

# 手のひら・足のうらで発現が高いWnt阻害剤・Dickkopf 1がアンチエイジング(抗しわ、美白、色素再生、毛髪再生、除毛、皮膚再生)に及ぼす影響

名古屋市立大学大学院医学研究科 加齢・環境皮膚科学

山口 裕史

Palmoplantar skin, which stands for palms of the hands and soles of the feet, is generally hypo-pigmented compared with non-palmoplantar skin on the rest of the body. We have been hypothesizing that palmoplantar skin phenotype derives from the dermal fibroblasts, which influence overlying epithelium. We have proved that cultured fibroblasts derived from palmoplantar skin express higher levels of dickkopf1 (DKK1), which is an inhibitor of Wnt signalling, than those derived from non-palmoplantar skin at the RNA level measured by RT-PCR and at the protein level by Western blotting and immunocytochemistry. We also proved that DKK1 suppresses melanocyte growth and differentiation through the Wnt/ $\beta$ -catenin/MITF pathway. DKK1 also suppresses melanin uptake by epidermal keratinocytes via PAR2, which explains why DKK1 causes hypo-pigmentation in three dimensional skin equivalents. Additionally, DKK1 increases the growth of keratinocytes via the induction of  $\alpha$ KLEIP and keratin 9. Male type baldness is associated with higher DKK1 expression levels. In this study, we evaluated the expression patterns of DKK1 between palmoplantar skin and non-palmoplantar skin *in vivo*. Western blotting and immunohistochemistry indicate that the expression of DKK1 is upregulated in palmoplantar skin compared with non-palmoplantar skin *in vivo*. We conclude that the expression of DKK1 is upregulated *in vivo*, thus maintaining the homeostasis of palmoplantar skin, which is non-hair bearing, thick and hypopigmented skin. Further studies will focus on the effect of DKK1 on anti-aging.

## 1. 緒言

皮膚科専門医にとって、掌蹠(手掌・足底)にできた皮膚欠損の治療には難渋し、問題となることがある。掌蹠皮膚は全体の約5%しかない特殊な皮膚であるからである。掌蹠はなぜ分厚いか・色が白いか・毛がないかを疑問に思ったことはないだろうか? 掌蹠の皮膚は分厚い、つまり外的刺激に強いという特徴があり、他の部位の皮膚を用いて再建すると多くの点で不都合が生じる。他部位の皮膚を用いて再建された場合、新たな皮膚欠損が痛みを伴い出現することも多い。高齢化社会で静脈性・動脈性の変化による皮膚欠損がおきることが近年脚光を浴びている。特に糖尿病が原因の皮膚の障害は足先や指先から始まることが多い。なぜ掌蹠は特殊な皮膚を構築しているかを我々が行ってきた研究を中心に述べ、本研究助成を得た成果を報告する。

### 1.1 なぜ掌蹠は分厚いのか?

皮膚を移植する植皮は以前より、分厚ければ分厚いほど機能的にも見た目にも良いとされていた。私は形成外科医を目指していた頃、大いに疑問を感じていた。皮膚には表皮といわれる最外層の上皮成分と真皮といわれるその下層の間葉成分とからなる。皮膚は場所ごとに、分厚さ、色合

い、毛の密度が違う。分厚い皮膚を移植すれば、その元の場所の皮膚の性質をそのまま移すことになる。周辺の組織との違和感を患者さん本人やそのご家族が非常に気にしている現状を目の当たりにした。しかも前述のように、掌蹠にやけどなどで皮膚欠損が生じ、掌蹠以外の皮膚で植皮された場合、活発なお子さんであれば特に、皮膚潰瘍やそれに伴う痛みの原因となることがある。一人の医者として何とか良い治療法を開発したいと考え悩んだ。

そこで立てた仮説は、「皮膚が場所により違う(頭部には毛があり、掌蹠にはない)のは、真皮線維芽細胞という間葉系由来細胞が、最外層に存在する上皮系成分(表皮細胞やメラノサイト)に影響を及ぼすから」というものであった。この仮説自体は胎生期にはある程度認められているものの、胎生期以後では一般的な概念ではなかった。

まずはこの仮説を証明するために、同一個体から掌蹠真皮線維芽細胞と大腿部などの掌蹠以外の線維芽細胞とを培養した。別個体の掌蹠以外の表皮細胞(およびコントロールとして掌蹠由来表皮細胞)を用意した。掌蹠表皮細胞にはケラチン9という特殊なケラチンが産生されることが分かっていたので、掌蹠線維芽細胞と共培養した掌蹠以外の表皮細胞にケラチン9が誘導されるか調べた。mRNAレベルでもSCIDマウスを用いた蛋白レベルでもケラチン9の誘導が確認された<sup>1)</sup>。

