

Title	FGFスーパーファミリーと皮膚再生の関係
Sub Title	The relationship between FGF superfamily and skin regeneration
Author	青木, 麻利江(Aoki, Marie)
Publisher	
Publication year	2020
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2019.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>マウス胎仔皮膚創傷モデルを用いて、胎生13日の創傷部は完全に再生するが、胎生15日以降は皮膚が完全には再生しないという発見に基づいて、皮膚の再生メカニズムに迫った。胎生13日の創傷部と胎生15日の創傷部で、fibroblast growth factor receptor (FGFR) の発現に明らかな違いを発見し、そのリガンドとなる分子の絞り込みから1種のFGFファミリーに絞り込むことができた。本研究に基づいて、本FGFファミリーを用いた皮膚の瘢痕抑制が可能になると思われる。</p> <p>Using a mouse fetal skin wound model, we approached the mechanism of skin renewal based on the finding that the wound on day 13 of embryonic renewal was completely regenerated, but the skin was not completely regenerated after day 15 of embryonic development. We found a clear difference in the expression of fibroblast growth factor receptor (FGFR) between the wounds on day 13 of embryo and day 15 of embryo, and narrowed down the molecules that are the ligands to narrow it down to one FGF family. It was Based on the present study, it is considered possible to control scarring of the skin using this FGF family.</p>
Notes	研究種目：若手研究 研究期間：2018～2019 課題番号：18K17001 研究分野：形成外科
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_18K17001seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

令和 2 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17001

研究課題名(和文) FGFスーパーファミリーと皮膚再生の関係

研究課題名(英文) The relationship between FGF superfamily and skin regeneration

研究代表者

青木 麻利江 (Aoki, Marie)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：20624456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウス胎仔皮膚創傷モデルを用いて、胎生13日の創傷部は完全に再生するが、胎生15日以降は皮膚が完全には再生しないという発見に基づいて、皮膚の再生メカニズムに迫った。胎生13日の創傷部と胎生15日の創傷部で、fibroblast growth factor receptor (FGFR)の発現に明らかな違いを発見し、そのリガンドとなる分子の絞り込みから1種のFGFファミリーに絞り込むことができた。本研究に基づいて、本FGFファミリーを用いた皮膚の癒痕抑制が可能になると思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウス胎仔皮膚創傷モデルを用いて、胎生13日の創傷部は完全に再生するが、胎生15日以降は皮膚が完全には再生しないという発見に基づいて、皮膚の再生メカニズムに迫った。胎生13日の創傷部と胎生15日の創傷部で、fibroblast growth factor receptor (FGFR)の発現に明らかな違いを発見し、そのリガンドとなる分子の絞り込みから1種のFGFファミリーに絞り込むことができた。本研究に基づいて、本FGFファミリーを用いた皮膚の癒痕抑制が可能になると思われる。

研究成果の概要(英文)：Using a mouse fetal skin wound model, we approached the mechanism of skin renewal based on the finding that the wound on day 13 of embryonic renewal was completely regenerated, but the skin was not completely regenerated after day 15 of embryonic development. We found a clear difference in the expression of fibroblast growth factor receptor (FGFR) between the wounds on day 13 of embryo and day 15 of embryo, and narrowed down the molecules that are the ligands to narrow it down to one FGF family. It was Based on the present study, it is considered possible to control scarring of the skin using this FGF family.

研究分野：形成外科

キーワード：胎仔 皮膚 再生

1. 研究開始当初の背景

マウス胎仔に皮膚創傷を作成すると、胎生 13 日 (E13) までのマウス胎仔の創傷部は、皮膚紋理を含め完全に再生するが、E14 以降は皮膚が完全には再生せず、いわゆる傷痕が残存する。また、E17 以降は、真皮の部分が線維化を起し、その結果、瘢痕を残す。その後の研究で E14 の胎仔の創傷部は途中までは、再生的に変化し、創作成後 24 時間を超えた頃よりから、傷痕を残す状態に変化することが判明したので、現在では因子の絞り込みを明確にするために、E13 と E15 の 24 時間後の創傷部を比較することで、皮膚の再生現象に迫っている。

