

平成 21 年 3 月 24 日現在

研究種目:若手研究(A)
 研究期間:2006 ~ 2008
 課題番号:18689028
 研究課題名(和文)部位特異的な上皮間葉系相互作用を通じた皮膚疾患病態解明及び再生医療に関する研究
 研究課題名(英文)Site-specific mesenchymal-epithelial interactions elucidate pathogenesis of skin diseases and contribute to perfect tissue regeneration.
 研究代表者
 山口 裕史(YAMAGUCHI YUJI)
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授
 研究者番号:00335340

研究成果の概要:

「ヒト成人においても、上皮間葉系相互作用（真皮線維芽細胞がその上にある上皮系細胞に与える作用）により部位特異性（皮膚のさまざまな部位で性質が異なること）を決定付けていること」を実証してきた。手のひら・足のうらの皮膚は、分厚い皮膚で外からの刺激に強い・毛が無い・色素が薄いという3つの特徴がある。手のひら・足のうらの真皮線維芽細胞で発現が高いDKK1が、メラノサイトの機能を抑えるだけでなく、表皮細胞のメラニン取り込み能を抑制すると同時に、重層化を促進している結果を得ることが出来た。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2007年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	18,200,000	5,460,000	23,660,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード:皮膚腫瘍学・創傷治癒学・再生医学・色素細胞学・皮膚発生学

1. 研究開始当初の背景

形態学的に全く区別がつかない線維芽細胞は20年以上前に考えられていたように均一(体のどの部位も同じ)ではなく、胎生期の体軸形成の名残(HOX遺伝子等)が成人になっても存在し、不均一であり部位特異性を有する。更に各種細胞は隣接細胞及び外部刺激による部位特異的影響を受けており、皮膚では表皮構成細胞(表皮細胞やメラノサイト等)と真皮構成細胞(線維芽細胞等)による上皮間葉系相互作用は恒常性維持の為に必要である。具体的には、手掌足底型皮膚線維芽細胞は他部位由来線維芽細胞と異なり、表

皮細胞における特殊なケラチン(K9)を誘導する能力及びメラノサイトの増殖及び分化を抑制する能力を持つ。(故に手掌足底型皮膚は、機械的刺激に強い、毛包構造を持たない、色素が薄いという部位特異性を持つ。) DKK1(Dickkopf:ドイツ語「大きい頭」の意で頭部誘導能を持つ分泌蛋白)はWnt阻害物質であるが、手掌足底線維芽細胞で発現が上昇しており、Wnt-βカテニン系を介してメラノサイトの機能を抑制している。

残念ながらこの概念(「皮膚が場所により違うのは真皮成分即ち間葉系由来細胞が、最外層に存在する表皮成分即ち上皮系由来細胞

胞に影響を及ぼす」)は成人ヒト皮膚では一般的に受け入れられていない。この概念を立証することが研究開始当初の背景として上げられた。

2. 研究の目的

本研究目的は、部位特異的皮膚の再生医療に対する一連の研究を更に推進すること及び表皮真皮相互作用を介した皮膚疾患病態の解明である。具体的に(1)~(3)に上げる。

(1) DKK1 がメラノサイト、表皮細胞及び線維芽細胞に与える生理的影響を調べること。

(2) 難治性潰瘍(外傷、糖尿病性足潰瘍、膠原病に伴う潰瘍)に対して世界的に認知されつつある治療法(植皮は分厚ければ良い訳ではなく、表皮成分のみを植皮すると部位特異的な皮膚の再生が可能となる治療法)の臨床応用をより推進すべく分子生物学的手法を用いて有用性を証明すること。

(3) DKK が本邦に多いタイプの(手掌足底型皮膚に発生しやすい)悪性黒色腫由来細胞株の増殖に与える影響を調べること。

3. 研究の方法

(1) 手掌足底型真皮で発現が高いDKK1がメラノサイト、表皮細胞及び線維芽細胞に与える影響について

①. DKK1で様々の時間刺激したり様々の細胞株を使用したりしてcDNAマイクロアレイを施行してきたので、どのような遺伝子がどのような時間で動いているかのデータまたどの細胞株に特異的に作用しているかのデータがあるので、様々の方向転換が可能となった。オーソドックスな実験手技のみを用いて、全ての候補遺伝子とも十分納得の行く説明ができた。