以上の基礎データを基に、実際に患者さんに本治療概念を臨床応用した。つまり、掌蹠皮膚欠損創に掌蹠以外からの表皮成分のみを採取し移植し、分厚い皮膚が形成されるかを確認した(図1)。予想通り、従来の掌蹠以外由来の植皮は分厚い皮膚へと変化せず、移植された部位の性質を得ることなく、移植される前の状態の皮膚のままであっ



The effects of dickkopf 1 (which is an inhibitor of Wnt signaling pathway and is highly expressed in palmoplantar areas) on anti-aging (including the regulation of pigmentation, hair follicles and skin regeneration)

Yuji Yamaguchi

Department of Geriatric and Environmental Dermatology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences

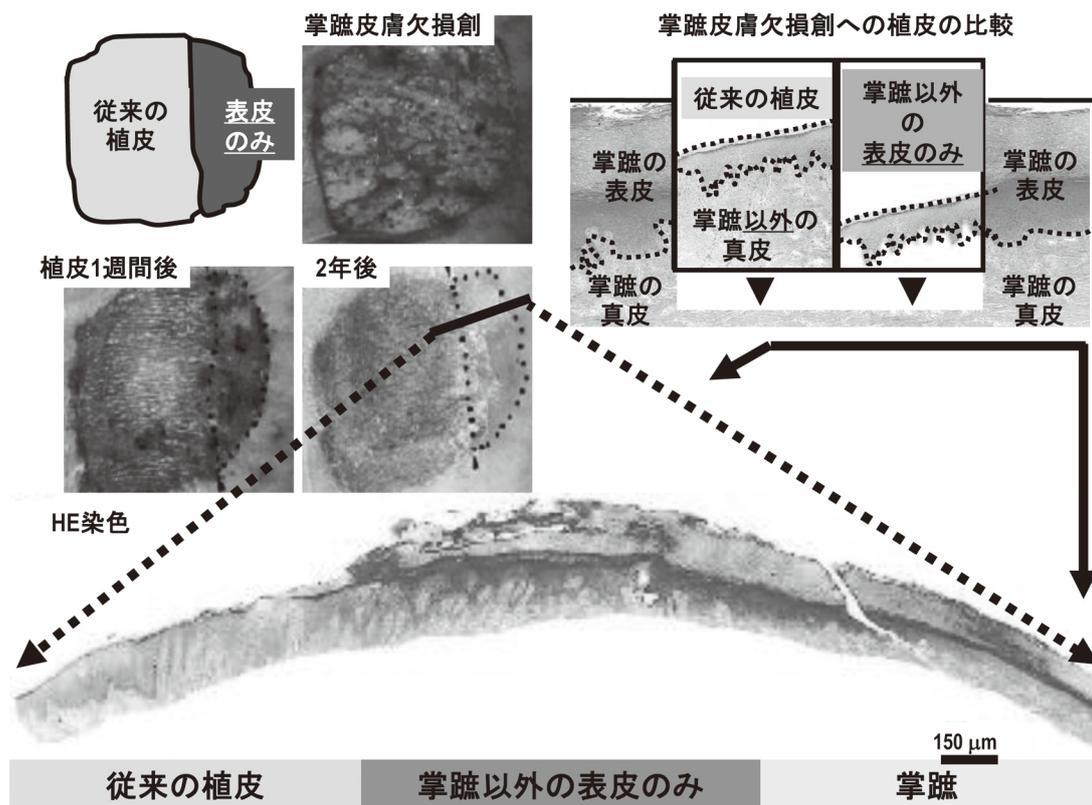


図1 掌蹠皮膚欠損創への植皮の比較. (文献2より改変)

た。ところが、厚さ0.2ミリにも満たない掌蹠以外の表皮のみを移植された場合、周辺の掌蹠の組織を反映するように、掌蹠の皮膚へと変化していた<sup>2)</sup>。糖尿病性足潰瘍<sup>3)</sup>やリウマチ性潰瘍<sup>4)</sup>やその他の疾患が原因の掌蹠や指端・足指の皮膚潰瘍<sup>5)</sup>においてもこの治療法が非常に有効であることが証明された。

