

(様式5)

学位論文要旨

西暦 2023年 1月 19 日

学位申請者

(山西 治代) 印

学位論文題目

収束イオンビーム走査型電子顕微鏡を用いたヒト毛包の3次元微細構造の解析

学位論文の要旨

毛は哺乳動物の特徴であり体温の保持、外力からの保護、異性の獲得とともに触覚の機能を持つ。毛包は上皮系、間葉系の細胞群からなり、その周囲には血管や神経といった複雑な構造を保持し、各種因子、ホルモンおよびストレスなどの影響を受ける。ヒトでは、他の動物ほどこれらの機能が必須であるとは言い難いが、頭皮の薄毛や濃い体毛など大きな問題が存在する。特に薄毛の悩みは大きく、男性ホルモンの影響を受け、毛髪が細くミニチュア化することによると考えられている。薄毛については、毛包の再生医療や医薬品などの開発が進められているが、まだ十分に対応できているとは言えない。人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells、iPS 細胞) からヒトの毛包を含む皮膚が *in vitro* で再構築できるようになった。しかし、薄毛に悩む患者からの iPS 細胞由来の毛髪移植が技術的に実現可能になるには、頭皮に硬毛としての構造を維持させなければならない点で、多くの課題があることが予想される。毛周期の司令塔である毛乳頭 (DP) 細胞、およびそのリソースである結合繊維鞘 (DS) 細胞は、毛球部を維持する間葉系幹細胞としての重要な役割を持つ。また機械刺激受容器である柵状神経終末は、毛包上皮幹細胞ニッチであるバルジ領域と密接に関係している。これらは毛包において重要な役割を果たしているにも関わらず、ヒトでの検討は殆ど行われておらず、マウスを用いて研究が進められてきた。柵状神経終末においては、ヒトの頭皮における硬毛では報告されてもいない。ヒトの毛包の成長、および毛周期の維持のために重要である毛球部およびバルジ領域周囲に関する基礎的な知見を得ることが課題であると考えられた。

本研究では、毛の成長や毛周期に重要な役割を持つDP細胞、間葉系幹細胞と考えられているDS細胞、および上皮系幹細胞ニッチであるバルジ領域と深い関わりがある柵状神経終末に着目し、これらの部位を電子顕微鏡レベルでの3次元微細構造を解析するための方法として、収束イオンビーム走査型電子顕微鏡 (FIB-SEM) の応用を試み、その観察条件の確立を目指した。そして、最終的にはヒト毛包の構造に関する基礎的な知見を得ることを目的とした。そこで本論文では、ヒト毛包の毛球部において、間葉系細胞がどのような形態をとり、毛球部の構造維持にどのような役割を果たしているか解析した。さらに、ヒト頭皮の毛包において、毛包峡部に柵状神経終末が、どのように存在し分布

するか解析した。本論文は、全4章から構成され、第1章では以上の研究背景を述べた。第2章以降の内容について以下に詳細を示す。

初めに、ヒト毛球部における間葉系細胞の形態解析を行った。共焦点顕微鏡を用いて毛球部の間葉系細胞がどのように配向しているか調べた。続いて透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて、DP細胞と基底床に存在するdermal sheath cup (DSC)細胞、DS細胞の微細な形態学的特徴を抽出した。共焦点顕微鏡およびTEMの結果から、毛球部の間葉系細胞は、その存在する部位ごとに配向や形態が異なることが示唆された。そこで、FIB-SEMを用いて、ヒトの単離毛包の毛球部の3次元微細構造解析法を確立し、毛球部の部位ごとの間葉系細胞の3次元形態の相違について検討を行った。結合織鞘に存在するDS細胞、基底床に存在するDSC細胞の形態は扁平であった。一方、毛乳頭に存在するDP細胞は多数の分岐構造を持ち、基底床の茎 (stalk) に存在するDSC細胞は扁平な形態の細胞と、分岐構造を持つ細胞が存在した。基底床の茎 (stalk) において、毛球部の間葉系細胞の形態変化が起こると考えられた。また毛球部における間葉系細胞間の細胞接着の違いについては、DS細胞、DSC細胞では‘指’のような小さな細胞突起で接着するが、DP細胞では‘手のひら’のような比較的大きな細胞突起で接着することが明らかとなった。間葉系細胞どうしの細胞接着はギャップ結合であると考えられ、毛球部全体に間葉系細胞のネットワークが形成され、小分子やイオンなどの移動に関与していることが示唆された。すなわち、退行期にカルシウムイオンによってDS細胞が収縮する際に、DS細胞が同調して関与する可能性が考えられた。さらに、DP細胞に見られる特徴的な分岐構造について検討を行った。免疫組織染色より、DP細胞に神経軸索の分岐の形成に関与している β II スペクトリンが発現したことから、神経軸索の分岐構造と同様に、DP細胞の分岐構造の形成に関与している可能性が考えられた。DP細胞が分岐構造を発達させることで毛球部の構造を維持し、正常な頭皮の毛包では、毛乳頭が大きく、太い毛髪を産生することに寄与していると考えられた。(第2章)