②. 本研究を更に進めるべく、黒毛マウスの皮下にDKK1を単独投与することで、手掌足底型皮膚を誘導できるか判定する。Cre-LoxPを用いた表皮細胞特異的なDKK1遺伝子導入マウスでは、手掌足底型皮膚ができたとの報告があり、我々の出したデータと総合しても、単独投与でも誘導が可能と考える。できなかったとしてもネガティブデータとして有用で、なぜ誘導できなかったかの解析をする。

③. 更にDKK1投与後のマウス皮膚を生検し、cDNAマイクロアレイで得られた新規遺伝子の発現レベルを各種細胞生物学的手法(In Situ Hybridization、免疫染色等)を用いてin vivoにおいても検索する。培養系とは異なるデータも予想されるため、有用と思われる。海外ではマウス使用に関しても生命倫理

的な規制が厳しくなっており(米国在籍中に何度かマウスを用いた研究を申請したが、半年以上の審査が必要であった)、本邦においても慎重に対処する予定であるが、非常に有効なデータを得られる可能性が高いと思われる。

(2) 部位特異的組織再生の臨床応用のための分子生物学的裏付けの基礎的研究について

①. 生検皮膚を経時的に得ることができれば、部位特異的再生誘導を確認するために、部位特異的表皮標識物質(手掌足底型表皮であればケラチン9等)を用いて免疫組織学的に検討する。

②. 植皮に用いる表皮のみのシートは吸引水疱蓋より採取しているが、表皮-真皮接合部のどの部位にて剥がれているかの報告はない。コラーゲンIV型やVII型やラミニン5等の抗体を用いて免疫組織学的に考察し、表皮移植の有用性についての追加報告ができればと考える。どこの層で剥がれるかの予想はできないが、熱傷や水疱症に関する研究にも貢献できる結果が得られる可能性が高い。

(3) DKKが悪性黒色腫由来細胞株の細胞死に与える影響について

①. 各種悪性黒色腫細胞株を入手し、其々の増殖能及び色素産生能を調べるために、各種細胞生物学的手法(3H-ラベル法、BrdU取り込み能、細胞数測定、メラノソーム関連蛋白定量及びメラニンアッセイ)を用いて細胞株間の特徴を把握する。現在15株入手しており、ある程度の特性を掴んだ。

②. DKK1あるいはDKK3の添加または遺伝子導入が悪性黒色腫株の増殖に与える影響を各種細胞生物学的手法(BrdU取り込み能及び細胞数測定)にて判定する。予備実験ではMNT1株においてDKK3による著しい増殖抑制を認めた。更に追加実験を施行し確認予定である。

3. DKKが悪性黒色腫株の細胞死(アポトーシス)に与える影響を調べるために、TUNEL、Bcl及びCaspaseを用いた免疫組織染色及びウエスタンブロット法を施行する。こちらも予備実験にてMNT1株でDKK3に細胞死誘導能を確認したが、更に確認が必要と考える。

④. 更にDKKの細胞死誘導能を調べるために、AnnexinVとPropidium Iodideとの2重染色の後、FACS法にて判定し、サザンブロットにてLadder形成の状態も確認する。

