The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| 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">大阪大学の博士論文について</a>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

【25】

| | |
|---|---|
| 氏名・(本籍) | 佐々木　裕（さささき　ゆたか） |
| 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<br>**(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)<br>教授　鎌田　武信<br>(副査)<br>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で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（$CCl_4$）・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10μmの凍結切片を作製しスライドグラスに貼付した。次にスライドグラスをprehybridization溶液に室温で1hr反応させた後，プローベとして$^{35}$S-labeled v-Ha-ras fragment（880bp）を含むhybridization溶液にて42℃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，$^{35}$S-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-cecium 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，$^{32}$P-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。$CCl_4$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，$CCl_4$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$CCl_4$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。