farber, E.** : Kinetics of phenotypic maturation of remodeling of hyperplastic nodules during liver carcinogenesis. *Cancer Res.* **42** : 2330-2335, 1982.
- 23) **Kitagawa, T., Watanabe, R., Kayano, T. and Sugano, H.** : In vitro carcinogenesis of hepatocytes obtained from acetylaminofluorene-treated rat liver and promotion of their growth by phenobarbital. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* **91** : 747-754, 1980.