4. 研究成果

「皮膚が場所により違うのは、真皮線維芽細胞

胞という間葉系由来細胞が、最外層に存在する表皮細胞やメラノサイトに影響を及ぼすからという独創的観点から多数の研究成果を揚げた。

(1) 手掌足底型真皮で発現が高い DKK1 がメラノサイト、表皮細胞及び線維芽細胞に与える影響について

「ヒト成人においても、上皮間葉系相互作用(真皮線維芽細胞がその上にある上皮系細胞に与える作用)により部位特異性(皮膚のさまざまな部位で性質が異なること)を決定付けていること」を実証してきた。手のひら・足のうらの皮膚は、分厚い皮膚で外からの刺激に強い・毛が無い・色素が薄いという3つの特徴がある。表皮細胞 (FASEB J 2008) に及ぼす Dickkopf 1 (DKK1) の影響をマイクロアレイによる解析を含めた分子生物学的手法を用いて更に詳しく調べた。手のひら・足のうらの真皮線維芽細胞で発現が高い DKK1 が、メラノサイトの機能を抑えるだけでなく、メラノサイトに細胞死を誘導する可能性を示唆した (J Invest Dermatol 2007)。さらに DKK1 が表皮細胞のメラニン取り込み能を PAR2 を介して抑制すると同時に、KLEIPなどを介して重層化を促進している結果を得ることが出来た (FASEB J 2008)。これらの一連の研究成果は 2007 年度の J Biol Chem の総説特集号の表紙を飾る仕事となった。

(2) 部位特異的組織再生の臨床応用のための分子生物学的裏付けの基礎的研究について

表皮のみを効率良く採取する方法を編み出し公表するなど、難治性皮膚潰瘍や皮膚がんに関する論文で、研究課題の再生医療を臨床応用する論文を発表した。表皮を採取する際の吸引水疱蓋移植では、コラーゲンタイプ VII が表皮側と真皮側とに分断されることが示された (投稿準備中)。

(3) DKK が悪性黒色腫由来細胞株の細胞死に与える影響について

皮膚がん発症には部位特異性があり、露光部に多く、紫外線の影響を受けているものが多い。ヒト皮膚に関して色調を司る因子 (紫外線や部位特異的なサイトカインの発現様式) の研究にも従事し、成果を上げた。マウス毛包形成における DKK1 を含めた Wnt 系、Shh 系、

Bmp 系の相互作用も調べ DKK1 が制御する b-カテニン系の重要性を調べた (Development 2009)。DKK が悪性黒色腫に与える作用については投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 28 件)

(英文のみ掲載、全て査読有り、他和文多数)

1. Yamaguchi Y(4名・筆頭・責任著者), Morita A, et al. Regulation of skin pigmentation and thickness by DKK1. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2009;in press.

2. Takahashi Y, Yamaguchi Y(6名・共筆頭・責任著者), et al. Intractable wounds caused by pyoderma gangrenosum in a patient with critical limb ischemia treated with cyclosporine and adjuvant sympathectomy. *Dermatol Surg* 2009;Epub Mar 20.

3. Coelho SG, 中略, Yamaguchi Y(15名・5番目), et al. Short- and long-term effects of UV radiation on the skin. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2009;in press.

4. Morita A, 中略, Yamaguchi Y(4名・最終著者) Molecular basis of premature skin aging induced by tobacco smoking. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2009 in press

5. Ishida I, Yamaguchi Y(7名・共筆頭・責任著者), T et al. Stage III melanoma treated with chemotherapy after surgery during the second trimester of pregnancy. *Arch Dermatol* 2009 145(3):346-8.

6. Kobayashi K, 中略, Yamaguchi Y(11名・10番目), et al. The development of a filter to enhance the efficacy and safety of excimer light (308 nm) therapy. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2009 25(1):30-6.

7. Morita A, 中略, Yamaguchi Y(8名・7番目), et al. Feasibility and accuracy of a newly developed hand-held device with a flat-type fluorescent lamp for measuring the minimal erythema dose for narrow-band UVB. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2009 25(1):41-4.

8. Suzuki K, Yamaguchi Y(13名・2番目), et al. Embryonic hair follicle fate change by augmented beta-catenin signaling through Shh and Bmp signaling. *Development* 2009 136(3):367-72.

9. Hanafusa T, Yamaguchi Y(14名・共筆頭・責任著者), et al. Establishment of suction blister roof grafting by injection of local anesthesia beneath the epidermis: less painful and more rapid formation of blisters. *J Dermatol Sci* 2008;50(3):243-7.

10. Yamaguchi Y(3名・筆頭・責任著者), Beer JZ, Hearing VJ. Melanin mediated apoptosis of epidermal cells damaged by ultraviolet radiation: factors influencing the incidence of skin cancer. *Arch Dermatol Res* 2008;300 Suppl 1:S43-50.