つまり、掌蹠がなぜ分厚いかの一つの理由として、掌蹠真皮成分がその上の上皮成分に作用しているからと考えられる。この掌蹠真皮による掌蹠皮膚の誘導は70歳代の成人でも起こる現象であることが分かっている。

### 1.2 なぜ掌蹠は色が白いのか？

上記現象の科学的な根拠を解明するために、掌蹠真皮線維芽細胞と掌蹠以外の真皮線維芽細胞とを培養しcDNAマイクロアレイを施行した。多くの遺伝子で発現レベルの差があった<sup>6)</sup>。中でも Wntシグナルの阻害因子である Dickkopf1 (DKK1; 独語で「頭でっかち」という俗語) に注目し機能解析した。DKK1はメラノサイト(掌蹠以外由来のもの)に作用し、増殖を抑制し、メラノサイト関連蛋白の発現をも抑制した(図2)。メラノサイトに DKK1 を作用させることで動く遺伝子群についても、マイクロアレイにより網羅的解析を施行し多くの候補遺伝子を導くことができた<sup>7)</sup>。また掌蹠真皮で多く発現している DKK1 は表皮細胞にも影響し(図3)、メラニンの取り込みを抑制す

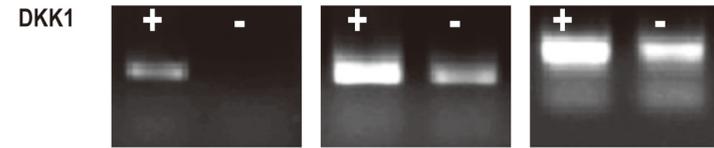
ることも明らかとなった<sup>8)</sup>。このように掌蹠の色が白いのは真皮成分の DKK1 がその上に存在するメラノサイトに影響を与えて機能面で抑制しているだけでなく、表皮細胞にも影響を与えてメラニン取り込み能をも抑制しているということが証明された。更に前項の話に戻るが、掌蹠が分厚い理由として、DKK1 がケラチン9を誘導することも証明された。これらの一連の研究成果は総説などで詳細に解説しているので参照されたい<sup>9,10)</sup>。

### 1.3 なぜ掌蹠は毛がないのか？

同じ頃 Stanford 大学の Howard Y. Chang らが我々の掌蹠真皮線維芽細胞によるケラチン9の誘導に着目して、ご猷体より50か所の様々な部位より皮膚(口腔粘膜や肺組織も含めて)を採取し、真皮線維芽細胞からRNAを抽出した。そして大規模なマイクロアレイを施行し、線維芽細胞の部位特異性を HOX 遺伝子(胎生期の対軸形成に関与する転写因子)の発現パターンの違いで部位特異性を説明した。この網羅的遺伝子解析でも多くの遺伝子群に差があり、Wntシグナルは大きな注目を浴びた。Pennsylvania大学の Sarah E. Miller らは、遺伝子改変マウス(DKK1を表皮細胞に強制発現させたマウス)を用いた系にて、DKK1を皮膚に作用させると、毛がなくなることを証明した。このように掌蹠で毛がないことも DKK1 で説明される可能性が高い。

RNA レベルでの解析

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> GSE5515 - マイクロアレイ



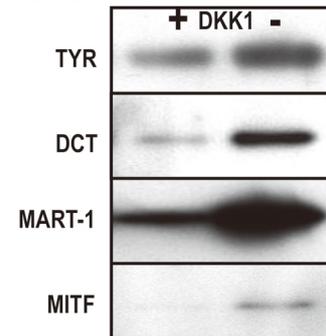
メラノサイトの増殖・分化を抑制

メラノソーム  
関連蛋白

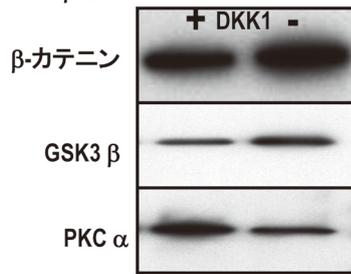
DKK1に対する他の受容体? 細胞死の経路?

蛋白レベルでの解析

メラノサイト特異蛋白



Wnt/β-カテニン/MITF シグナル伝達



掌蹠由来線維芽細胞

メラノサイト

図2 DKK1によるメラノサイトの増殖・分化の抑制。(文献6・7より改変)

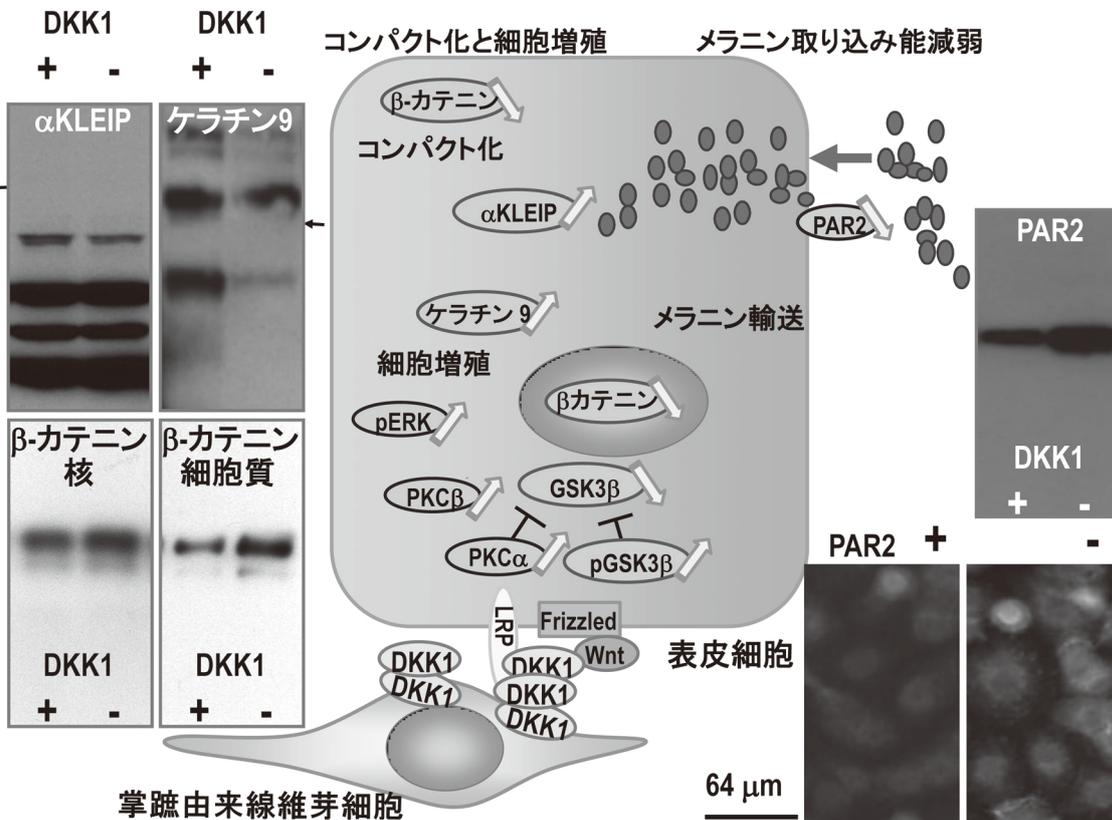


図3 DKK1による表皮細胞の増殖促進・メラニン取り込み能の抑制。(文献8より改変)

## 2. 実験

緒言にて説明したように、DKK1には様々な作用があることが分かってきた。DKK1は表皮細胞に作用し、ケラチン9を誘導し表皮細胞の重層化を促進している可能性があること。また表皮細胞のメラニン取り込みのための受容体として知られているPAR2の発現を抑制することで、メラニン取り込みを抑制していること。メラノサイトに作用し、増殖能を抑制しメラノソーム関連蛋白として知られているさまざまな特殊蛋白の発現を抑制していること。などである。更にDKK1は掌蹠真皮に発現が高いことが我々の一連の研究から知られているが、証明されたのは全て培養系 (*in vitro*) であった。そこで今回、成人ヒト生体 (*in vivo*) でも同様のことが証明されるかどうかを調べた。

### 2.1 Western blotting

同一個体由来の成人ヒト皮膚を用いた。名古屋市立大学倫理審査委員会により承認された範囲内での研究を施行した。同一個体より掌蹠皮膚および周辺の掌蹠以外の皮膚を採取した。これら皮膚は皮膚外科手術による余剰皮膚を用いた。Dispase (Sigma) を用いて表皮成分と真皮成分とに分けた。超音波破碎装置を用いて組織を裁断した。それぞれに対してProteinase Inhibitorを添加したProtein Extraction Bufferに溶解した。8%ゲルを用いてDKK1、ケラチン9、βカテニンの発現量を調べた。

### 2.2 免疫組織染色

上記同様に同一個体由来の成人ヒト皮膚を用いた。また名古屋市立大学倫理審査委員会により承認された範囲内での研究を施行した。ヘルシンキ宣言も遵守した。同一個体より掌蹠皮膚から周辺の掌蹠以外の皮膚へ移行する部位を採取した。免疫組織染色の手技の詳細は別編などを参照さ