これまでの予備実験で、E13 の創傷部と E15 の創傷部で、FGFR の発現に明らかな違いがあることを発見した。しかし、これまでそのリガンドとなる分子については明らかになっていなかった。そこで、これまでに明らかになった、胎仔皮膚の再生の変換点の前後の FGFR 発現の変化をもとに、FGF スーパーファミリーのどの因子が変化しているのかを明らかにし、その因子が創傷部あるいは皮膚再生にどのように関与しているのかを明らかにし、その因子を胎仔または成獣の創傷部に投与することで、皮膚再生にどのような影響を及ぼすかを調べようとしたのが、研究の背景である。これまでの予備実験で receptor となる FGFR1, FGFR2 とともに表皮基底層を中心に特異的な発現が認められるが、E13 の創傷部位でさらに増強し、E15 の創傷部位で逆に減少することが認められている。このことから、これらのリガンドとなる FGF スーパーファミリーの中のタンパク質が、皮膚再生を促すタンパク質である可能性が高いと考えられる。FGF スーパーファミリーは再生や創傷治癒に深くかかわっていて、発生の分野で研究が進んでいる。FGF スーパーファミリーは、現在解明されているだけで 22 個の因子を有する大きなスーパーファミリーで、それぞれが皮膚再生にどのようにかかわっているかは明らかにされていない。

2. 研究の目的

FGF スーパーファミリーは、現在までに 22 種類が報告されているが、本研究の目的は、その中で皮膚を再生する因子を検索し、そのメカニズムを調べることである。マウス胎仔の創傷部の変化をもとにした皮膚再生研究は、慶應義塾大学形成外科で編み出したものであり、これをもとに皮膚の完全再生の再生メカニズムを探っている。その中で、FGFR の発現について知見を得て、これらのリガンドとなる FGF スーパーファミリーの中のタンパク質の発現の変化が、皮膚再生を促すタンパク質である可能性が高いと考えた。FGF スーパーファミリーのうち、bFGF (FGF-2) は、創傷治癒促進効果から、日本が世界に先駆けて臨床応用されており、それまでは、治りがたかった潰瘍が、治るようになってきている。また、FGF 4 は、四肢の発生に中心的な役割を果たす因子であり、FGF-10 はゼブラフィッシュのヒレの再生に大きくかかわっている因子であることが証明されている。このように、FGF スーパーファミリーは再生や発生、創傷治癒に深くかかわっているが、現在解明されているだけで 22 個の因子を有する大きなスーパーファミリーで、それぞれが皮膚再生にどのようにかかわっているかは明らかにされていない。本研究では Receptor の変化を基に臨床に直結するリガンドとなる FGF スーパーファミリーが直接的に関わっているかを調べて、将来的にそれを製剤とすることを目的としている。

3. 研究の方法

妊娠 13、15、17 日目の ICR 妊娠マウスを用いて、全身麻酔下に胎仔手術を行った。様々な時間の後に、動物を安楽死させ、創傷部を含めた皮膚を採取し、パラフィン切片または新鮮凍結切片用の資料として、保存した。保存した資料から、7 μ m の切片を作成し、パラフィン切片からは、*in situ* hybridization で FGFR1, FGFR2 の mRNA の発現を、おもに新鮮凍結切片からは、FGFR1, FGFR2 の免疫染色を行い、タンパク質の局在を確認した。予測できた創傷後の時間をもとに、創辺縁の皮膚から mRNA を抽出し、cDNA に変換後、RT-PCR による解析を行い、FGF スーパーファミリーのうちどの因子が、E13 と E15 の創傷部位で発現に変化があるかどうかを観察した。確認でき FGF スーパーファミリーの中の因子の発現を、*in utero* でノックダウンすることで、胎仔創傷治癒に及ぼす影響を観察した。すなわち、E13 の創傷部で発現の増強が認められた FGF スーパーファミリーの因子に対しては、これまで、当研究室で報告してきた、マウス胎仔の羊水内 siRNA 投与方法を用いて、発現が増強している FGF スーパーファミリーの因子のノックダウンを行うことで、皮膚が完全に再生する状態がどのように変化するかを確認した。また、E15 の創傷部位で発現が増強している因子についても、同様に胎生 15 日の羊水内 siRNA 投与方法による変化を観察した。E13 と E15 の創傷治癒に影響を及ぼすと考えられる FGF スーパーファミリーの因子につき、レコンピナントタンパク質を胎仔および成獣の創傷部に投与した。妊娠 ICR マウスには、胎生 13 日と 15 日の段階で胎仔手術を施し、真皮下に 26G 針を用いて注入し、その直後に創を作成し 72 時間後に回収し、皮膚の再生や瘢痕形成に及ぼす影響を観察した。