11. Yamaguchi Y(11名・筆頭・責任著者), Passeron T, et al. DKK1 regulates skin pigmentation and thickness by affecting Wnt/ β -catenin signaling in keratinocytes. *FASEB J* 2008;22(4):1009-20.

12. Watabe H, 中略, Yamaguchi Y(10名・4番目), et al. Involvement of dynein and spectrin with early melanosome transport and melanosomal protein trafficking. *J Invest Dermatol* 2008;128(1):162-74.

13. Miller SA, 中略, Yamaguchi Y(7名・5番目), et al. Dynamics of pigmentation induction by repeated UV exposures: dose, dose interval and UV spectrum dependence. *Br J Dermatol* 2008;159:921-30.

14. Kubo T, 中略, Yamaguchi Y(5名・3番目), et al. Congenital peristernal dermal sinuses: a new entity? *Br J Dermatol* 2008;159:763-5.

15. Yamaguchi Y(7名・筆頭著者), Coelho SG, et al. Cyclobutane pyrimidine dimer formation and p53 production in human skin. *Exp Dermatol* 2008;17(11):916-24.

16. Kanazawa S, 中略, Yamaguchi Y(7名・4番目), et al. Apocrine adenocarcinoma originating from the Moll's gland of the eyelid: report of a case. *Eur J Plast Surg* 2008;31:333-6.

17. Hanafusa T, Yamaguchi Y(3名・責任著者), Katayama I. Intractable wounds caused by arteriosclerosis obliterans with end-stage renal disease treated by aggressive debridement and epidermal grafting. *J Am Acad Dermatol* 2007;57(2):322-6.

18. Hanafusa T, Yamaguchi Y(6名・責任著者), et al. Intractable wounds caused by calcific uremic arteriopathy treated

with bisphosphonates. *J Am Acad Dermatol* 2007;57(6):1021-5.

19. Miyamura Y, 中略, Yamaguchi Y(14名・12番目), et al. IRegulation of human skin pigmentation and responses to UV radiation. *Pigment Cell Res* 2007;20(1):2-13.

20. Yamaguchi Y(7名・筆頭・責任著者), Passeron T, et al. The effects of dickkopf 1 on gene expression and Wnt signaling by melanocytes: mechanisms underlying its suppression of melanocyte function and proliferation. *J Invest Dermatol* 2007;127(5):1217-25.

21. Hanafusa T, Yamaguchi Y(4名・責任著者), et al. Intractable wounds from a herpes simplex infection in an immunosuppressed patient with rheumatoid arthritis. *Arch Dermatol* 2007;143(10):1340-2.

22. Yamaguchi Y(3名・筆頭著者), Brenner M, Hearing VJ. The regulation of skin pigmentation. *J Biol Chem* 2007;282(38):27557-61.

23. Valencia JC, Yamaguchi Y(14名・6番目), et al. Sialylated core 1 O-glycans influence the sorting of Pmel17/gp100 and determine its capacity to form fibrils. *J Biol Chem* 2007;282(15):11266-80.

24. Takahashi K, 中略, Yamaguchi Y(7名・3番目), et al. UV increases the nuclear localization of APE/Ref-1 in human skin. *J Invest Dermatol* 2006;126(12):2723-6.

25. Yamaguchi Y(9名・筆頭著者), Takahashi K, et al. Human skin responses to UV radiation: pigment in the upper epidermis protects against DNA damage in the lower epidermis and facilitates apoptosis. *FASEB J* 2006;20(9):1486-8.

26. Valencia JC, 中略, Yamaguchi Y(14名・8番目), et al. Sorting of Pmel17 to melanosomes through the plasma membrane by AP1 and AP2: evidence for the polarized nature of melanocytes. *J Cell Sci* 2006;119(Pt 6):1080-91.

27. Watari A, 中略, Yamaguchi Y(14名・8番目), et al. Suppression of tumorigenicity, but not anchorage independence, of human cancer cells by new candidate tumor suppressor gene CapG. *Oncogene* 2006;25(56):7373-80.

28. Rouzaud F, 中略, Yamaguchi Y(10名・3番目), et al. Regulation of constitutive and UVR-induced skin pigmentation by

melanocortin 1 receptor isoforms. *FASEB J* 2006;20(11):1927-9.

