

氏名	たか いし しげ お 高 石 繁 生
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2414 号
学位授与の日付	平 成 13 年 11 月 26 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学位論文題目	Identification of a Novel Alternative Splicing of Human FGF Receptor 4: Soluble-Form Splice Variant Expressed in Human Gastrointestinal Epithelial Cells (ヒト線維芽細胞増殖因子受容体4型の新規選択的スプライシングの同定: ヒト消化管上皮細胞に発現する可溶型変異スプライス)
論文調査委員	(主 査) 教 授 今 村 正 之 教 授 武 藤 誠 教 授 千 葉 勉

論 文 内 容 の 要 旨

線維芽細胞増殖因子(以下 FGF と略)は現在、哺乳類において23種のファミリー遺伝子から構成されることが判明しているが、その受容体は1-4型までの4種のファミリー遺伝子が同定されているに過ぎない。FGFの多様な作用は、その受容体が各種の選択的スプライシングにより、リガンドとの親和性の異なる様々な受容体を形成することにより発揮されていると考えられている。

FGF受容体のうち1・2・3型については、細胞外領域の3つの免疫グロブリン様繰り返し配列の、3番目の配列のC端側半分をコードするエクソン2個が入れ替わることにより、選択的スプライシングが形成されている。しかし FGF 受容体4型については、そのゲノム遺伝子の構造解析から、対応するエクソンは1個しかないことが判明している。FGF受容体1-3型の他の選択的スプライシングとして、(1回)膜貫通領域をコードするエクソンが欠失またはフレームシフトを起こすことにより、膜貫通領域のない可溶型受容体が各々に存在するが、4型にはそのような可溶型受容体の存在は報告されていなかった。

今回、ヒト消化管上皮細胞の増殖・分化を司るチロシンキナーゼ・ファミリー遺伝子を調べる目的で、ヒト胎児小腸培養細胞 Intestine 407 及び大腸癌培養細胞 Caco-2 におけるヒト FGF 受容体4型遺伝子の発現を RT-PCR 法により解析したところ、新規選択的スプライシングとして、膜貫通領域の欠失した受容体を同定した。この変異スプライスは、遺伝子の塩基配列を解析した結果、膜貫通領域をコードする9番目のエクソンが完全に欠失し、従来9番目のイントロンとみなされていた配列によって完全に置き換えられていた。その他のエクソン、すなわち細胞外領域をコードするエクソン1-8、及び細胞内領域をコードするエクソン10-18は、共に全く変化を認めず、とりわけシグナル配列を含むエクソン2が保たれているので、可溶型受容体であることが示唆された。

この変異スプライスは膜貫通型受容体と共に、ヒト食道・胃・大腸・膵臓および胃癌培養細胞 KATO-III・GCIY、膵癌培養細胞 ASPC1 のいずれにも発現していたが、マウスおよびラットの胃・小腸・大腸には変異スプライスの発現は認められず、膜貫通型受容体のみが発現していた。また単一細胞 RT-PCR 法を用いて、変異スプライスと膜貫通型受容体とが、大腸癌培養細胞 Caco-2 において同一細胞上に同時に発現していることが確認された。

この変異スプライスが、実際に可溶型受容体であることをタンパク質レベルで検証するため、膜貫通型受容体および変異スプライスの全長 cDNA を発現するプラスミドを構築し、COS7 細胞に遺伝子導入して一過性に発現させ、その培養上清および細胞内での発現をウエスタン・ブロッティング法により解析した。その結果、膜貫通型では細胞内のみしか発現が認められなかったが、変異スプライシングでは培養上清および細胞内の両方に発現が認められた。以上の結果から、今回同定された FGF 受容体4型の新規変異スプライスは、可溶型受容体であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

線維芽細胞増殖因子（FGF）は、消化管上皮細胞の増殖・分化に深く関与しているが、その作用機構の詳細は不明である。FGFには23種の遺伝子が存在するが、その受容体は4種が同定されているに過ぎない。FGFの多様な作用は、その受容体が選択的スプライシングにより、リガンドとの親和性の異なる様々な受容体を形成することにより発揮されると考えられている。FGF受容体1・2・3型には膜貫通領域の欠失した可溶性受容体が存在することが既に報告されていたが、4型については不明であった。

本研究では、消化管上皮細胞におけるヒト FGF 受容体 4 型遺伝子の発現を RT-PCR 法で解析することにより、新規選択的スプライシングとして膜貫通領域の欠失した受容体を初めて同定した。この受容体は、膜貫通領域をコードする 9 番目のエクソンが完全に欠失し、従来 9 番目のイントロンとみなされていた配列によって完全に置き換えられていた。この変異スプライスは膜貫通型受容体と共に、ヒト食道・胃・大腸・膵臓および各種の胃癌・大腸癌・膵癌培養細胞に発現していた。また単一細胞 RT-PCR 法を用いて、変異スプライスと膜貫通型受容体とが同一細胞上に同時に発現していることが確認された。この変異スプライスが実際に可溶性受容体であることは、変異スプライスの全長 cDNA を発現するプラスミドを構築し、COS7 細胞に遺伝子導入して一過性に発現させ、その培養上清での発現をウエスタン・ブロッティング法で解析することにより、タンパク質レベルで実証された。

以上の研究は、消化管上皮細胞の増殖・分化における線維芽細胞増殖因子の作用機構の解明に貢献し、消化器病学の進展に寄与するところが大きい。従って、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成13年6月25日実施の論文内容とそれに関する試問を受け、合格と認められたものである。