4. 研究成果

これまでの研究で FGF スーパーファミリーの receptor となる FGFR1, FGFR2 とともに表皮基底層を中心に特異的な発現が認められた。これを再度、RT-PCR および *in situ* hybridization を用いて確認した。E13 の創傷部位では、発現がさらに増強し、E15 の創傷部位で逆に減少することが観察された。これらの発現は、*in situ* hybridization でも確認されたが、real time PCR でも E13-24H では発現量が増加し、E15-24H、E17-24H では有意に発現量が減少することが確認され

た。

その後、FGFR1, 2 に結合するリガンドについて行った。それぞれについてリアルタイム定量 PCR 法を行った。FGF1-10, 17 を測定したところ、FGF3, 4, 5, 8, 9, 17 は発現量が微量で検出されなかった。FGF1 は、E13-24H では発現量が増加し、E15-24H では発現量が低下した。また、E17-24H では発現量が減少した。FGF2 は E13-24H では発現量はあまり変化しなかったが、E15-24H では発現量が減少した。また、E17-24H では発現量に変化は見られなかった。E13-24H では発現量が減少した。そしてさらに E15-24H, E17-24H では発現量が減少した。FGF7 は、E13-24H では発現量が増加した。しかし、E15-24H では発現量に変化は見られず、E17-24H では発現量が減少した。FGF10 は、E13-24H では発現量が減少した。そしてさらに E15-24H では発現量に変化は見られず、E17-24H では発現量が減少した。

これらの結果の中から皮膚再生の関与の疑いが高い FGFX についてさらに検討した。in situ hybridization の結果において、それぞれ発現量が少ないため染色が鮮やかに見えないが、E13-24H の創傷部において発現が正常部と比べ増強していることが観察された。また E15-24H において、創傷部と正常部での発現の変化は見られなかったが、E17-24H では E13-24H, E15-24H に比べると発現自体が減弱していることが観察された。リアルタイム定量 PCR 法の結果と同様に、E13-24H の創傷部で発現が増強し、E15-24H では変化は見られず、E17-24H では創傷部で発現が減少した。rmFGFX を羊水内に投与し、実体顕微鏡で観察すると rmFGFX 投与群と Control 群において形態学的に明確な変化は見られなかった。切片の観察では、Control 群では表皮が湾曲し、癒痕を形成しているのに対し、rmFGFX 投与群においては表皮の形成が促進されていることが観察された。Control 群と比べると rmFGFX 投与群はアニリン青の染色が増強していることが観察できる。アニリン青の密度が高くなっていることが観察された。アニリン青の染色が密になっていることから rmFGFX 投与群では膠原線維が創傷部に密に形成されていることが示唆された。Control 群では創傷部において黄茶色の染色が増強していることが観察された。また rmFGFX 投与群の創辺縁部では黄茶色の染色部分が増加していた。rmFGFX 群と Control 群で比べると赤色の染色の密度が rmFGFX 群では創辺縁部で密になっているのに対して、Control 群では創部全体に密になっていることが観察された。どちらも創傷部において筋線維芽細胞が増加していることが示唆された。また膠原線維は創傷部において密になっていることが確認された。rmFGFX 投与群において、創辺縁部にて発現が増強していた。また Control 群では創全体に染色が増強されており、なおかつ真皮に広範囲に増強されていることが確認された。rmFGFX では創辺縁部において線維化が起きているが、Control 群においては創部の真皮広範囲にわたり線維化が起きていることが示唆された。また、Cell count を行った結果、rmFGFX 投与群において有意に α -SMA 陽性細胞が減少した。したがって rmFGFX 投与群において、有意に線維化が抑制したことが示された。マッソン・トリクローム染色にて評価を行ったところ、Control 群に比べて rmFGFX 投与群は有意に癒痕スコアが低下した。今後、FGF ファミリーを用いて、癒痕抑制の観点から研究が進んでゆくものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----