



Title	Cellular analysis of c-Ha-ras gene expression in the rat liver after CCl4 administration
Author(s)	佐々木, 裕
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36886
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文について をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	佐々木	裕
学位の種類	医学博士	
学位記番号	第 8750	号
学位授与の日付	平成元年6月9日	
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当	
学位論文題目	Cellular analysis of c-Ha-ras gene expression in the rat liver after CCl ₄ administration (四塩化炭素投与後ラット肝における c-Ha-ras 遺伝子発現動態の細胞レベルで検討)	
論文審査委員	(主査) 教授 鎌田 武信	
	(副査) 教授 森 武貞	教授 遠山 正彌

論文内容の要旨

(目 的)

肝再生・分化過程における細胞性癌遺伝子の役割については、最近多くの報告がなされており、これら遺伝子発現と再生・分化との間に密接な関連がある事が示唆されている。特に細胞性癌遺伝子の一つである c-Ha-ras 遺伝子は、その遺伝子産物である p21 蛋白が GTP, GDP 結合能を有する事から、再生・分化に携わる細胞外シグナルに対する細胞応答に関与するものと考えられている。

一方、肝再生・分化は障害部位に対応し、小葉内偏倚性をもっておこなわれる事が報告されている。しかしながら、c-Ha-ras 遺伝子発現についての従来の報告は、whole liver を用いた検討のみで、in situ の解析は皆無である。

本研究では in situ hybridization を用いて肝再生モデルを対象に、c-Ha-ras 遺伝子発現を解析し、遺伝子発現の偏倚性の有無の検討、および発現に携わる細胞の同定を行った。

(方 法)

肝再生モデルは、SD 系雄性ラットに四塩化炭素 (CCl₄)・オリーブ油 (1:1) 混合液 (0.25ml/100g B. W.) を胃管にて投与し作製した。投与後 12hrs, 24hrs, 48hrs, 72hrs の時点で空腹下に下記の検討に供した。正常群としてはオリーブ油のみを投与したラットを用いた。

1. In situ hybridization : 麻酔下に開腹し、2% paraformaldehyde を含む 0.1M phosphate buffer で肝の門脈灌流固定を行い、摘出後厚さ 10 μ m の凍結切片を作製しスライドガラスに貼付した。次にスライドガラスを prehybridization 溶液に室温で 1 hr 反応させた後、プローベとして ³⁵S-labeled v-Ha-ras fragment (880bp) を含む hybridization 溶液にて 42°C で 12hrs 反応させた。その後乳剤

に浸漬し 0℃で 7 日間 exposure した。

コントロール実験には、³⁵S-labeled pBR322 をプローベとして用いた。

2. 免疫組織学的検討：連続切片を用いて抗 p21 蛋白マウスモノクローナル抗体、もしくは抗 γ -GTP 山羊抗体を第一抗体とした ABC 法を行った。
3. ノーザンブロット：各時点において guanidine thiocyanate-cesium chloride 法、および oligo-dT affinity chromatography 法により回収した poly(A)⁺mRNA を agarose-formaldehyde gel で分離し、nitrocellulose filter に transfer した後、³²P-labeled v-Ha-ras fragment を含む hybridization 溶液と反応させ、その後の 3 日間 exposure した。

(成 績)

正常肝では c-Ha-ras mRNA-cDNA の hybrid を示す silver grain を有する肝細胞が、小葉内に少数散見されるのみであった。CCl₄ 投与後 12hrs の病理学的変化出現前の段階から、小葉中心域、中間域に grain の集簇を有する肝細胞が観察されるようになった。投与後 24hrs になると小葉中心域、中間域に脂肪変性、風船様変性、壊死が観察されるようになり、これらの周辺に強い grain の集簇を有する肝細胞が多数認められた。このような c-Ha-ras 遺伝子発現は、投与後 24hrs でピークを示し、投与後 48hrs では減弱しはじめ、投与後 72hrs ではほぼ正常肝のレベルに復した。一方、p21 蛋白発現動態は遺伝子発現動態とはほぼ一致しており、p21 蛋白陽性細胞が小葉内偏倚性をもって観察された。しかし p21 蛋白の消褪は、遺伝子発現に比して時間的に遅い傾向にあった。c-Ha-ras 遺伝子発現は肝実質細胞のみならず非実質細胞にも認められ、 γ -GTP 陽性により同定された oval cell に一致して、grain の集簇が観察された。

ノーザンブロット法による解析では、1.2kb の単一バンドが観察され、CCl₄ 投与後 24hrs をピークにした c-Ha-ras 遺伝子の発現が、半定量的にも確認された。

(総 括)

ラット CCl₄ 投与後再生肝モデルにおいて、細胞性癌遺伝子である c-Ha-ras 遺伝子は、小葉内偏倚性をもって病理学的変化の出現前より発現し始め、病理学的変化の出現に伴いその周辺で更に強く発現した。このような遺伝子の発現は、肝実質細胞のみならず非実質細胞である oval cell においても観察された。

論文の審査結果の要旨

本研究は、肝再生過程における細胞性癌遺伝子の一つである c-Ha-ras 遺伝子の発現を、ラット四塩化炭素再生肝モデルを対象に in situ hybridization 法を用いて解析したものである。c-Ha-ras 遺伝子は、障害部位に対応し小葉内偏倚性を持って発現しており、その発現は DNA 合成と時間的にはほぼ一致する事を明かにした。また遺伝子発現には肝実質細胞のみならず非実質細胞も関与している事を明かにした。本研究は再生肝における細胞性癌遺伝子の発現を、in situ で初めて解析したものであり、再生

肝における細胞性癌遺伝子の役割を検討するうえで、新たな知見をもたらすものである。
従って学位に値すると考える。