次に、頭皮の毛包峽部における柵状神経の分布とその微細構造について解析した。光シート顕微鏡観察法と光電子相関観察法 (CLEM) により、頭皮における毛包の柵状神経終末について調べたところ、毛群内の一部の毛包にのみ柵状神経終末が存在することが明らかとなった。硬毛における柵状神経終末の微細構造は、これまで報告されてきたヒトの軟毛に存在している柵状神経終末の構造と同様であった。柵状神経終末の分布は、軟毛とは異なり、硬毛の周囲の一部にしか分布していなかったことが明らかとなった。共焦点レーザー顕微鏡観察とFIB-SEMを組み合わせた3D-CLEM法を確立し、柵状神経終末の電子顕微鏡レベルで3次元構造を明らかにした。免疫電子顕微鏡観察より、Piezo2がヒトの頭皮の毛包においても柵状神経終末の軸索および終末シュワン細胞の細胞膜に近接して発現していることが認められたことから、頭皮における硬毛の柵状神経終末も機械刺激受容器として働くと考えられた。さらに興味深いことに、薄毛に伴いミニチュア化した毛包における柵状神経終末の数は、硬毛の柵状神経終末と比較して優位に多く、これは柵状神経終末における神経終末が毛包のミニチュア化に伴い構造変化を起こしていることを示唆している。柵状神経終末は毛包のCD200陽性のバルジ領域にも近接しており、ヒトにおいても毛包上皮幹細胞との関連が示唆された。(第3章)

第4章では以上の研究結果について総括した。

本研究の結果より、これまで線維芽細胞様と報告されていた毛球部の間葉系細胞の3次元微細構造、およびヒト頭皮毛包における柵状神経終末の存在が明らかとなった。FIB-SEMを用いた3次元微細構造解析は、毛球部の間葉系細胞の形態や柵状神経終末の構造を明らかにするうえで、有用なツールであると考えられた。とりわけ、毛球部の間葉系細胞の中でも、DP細胞は分岐構造を有する特徴的な形態をしており、DP細胞の幹細胞で

あるDSC細胞、DS細胞は非常に大きな細胞膜を持ち、薄く扁平な細胞の構造をしていることは、DSC細胞やDS細胞が毛乳頭に移行した際に直ちに分岐を持った構造に変化できることを支持している。DP細胞やDS細胞、DSC細胞が毛球部の結合織鞘において、ギャップ結合により細胞間のネットワークを形成し、イオンや低分子によってコミュニケーションしていることが示唆された。さらに、これまで報告されていなかった頭皮の柵状神経終末は、毛包のバルジ領域に近接して存在すること、およびその分布についても明らかとなった。加えて柵状神経終末は、機械刺激受容体として機能することが示唆された。今後の課題として、毛周期に伴って毛球部の間葉系細胞の3次元構造および細胞のネットワークがどのように変化するかを検討する必要がある。加えてヒトにおいて、毛包上皮系幹細胞と柵状神経終末が、毛の伸長にどのように影響を及ぼすかについて検討する必要がある。その結果、新たな育毛剤の開発や毛髪再生の有効な糸口に繋がると考えられる。

備 考

1. 要旨は4000字程度にまとめること。
2. 本様式により、ワープロで作成することを原則とする。
3. 用紙はA 4版 上質紙を使用すること。

(様式6)

S u m m a r y

Applicant for degree: PhD

Haruyo Yamanishi

Title of thesis :

Three-dimensional ultrastructural analysis for human hair follicles by focused ion beam scanning electron microscopy

Hair follicle (HF) is a complex small-organ, composed by distinct cells, which are originated from epithelial, mesenchymal, endothelial and nerve cells. In the hair bulb dermal papilla (DP) cells which are derived from mesenchymal cells play instructive roles in hair follicle development and hair cycle regulation. The dermal sheath (DS) cells are contiguous to DP at the stalk of basal plate and DS cells are resources of DP cells. DP is affected by androgen to be shorten the anagen phase and the HF is miniaturized. The HF also functions as a sensory organ, and the lanceolate nerve endings (LNEs), which detect hair movement as sensory receptors, are closely involved in the bulge, which is the hair follicular stem cell niche. The three-dimensional (3D) structure of mesenchymal cells in the hair bulb and LNEs at the isthmus have not been analyzed sufficiently by conventional light and electron microscopy. Furthermore, LNEs have hardly been investigated in human scalp terminal hairs. Therefore, it is important to gain better understandings of the structure of normal hair follicles in the human scalp skin.

In this study, we developed the technique of observation for human HFs by focused ion beam scanning electron microscopy (FIB-SEM). At the first, we focused on morphology of mesenchymal cells in the hair bulbs, which were micro-dissected from scalp skin. 3D ultrastructural analysis revealed the different characteristics between DP and DS cells. At the stalk of basal plate, the cellular morphology of mesenchymal cells changes from flatten DS cells to DP cells which have branched structures. It was also suggested that cell-cell adhesion structures among the DP and the DS cells respectively were gap junctions.

Next, we revealed the distribution and 3D-ultrastructure of LNEs at the

isthmus of human terminal HFs by lightsheet microscopy and 3D-correlative light and electron microscopy, which are combined between confocal laser microscopy and FIB-SEM. All HFs were not innervated by the LNEs, and the LNEs were distinguished at one terminal HF but not at the other terminal HFs in the same follicular unit. The expression of Piezo-type mechanosensitive ion channel component 2 was distinguished at the LNEs by immunoelectron microscopy. This suggested that LNEs have a function as mechanosensors. Furthermore, the number of LNEs in miniaturized HFs was significantly more than that in terminal hairs. This suggests that the LNEs undergoes structural changes as the hair follicle becomes miniaturized.

Basic research on human hair follicles has been accumulated by this research. Further research will be applied to research and development such as thinning hair in the future. These results will contribute to the hair biological science.

備 考

1. 要旨は300語程度にまとめること。
2. 本様式により、ワープロで作成することを原則とする。
3. 用紙はA4版 上質紙を使用すること。