れたい<sup>11)</sup>。DKK1の発現を調べた。既存の抗体がうまく機能しないため、さまざまなエピトープを標識する家兎由来ポリクローナル抗体を独自で作成した。

## 3. 結果

### 3.1 Western blotting (図4)

成人ヒト生体においても、掌蹠由来真皮では、掌蹠以外由来真皮と比較し、DKK1の発現量が亢進していた。またコントロールとして掌蹠由来表皮では、掌蹠以外由来表皮と比較し、ケラチン9の発現量が亢進していた。またβカテニンの発現量の違いはうまく証明することができなかった。が、掌蹠由来表皮では、掌蹠以外由来表皮と比較し、βカテニンの発現量が若干低下しているように思われた。

### 3.2 免疫組織染色 (図5)

上記同様に同一個体の掌蹠から掌蹠外へと移行する部位を中心にDKK1の発現を解析した。対応する明視野との比較で、色素が薄い掌蹠側皮膚の表皮直下では多くのDKK1の発現を認めたのに対して、色素が濃い掌蹠以外の皮膚の

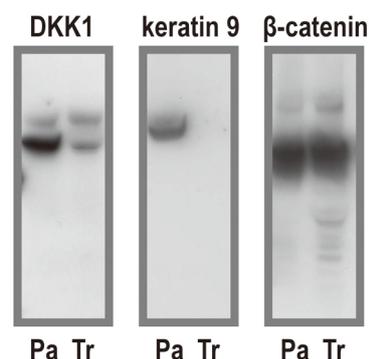


図4 成人ヒト生体での各種因子の発現量の掌蹠・掌蹠以外間比較

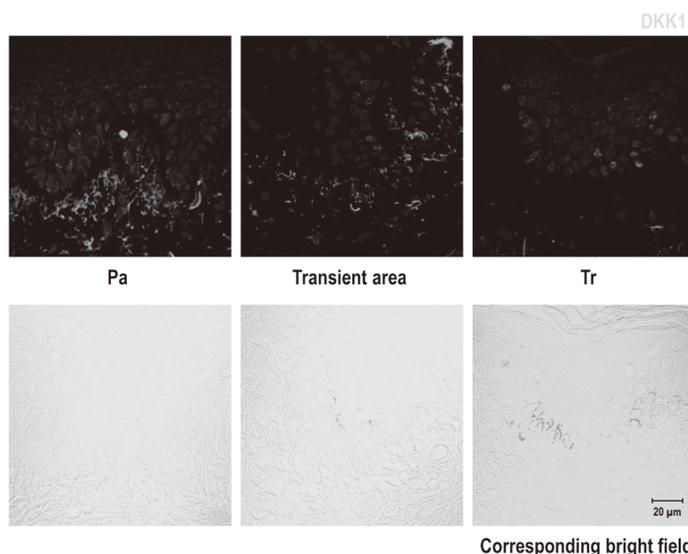


図5 成人ヒト生体での掌蹠・移行部・掌蹠外での DKK1 発現比較

表皮直下にはあまり DKK1 の発現を認めなかった。移行部では色素が薄い個所に DKK1 の発現が強い傾向を認めた。

#### 4. 考 察

上述のように培養系だけでなく生体系でも、成人ヒトでは真皮成分の部位特異性があることが証明された。つまり掌蹠真皮では DKK1 の発現量がその他の部位由来真皮と比較して多いことが示された。今後 DKK1 のアンチエイジング (抗しわ、美白、色素再生、毛髪再生、除毛、皮膚再生) 治療薬剤としての可能性を探求していきたい。

老化に伴う顔の「しわ」を気にする方は比較的多い。老化に伴い表皮が薄くなることは知られている。DKK1 を作用させて表皮を厚くすることができれば、しわ取り効果のあるクリーム開発につながると思われる。

老化に伴う顔の「しみ」(正確には肝斑・老人性色素斑) を気にする方も多い。DKK1 を作用させて皮膚色調を薄くすることができれば、全く今までと作用機序の違う美白剤の開発につながると思われる。

老化に伴う「皮膚潰瘍」は近年糖尿病などの生活習慣病の増加に伴い増えている。DKK1 を作用させて手のひら・足のうら型の強い皮膚を再生することができれば、新たな治療法開発に直結すると思われる。

老化に伴う「はげ」(男性型脱毛) を気にする方も多い。DKK1 を拮抗的に作用させて新しい毛生え薬の開発につながると思われる。現実的にもマウスの研究などから DKK1 中和抗体の研究が各種他グループ (米国や韓国) でなされている。

#### 5. 総 括

再生医療が目される昨今、研究の主流は iPS 細胞に向かっている。が、臨床応用を考慮すると、多くの解決すべき問題点があることが窺い知れる。コスメトロジーと皮膚再生医学は密接に関連しており、最新の技術を駆使して得られた知見は、化粧品学の進歩に直結していると思われる。

手のひら・足のうらの皮膚に張りがあり、色素が薄く、毛が存在しないことの原因解明は、アンチエイジング、美白、脱毛 (あるいは毛髪再生) といった美容分野開発へとつながる可能性がある。実際、手のひら・足のうらの真皮線維芽細胞とその上皮系細胞との相互作用を解剖学的に別の個所の相互作用と比較したところ、DKK1 という物質が手のひら・足のうらの真皮でより多く存在することが培養系で証明された。更に今回の研究成果として、生体においても DKK1 を手のひら・足のうらは他部位と比較し多く分泌していることが証明された。

我々の研究グループだけでなく、他の研究者からの報告も総合すると、今後薬剤としての DKK1 の開発に期待がもたれる。様々な抗原を認識する抗体を作成したので、どの

部位がアンチエイジング、美白、脱毛に大きな効果を有するかなどの検討も将来的に可能と思われる。

#### 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、一部の研究費を援助して下さいました財団法人コスメトロジー研究振興財団に深く感謝申し上げます。また本研究は「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」(課題番号 18689028) (H18-H21) 及び「部位特異的な皮膚再生医療に関する研究」(課題番号 21591440) (H22-) の二つの課題に対する文部科学省の科学研究費補助金による援助を受けています。本研究を指導して下さいました名古屋市立大学加齢・環境皮膚科学主任教授森田明理先生に感謝します。

#### (引用文献)

- 1) Yamaguchi Y, Itami S, Tarutani M, 他. Regulation of keratin 9 in nonpalmoplantar keratinocytes by palmoplantar fibroblasts through epithelial-mesenchymal interactions. *J Invest Dermatol* 1999 Apr;112(4):483-488.
- 2) Yamaguchi Y, Kubo T, Tarutani M, 他. Epithelial-mesenchymal interactions in wounds: treatment of palmoplantar wounds by non-palmoplantar pure epidermal sheet grafts. *Arch Dermatol* 2001 May;137(5):621-628.
- 3) Yamaguchi Y, Yoshida S, Sumikawa Y, 他. Rapid healing of intractable diabetic foot ulcers with exposed bones following a novel therapy of exposing bone marrow cells and then grafting epidermal sheets. *Br J Dermatol* 2004 Nov;151(5):1019-1028.
- 4) Yamaguchi Y, Sumikawa Y, Yoshida S, 他. Prevention of amputation caused by rheumatic diseases following a novel therapy of exposing bone marrow, occlusive dressing and subsequent epidermal grafting. *Br J Dermatol* 2005 Apr;152(4):664-672.
- 5) Hanafusa T, Yamaguchi Y, 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 Aug;57(2):322-326.
- 6) Yamaguchi Y, Itami S, Watabe H, 他. Mesenchymal-epithelial interactions in the skin: high expression of dickkopf1 by palmoplantar fibroblasts results in decreased melanocyte function. *J Cell Biol* 2004 Apr;165(2):275-285.
- 7) Yamaguchi Y, Passeron T, Watabe H, 他. The

- effects of dickkopf 1 (DKK1) on gene expression and Wnt signaling by melanocytes: mechanisms underlying its suppression of melanocyte function and proliferation. *J Invest Dermatol* 2007 May;127(5):1217-1225.
- 8) Yamaguchi Y, Passeron T, Hoashi T, 他. Dickkopf 1 (DKK1) regulates skin pigmentation and thickness by affecting Wnt/beta-catenin signaling in keratinocytes. *FASEB J* 2008 Apr;22(4):1009-1020.
- 9) Yamaguchi Y, Brenner M, Hearing VJ. The regulation of skin pigmentation. *J Biol Chem* 2007 Sep;282(38):27557-27561.
- 10) Yamaguchi Y, Hearing VJ. Physiological factors that regulate skin pigmentation. *Biofactors* 2009 Mar-Apr;35(2):193-199.
- 11) Yamaguchi Y, Takahashi K, Zmudzka BZ, 他. 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 Jul;20(9):1486-1488.