[学会発表] (計 8 件)

(英語かつ招聘講演・セミナー講演・プレナリー講演のみ掲載、他日本語での講演多数)

1. Yamaguchi Y. Adult dermal fibroblasts determine the fate of the overlying epidermis. The Global COE Liaison Laboratory regular seminar Mar 4, 2009, [Invited lecturer] Kumamoto, Japan.
2. Yamaguchi Y. The effect of UV on human skin pigmentation. The 3rd Annual Symposium in Institute of Dermatological Science Feb 6, 2009, [Invited lecturer] Seoul, Korea.
3. Yamaguchi Y. Melanocyte Biology. Pre-seminar for the 3rd Annual Symposium in Institute of Dermatological Science Feb 5, 2009, [Invited lecturer] Seoul, Korea.
4. Yamaguchi Y. Regulation of skin pigmentation and thickness by dickkopf 1 (DKK1). IID 2008 Satellite Symposium Photoaging Research Symposium May 13, 2008, Kyoto, Japan.
5. Yamaguchi Y. Workshop: CS-14 Molecular and surgical pathology. The 20th International Pigment Cell Conference and 5th International Melanoma Research Conference. May 7-12, 2008, [Invited lecturer] Sapporo, Japan.
6. Yamaguchi Y. Epidermal sheet grafting for chronic wound. Workshop: Modern wound management. The 21st World Congress of Dermatology. Sep 30-Oct 5, 2007, [Oct 3, 8:15 a.m.-10:15 a.m. (9:15 a.m.-9:35 a.m.) Invited lecturer] Buenos Aires, Argentina.
7. Yamaguchi Y. Regulation of skin pigmentation. Avon Lecture Series for Pigment Cell Research. May 15, 2007, New York, NY, USA.
8. Yamaguchi Y., Passeron T, Katayama I, Hearing VJ. The effects of dickkopf 1 on gene expression and Wnt signaling by keratinocytes: mechanisms regulating skin pigmentation and thickness. The 68th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology. May 9-12, 2007 [May 11, 4:00 p.m.-4:12 p.m. Oral and Poster], Los Angeles, CA, USA.

[図書] (計 1 件) (他和文多数)

1. Yamaguchi Y (2名・筆頭著者), Hearing VJ.

Chapter 6: Melanocyte distribution and function in human skin: effects of UV radiation. In: Hearing VJ, Leong SPL, editors. From melanocytes to malignant melanoma: the progression to malignancy. Totowa: Humana Press; 2006. p. 101-115.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

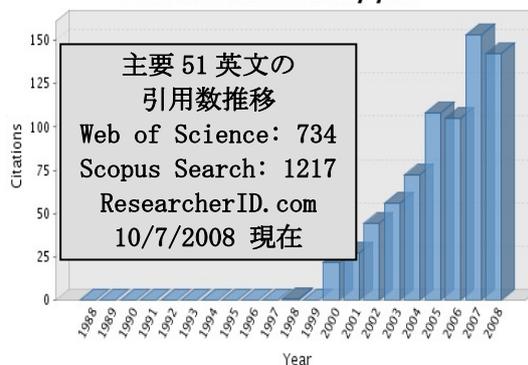
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

国際学会での招待講演を含め 60 回を超える国際学会での発表・講演実績がある。国内では 200 回を超える。研究内容は既に共同通信・聖教新聞・読売新聞・朝日新聞・NHK・テレビ愛知でも取り上げられた。特に共同通信の取材記事は国内の地方紙を中心に 50 誌以上に掲載された。この一年以内に名古屋市・札幌市にて市民公開講座として 3 回講演し、愛知県主催の県民公開講座でも 1 回講演し、研究内容を広く一般国民にも伝えてきた。

今回が研究代表者・分担者を含め科研費受領は初めてであったが、研究代表者の主要論文 51 編の引用数は右肩上がりであり、2006 年度にこの科研費受領後、2007 年度・2008 年度の伸びが著しい。

Citation Distribution by year



6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 裕史 (YAMAGUCHI YUJI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 0 0 3 3 5 3 4 0

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし