

東京工科大学  
博士学位論文

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

2023年 3月

山西 治代

## 目次

第 1 章 序論 .....	7
1-1. はじめに.....	7
1-2. 毛包の構造、および毛包を構成する細胞.....	8
1-3. 毛周期.....	12
1-4. 毛の発生.....	14
1-5. 毛包誘導能.....	15
1-6. 薄毛.....	17
1-7. 毛包の神経支配.....	18
1-8. 柵状神経終末.....	19
1-9. 収束イオンビーム走査型電子顕微鏡による電子トモグラフィー.....	22
1-10. 光学顕微鏡と収束イオンビーム走査型電子顕微鏡を組み合わせた 3 次元 光電子相関観察法.....	24
1-11. 本研究の目的.....	25
第 2 章 FIB-SEM を用いたヒト毛球部における間葉系細胞種の 3 次元微細構 造解析.....	28

2-1.	緒言.....	27
2-2.	実験方法.....	30
2-2-1.	試料.....	30
2-2-2.	毛球部における細胞形態の解析.....	30
2-2-3.	FIB-SEM および TEM 観察試料の調製.....	30
2-2-4.	FIB-SEM 画像の取得.....	31
2-2-5.	3次元画像の再構築およびセグメンテーション.....	32
2-2-6.	免疫組織化学染色.....	32
2-3.	結果.....	33
2-3-1.	毛球部における間葉系細胞の形態は毛球の部位に依存する.....	33
2-3-2.	DS 細胞はコラーゲン線維の中間層に並走し微小突起で接する....	40
2-3-3.	DSC 細胞は基底床のコラーゲン線維に沿って存在し、微小突起を介して接する.....	43
2-3-4.	DP 細胞は枝分かれした構造を持ち、手のひらのような突起で接する.....	46
2-3-5.	DS 細胞から DP 細胞への形態変化は、基底床の stalk で起こる...	49
2-3-6.	毛球部における間葉系細胞の細胞骨格に寄与する分子.....	51
2-4.	考察.....	52

### 第 3 章 3D-CLEM を用いたヒトバルジ領域に存在する柵状神経終末の分布と

3次元微細構造.....	57
3-1. 緒言.....	57
3-2. 実験方法.....	59
3-2-1. 試料.....	59
3-2-2. 組織透明化法.....	59
3-2-3. 蛍光免疫染色法.....	60
3-2-4. TEM.....	62
3-2-5. FIB-SEM.....	63
3-2-6. 3次元再構築およびセグメンテーション.....	64
3-2-7. 統計解析.....	64
3-3. 結果.....	65
3-3-1. 終毛における柵状神経の微細構造解析.....	65
3-3-2. ミニチュア化した毛包における柵状神経の微細構造解析.....	73
3-3-3. 終毛およびミニチュア化毛の柵状神経における Piezo2 の発現....	78
3-3-4. 終毛およびミニチュア化毛における柵状神経の数の比較.....	80
3-4. 考察.....	82

第 4 章 総括..... 87

参考文献

## 略語一覽

3D-CLEM: three-dimensional correlative light and electron microscopy

A. pili; arrector pili muscle

AGA: androgenetic alopecia

Ax: axon

CLEM: correlative light and electron microscopy

DHT: dihydrotestosterone

DP: dermal papilla

DS: dermal sheath

DSC: dermal sheath cup

Epi: epidermis

FE-SEM: field emission scanning electron microscopy

FIB-SEM: focused ion beam scanning electron microscopy

HF: hair follicle

HR: hair root

iPS cells: induced pluripotent stem cells

IRS: inner root sheath

LNEs: lanceolate nerve endings

Mx: matrix

ORS: outer root sheath

PBS: phosphate buffered saline

PGP9.5: protein gene product 9.5

Piezo2: Piezo-type mechanosensitive ion channel component 2

S100 $\beta$ : S100 calcium binding protein B

SEM: scanning electron microscopy

SG: sebaceous gland

TEM: transmission electron microscopy

tSC: terminal Schwann cell

## 第1章 序論

### 1-1. はじめに

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、そして触覚としての機能などを持つ [1]。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、ホルモンやストレスなどの影響を受ける。ヒトでは、他の動物ほど毛の機能が必須であるとは言い難いが、頭髪の薄毛や濃い体毛などのような Quality of life (QOL) 的な問題が存在する。薄毛においては毛包の再生医療や医薬品など研究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。Induced pluripotent stem cell (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が [2]、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、多くの課題が残っている。しかし、ヒト頭皮における毛包の構造が十分に解明されているとは言えず、毛包の成長および構造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の形態に関する基礎的な知見を得ることが重要な課題であると考えられた。

そこで、近年、皮膚科学においても応用されつつある収束イオンビーム走査型電子顕微鏡観察法 (focused ion beam scanning electron microscopy; FIB-SEM) を、

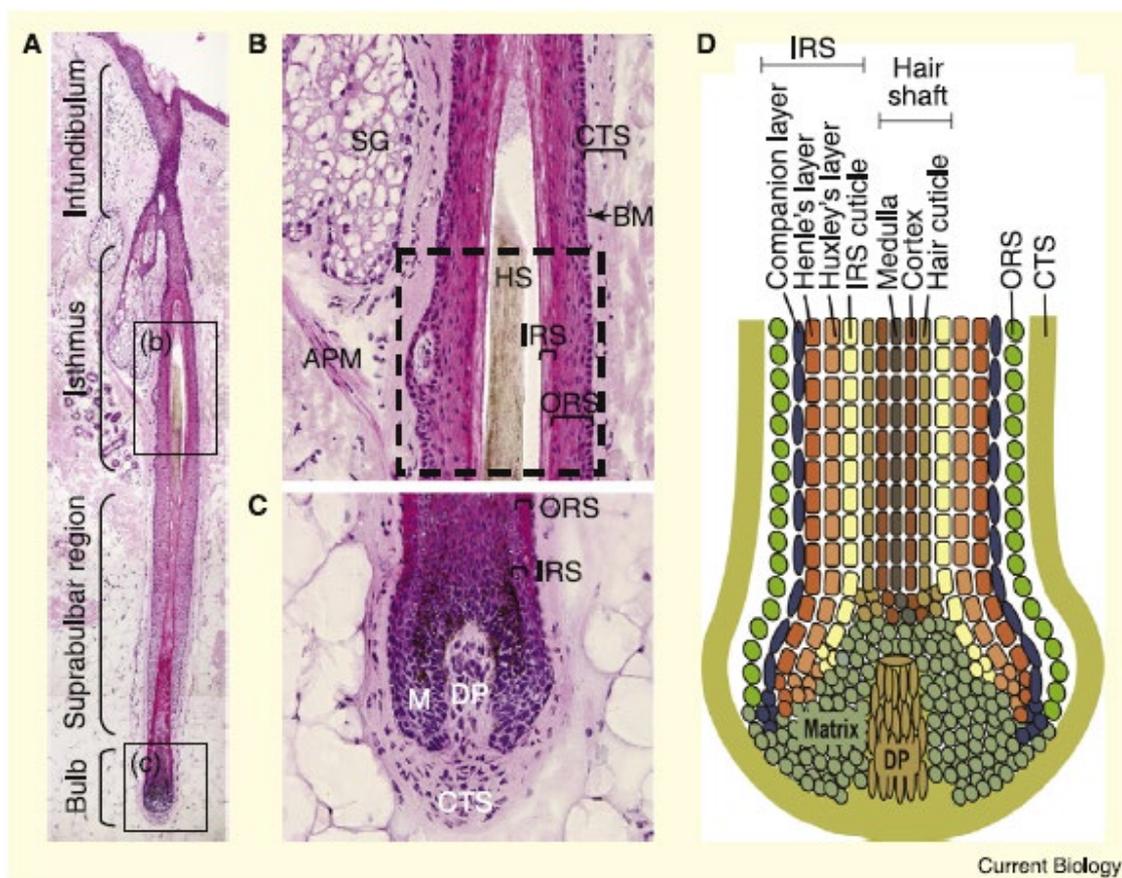
毛包構成細胞の形態解析への応用を試みた。FIB-SEM は従来の走査型電子顕微鏡観察法（scanning electron microscopy; SEM）とは異なり、収束イオンビームにより、ターゲットとなる観察領域を露出させることができる。広範囲に連続性のある表皮や真皮といった組織では、FIB-SEM に依らずともターゲット領域の観察が比較的容易だが、毛包のように複数の細胞が複雑に混在する器官では、ターゲットとなる観察領域を露出させる方法として、FIB-SEM が適していると思われる。

本研究では、毛包において細胞間相互作用が重要な部位である毛球部およびバルジ領域に着目し、当該部位を FIB-SEM で観察するために適した手法を確立することを目的とした。

## 1-2. 毛包の構造、および毛包を構成する細胞

毛包は表皮に連続した器官であり、成長期毛包の深部は真皮～皮下組織にまで到達している。毛包は毛孔から皮脂腺の開口部までを漏斗部（infundibulum）、皮脂腺の開口部から立毛筋の基部との結合部までを峽部（isthmus）、下方を下半部、最下部を毛球部（bulb）と呼ぶ。立毛筋基部の近傍には上皮組織が隆起した部位があり（bulge）、ここには毛包の上皮系幹細胞および色素幹細胞が存在する。表皮から連続した上皮組織は、毛髓（medulla）、毛皮質（cortex）、毛小皮（hair

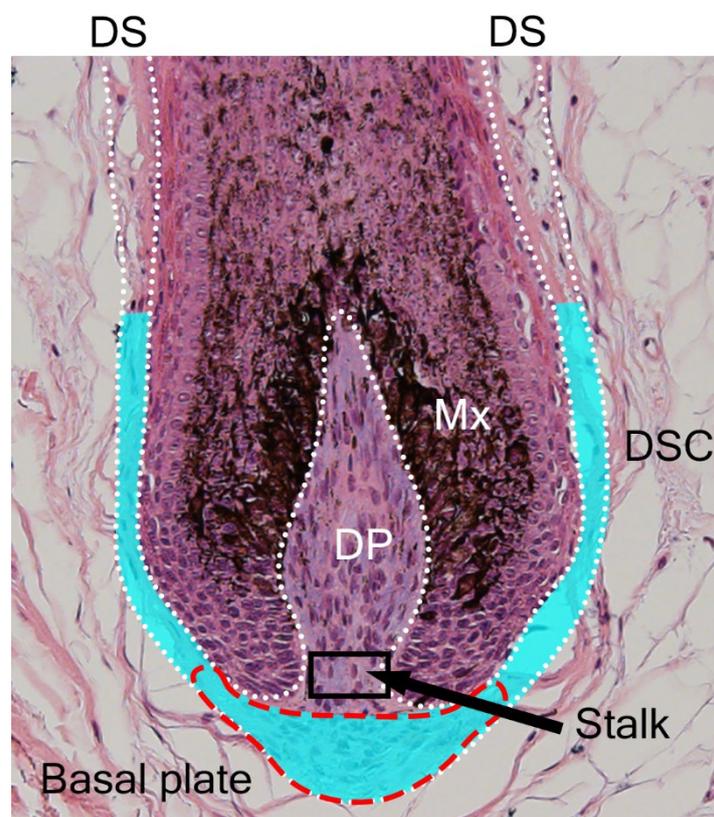
cuticle)、内毛根鞘小皮 (IRS cuticle)・Huxley 層・Henle 層より成る内毛根鞘 (inner root sheath, IRS)、および外毛根鞘 (outer root sheath, ORS) から構成される。毛球部には特殊な間葉系細胞が上皮側に陥入し、毛乳頭 (dermal papilla, DP) を形成している。そして、未分化で毛母 (matrix) と呼ばれる上皮系細胞群が毛乳頭を囲む。毛包は基底膜を介し、結合織鞘 (dermal sheath, DS; connective tissue sheath, CTS) に覆われて、真皮および脂肪層中に存在する (Fig. 1-1) [3]。



**Fig. 1-1 Structure of the hair follicle** From: Schneider M.R. et al., Curr Biol, 2009. 19, R132-142 [3].

毛周期については次項で述べるが、成長期の間、結合織鞘と毛乳頭は連続して

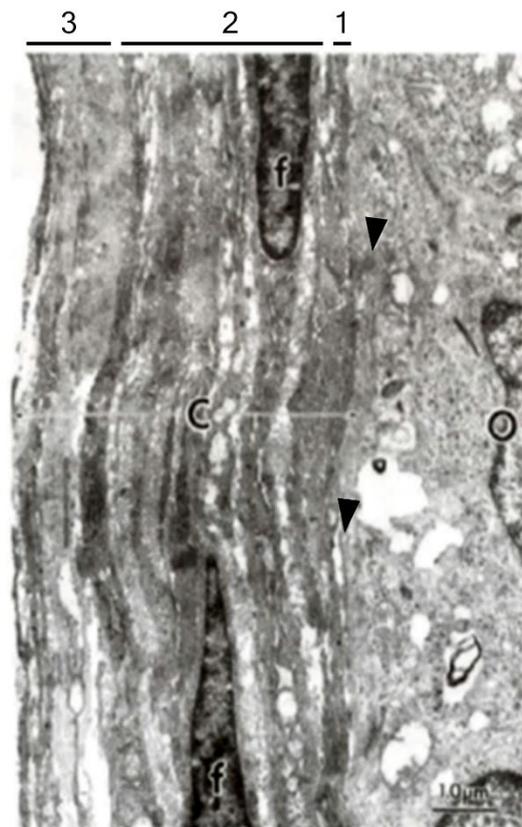
おり毛乳頭直下の結合織鞘を特に基底床 (basal plate)、毛乳頭下部の基底床に連結する部位を茎 (stalk) と呼ぶ。結合織鞘の中でも毛乳頭の高さまでの領域を dermal sheath cup (DSC) と呼んで区別している (Fig. 1-2) [4]。結合織鞘には多数の血管が存在するが、成長期毛包の基底床の stalk では太い血管と非常に細いエラスチン様繊維が発達している [5, 6]。



**Fig. 1-2 Structure of the hair bulb** DP, which is located at the center of the hair bulb, is continuous to the basal plate (red dashed line) in DS via the stalk (black rectangle). DSC is depicted by blue.

一方、成長期の結合織鞘には、透過型電子顕微鏡観察により、毛根に対し3つの層を形成するコラーゲン線維が存在していることが報告された (Fig. 1-3) [7]。

基底膜の外側にある内側のコラーゲン線維は毛軸に対し平行に薄い層を形成する。中央に存在するコラーゲン線維は毛軸に対し横方向に厚い層を形成し、外側のコラーゲン線維は毛軸に対し平行に層を形成する。間葉系細胞の多くは中央のコラーゲンの層に存在するが、内側の層にはほとんど存在しないと報告されている [7]。退行期には、基底膜と内側コラーゲン層の変性を示し、毛周期により結合織鞘の動的な代謝の変化があることを示唆した。



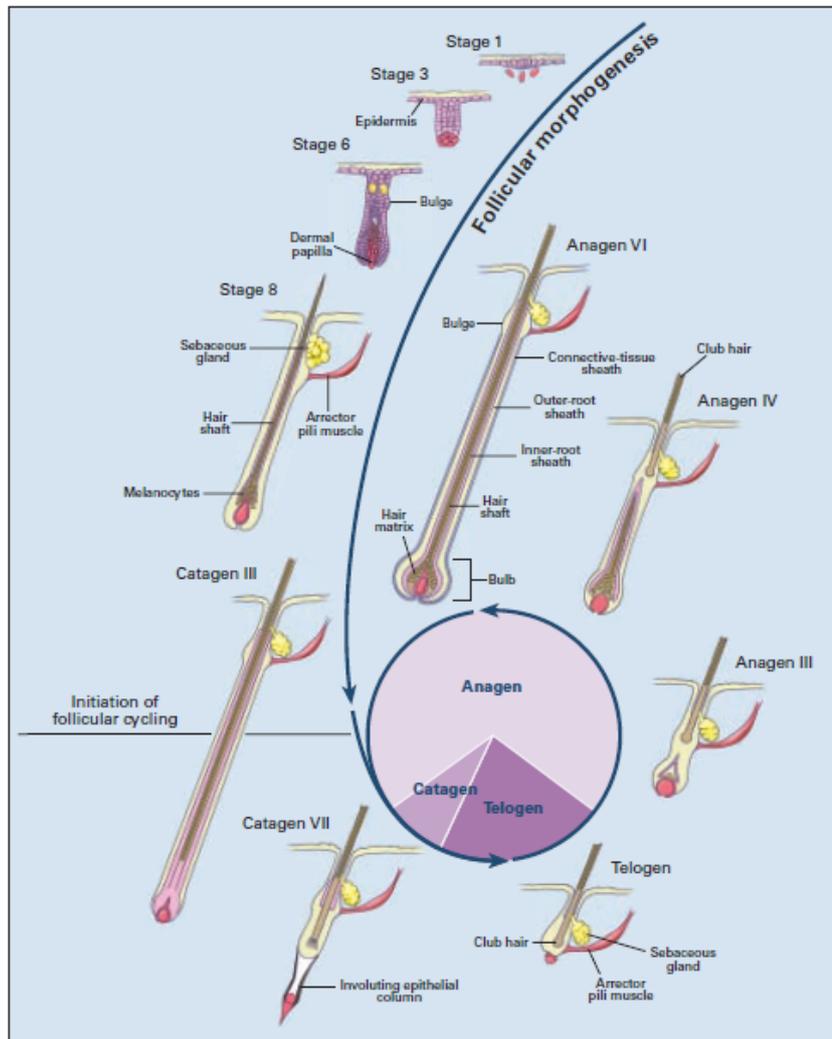
**Fig. 1-3 Structure of dermal sheath** Dermal sheath is located outside of ORS (O). DS cells (f) are located in three layers of collagen fibers (C). Basal lamina is indicated by black arrowheads. Modified from: Ito M. et al., Arch Dermatol Res, 1990. 282, 434-441.[7].

ヒトの毛は、手掌、足底、粘膜など無毛部以外の皮膚に存在し、硬毛 (terminal hair) と軟毛 (vellus hair) に大別される。硬毛は頭髪、眉毛、睫毛、髭などのように肉眼でも容易に識別され、長く、粗で硬く毛髓を有している。軟毛はほとんど色素を持たず、短く軟らかい。毛幹の太さが、侵襲のバイオプシー試料では30 $\mu\text{m}$ 以下、フォトリソグラフィのような非侵襲での観察では40 $\mu\text{m}$ 以下を軟毛と定義されている [8, 9]。ヒトの頭皮の硬毛と耳介後部の軟毛を用いて、成長期毛包の形態的比較がなされている [10]。Vogtらは、耳介後部の軟毛と頭皮の硬毛について、表皮から毛球部の長さを計測しており、硬毛では3800 $\mu\text{m}$ 、軟毛では、650 $\mu\text{m}$ であった [10]。軟毛の漏斗部の直径は約80 $\mu\text{m}$ であり、硬毛の漏斗部では約170 $\mu\text{m}$ としている [10]。

### 1-3. 毛周期

毛の成長は周期的に繰り返され、これを毛周期 (hair cycle) と呼ぶ [11]。毛包の漏斗部から峡部は、毛周期に関与しない固定部、下半部は毛周期に依存して構造変化を起こす変動部である。毛周期は、成長期 (anagen)、退行期 (catagen)、休止期 (telogen) の3期に分けられ、毛は成長期にのみ産生され、伸長する (Fig. 1-4)。成長期が開始する兆候は、休止期における毛芽の細胞分裂に始まり、続いて毛包上皮系細胞が分裂を繰り返し、毛幹が伸長しながら、毛球部が脂肪層深

くまで達する。一定の期間ののち、毛周期は退行期に入り、毛球部の色素産生を停止する。さらに外毛根鞘などの毛包上皮系細胞にアポトーシスがおこり、バルジ領域まで毛包は退縮する。同時に結合織鞘、基底膜が厚くなり、硝子膜 (glassy membrane) となる [12]。退行期は2～4週とされている。休止期の毛包は、成長期毛包の1/2から1/3の長さで、前の毛周期の毛である棍毛 (club hair) の先端を毛芽 (hair germ) が取り囲み、その先端に毛乳頭が付随している。次の毛周期の毛幹伸長に伴い、休止期毛である棍毛 (前の毛周期の毛; club hair) は押し上げられ自然と脱落する。休止期は約3か月とされている。頭髪ではおおよそ10万の毛包があるとされ、毛周期の割合は、成長期が80%程度、退行期が1～2%、休止期が15%程度とされる。



**Fig. 1-4 Scheme of hair cycle** From: Paus R, The New England Journal of Medicine, 1999. 341, 491-497 [11].

#### 1-4. 毛の発生

毛包は胎児期に毛包原基が形成され、出生時には毛包の数は決定され、毛周期は確立している。毛包の発生は、ヒトの場合、胎生 2 カ月末に頭部から開始する。毛包は毛線に沿って頭部から尾部への順に形成される。毛包の発生は、胎生 4、5 カ月までに頭部以外にも起こり、胎生後期まで継続する。胎児期の毛包は表皮の基底層に集積する細胞群 (placode) が認められ原始毛芽と呼ばれ、わずか

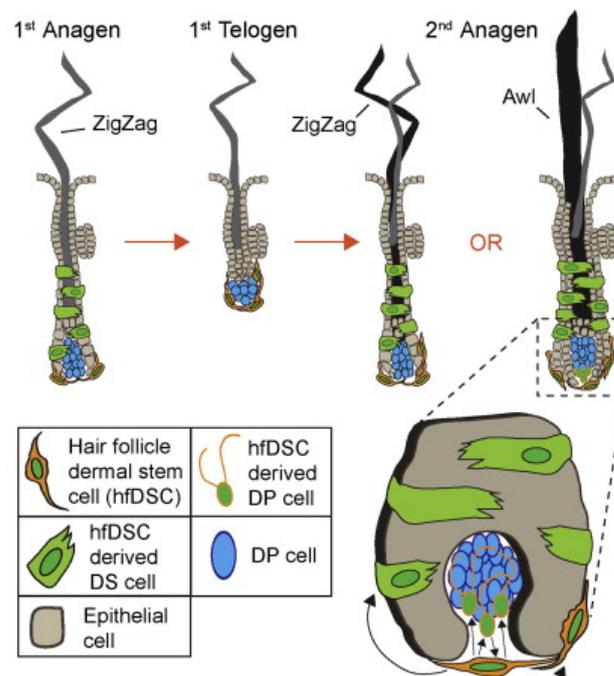
に隆起する。その後、真皮に向かって伸長し、真皮中の間葉系細胞が毛芽の周囲に集まり毛原基を形成し、将来の毛乳頭を形成する。胎生 5 カ月に完成したヒトの毛包は毛髓がなく生毛 (lanugo hair) よりなるが、生毛は胎生 8 カ月にすべて軟毛 (vellus hair) に生え変わる。生後約 1 年で、頭髪、眉毛、睫毛は硬毛 (terminal hair) に生え変わる [13]。

1 個の毛原基から一次毛包が発生すると、その両側に 2 個の毛包が形成される。それぞれを 2 次毛包、3 次毛包と呼ぶ。3 個の毛包を基本として毛群 (hair group あるいは follicular unit) を形成する。真皮の浅い領域では毛包峽部において外毛根鞘を共有し、皮脂腺の深さではコラーゲン線維により個々の毛群が識別可能である [8]。

#### 1-5. 毛包誘導能

毛乳頭 (dermal papilla; DP) 細胞は、毛包の成長と毛周期に司令塔としての重要な働きを持ち、上皮細胞と相互作用することで毛包を誘導する能力を有する (毛包誘導能) [14]。DP 細胞を含む毛球部を切断すると、毛包の上部の上皮細胞のみでは毛包は再生が認められないが、毛球部を削除した毛包に別の毛包由来の DP 細胞を含む毛球部あるいは DP 細胞を移植すると毛髪を産生することが報告されている [15, 16]。DP 細胞を通常平面培養すると、毛包誘導能は失われ

るが、スフェロイドなどの3次元培養により誘導能が一部回復され、ヒト DP 細胞由来の新生毛包がマウスへの移植実験により認められた [17]。DP 細胞のマウスへの移植実験では、DP 細胞に加え、結合織鞘 (dermal sheath、DS) 細胞にも、毛包誘導能が認められている [4]。近年、マウスの細胞分化系譜追跡実験により、DS 細胞が DP 細胞の前駆細胞である可能性が示唆された (Fig. 1-5) [18]。DS 細胞は加齢に伴い枯渇し、DP 細胞への供給が減少すると考えられている [19]。さらに iPS 細胞を用いて、*in vitro* で毛包を含むヒトの皮膚がマウスで再構成されたことが報告されている [2]。



**Fig. 1-5 DS cells are resource of DP cells** DP cells (blue) are provided from DS cells (green). From: Rahmani W., et al., Dev Cell, 2014. 31, 543-558 [18].

## 1-6. 薄毛

多くの育毛剤が上市されていることでも明らかであるように、薄毛に伴う悩みは尽きない。男性型脱毛（androgenetic alopecia, AGA）は遺伝的背景や男性ホルモンによって主に男性に現れる。男性ホルモンは毛の成長には不可欠だが、一方、AGA では毛の成長は抑制される [20]。特に毛乳頭細胞において、テストステロンが 5 $\alpha$ -リダクターゼにより還元されたジヒドロテストステロン（DHT）が男性型脱毛に大きく関与している。5 $\alpha$ -リダクターゼには 1 型と 2 型があり、2 型 5 $\alpha$ -リダクターゼは AGA の脱毛部において高発現しているが、非脱毛部には殆ど発現していない [21-23]。つまり、2 型 5 $\alpha$ -リダクターゼが、テストステロンを DHT に変換する反応に中心的な役割を果たしている。DHT は細胞核内でアンドロゲン受容体と結合し、退行期誘導因子 TGF- $\beta$  の発現を亢進する。TGF- $\beta$  は毛乳頭周囲の毛包上皮系細胞に作用してアポトーシスを誘導し、毛周期が本来より早く退行期に移行する。この結果、毛包が十分に成長する前にミニチュア化し、軟毛化すると考えられている (Fig.1-6) [12, 24]。近年、加齢による毛包基底膜の 17 型コラーゲンの減少により、毛包がミニチュア化することも報告されている [25]。女性の薄毛においては、新たな成長期が始まる前に、前の成長期の毛髪が抜け落ち、毛幹が失われたままの状態の kenogen と呼ばれる期間が継続することが脱毛症の一因と考えられている [26, 27]。



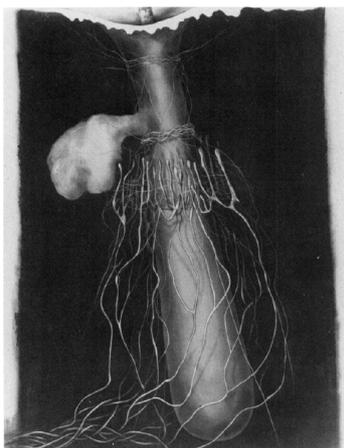
**Fig. 1-6 Scheme of miniaturization of HF** The progressive diminution in the size of scalp follicles during balding takes place over several successive generations of hair cycles. From: Montagna W. The structure & function of skin (third edition), 1974, 172-258 [12].

#### 1-7. 毛包の神経支配

毛包周囲には、多数の感覚神経線維や神経終末が存在するため、毛は触覚としても働く器官と考えられている。これまでの研究の多くは、毛髪に覆われた哺乳動物で行われてきた。毛包峽部には毛の毛軸に垂直に毛包周囲を取り巻く circumferential (pilo Raffini) 神経終末が存在し、毛が引っ張られた際の痛みを感知すると考えられている [28,29]。その内側には、毛の毛軸に平行に沿ってフォーク状の構造を有する柵状神経終末が存在し、毛がたわむ際の、毛の動きを感知している [30,31]。Fig. 1-7 に Montagna が提唱した毛包周囲の神経の分布について

ての模式図を示す [12]。

ヒトの毛包周囲の神経支配は、胎生 29 週頃に始まり、胎生 35 週には柵状神経を形成している [32]。



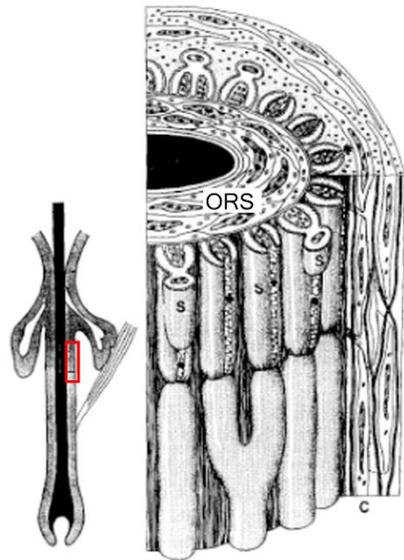
**Fig. 1-7. Diagram of the disposition of nerves around a small hair follicle** From: Montagna W. The structure & function of skin (third edition), 1974, 172-258 [12].

#### 1-8. 柵状神経終末

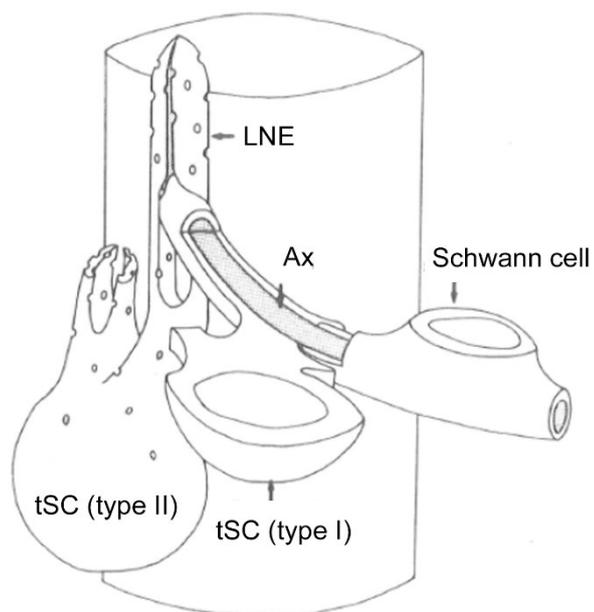
柵状神経終末の構造については、哺乳動物、特にラットやマウスにおいてが詳細に解析されてきた [33]。ヒゲなどの洞毛には特に発達しており、多数の柵状神経終末が認められる [34,35]。柵状神経終末は、ヒトの軟毛で発達していることが報告されているものの、硬毛の神経支配については明らかにされていない。柵状神経終末は、毛包に沿ってフォーク状の構造をしている。神経終末のそれぞれは槍型神経終末とも呼ばれ、神経の軸索が終末シュワン細胞に挟まれた特徴的な構造をしている (Fig. 1-8) [36]。柵状神経終末の軸索は、真皮側の太い神経束から毛包の峽部に達し、軸索は I 型終末シュワン細胞に覆われており、毛包の

長軸方向と並走する領域ではII型終末シュワン細胞に置き換わり、軸索がII型終末シュワン細胞の突起によって挟まれて存在する (Fig. 1-9) [33]。神経軸索の毛包側の領域は、毛包上皮系細胞である外毛根鞘 (ORS) の基底膜と神経終末が接しており、軟毛の峽部の断面を観察すると毛根に対し柵状神経終末が車輪のように外周しているように見える [30]。

柵状神経終末と毛包上皮系幹細胞は、毛包の構造において相互に作用すると考えられている。毛包が軸索の柵状神経終末が位置する毛包峽部は、毛包上皮系幹細胞のニッチであるバルジ領域の近傍であり、マウスにおいては、峽部に存在する神経が、毛包上皮系幹細胞の多能性に関与しているとの報告がされている [37]。毛包上皮系幹細胞は、表皮の創傷治癒の際、表皮幹細胞の供給源となるが、神経を切断すると、毛包上皮系幹細胞の多能性が変化し、表皮の再生能が低下する [37]。一方で、毛包上皮系幹細胞が柵状神経の構造の形成に関与することが明らかとなり、毛包の上皮系幹細胞ニッチであるバルジ領域と柵状神経終末の構造に重要な関連があると考えられている [38]。



**Fig. 1-8 Schematic representation of the lanceolate nerve endings of a vellus hair**  
 LNEs are aligned along the longitudinal HF. Modified from Halata Z. *J Invest Dermatol* 1993, 101: 75S-81S [36].



**Fig. 1-9 A diagram of the palisade nerve endings in rat pelage.** Modified from: Seguchi H. et al., *Anat Anz*, 1989. 169, 225-234. [33]

## 1-9. 収束イオンビーム走査型電子顕微鏡による電子トモグラフィ

毛包の微細構造の解析は、これまで透過型電子顕微鏡観察法（transmission electron microscopy; TEM）を用いて行われてきた [39]。真皮の血管内皮細胞やその周囲に存在する周皮細胞やデンドロサイトでは、TEM を用いた 3 次元構造解析法も検討されてきた [40, 41]。その方法では、百数十枚に及ぶリボン状の連続超薄切片を単孔グリッドに回収し同一の部位の画像を、TEM で連続して取得し、数  $\mu\text{m}$  の厚みで 3 次元再構築が画像を得る。連続超薄切片の回収は、非常に困難で熟練の技術が必要とされる [42]。

生物学の研究分野において、走査型電子顕微鏡観察法（scanning electron microscopy; SEM）も用いられてきた。SEM は、毛髪のキューティクルや断面などのような主に試料表面の凸凹形状の観察に用いられ、試料内部の観察には不向きである。観察対象が露出していない場合、組織を物理的にあるいは化学的に剥離したり、酵素や酸・アルカリなどで消化したりすることで、SEM で観察するための観察表面を露出させる剖出法の改良が行われてきた [12]。毛包においては、真皮成分を EDTA や臭化カリウムにより剥離し上皮系細胞の構造を表面観察する方法が用いられてきた [12, 43]。毛包周囲の毛細血管網の観察などには、血管に樹脂を還流し、樹脂を硬化したのち、真皮成分を水酸化カリウム水溶液で溶解し、残った樹脂を観察する鋳型法も開発された [44, 45]。

こうした中、電界放出型走査型電子顕微鏡 (field emission-SEM; FE-SEM) が開発され、生物試料の観察にも広く応用されるようになった [46]。電解放出型の電子銃を用いることで、電子ビームの径を小さくすることが可能となり、より高分解能な観察が可能となる。電子銃から放出された電子は、試料表面および内部の物質に作用し二次電子や反射電子、X線等を発生する。凸凹形状の観察には、比較的エネルギーの小さな二次電子が使用される。一方、高エネルギー側の反射電子は試料を構成する物質に依存し、元素番号が大きいほど、反射電子の放出量は大きくなり、組成情報を得ることに利用されている。反射電子を利用した生物試料の FE-SEM 観察には、高いコントラストを得るために試料側の調製も必要とされ、オスミウム、チオカルボキシヒドラジドなどの重金属の反応を重ねて行う OTO 染色法が一般的に用いられ、TEM に似た像が得られる [47]。

収束イオンビーム走査型電子顕微鏡 (focused ion beam-SEM: FIB-SEM) には、電解放出型の電子銃に加え、試料を薄く切削する収束イオンビームが搭載されており、試料表面の加工と画像取得が交互に実施することが可能である。連続で得られた画像は画像処理ソフトを用いて再構築され、任意の領域について電子顕微鏡レベルでの3次元像を得ることができる [48]。従来、TEM では困難だった毛包の内部構造を含めた3次元微細構造は、最近登場した FIB-SEM を用いることによって可能となると思われる。

電子トモグラフィー法には、SEM の内部にダイヤモンドナイフが搭載され、ダイヤモンドナイフによる薄切と画像取得を交互に行うことが可能な機構 (Serial block face SEM: SBF-SEM) や、ウルトラマイクロームによって作製した連続切片をウエハーなどに伸展して連続で観察する手法 (Array tomography) も開発されている [49, 50]。近年、皮膚科学研究の領域においても FIB-SEM が応用され始めている [51-53]。

#### 1-10. 光学顕微鏡と収束イオンビーム走査型電子顕微鏡を組み合わせた 3 次元光電子相関観察法

従来の光学顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を含めた蛍光顕微鏡を用いた方法では、分解能に限界があり、細胞内の目的の分子の局在を示すには十分とは言えない。分子の局在を調べるためには、免疫電子顕微鏡観察が適しているが、目的の分子が組織の中で限られた領域にしか存在しないような場合には、電子顕微鏡観察を行うのは容易ではない。光電子相関顕微鏡法 (correlative light and electron microscopy; CLEM) と呼ばれる、一つの試料に対して光学顕微鏡と電子顕微鏡を相関させて観察する手法が 1960 年頃から行われてきた [54]。蛍光免疫染色法の進化とともに近年 CLEM も発展した [55]。最も行われている手法が、蛍光免疫染色法に続いて電子顕微鏡観察を行う方法である。標的のタンパク

質を蛍光標識し、蛍光顕微鏡により発現部位を同定し、TEM や SEM を用いて細胞での局在を高い分解能で観察を行う [56]。CLEM を用いることによって、組織や細胞内での蛍光物質の位置や強さを手掛かりにし、その周囲の超微細構造を電子顕微鏡で解析することが可能となった。しかし、毛包では CLEM の適用例がない。前述の FIB-SEM では任意の領域を加工し画像取得が可能であるが、さらに共焦点レーザー顕微鏡と FIB-SEM を組み合わせた 3D-CLEM を用いることによって、特定した組織や細胞内での蛍光の局在を、3次元の超微細構造を解析することが可能となると思われる。

#### 1-11.本研究の目的

毛包構造の維持、毛周期における構造変化には、構成する細胞間の相互作用が不可欠である。また毛包の構造を維持し、毛周期に伴う毛の伸長および構造変化には、毛球部の間葉系細胞とバルジ領域の毛包上皮系幹細胞が深く関与している。

本研究では、毛包の構造や機能を深く理解するため、毛包における間葉系幹細胞と考えられている結合織鞘 (DS) 細胞および毛乳頭 (DP) 細胞について (第 2 章)、また、バルジ領域の毛包上皮系幹細胞の多能性に関与するとされる柵状神経終末について (第 3 章)、細胞形態の観点から従来の電子顕微鏡では明らか

にできなかった詳細な 3 次元微細構造を、FIB-SEM および 3D-CLEM を用いることによって明らかにする方法を確立することを目的とした。

第 2 章では、FIB-SEM を用いて毛球部の毛乳頭 (DP) および結合織鞘 (DS) における間葉系細胞の形態の違いについて検討を行った。FIB-SEM を用いた、毛球部 3 次元微細構造の観察法を確立した。その結果、これまで情報がなかった、毛乳頭 (DP) と結合織鞘 (DS) における間葉系細胞の 3 次元形態の違いを明らかにした。さらに細胞の形態から DP 細胞に特徴的な構造タンパク質を見出した。また、毛球部における間葉系細胞の細胞間接着について 3 次元構造解析を行った。

第 3 章では、ヒト頭皮における毛包周囲の柵状神経終末について解析を行い、柵状神経終末に対する共焦点顕微鏡と TEM を組み合わせた光電子相関観察 (correlative light and electron microscopy; CLEM) 法を確立した。その結果、これまで不明であった、硬毛の毛包における柵状神経終末の分布を明らかにした。また、共焦点レーザー顕微鏡および FIB-SEM を組み合わせた 3 次元光電子相関観察法 (3D-CLEM) を確立し、複数の毛包から構成される毛群での柵状神経の配置についても明らかにするとともに、毛包に接する柵状神経終末の構造を示した。さらに、ミニチュア化した毛包における柵状神経終末の分布について、正常な毛包との比較を行い、ミニチュア化した毛包の柵状神経終末は、硬毛の毛包の

柵状神経終末より有意に少ないことを明らかにした。

## 第2章 FIB-SEMを用いた、ヒト成長期毛球部における間葉系細胞種の3次元 微細構造解析

### 2-1. 緒言

間葉系細胞である DP 細胞は、毛包の発生と毛周期調節において重要な役割を果たし、上皮マトリックス細胞の増殖にも関与している [57,58]。DP 細胞の最も重要な特性の1つは、毛包誘導能である [16,59]。毛包から分離した DP 細胞を、上皮細胞と混合して皮内に注入すると、新たな毛包が形成される。マウスにおける細胞移植実験により、毛球部の結合織鞘 (DS) の中でも、基底床 (basal plate) の下部に存在する dermal sheath cup (DSC) 細胞 (Fig.1-2) が毛包を誘導することから、DSC 細胞にも毛包誘導能があることが示されている [4]。毛髪の太さは毛乳頭の大きさに相関し、太い毛ほど毛乳頭のサイズが大きいとされる [60]。ヒトにおける臨床研究が進められ、DSC 細胞を用いた自家細胞移植により毛髪の直径が太くなることが示され、移植した DSC 細胞が毛乳頭へ取り込まれ、毛乳頭の構造や成長期の維持に寄与していると考えられている [61]。

マウスの毛包における組織学解析から、成長期から休止期にかけて DP 細胞の数は、優位に減少するが、成長期初期に基底床付近の DS 細胞が分裂期に入ることが示され、成長期において、DS 細胞によって結合織鞘の伸長と DP 細胞の

供給が行われると考えられた [62]。さらに近年 DS 細胞は、マウスの細胞追跡実験によって、DS 細胞が毛乳頭へ移行することが示され、DP 細胞の前駆細胞であると考えられている [18]。DS 細胞は、損傷した DP 細胞を置き換える可能性があることが示されている [19]。毛球部の基底膜に発現する細胞外マトリックスの発現は、毛周期に応じて変化することも報告されている [63]。DS 細胞は結合織鞘の 3 層から成るコラーゲン繊維内に存在し、退行期では明瞭な硝子様膜となり厚みが増す [7]。さらに、DP 細胞と DS 細胞は、ギャップ結合を介してネットワークを形成すると推測されている [64]。近年、DS 細胞が退行期の毛包収縮の駆動力を持っていることも示された [65, 66]。これらの知見は、毛乳頭を取り囲む DS 細胞の形態が毛周期を通じて変化することを示しているが、詳細は明らかではない。

近年、走査型電子顕微鏡の後方散乱電子を用いた電子線トモグラフィーは、透過型電子顕微鏡 (TEM) と同様の画像を生成し、皮膚科学の領域でも応用されてきている [48, 51, 52]。

本研究では、TEM と集束イオンビーム走査型電子顕微鏡 (FIB-SEM) を使用して、毛球部の間葉系細胞の形態的な特徴を明らかにすることが可能かどうか明らかにすることを目的とした。さらに、その結果得られた同細胞の役割を考察した。

## 2-2. 実験方法

### 2-2-1. 試料

ヒト毛包組織は、28歳、42歳、50歳、59歳および68歳男性の植毛手術の際に余剰となった後頭部頭皮から採取した。本研究は、ヘルシンキ宣言の原則に従って資生堂ヒト倫理委員会により承認された。

### 2-2-2. 毛球部における細胞形態の解析

ヒト頭皮は真皮-脂肪層間で切断し、脂肪層に埋没している毛包を、実体顕微鏡下でピンセットを用いて単離した。単離毛包は以前に報告されている報文を元に、毛周期を分類した [67-69]。単離毛包は4%パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を用いて、一晚4°Cで固定した。PBSで洗浄したのち、0.5% Triton X-100を含むPBSにより透過処理を室温30分行った。続いて、3% ウシ血清アルブミン、0.05% Triton X-100を含むPBSを用いてブロッキングを室温30分行った。2 µg/ml HCS CellMask Stain (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を含むブロッキング液で30分染色を行った。PBSで洗浄したのち、Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific) で核染色を行った。試料はプレパラートに包埋し共焦点顕微鏡 LSM700 (Carl Zeiss, Germany)により観察を行った。

### 2-2-3. FIB-SEM および TEM 観察試料の調製

皮膚での検討で使用されている手法を元に試料を作製した [48]。50 歳男性の頭皮より単離毛包を得た。単離毛包は、ハーフカルノフスキー固定液を用いて、4°Cで3時間固定したのち、1.5% potassium ferrocyanide、2% 四酸化オスミウムを含むカコジル酸緩衝液で4°Cで1時間固定した。さらに1% チオカルボキシヒドラジド水溶液を用いて室温で1時間固定し、2% 四酸化オスミウム水溶液を用いて、4°Cで1時間固定した。引き続き、1% 酢酸ウラニル水溶液を用いて、4°Cで一晩固定を行った。さらに、アスパラギン酸鉛水溶液で室温30分のブロック染色を行って、エタノールにより脱水した。試料はエポキシ樹脂 (Epon 812, TAAB Laboratories, Berks, UK)に置換し60°Cで72時間重合した。樹脂はウルトラミクロトーム EM UC7 (Leica Microsystems, Vienna, Austria)を用いて、トリミングを行った。80nm厚の超薄切片を作製し、透過型電子顕微鏡 H-7100、H-7600 (Hitachi High-Technologies, Tokyo, Japan)での観察に供した。得られた毛球部の画像は Adobe Photoshop CC 2018によりモンタージュを行った。樹脂側は試料台に接着し、MC1000 ion sputter coater (Hitachi High-Technologies)により白金パラジウム蒸着を行った。

#### 2-2-4. FIB-SEM 画像の取得

樹脂包埋した試料を Helios660 FIB-SEM system (FEI, Eindhoven, Netherlands)に挿入し加速電圧 20 kV 下で、試料表面の2次電子像から、任意の観察領域を

決定した。30 kV ガリウムイオンビームにより加工領域を切削し露出させた。加速電圧 2 kV 下で反射電子像を生成した。Auto Slice & View (FEI) により、30 nm の加工と画像取得を交互に行い連続画像を得た。画像は解像度 3072 × 2048 pixel、6 μs dwell time で取得した。

#### 2-2-5. 3次元画像の再構築およびセグメンテーション

連続画像は Avizo ver. 9.2 (FEI) によりアラメントを行って、位置ずれを調整したのち、3次元再構築を行った。マニュアルにより細胞膜をトレースし、3次元再構築像を得た。

#### 2-2-6. 免疫組織化学染色

頭皮は 4% パラホルムアルデヒドを含む PBS を用いて 4°C で一晩固定したのち、30% スクロース水溶液に 3 時間浸漬し、O.C.T. コンパウンド (サクラファイnteック) に包埋した。クライオマイクロトームにより 10 μm 厚の凍結切片を作製した。10mM クエン酸緩衝液 (pH6.0) に浸漬し、20 分間の熱処理により抗原賦活を行った。3% ウシ血清アルブミン、0.05% Triton X-100 を含む PBS を用いてブロッキング反応を室温 30 分を行った。抗 SPTBN1 抗体 (abcam, UK) を 4°C で一晩反応させた。コントロールには isotype IgG control (abcam) を用いた。二次抗体には抗ウサギ Alexa-488 (Thermo Fischer Scientific) を用いた。Hoechst 33342 (Thermo Fischer Scientific) により核染色を行った、共焦点顕微鏡 LSM700 で観

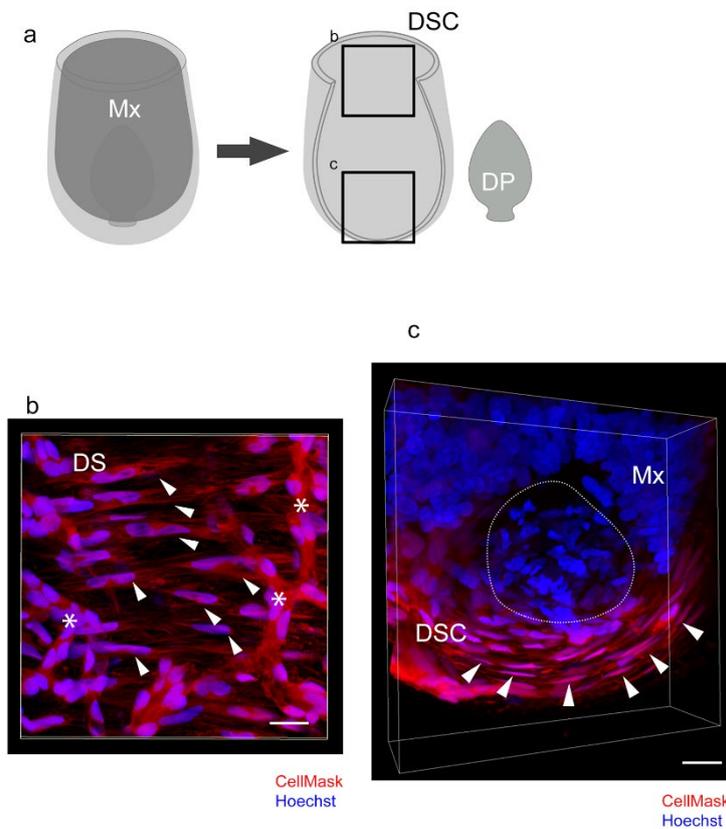
察した。

## 2-3. 結果

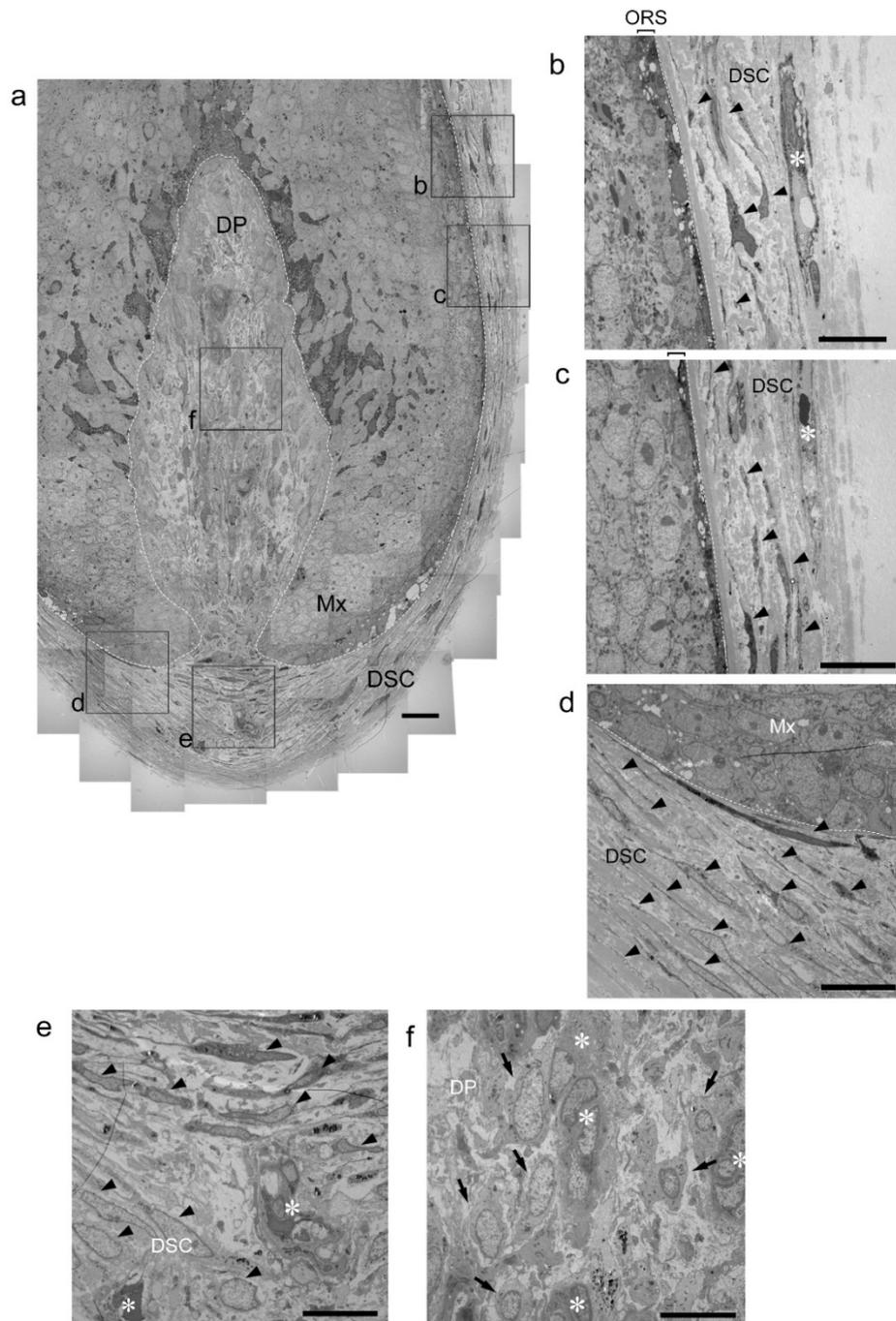
### 2-3-1. 毛球部における間葉系細胞の形態は毛球の部位に依存する

毛球部における間葉系細胞の配向を理解するために、細胞膜を染色する CellMask を使用して DS の細胞形態を可視化した (Fig. 2-1a)。血管内皮細胞を除く DS 細胞は、毛軸に対して横方向に存在したが、DSC 細胞は毛乳頭の底部に沿って整列していた (Figs. 2-1b, c)。

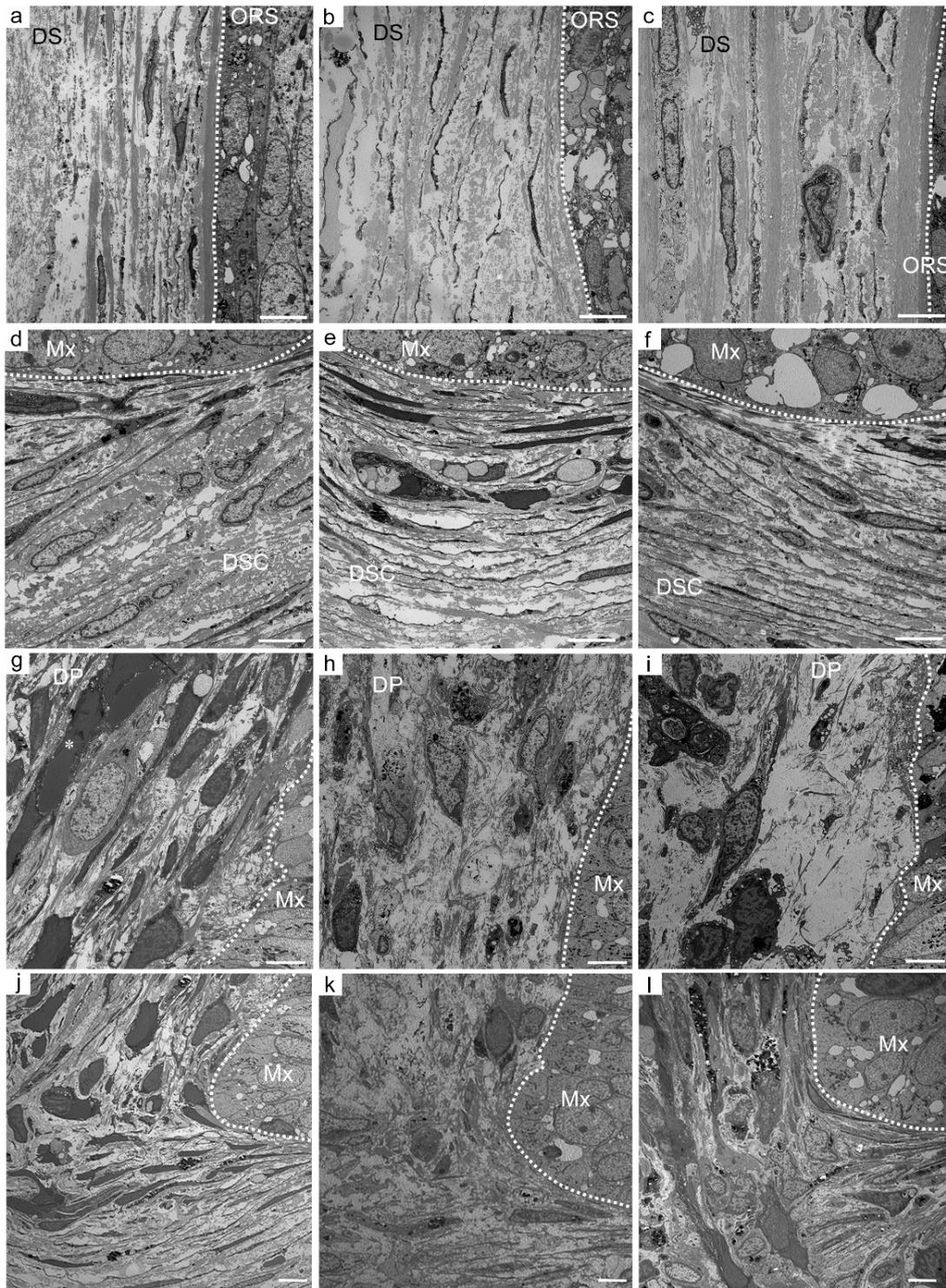
次に、TEM を用いて、成長期の毛球部の DP 細胞と DSC 細胞の微細な形態学的特徴を抽出した。TEM による毛球部全体のモンタージュ画像は、毛球部における細胞の正確な局在と形態を示した (Fig. 2-2a)。DSC の上側に位置する DS 細胞は、毛の軸に対して横方向に走るコラーゲン線維間に存在し、不定形の核と薄い細胞質を有していた (Figs. 2-2b, c)。基底床では、DSC 細胞は糸のように細い構造の細胞質と薄く扁平な核を有していた (Fig. 2-2d)。基底床と毛乳頭の間、茎 (stalk) に位置する DSC 細胞の形状は、上部の DSC 細胞およびマトリックスの外側の DSC 細胞と比較して厚かった (Fig. 2-2e)。DP 細胞は楕円形をした核であった (Fig. 2-2f)。Fig. 2-3 に 3 ドナーの代表的な毛球部の TEM 像を示す。3 ドナーの毛球部の DS、DSC、DP、基底床の茎 (stalk) における間葉系細胞の形態は Fig. 2-2 と同様であった



**Fig. 2-1 Distribution of mesenchymal cells in the DS and DSC in anagen hair bulb**  
 (a) Scheme for the observation of DS and DSC cells. (b) Cells (arrowheads) aligned vertically against the follicular axis in the DS. (c) Cells (arrowheads) aligned along the bottom of the DP region. A small number of DP cells was left after the removal. Cell membrane: red; nuclei: blue; blood vessels: asterisk. Scale bars = 10  $\mu\text{m}$  (b) and 15  $\mu\text{m}$  (c). Images are from hair follicles of a 68-year-old male.

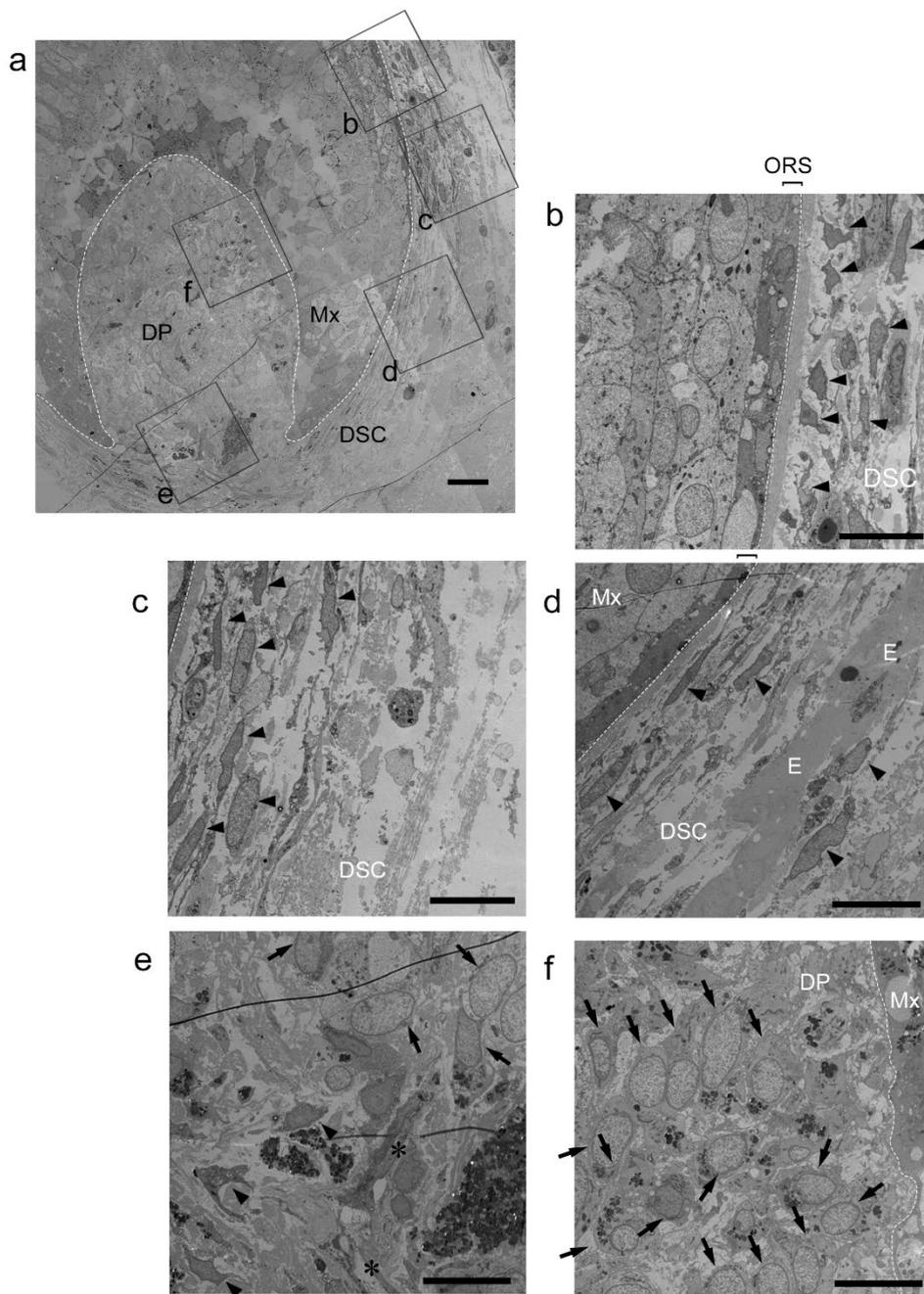


**Fig. 2-2. Overview of an anagen hair bulb in an anagen HF** (a) TEM micrograph of the region of the hair bulb, which includes the basal plate (white dotted line), dermal papilla (DP), dermal sheath cup (DSC), matrix (Mx), and DSC line (black line). (b-f) Magnified images of black rectangles in panel (a) show mesenchymal cells in the upper side of the DSC (b, c), lower side of the DSC (d, e), and DP (f). Black arrowheads: DSC cells; black arrows: DP cells; asterisk: blood vessels; dashed line: basal membrane. Scale bars = 20  $\mu\text{m}$  (a) and 10  $\mu\text{m}$  (b-f). Images are from hair follicles of a 42-year-old male.

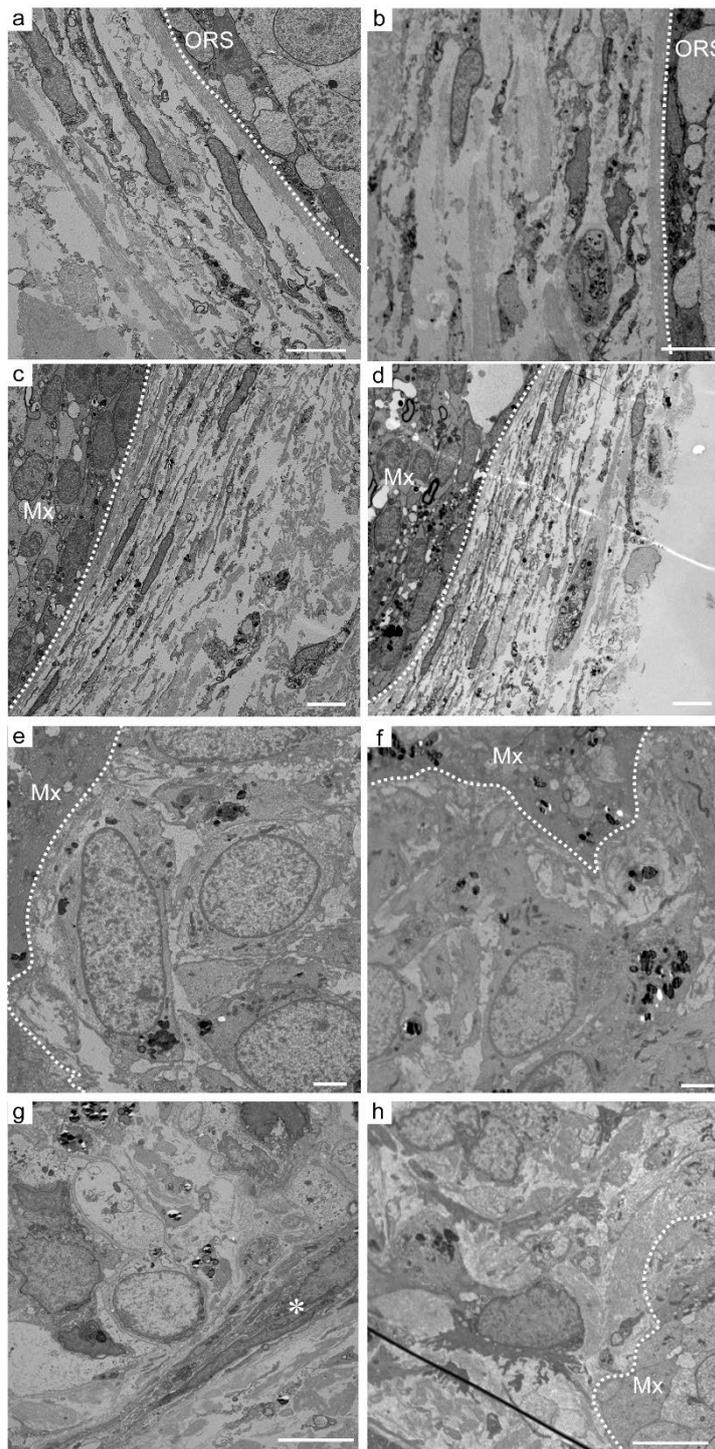


**Fig. 2-3. Morphologies of mesenchymal cells in anagen HFs** TEM micrographs indicate the regions of DS (a - c), DSC (d - f), DP (g - i) DS and the stalks (j - l). Dermal papilla, DP; dermal sheath, DS; dermal sheath cup, DSC; matrix, Mx; outer root sheath, ORS. Asterisks: blood vessels; dotted line: basal membrane. Scale bars = 5  $\mu$ m. Images are from HF's of 28- (a, d, g, j), 50- (b, e, h, k), 68- (c, f, i, l) year-old males.

次に、退行期初期の毛球部における間葉系細胞の形態を調べた。TEM のモニター画像は、退行期毛包に特異的な硝子様膜はまだ形成されていなかったが、DP の形状が楕円形で基底床の毛母が開いており、退行期初期の特徴であることを示していた (Fig. 2-4a)。退行期初期の DSC 細胞の形状は、マトリックスの外側の成長期 HF と比較して丸く、茎 (stalk) と DS 細胞は収縮しているように観察された (Figs. 2-4b-d)。上部の DSC 細胞は、不規則なコラーゲン線維の中に不均一な核と薄い細胞質を有していた (Figs. 2-4b, c)。コラーゲン線維の方向性は、乱れており、弾性線維が認められた (Fig. 2-4d)。基底床の茎 (stalk) に位置する間葉系細胞は、DP 細胞と区別するのが困難であった (Figs. 2-4e, f)。退行期初期の DP 細胞は、成長期の DP 細胞と比較してより丸く、より密であった (Fig. 2-4f)。 Fig. 2-5 に 2 ドナーの代表的な毛球部の TEM 像を示す。退行期毛包が得られた 2 ドナーの毛球部の DS、DSC、DP、基底床の茎 (stalk) における間葉系細胞の形態は Fig. 2-4 と同様であった。



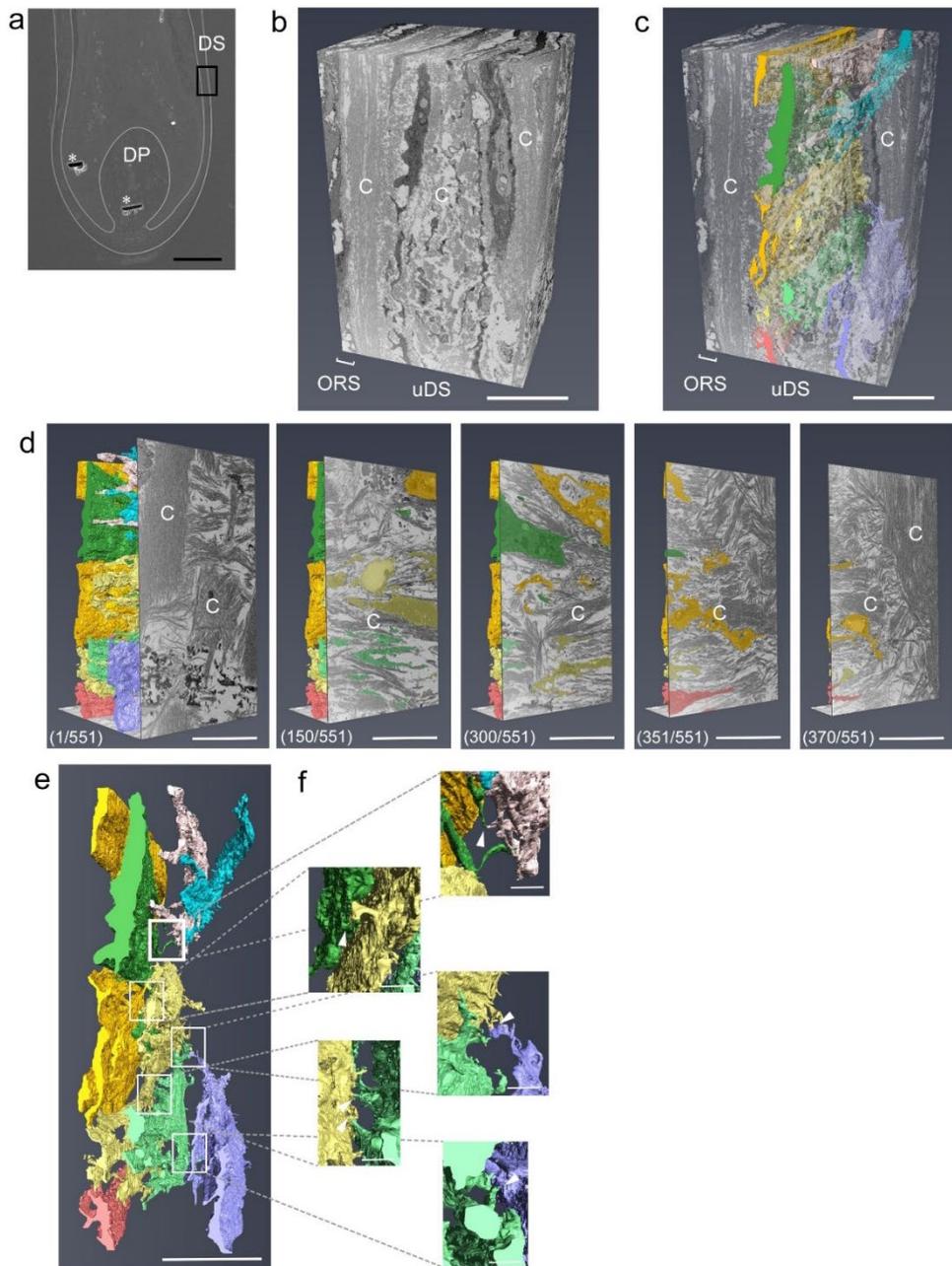
**Fig. 2-4. Overview of an anagen hair bulb in an early catagen HF** (a) Cross-sectioned TEM micrograph of the region of the hair bulb, which includes the basal plate (white dotted line), dermal papilla (DP), dermal sheath (DS), and matrix (Mx). Black rectangles are magnified in panel b-g. Magnified images of black rectangles in panel (a) show mesenchymal cells in the upper side of the DSC (b, c), lower side of the DSC (d, e), and DP (f). Black arrowheads: DSC cells; black arrows: DP cells; E, elastic fibers; asterisks: blood vessels; dashed line: basal membrane. Scale bars = 20  $\mu\text{m}$  (a) and 10  $\mu\text{m}$  (b-f). Images are from hair follicles of a 42-year-old male.



**Fig. 2-5. Morphologies of mesenchymal cells in anagen HF's** TEM micrographs indicate the regions of DS (a, b), DSC (c, d), DP (e, f) and the stalks (g, h). Dermal papilla, DP; dermal sheath, DS; dermal sheath cup, DSC; matrix, Mx; outer root sheath, ORS. Asterisks: blood vessels; dotted line: basal membrane. Scale bars = 5  $\mu\text{m}$ . Images are from HF's of 50- (a, c, e, g), 68- (b, d, f, h) year-old males.

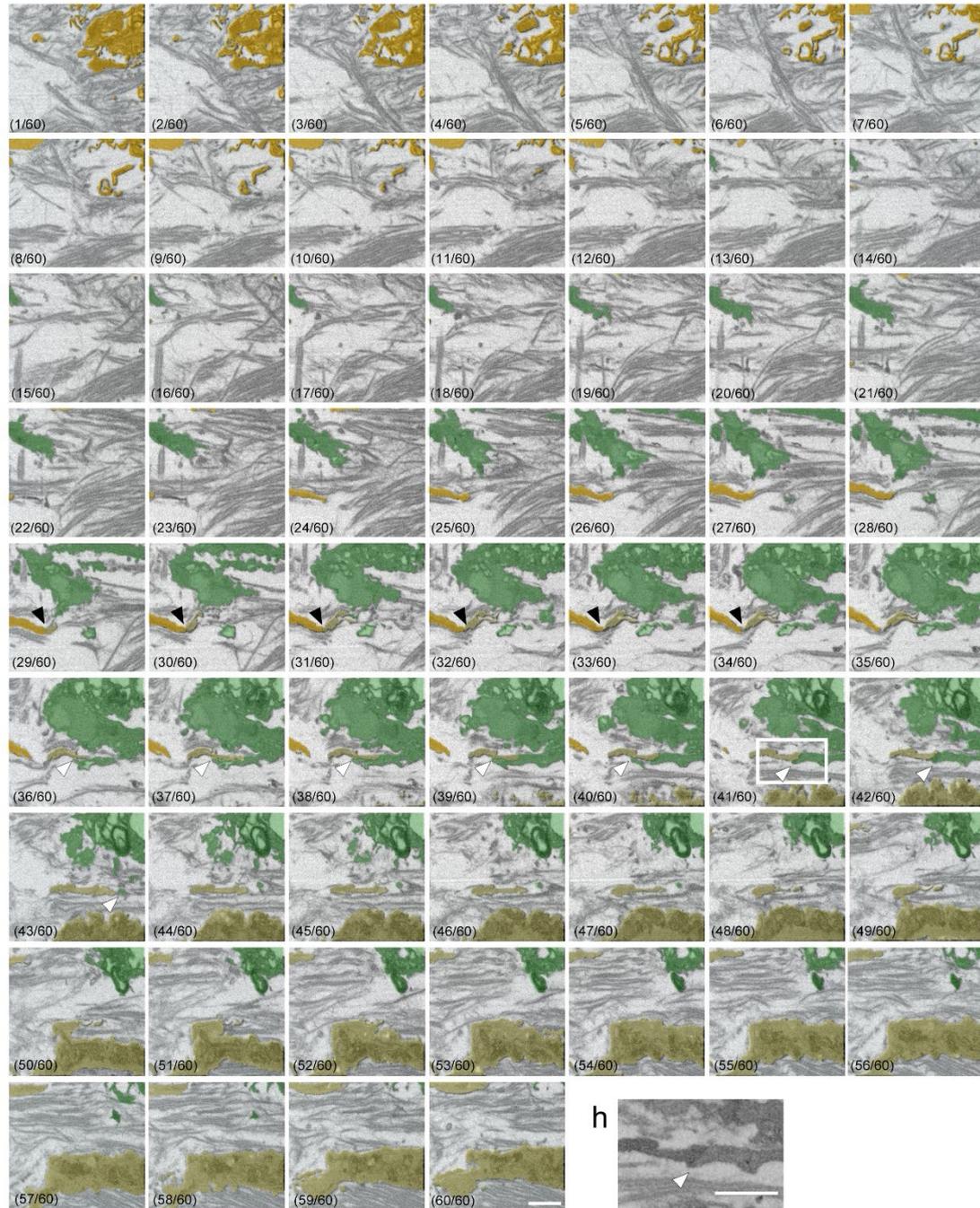
### 2-3-2. DS 細胞はコラーゲン線維の中間層に並走し微小突起で接する

TEM によるモンタージュ画像から、毛球部に存在する間葉系細胞は、存在部位によって、細胞形態が異なると考えられた。そこで、成長期毛球部における間葉系細胞の構造を詳細に特徴付けるために、DS、DSC、DP および基底床の茎 (stalk) の間葉系細胞を FIB-SEM で詳細に解析を行った。まず、DS 領域の再構築を試みた (Fig. 2-6a)。Fig. 2-6b に FIB-SEM により得られた DS 領域の連続画像から再構築を行った 3 次元画像を示す。11.8 × 11.8 × 30 μm<sup>3</sup> にトリミングした領域には、外毛根鞘、基底膜、DS 領域のコラーゲン層が含まれる。FIB-SEM による 3 次元再構築像には、8 つの DS 細胞が存在し、それぞれ異なる 8 色で示した (Fig. 2-6c)。DS 細胞は、基底膜に隣接する 3 層のコラーゲン層の中間の層に、毛軸に対して直行して存在した (Fig. 2-6d)。3 次元再構築像から、DS 細胞は薄く、凸凹した細胞表面であり、それらは微小な突起であることが示され、細胞の周辺領域で互いに接していた (Figs. 2-6e-h)。



**Fig. 2-6. FIB-SEM images indicate that DS cells have thin flattened cytoplasm and are connected to each other at protrusions in an anagen HF** (a) Surface of a cross-sectioned hair follicle embedded in resin. (b) Three-dimensional reconstruction of the DS region in the black rectangle in panel (a). (c) DS cells depicted by eight different colors (yellow, green, pale pink, blue, pale yellow, pink, pale green, and purple). (d) DS cells existed among collagen bundles that formed three layers. DS cells resided within the middle layer of collagen bundles that are ran along the orthogonal axis of hair follicles. (e, f) DS cells contacted each other at the points of small processes.

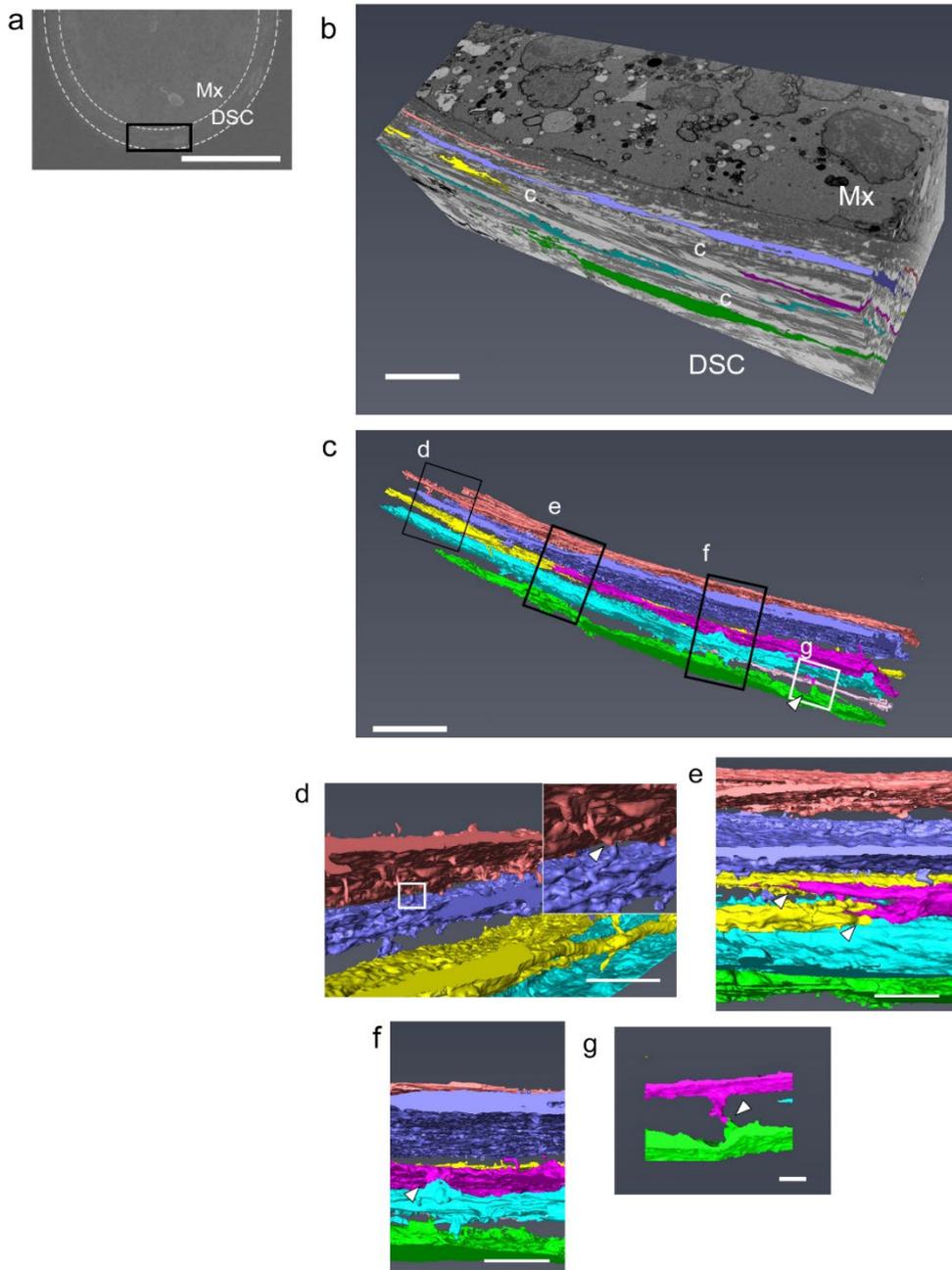
g



**Fig. 2-6. Continued.** (g) Serial sectioned images of the cell-cell contact by ‘finger-like’ protrusions (black and white arrowheads) indicated by a bold white rectangle in a panel e. (h) A magnified view in a white rectangle of panel g. Asterisks, traces milled by FIB; DS, dermal sheath; DP, dermal papilla; c, collagen. Scale bars = 20  $\mu\text{m}$  (a), 7  $\mu\text{m}$  (b-e), 3  $\mu\text{m}$  (f) and 1  $\mu\text{m}$  (g, h). Images are from hair follicles of a 50-year-old male.

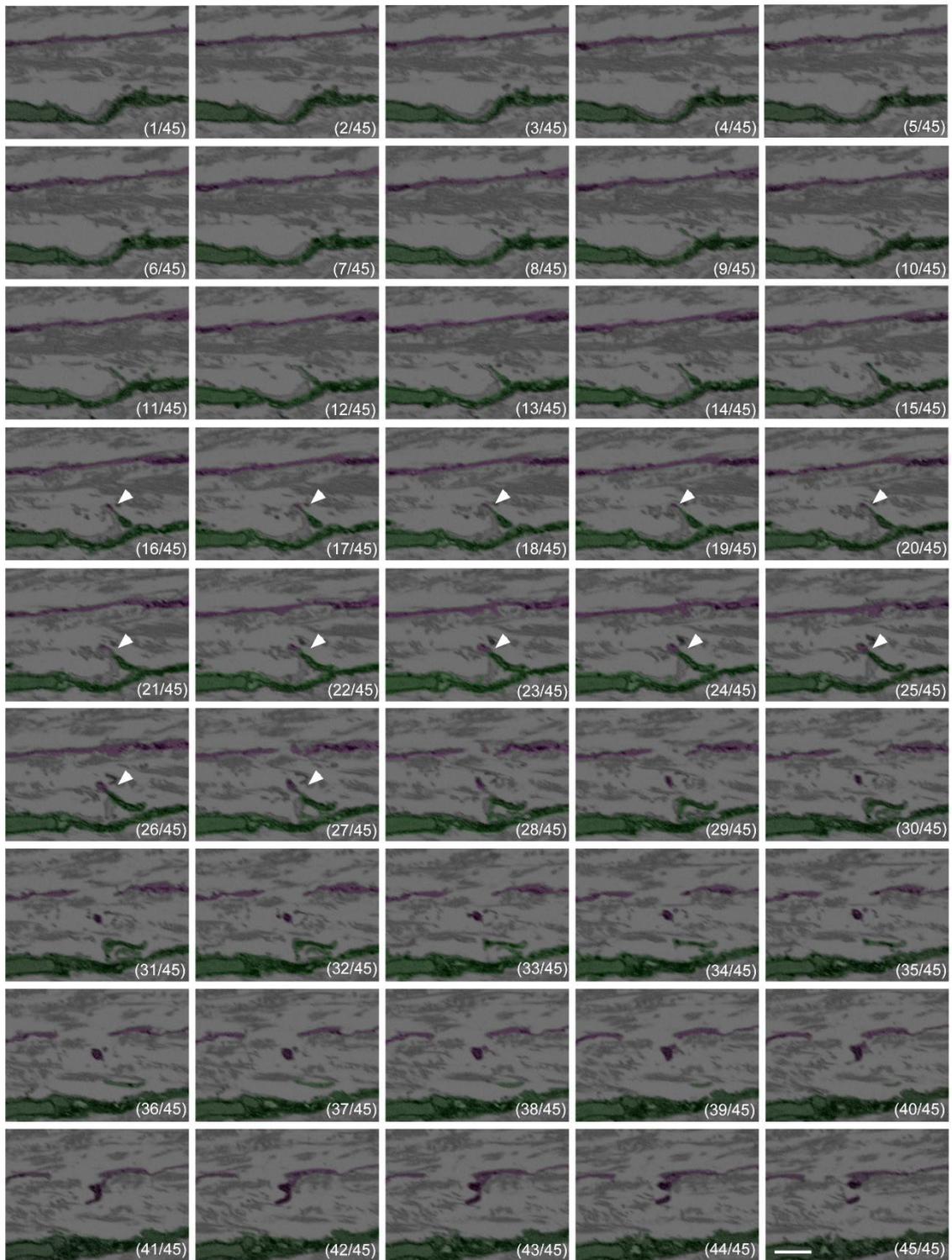
### 2-3-3. DSC 細胞は基底床のコラーゲン線維に沿って存在し、微小突起を介して接する

次に、FIB-SEM を用いて、成長期毛球部における DSC 細胞の 3 次元構造を解析した (Fig. 2-7a)。DSC 領域を FIB-SEM により観察し、得られた連続画像を再構築し、 $33.1 \times 12.2 \times 21.0 \mu\text{m}^3$  にトリミングした (Fig. 2-7b)。この領域には 7 つの DSC 細胞が存在し、異なる 7 色で示した (Fig. 2-7b)。毛球部の硝子様膜に沿って薄いコラーゲン線維が配向し、その間に DSC 細胞が存在することが明らかとなった (Fig. 2-7b)。DSC 細胞は平らな細胞質を有し、細胞質の表面は DS 細胞と比較して平坦だった (Fig. 2-7c)。微小な突起が DSC 細胞の表面から伸び、突起の先端で互いに接していた (Figs. 2-7d-g)。Fig. 2-5g に対応する連続画像を Fig. 2-7h に示す。Fig. 2-7h の白矢頭で示したように、2 つの DSC 細胞が接着する様子が検出された。細胞接着は、連続した 12 枚の画像にわたって認められ、約 360 nm と微小であることが明らかとなった。さらに TEM 観察から DSC 細胞の突起の接触は、ギャップ結合様の構造であることが示唆された (Figs. 2-7i,j)。

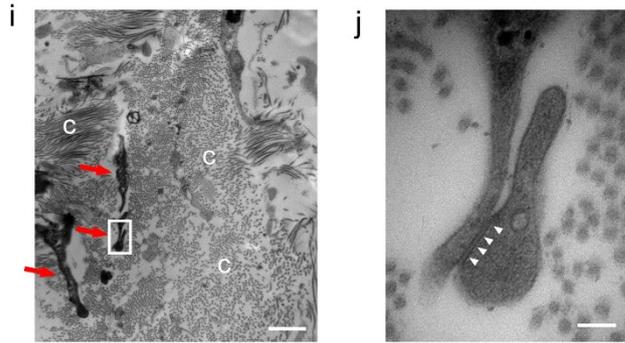


**Fig. 2-7. FIB-SEM images indicate that DSC cells have thin flattened cytoplasm and connect to each other at protrusions** (a) Surface of a cross-sectioned hair follicle embedded in resin. The border of the DSC and matrix is indicated by white-dotted lines. The observation field is indicated by a white rectangle. (b, c) Three-dimensional reconstruction of DSCs shown in seven different colors (pink, blue, yellow, purple, pale blue, gray, and green) with serial sectioned images (b) and without them (c). (d-g) Magnified views of connecting points between DSCs are indicated by white arrows from the rectangles of panel (c). Small and thin protrusions elongated from the cell membrane and connected to each other (white arrowheads). The inset is magnified in panel d.

h



**Fig. 2-7. Continued** (h) Serial sectioned images of the cell-cell contact by 'finger-like' protrusions (white arrowheads), which are shown in panel g.

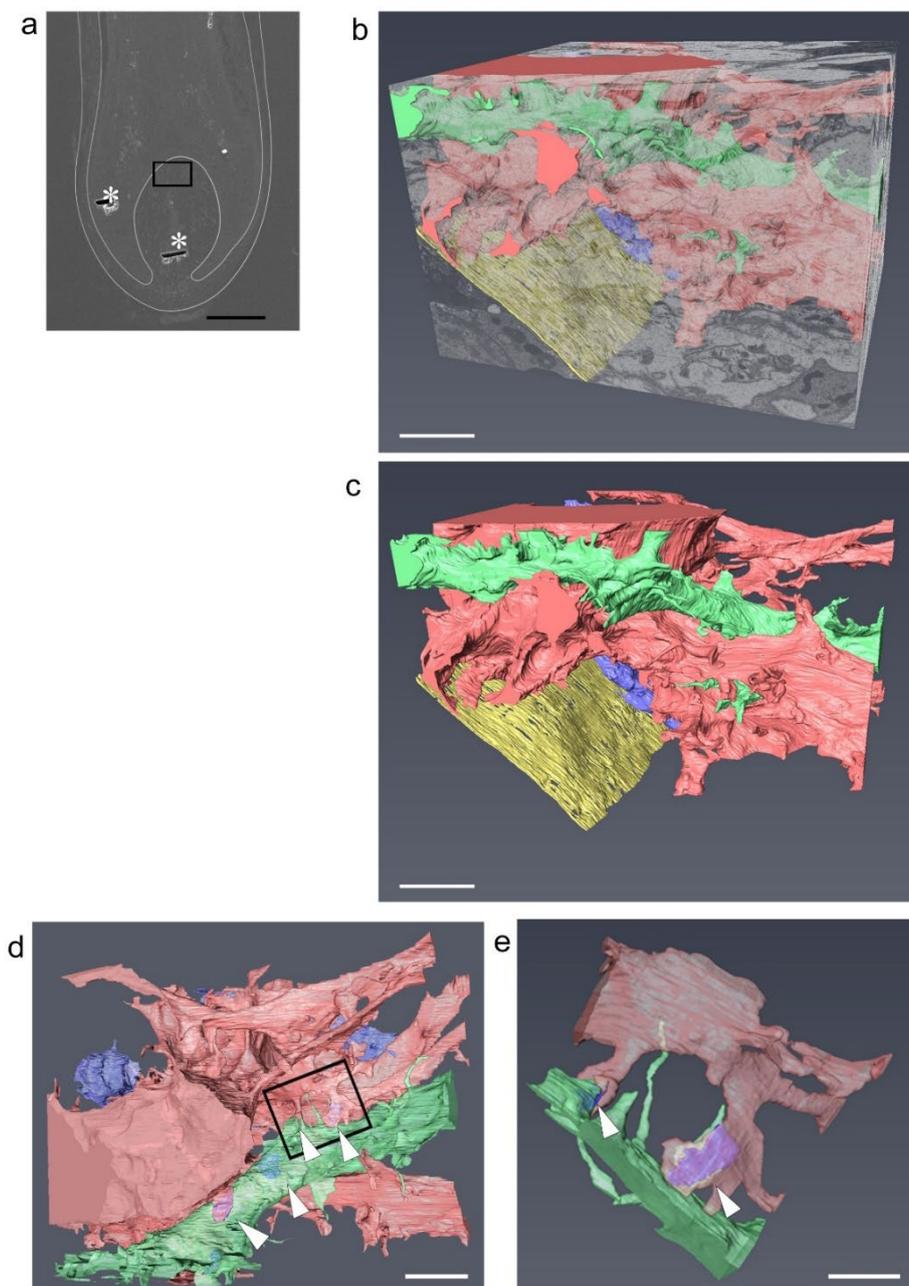


**Fig. 2-7. Continued** (i, j) Small protrusions contacted via gap junctions between DSC cells in the white rectangle of panel i (white arrowheads). Scale bars = 100  $\mu\text{m}$  (a), 5  $\mu\text{m}$  (b, c), 2  $\mu\text{m}$  (d-f), 1  $\mu\text{m}$ . (g, h), 500 nm (i), and 100 nm (j). Images are from hair follicles of a 50-year-old male (a-h) and 28-year-old male (i, j).

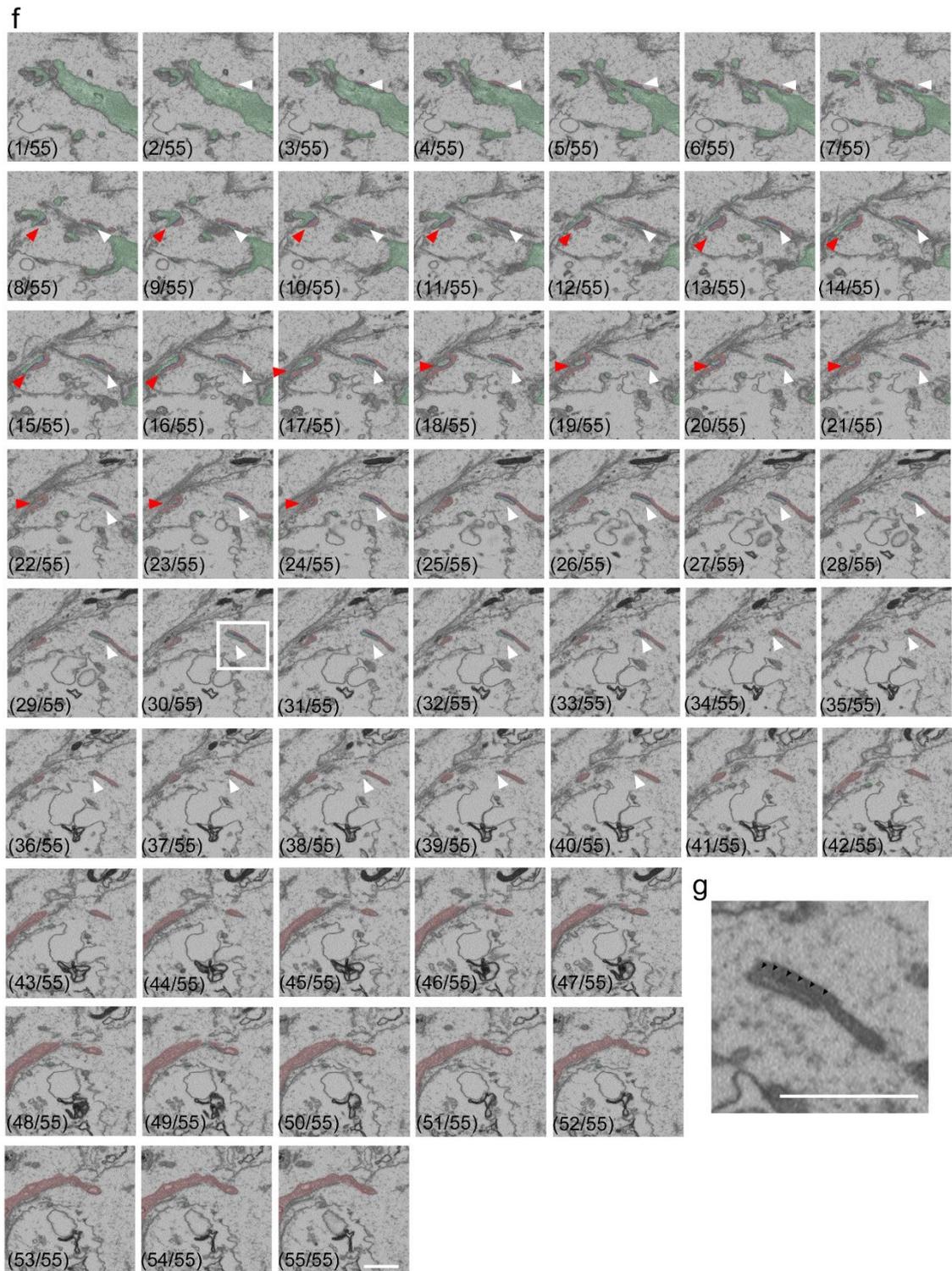
#### 2-3-4. DP 細胞は枝分かかれた構造を持ち、手のひらのような突起で接する

さらに、FIB-SEM を用いて、成長期の毛球部における DP 細胞の 3 次元構造を解析した (Fig. 2-8a)。DP の連続画像より  $15.9 \times 10.7 \times 13.0 \mu\text{m}^3$  の領域をトリミングし再構築した (Fig. 2-8b)。この領域にはコラーゲン線維は認められず、3 つの DP 細胞が存在し、それぞれ異なる色で抽出した (Fig. 2-8c)。DP 細胞の 3 次元構造は、DS 細胞、DSC 細胞と大きく異なっていた。桃色で示す DP 細胞は、分岐した細胞質と、分岐構造から伸びた突起を持ち、他の 2 つの DP 細胞の分岐構造を覆い、互いに面で接していた (Fig. 2-8d)。DP 細胞同士が接する領域は、「手のひら」のような特徴的な突起であることがわかった (Figs. 2-8e-g)。Fig. 2-8g に対応する連続画像を Fig. 2-8f に示した。Fig. 2-8f の白矢頭で示すように、2 つの DP 細胞の細胞接着は 39 枚にわたり、約  $1\mu\text{m}$  に相当する。この細胞接着

は、ギャップ結合であった (Fig. 2-6h)。



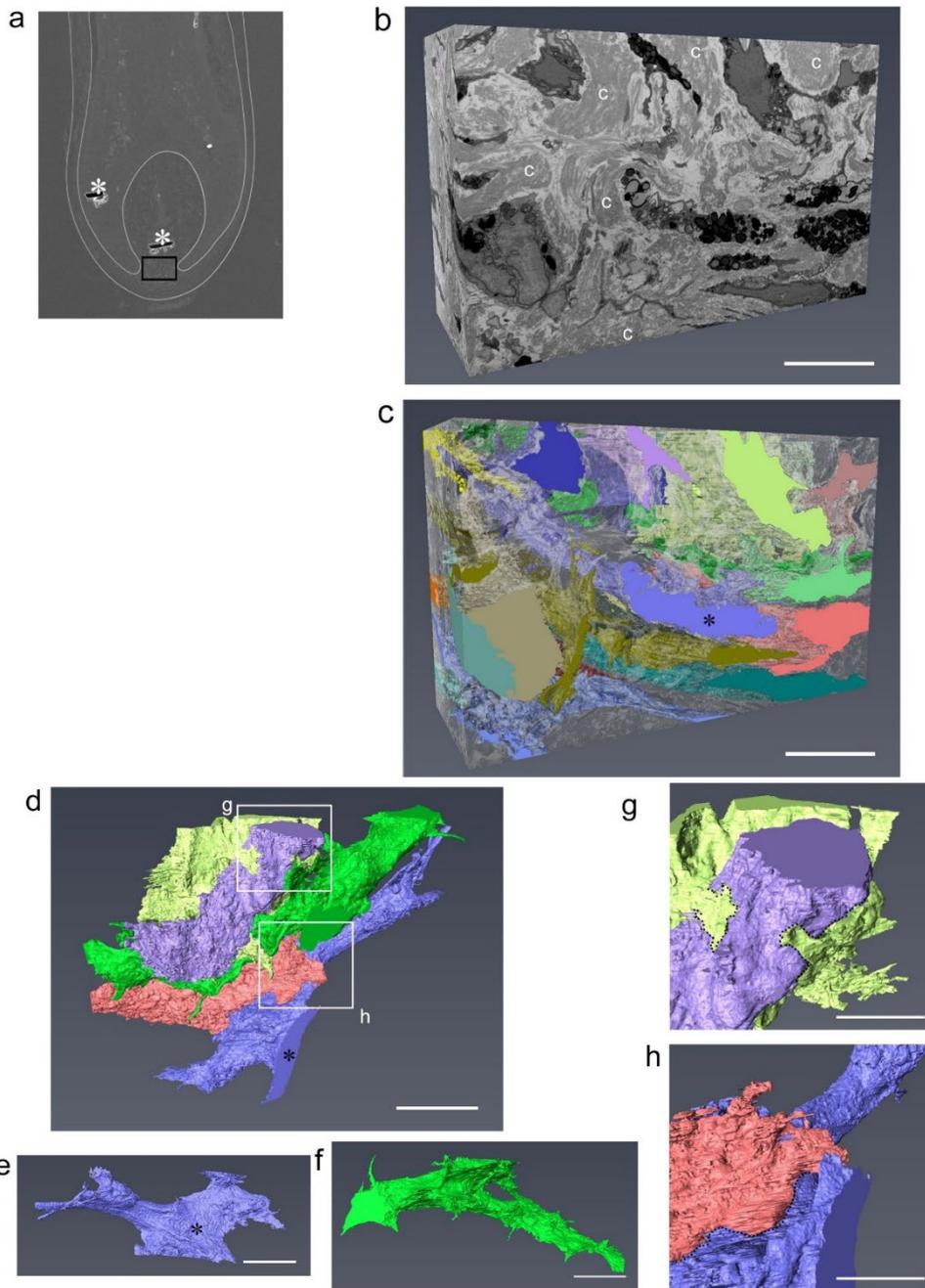
**Fig. 2-8 FIB-SEM images indicate that dermal papilla (DP) cells have thick cytoplasm with branches and connect to each other at protrusions** (a) Surface of a hair follicle embedded in resin. The observation field, which is the DP area, is indicated by a black rectangle. (b, c) Three-dimensional reconstruction of DP shown in four different colors (DP cells; pink, blue, and green; basal lamina; yellow). (d) 3D reconstruction of DP cells from a different angle to panel c. (e) Magnified view of a black rectangle of panel d. ‘Palm-like’ protrusions contact via gap junctions (blue).



**Fig. 2-8 Continued** (f) Serial sectioned images of the ‘palm-like’ protrusions in panel e. The two DP cells contact by gap junctions indicated by white and red arrowheads. (g) A magnified view is shown in a white rectangle of panel f. Gap junctions are indicated by black arrowheads. Scale bars = 100  $\mu\text{m}$  (a), 3  $\mu\text{m}$  (b–e) and 1  $\mu\text{m}$  (f, g). Images are from hair follicles of a 50-year-old male.

### 2-3-5. DS 細胞から DP 細胞への形態変化は、基底床の茎 (stalk) で起こる

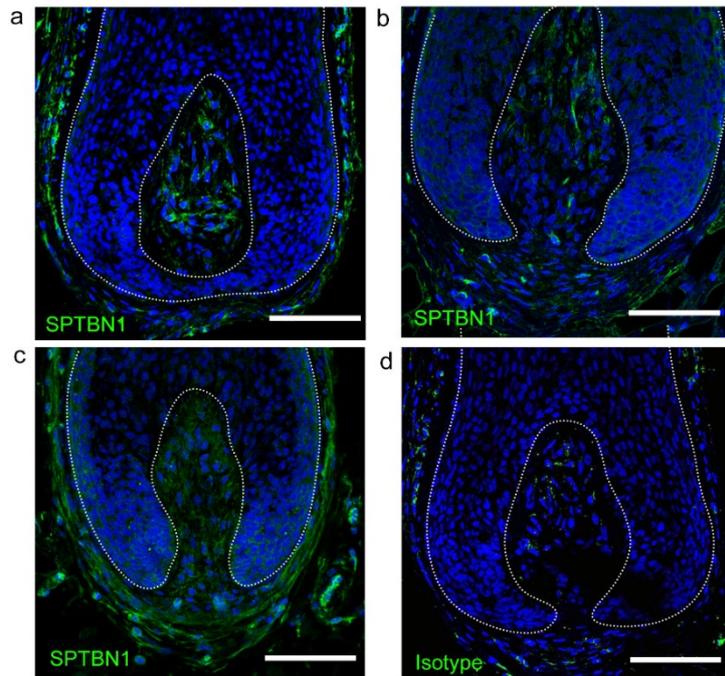
毛球部の間葉系細胞の形態は DP と DS では大きな差が認められ、細胞の形態は DSC から DP に移行する基底床の stalk で変化するという仮説を立てた。そこで、DP の直下の stalk 内の間葉系細胞の構造に着目した (Fig. 2-9a)。FIB-SEM を用いて連続画像を取得し、 $33.1 \times 12.2 \times 21.0 \mu\text{m}^3$  にトリミングを行って、3次元再構築像を得た (Fig. 2-9b)。stalk では間葉系細胞が密であり、28 個の間葉系細胞が不規則なパターンを示すコラーゲン線維内に存在した (Fig. 2-9c)。視野の中央に位置した 5 個の間葉系細胞に着目すると、上部、つまり DP に近い領域に位置する細胞は、下側、つまり DSC 側にある細胞と比較してより分岐した細胞構造を持っていることが認められた (Fig. 2-9d)。紫色で示す細胞 (Figs. 2-9c-e のアスタリスクで示した) は、薄い細胞質を有した (Figs. 2-9e, f)。さらに、薄緑色で示す間葉系細胞は、分岐した細胞質と平らな「手のひら」のような突起が認められ、分岐構造から伸び、他の間葉細胞の分岐構造を包み込み、面で互いに接した (Figs. 2-9g, h)。



**Fig. 2-9 FIB-SEM images indicate that mesenchymal cell structures change at the stalk of the basal plate** (a) Surface of a hair follicle embedded in resin. The observation field, which is the stalk of the basal plate, is indicated by a black rectangle. (b, c) Three-dimensional reconstruction of DP, which is depicted in 28 different colors. (d) Five mesenchymal cells located at the center of the stalk in the basal plate. (e, f) 3D structure of mesenchymal cells from different angles in panel (d). (g, h) Each cell contacted with “palm-like” processes indicated by white rectangles in panel (d). Scale bars = 100  $\mu\text{m}$  (a), 7  $\mu\text{m}$  (b-f), and 4  $\mu\text{m}$  (g, h). Images are from hair follicles of a 50-year-old male.

### 2-3-6. 毛球部における間葉系細胞の細胞骨格に寄与する分子

FIB-SEM の 3 次元再構築像より、毛球部の間葉系細胞の形態は DP と DS では大きな差が認められた。DS 細胞および DSC 細胞の平坦な細胞質の形態は、DS における  $\alpha$ -smooth muscle actin の発現に依存すると考えられた [70]。そこで、DP 細胞の分岐構造を維持する細胞骨格を検討した。神経細胞では、軸索および樹状突起のような細胞骨格が存在し DP 細胞の分岐構造にも関与しているのではないかと考え、神経軸索の細胞質全体に足場を形成する  $\beta$ II スペクトリン (SPTBN1) に着目した [71]。免疫組織染色により、毛球部の DP 細胞に SPTBN1 の発現が認められた (Fig. 2-10)。



**Fig. 2-10 Representative images of fluorescence analyses for SPTBN1 (green), and counterstained with Hoechst33342 (blue) (a - c) Immunostaining of SPTBN1. (d) isotype IgG control. Anagen hair bulbs were from 59- (a, d), 42- (b) and 68- (c)year-old male occipital skin. Bars = 100  $\mu$ m.**

## 2-4. 考察

毛球部の形態解析について、これまでに用いられてきた手法および本検討に用いた手法による結果を Table 2-1 に示した。これまでに行われてきた毛球部の解析では、光学顕微鏡や TEM を用いて、毛球部の DP、DS、基底床の基底膜や細胞外マトリクスの毛周期による変化が調べられてきた。また DP 細胞については、核と細胞質の割合やオルガネラが報告されているが、細胞の形態については報告されていない。本研究では、ヒトの頭皮の毛球部の間葉系細胞の形態を共焦点顕微鏡、TEM および FIB-SEM を用いて、俯瞰的および詳細な解析が可能かどうか検討を行った。その結果、従来用いられてきた光学顕微鏡や TEM だけでは観察できなかった毛球部間葉系細胞の微細な構造を明らかにできることが確認でき、共焦点顕微鏡および FIB-SEM の毛髪生物学の応用が同分野の理解を深めることに有効であることが示された。

共焦点顕微鏡観察より、成長期毛包における毛球部の間葉系細胞は DS、DSC、DP のそれぞれの領域により形態が異なることが示唆された (Fig. 2-1)。さらに TEM 観察により、成長期と退行期初期の毛包では、毛球部を構成する間葉系細胞の形態が異なることが示された (Figs. 2-2, 2-3, 2-4, 2-5)。DP 細胞は、成長期と比べ、退行期初期でより密に存在した (Figs. 2-2f, 2-4f)。退行期初期の毛包では、コラーゲン線維の配向性が失われ、DSC 細胞の形態は不規則であった、

(Figs. 2-2b-d)。超微細構造解析により、ヒト毛包の結合組織鞘は、毛周期において、特に成長期後期から退行期初期にかけて、コラーゲン線維の配向と硝子膜の厚みといった細胞外基質に変化が生じることが報告されている [7]。退行期初期の DSC 細胞は、成長期の上部 DS 細胞に類似した形態を示した (Figs. 2-2b, 2-4b)。これらのことから、退行期初期に毛球部が表皮側へ退行し始める際に、DSC 細胞の構造変化が生じると考えられた。さらに、退行期初期における、間葉系細胞の構造変化と細胞外マトリックスの変化は、互いに関与していることが示唆された。

毛周期における間葉系細胞の構造変化を理解するためには、さらに詳細な解析が必要と考えられた。そこで、FIB-SEM を用いて、成長期毛包の毛球部における間葉系細胞の 3 次元超微細構造解析を行った。FIB-SEM による 3 次元画像は、DS、DP、DSC、基底床 stalk 部における間葉系細胞の 3 次元構造の特徴を示した (Figs. 2-6e, 2-7c, 2-8c, 2-9c)。特徴的な細胞質の形態は、DS 細胞と DSC 細胞では扁平、DP 細胞では分岐構造であった (Figs. 2-6e, 2-7c, 2-8c)。基底床 stalk 部では、DSC 細胞と DP 細胞の特徴をもつ、扁平な細胞と分岐を有する細胞が認められた (Fig. 2-9c)。免疫組織染色から、SPTBN1 が DP 細胞に発現していることが示され、DP 細胞の分岐構造に寄与している可能性が示唆された (Fig. 2-10)。分岐構造を形成・維持するためには、DP 細胞は表面積の大きな細胞膜

を必要とすると考えられる。DS 細胞は DP 細胞の前駆細胞であると考えられていることから [18]、前駆細胞である DS 細胞や DSC 細胞が薄く扁平な細胞形態を形成していることは、合理的な機構であると考えられた。

さらに、FIB-SEM による 3 次元構造解析は、間葉系細胞の細胞間結合の違いも明らかにした (Figs. 2-6e, f, 2-7d-g, 2-8d-e, 2-9g, h)。DS、DSC は点で接触していたが、DP 細胞は結合していた。毛球部の間葉系細胞の細胞間接着は Connexin43 の発現が報告されており、微細構造解析より DP 細胞間の細胞間結合はギャップ結合であると報告されている [20]。本検討において、DS 細胞に小さいながらもギャップ結合様の細胞接着が認められた (Figs. 2-7i, j)。DP 細胞においては、ギャップ結合の明瞭な 3 次元構造が明らかとなった (Fig. 2-8e)。

これらの結果より、DS 細胞、DSC 細胞のギャップ結合が DP 細胞では発達することが考えた。さらに、毛球部の間葉系細胞は毛包全体に 3 次元の細胞のネットワークを形成することが示唆された。退行期の毛包の退縮は、 $\text{Ca}^{2+}$  が DS 細胞の  $\alpha$ -smooth muscle actin の収縮を誘発することが報告されている [66]。これらのことから、間葉系細胞のギャップ結合は、毛周期に伴う毛包の構造変化に寄与していると考えられた。

FIB-SEM 観察により、DS 細胞と DSC 細胞は扁平で、規則性のあるコラーゲン繊維の層に整列していることが示された (Figs. 2-6e, 2-7b)。真皮では、扁平

な細胞質を持つベール細胞や樹状細胞とも呼ばれる間葉系細胞の一種であるテロサイトが、毛包、皮脂腺、汗腺、血管の周囲に存在し、ネットワークを形成している [40, 52, 72, 73]。一方、コラーゲン層の間に存在する角膜実質細胞と腱細胞はそれぞれ隣接する細胞との細胞接合を介して細胞間ネットワークを形成する [74-76]。真皮内のコラーゲンの配向は非極性であることから、結合繊維 (DS) における間葉系細胞、特に DS 細胞の形態やコラーゲン線維内の存在様式は、真皮内のテロサイトよりも、角膜と腱の構造に類似していると考えられた。基底床 stalk 部は毛周期の判断の決め手となるほど、特徴的な構造をしており、成長期毛包において、基底床 stalk 部という極めて小さな領域で、間葉系細胞の形態が変化する。毛周期における間葉系細胞の構造変化を解明するためには、皮膚以外の組織のコラーゲン線維の極性と細胞形態の観点から考慮することが一助となるかもしれない。

本研究の結果から、共焦点顕微鏡および FIB-SEM という新たな観察手法の応用が、毛球部の間葉系細胞の微細な 3 次元構造を解明する上で、非常に有効な手段であることが検証できた。さらに分子学的および形態学的手法の両方を組み合わせて毛周期に依存した間葉系細胞形態の構造変化を明らかにすることができれば、将来、男性型脱毛症などの有効な解決策を提示できる可能性があると考えられた。

	Light microscopy	TEM	FIB-SEM (this study)
Dermal papilla (DP)	The DP, which form onion-shape in anagen, becomes more condensed and almond-shaped the volume of DP is reduced during catagen [69, 77].	Numerous fibroblasts, which have well-developed rough endoplasmic reticulum and large Golgi apparatus. Fibroblasts and endothelial cells float wisps of collagen fibers (rat) [12]. The DP of the telogen HF consists of a ball-shaped group of fibroblasts (rat) [78]. Cytoplasmic process of adjacent DP cells were often apposed but no specialized intercellular contacts were observed to be randomly oriented, expect distally where they might become aligned along the axis of the papillary spine (Rat, vibrissa) [79]. High nuclear to cytoplasmic ratios. Heterochromatic and irregularly shaped nuclei without nucleoli. Few organelles in cytoplasm. Not all cells displayed similar synthetic activity (Human anagen HFs) [80].	Branched cytoplasm are well-developed and contact via 'palm-like' structure.
Dermal sheath (DS)	Glassy (vitreous) membrane is surrounding the catagen HF [77]. $\alpha$ -smooth muscle actin is expressed in DS [70, 81].	Numerous fibroblasts are located among the three collagen layers (human) [7, 39]. Thick glassy membrane is formed in catagen (human) [7, 39]. $\alpha$ -smooth muscle actin is expressed in DS cells (human) [81].	Thin DS cells are aligned among the multi-layered collagen fibers.
Basal plate/ Stalk	Elastin-like body (or bluish like body) is located [6].	Fibroblasts are aligned among collagen layers and microfibrils [82].	Thin DSC cells are aligned among the multi-layered collagen fibers. Morphology of mesenchymal cells change at the stalk.

**Table 2-1 Comparison of techniques in morphological studies of hair bulbs**

## 第3章 3D-CLEM を用いたヒト成長期毛包周囲に存在する柵状神経終末の分布と3次元微細構造解析

### 3-1. 緒言

毛球部が毛包の維持、毛髪の伸長に重要な機能を持つと同様に、毛包のバルジ領域は、上皮系幹細胞のニッチとして重要な領域である。

毛包は、皮膚において高度に神経支配された小器官であり、触覚刺激の重要な役割を果たしている [83]。毛包の周囲には神経が張り巡らされ、メルケル細胞や circumferential (pilo-Ruffini) などの神経終末、特に機械受容器が密に存在している。毛が風になびく感覚は、毛包周囲に存在する柵状神経終末 (palisade nerve endings) が受容している (Fig. 1-7, 1-8) [29, 31]。柵状神経終末は毛包峽部に限局して存在し、毛の長軸方向に沿ってフォーク状に整列しており、それぞれの神経終末を槍型神経終末 (lanceolate nerve endings, LNEs) と呼ぶ [84]。毛包横断面観察において、柵状神経終末が毛包の外周に放射状に並んでいるの車輪のように例えられる [30]。Fig. 1-1 に示すように、毛包峽部およびその直上の漏斗部は毛周期においても構造変化が起こらない不変部である。峽部は毛包上皮系幹細胞ニッチに近接している [85, 86]。近年、柵状神経終末は毛包上皮系幹細胞

から産生される細胞外マトリックス (EGFL6) により構造が維持されていることが報告された [87]。

ラットの体毛における柵状神経終末では、真皮の太い神経束より派生し、軸索は I 型終末シュワン細胞に覆われており、毛包の長軸方向と並走する領域では II 型終末シュワン細胞に挟まれ存在することが報告されている [33, 88]。I 型および II 型の終末シュワン細胞の形態的特徴はカベオラの有無で識別することができる [33]。マウスの体毛における柵状神経終末の軸索は、低閾値機械受容器 (low threshold mechanoreceptors, LTMRs) の組み合わせで構成されており、それぞれ  $A\beta$  RA-LTMRs、 $A\delta$ -LTMRs、C-LTMRs と区別される [89]。マウスの体毛では、機械刺激開口チャネルである Piezo-type mechanosensitive ion channel component 2 (Piezo2) が柵状神経終末に発現し、機械的刺激に対するシグナル伝達の最初の受容体であることが報告された [90]。このように、柵状神経終末と毛髪の間関り、その微細構造に関する情報が蓄積されてきた。

柵状神経終末の構造解析は、鍍銀染色、免疫染色などの光学顕微鏡観察あるいは透過型電子顕微鏡 (TEM) や走査型電子顕微鏡 (SEM) により、マウス、ラット、オポッサム、サルなど多くの動物種の洞毛、保護毛、下毛を用いて行われてきた [35, 36, 91-93]。しかし、ヒトの柵状神経終末については、瞼や主に産毛を用いて研究が行われてきたものの、毛密度が高いにも関わらず、頭髪などの

終毛ではほとんど解析されていない [30, 94, 95]。ヒトの頭髪は、動物の体毛に比べ太いが、ヒトの場合、毛包は加齢の影響を受け小さくなり、特に男性では男性ホルモンの影響を受け、後頭部を除いて産毛のように極端に細く短くなることが知られている (ミニチュア化) [96]。

本研究では、光シート顕微鏡を用いて、ヒト頭皮における終毛の柵状神経終末の存在および分布を明らかにすることを目的とした。さらに共焦点顕微鏡と TEM を組み合わせた光電子相関顕微鏡観察法 (correlative light and electron microscopy, CLEM)、および共焦点顕微鏡と FIB-SEM を組み合わせた 3D-CLEM により、柵状神経終末の微細構造を明らかにすることを目的とした。

## 3-2. 実験方法

### 3-2-1. 試料

ヒト毛包組織は、29 歳、41 歳、48 歳、48 歳、51 歳、59 歳男性の植毛手術の際に余剰となった後頭部頭皮から採取した。本研究は、ヘルシンキ宣言の原則に従って、資生堂ヒト倫理委員会により承認された。

### 3-2-2. 組織透明化法

組織透明化については、以前に報告されている手順を下に行った [97]。頭皮を真皮層と脂肪層の境界で分け、真皮層を 4% パラホルムアルデヒド溶液で一

晩固定した。PBS で洗浄後、毛幹が光路の妨げになるのを防ぐため、毛幹はピンセットを用いて引き抜いた。0.1% Tween20 含有-PBS (PBST) で一晩透過処理を行った。その後 1% ウシ血清アルブミン、5% Triton X-100、2.5% Tween20、0.05% アジ化ナトリウム含有 PBS を用いて 3 日間ブロッキングを行った。マウス抗 PGP9.5 抗体 (abacm、希釈率 1:100)、ウサギ抗 S100 $\beta$  抗体 (Proteintech、希釈率 1:100) を用いて 37°C で 7 日間 1 次抗体反応を行った。PBST を用いて、4°C で 3 日間洗浄を行ったのち、抗マウス Alexa-Fluor 594 IgG (Thermo Fisher Scientific、希釈率 1:200)、抗ウサギ Alexa-Fluor 647 IgG (Thermo Fisher Scientific、希釈率 1:200)、propidium iodide (PI, Thermo Fischer Scientific、希釈率 1:5000) を用いて、37°C で 3 日間 2 次抗体反応および核染色を行った。PBST を用いて、4°C で 3 日間洗浄を行ったのち、上昇メタノール系列で脱水した。Dichloromethane (Sigma) と dibenzyl ether (Sigma) を用いて透明化を行った。光シート顕微鏡 (Lightsheet microscope Z.1, Carl Zeiss) を用いて画像を取得し、Imaris (Bitplane) により 3 次元画像を再構築した。

### 3-2-3. 蛍光免疫染色法

頭皮は、4% パラホルムアルデヒド溶液で 4°C にて一晩固定した。PBS で洗浄後、30% スクロース水溶液で 3 時間置換し、OCT コンパウンド (Leica) に包埋した。クライオスタット (CM3050S, Leica) を用いて、50 $\mu$ m 厚の連続切片を

作製した。Free-floating により一連の免疫染色を行った。

共焦点顕微鏡観察には、試料を 0.5% Triton X-100 含有 PBS に室温で 30min 浸漬したのち、3% BSA、0.05% Triton-X100 含有 PBS により室温で 1 時間ブロッキングを行った。さらに、4°Cで一晩 1 次抗体反応を行った。1 次抗体には、マウス抗 PGP9.5 抗体 (abacm、希釈率 1:1000)、ウサギ抗 PGP9.5 抗体 (Merk、希釈率 1:200)、マウス抗 CD200 抗体 (BioRad、希釈率 1:1000)、ウサギ抗 S100 $\beta$  抗体 (Proteintech、希釈率 1:2000) を用いた。0.03% Triton-X100 含有 PBS で洗浄後、室温で 2 時間 2 次抗体反応を行った。2 次抗体には抗マウス Alexa-Fluor 488 IgG (Thermo Fisher Scientific, 希釈率 1:200)、抗ウサギ Alexa-Fluor 488 IgG (Thermo Fisher Scientific, 希釈率 1:200)、抗ウサギ Alexa-Fluor 488 IgG (Thermo Fisher Scientific, 希釈率 1:200)、抗ウサギ Alexa-Fluor 594 IgG (Thermo Fisher Scientific, 希釈率 1:200) を使用した。

CLEM 法には、試料を 1% BSA、0.05% アジ化ナトリウム含有 PBS で、室温で 1 時間ブロッキングしたのち、マウス抗 PGP9.5 抗体 (abacm、希釈率 1:3000)、ウサギ抗 S100 $\beta$  抗体 (Proteintech、希釈率 1:5000) を用いて、4°Cで 2 週間 1 次抗体反応を行った。PBS で洗浄後、抗マウス Alexa-Fluor 488 IgG (Thermo Fisher Scientific, 希釈率 1:200)、抗ウサギ Alexa-Fluor 594 IgG (Thermo Fisher Scientific, 希釈率 1:200) を用いて室温で 2 時間 2 次抗体反応を行った。

包埋前免疫電子顕微鏡法には、試料を 1% BSA、0.05% アジ化ナトリウム含有 PBS で、室温で 1 時間ブロッキングしたのち、マウス抗 PGP9.5 抗体 (abcam、希釈率 1:3000)、ウサギ抗 Piezo2 抗体 (Atlas Antibodies、希釈率 1:5000) を用いて、4°C で 2 週間 1 次抗体反応を行った。PBS で洗浄後、抗マウス Alexa-Fluor 594 IgG (Thermo Fisher Scientific、希釈率 1:200)、ビオチン標識抗ウサギ IgG (Jackson Immuno Research、希釈率 1:200) を用いて室温で 2 時間 2 次抗体反応を行った。PBS で洗浄後、Alexa Fluor 488 FluoroNanogold-Streptavidin (Nanoprobes) を用いて、室温で 2 時間反応した。

Hoechst 33342 (Thermo Fischer Scientific; 希釈率 1:3000) により核染色を行ったのち、Vectorshield (Vector) によりプレパラートに封入した共焦点顕微鏡 LSM700 を用いて、連続画像を取得した。Imaris により 3 次元画像を再構築した。

#### 3-2-4. TEM

共焦点顕微鏡観察に引き続いて、以前に報告された手法を用いて TEM 試料を作製した [98,99]。柵状神経終末を含む切片は 0.1 M リン酸緩衝液 (PB) を用いて洗浄し、3% グルタルアルデヒド含有 0.1 M PB により 4°C で 10 分固定した。続いて 1% 四酸化オスミウム含有 0.1 M PB により 30 分間氷上で後固定を行い、2% 酢酸ウラン水溶液を用いて 4°C で 30 分間染色した。試料は、上昇エタノール系列で脱水し、プロピレンオキサイド、続いてエポキシ樹脂 (TAAB Laboratories)

に置換し 60°Cで 3 日間重合させた。ウルトラマイクロトーム EM UC7 (Leica Microsystems) を用いて、80 nm 厚の超薄切片を作製し、1% 酢酸ウラニル水溶液、レイノルド鉛染色液で電子染色を行った。試料は TEM H-7600 (Hitachi High-Technologies) を用いて、観察した。

### 3-2-5. FIB-SEM

共焦点顕微鏡観察に引き続いて、以前に報告された手法を用いて TEM 試料を作製した [48, 100]。柵状神経終末を含む切片は 0.1 M カコジル酸緩衝液を用いて洗浄し、2.5% グルタルアルデヒド、2% パラホルムアルデヒド含有 0.1 M カコジル酸緩衝液により氷上で 10 分間固定を行った。0.1 M カコジル酸緩衝液で洗浄したのち、1.5% potassium ferrocyanide、2% 四酸化オスミウム含有 0.1 M カコジル酸緩衝液により氷上で 1 時間染色を行った。純水で洗浄したのち、1% 四酸化オスミウムにより氷上で 30 分染色を行った純水で洗浄したのち、1% 酢酸ウラニル水溶液を用いて 4°Cで一晩染色を行った。純水で洗浄したのち、Walton's アスパラギン酸鉛水溶液で 30 分染色を行った。上昇エタノール系列で脱水したのち、エポキシ樹脂に包埋し 60°Cで 3 日間重合させた。ウルトラマイクロトーム EM UC7 を用いて、樹脂表面のトリミングおよび面出しを行い、SEM の試料台に取り付け、イオンスパッタ MC1000 (Hitachi High-Technologies) により、白金パラジウムで蒸着した。

試料は FIB-SEM Helios660 (FEI) の 2 次電子ビームにより試料表面の位置を描出し、毛包の部位を指標として、任意の観察部位に白金の保護層を形成した。加速電圧 30 kV のガリウムイオンビーム (FIB) により、最初の観察面を露出させ、加速電圧 2 kV、加速電流 0.2 nA の電子線から生じる反射電子より画像を得た。画像取得は解像度 3,072 x 2,048 pixels、dwell time は 6  $\mu$ sec で行った。Slice & View software (FEI) を用いて 30 nm ピッチで FIB による加工と反射電子による画像取得を繰り返し、連続画像を取得した後、白黒のコントラストを反転した。

#### 3-2-6. 3次元再構築およびセグメンテーション

得られた連続画像は Avizo ver. 9.2 software (FEI) を用いて、位置ずれを補正したのち、3次元再構築を行った。さらに細胞ごとに、細胞膜に沿って輪郭を抽出し細胞表面の3次元像を得た。

#### 3-2-7. 統計解析

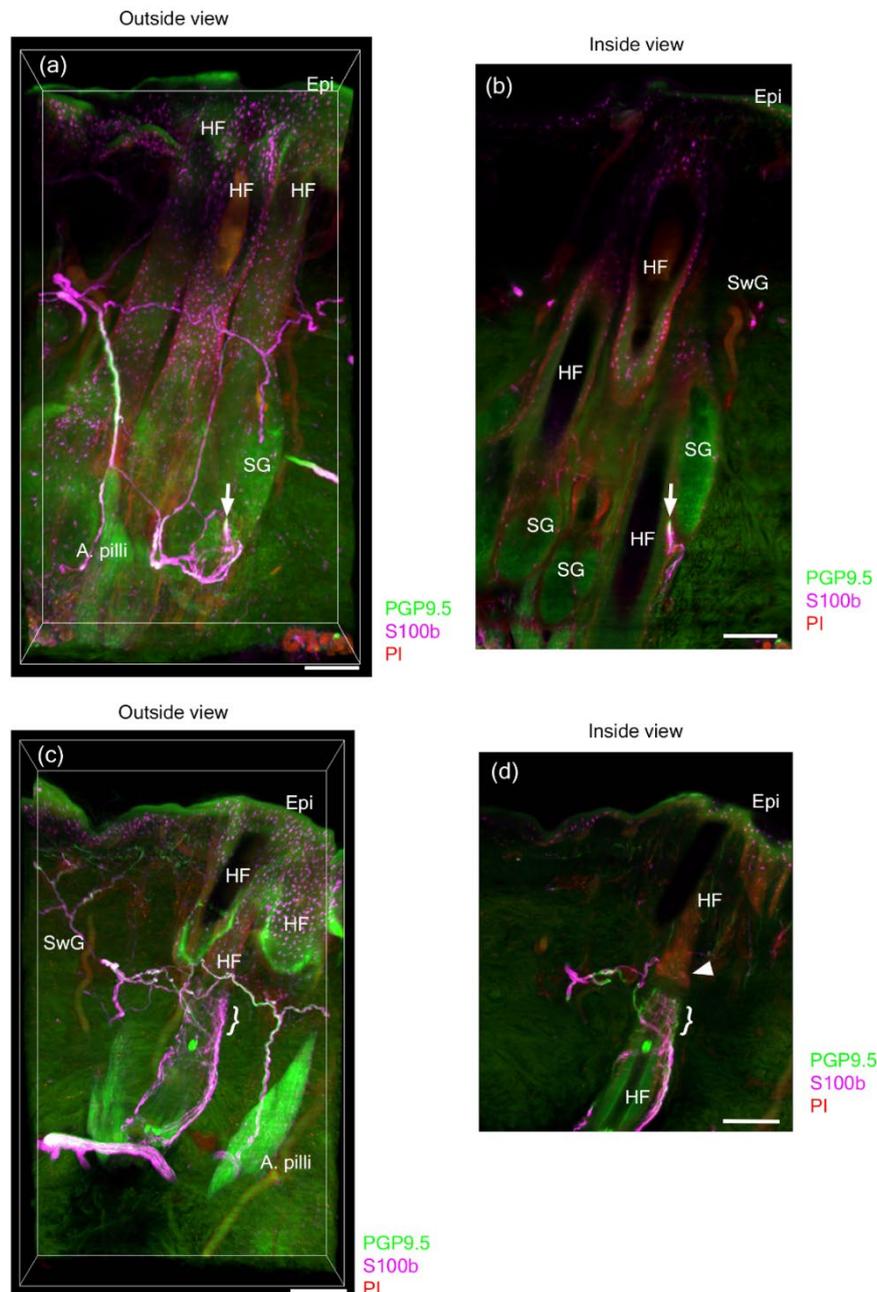
毛包の大きさと柵状神経の分布についての関連性を調べるため、毛包の横断面方向に薄切した切片に対し、柵状神経の免疫染色を行い、共焦点顕微鏡観察により得られた画像を用いた。それらの画像に対し、Image J のプラグイン Cell Counter を用いて、柵状神経を構成する槍型神経終末の数を数え記録した。柵状神経を有する毛包の外毛根鞘の直径について Imaris を用いて計測した。外毛根鞘の直径の中央値を境に外毛根鞘の直径が小さい群と大きい群の 2 群に分け、

槍型神経終末の数と外毛根鞘の直径について、マン・ホイットニーU検定を行った。p 値 0.05 未満を統計的に有意とした。ドナーの年齢と柵状神経終末の数については、散布図より回帰直線および相関係数を求めた。

### 3-3. 結果

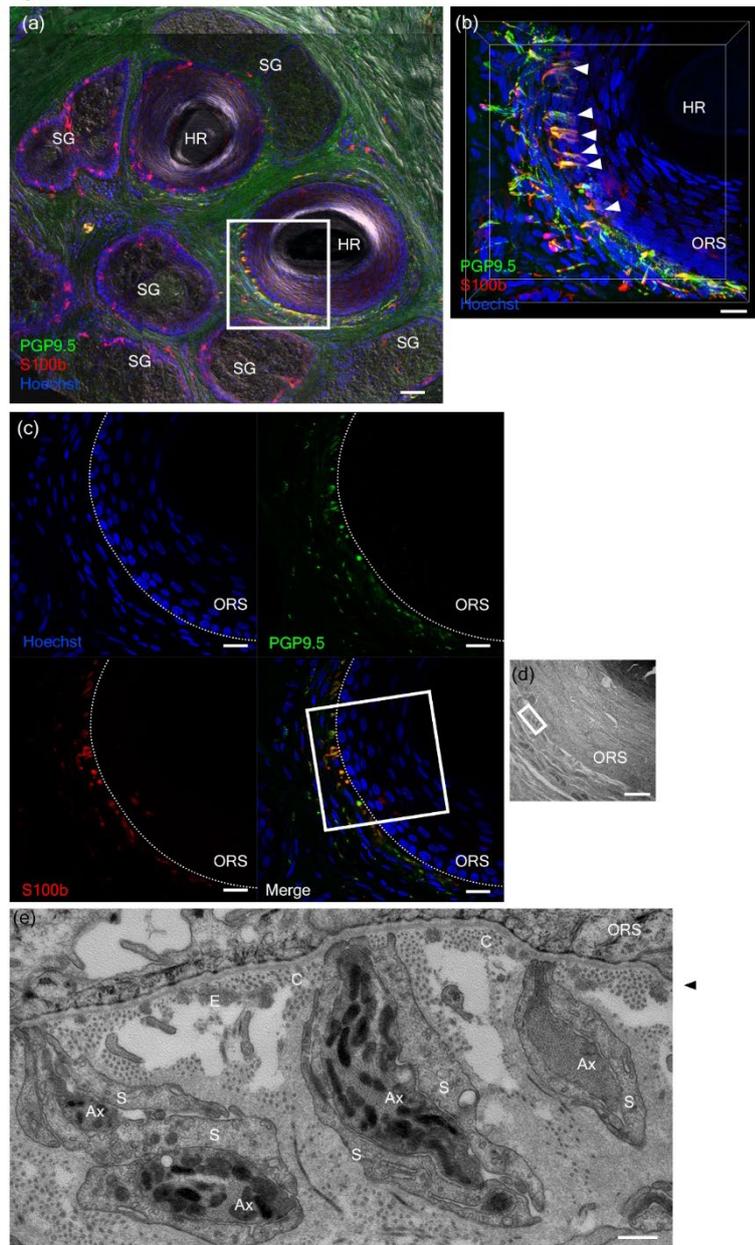
#### 3-3-1. ヒト頭皮終毛における柵状神経の微細構造解析

ヒト頭皮における毛包周囲に存在する柵状神経を調べるため、毛包周囲の神経分布を解析した。組織透明化法 (iDISCO) を用いて頭皮を透明化し、神経線維およびシュワン細胞のマーカーである PGP9.5 (protein gene product 9.5) と S100 $\beta$  (S100 calcium binding protein B) を用いて、免疫染色を行った。光シート顕微鏡観察により、3本の毛包からなる毛群の中で、1本の終毛の皮脂腺の下側に PGP9.5 陽性の太い神経線維を認めた。他の2本の毛包には明らかな柵状神経は認められなかった (Figs. 3-1a, b)。また別の3本の毛包からなる毛群に含まれる1本のミニチュア化した毛包において、明瞭な柵状神経が認められた。他の2本の終毛には柵状神経は認められなかった (Figs. 3-1c, d)。ミニチュア毛に存在した柵状神経は毛包上皮系細胞からなる隆起部分の直下に位置していた (Fig. 3-1d 白矢印)。



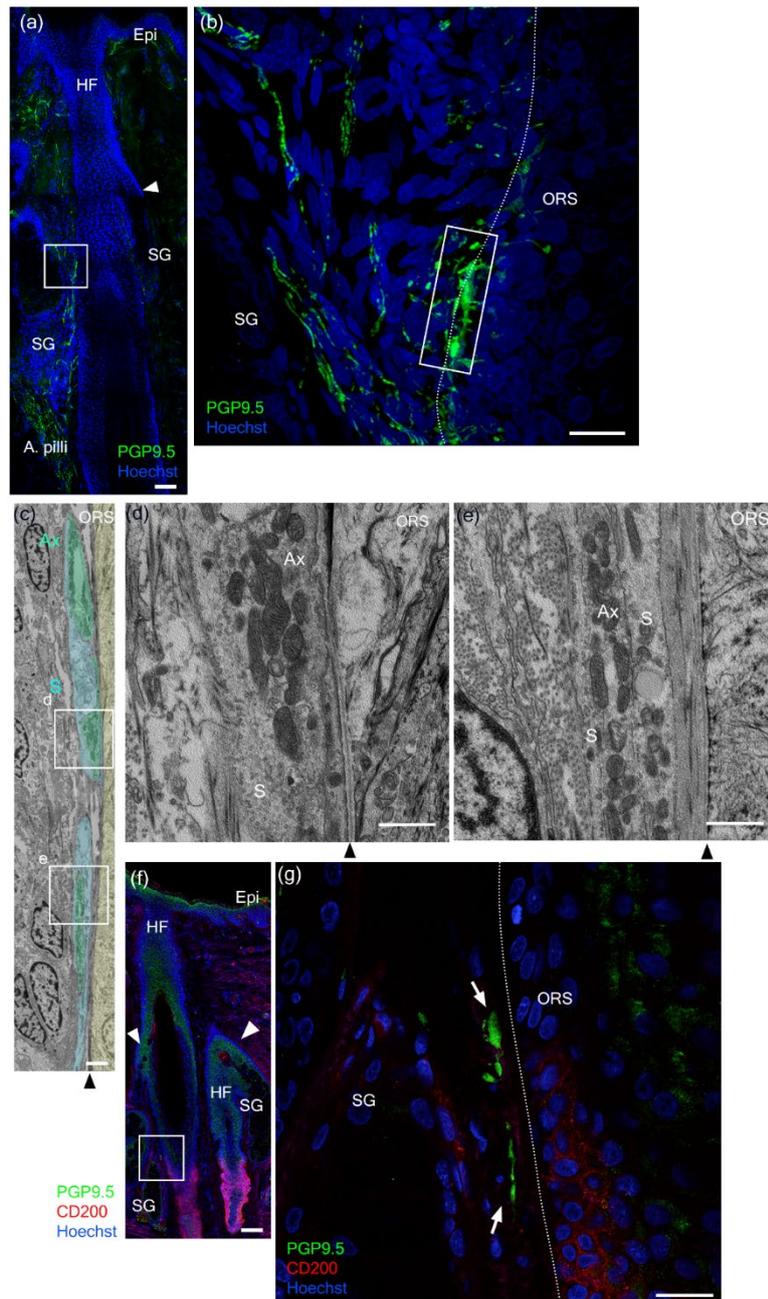
**Fig. 3-1** Neural networks at human scalp hair follicular units by light-sheet microscopy. (a–d) Whole-mount immunolabeling of PGP9.5 (green), S100 $\beta$  (magenta), and PI (red) shows innervation surrounding HFs. (a, b) Neural plexus (white arrows) at a terminal hair within three-hair follicular unit. (c, d) Palisade-like lanceolate complex (white bracket) at a miniaturized hair within three-hair follicular unit. A pili: arrector pili muscle; Epi: epidermis; HF: hair follicle; SG: sebaceous gland; SwG: sweat gland. Bars = 200  $\mu$ m. Images from 51-year-old male scalp skin

そこで、Figs. 3-1a, b に示した皮脂腺の直下に存在する神経線維が、柵状神経であるか検証するため、毛包に対し垂直に連続切片を作製し共焦点顕微鏡および TEM を組み合わせた CLEM 法により観察を行った。PGP9.5 および S100 $\beta$  に対する免疫染色により、2 本の毛包からなる毛群内の 1 本の毛包に PGP9.5 および S100 $\beta$  で共染色された神経が存在している様子を捉えた (Figs. 3-2a-c)。もう一方の毛包には、この切片の前後の連続切片では認められなかった。さらに Fig. 3-2c で見られた PGP9.5 および S100 $\beta$  で共染色された神経について TEM 観察を行ったところ、外毛根鞘の真皮側の基底膜に沿って、ミトコンドリアの豊富な軸索が終末シュワン細胞に挟まれて並んでいる様子が示され、柵状神経の構造であると認められた (Figs. 3-2d, e)。



**Fig. 3- 2** LNEs at the terminal HF by correlative confocal laser and electron microscopy. (a) A transverse section of a two-hair follicular unit immunolabeled with PGP9.5 (green), S100 $\beta$  (red), and Hoechst 33342 (blue) merged with differential interference contrast image. (b, c) Magnified views of a white rectangle in panel a. Lanceolate nerve endings encircle part of a HF. (d) Transmission electron micrograph shows the ultrastructure of LNEs in panels a and b. (e) Magnified image of a white rectangle in panel d shows that lanceolate nerve endings are aligned along the basal lamina (black arrowhead) outside the ORS and sandwiched by terminal Schwann cells. Ax: axon; C, collagen; E: elastin; HR: hair root; ORS: outer root sheath; S: terminal Schwann cells; SG: sebaceous gland. Bars = 200  $\mu$ m (a), 20  $\mu$ m (b-d), and 1  $\mu$ m (e). Images from 51-year-old male scalp skin.

次に CLEM 法を用いて、毛包の長軸方向での柵状神経の微細構造を解析した (Figs. 3-3a, b)。柵状神経は頭皮の終毛の峽部に観察され、ミトコンドリアの豊富な軸索が外毛根鞘の外側の基底膜および終末シュワン細胞に接着している様子が捉えられた (Figs. 3-3c-e)。さらに、バルジ領域のマーカである CD200、および PGP9.5 に対する免疫染色より、柵状神経は上部バルジ領域の CD200 陽性の外毛根鞘細胞に近傍に位置していた (Figs. 3-3f, g)。

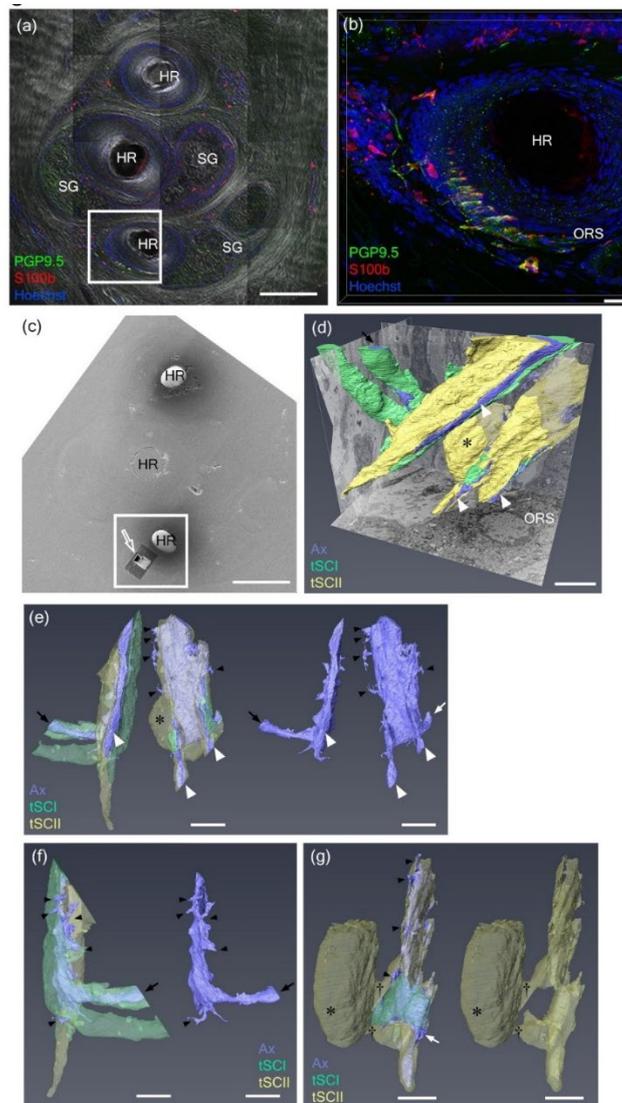


**Fig. 3-3** Cross-sectioned LNEs at the terminal hair by correlative confocal laser and electron microscopy. (a) Cross-sectioned terminal HF immunolabeled with PGP9.5 (green) and Hoechst 33342 (blue). (b) Magnified view of a rectangle in panel a. (c) Transmission electron micrograph of the white rectangle of panel b. (d, e) Magnified images of white rectangles of panel c. (f) Terminal HF immunolabeled with PGP9.5 (green), CD200 (red), and Hoechst (blue). (g) Magnified view of panel f. A pili: arrector pili muscle; Ax: axon; Epi: epidermis; HF: hair follicle; ORS: outer root sheath; S: terminal Schwann cells; SG: sebaceous gland; Bars = 100  $\mu$ m (a, f), 20  $\mu$ m (b, g), 2  $\mu$ m (c), and 1  $\mu$ m (d, e). Images from 51-year-old (a–e) and 38-year-old (f, g) male scalp skin.

次に、共焦点顕微鏡と FIB-SEM を組み合わせた 3D-CLEM 法を用いて、終毛の柵状神経の 3 次元微細構造解析を行った。毛包の横断面切片に対し、抗 PGP9.5 および抗 S100 $\beta$  の免疫染色を行った。共焦点顕微鏡観察から柵状神経が認められる切片および、切片内の柵状神経の位置を同定した。柵状神経は 3 本の毛包からなる毛群内の 1 本の毛包に認められた (Figs. 3-4a, b)。同一の毛群内の他の毛包には連続切片内に柵状神経は認められなかった。FIB-SEM により、Fig. 3-4a の四角内に認められた柵状神経の 3 次元再構築像を得た (Figs. 3-4c, d)。FIB-SEM により得られた連続画像を  $21.2 \times 16.7 \times 17.0 \mu\text{m}^3$  にトリミングを行い、柵状神経終末のセグメンテーションを行ったところ、この領域には 2 本の槍型神経終末が存在した (Fig. 3-4d)。2 本の槍型神経終末の軸索は、I 型、II 型終末シュワン細胞に覆われている様子が明らかとなり (Figs. 3-4d-g)、軸索は II 型終末シュワン細胞の突起に挟まれていた (Figs. 3-4d, e 白矢頭)。さらに II 型

終末シュワン細胞の突起の間から、軸索から複数の小さな突起が突出している様子が明らかとなった (Figs. 3-4e-g 黒矢頭)。神経軸索が I 型終末シュワン細胞に覆われている様子が明らかとなった (Fig. 3-4d-f 黒矢印)。軸索が毛包の長軸方向に沿う領域では、II 型終末シュワン細胞の突起に挟まれていた (Figs. 3-4d, e 白矢頭)。I 型終末シュワン細胞に覆われていた軸索は、毛包の長軸方向に

沿う領域でII型終末シュワン細胞に置き換わる様子を捉えた (Fig. 3-4g)。

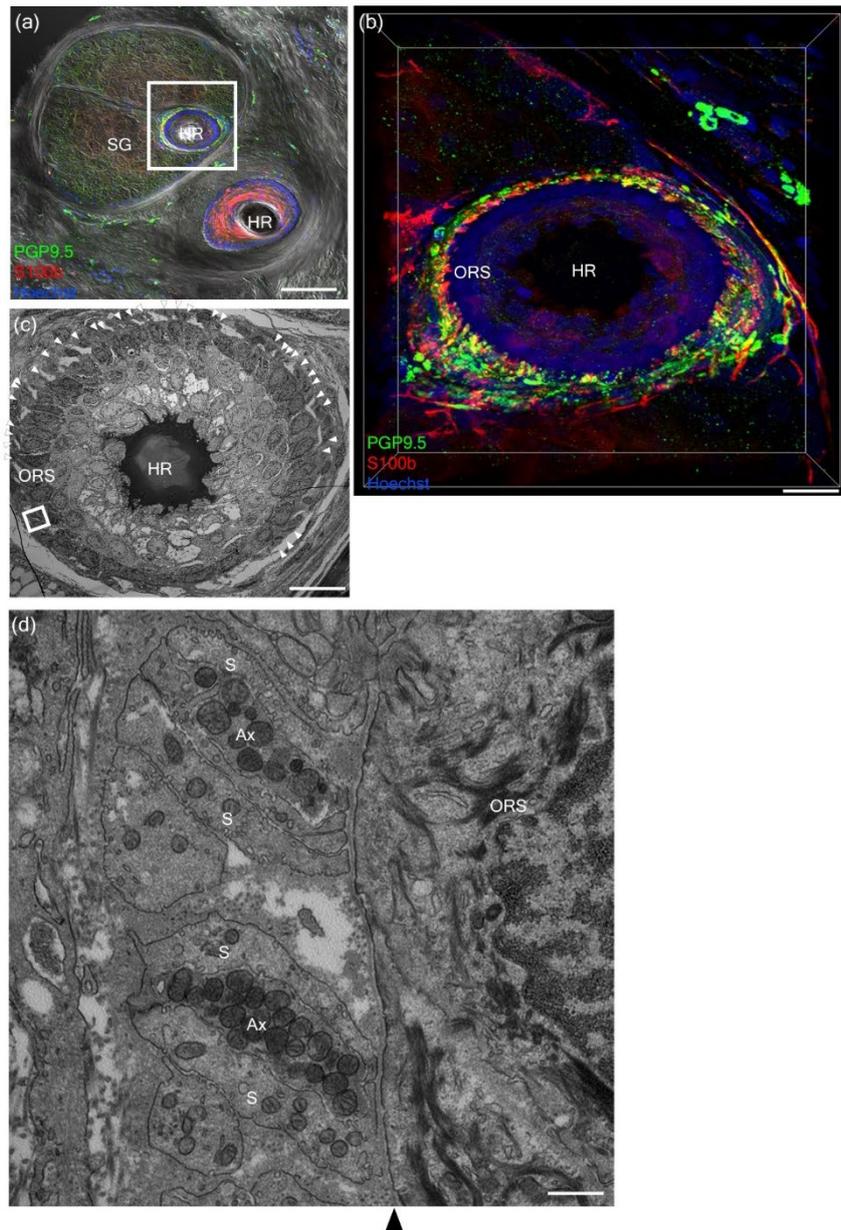


**Fig. 3-4** Three-dimensional reconstructed images of LNEs in a terminal HF by 3D-CLEM. (a) Transverse section of a follicular unit immunolabeled with PGP9.5 (green), S100β (red), and Hoechst 33342 (blue) merged with differential interference contrast image. (b) Magnified view of the white rectangle in panel a. (c) Surface of the three-hair follicular unit embedded in resin. (d-g) 3D reconstruction of two LNEs marked by the white opened arrow in panel c. Axons (purple) face the basal lamina (white arrowheads). Type I and type II tSCs are marked by green and yellow, respectively. Asterisk marks the nuclei of tSC (d, e, g) and the two processes originating from tSC are marked by daggers (g). Ax: axon; HR: hair root; ORS: outer root sheath; tSC: terminal Schwann cells; SG: sebaceous gland. Bars = 200 μm (a, c), 30 μm (b), 4 μm (e, f, g). Images from 51-year-old male scalp skin.

### 3-3-2. ミニチュア化した毛包における柵状神経の微細構造解析

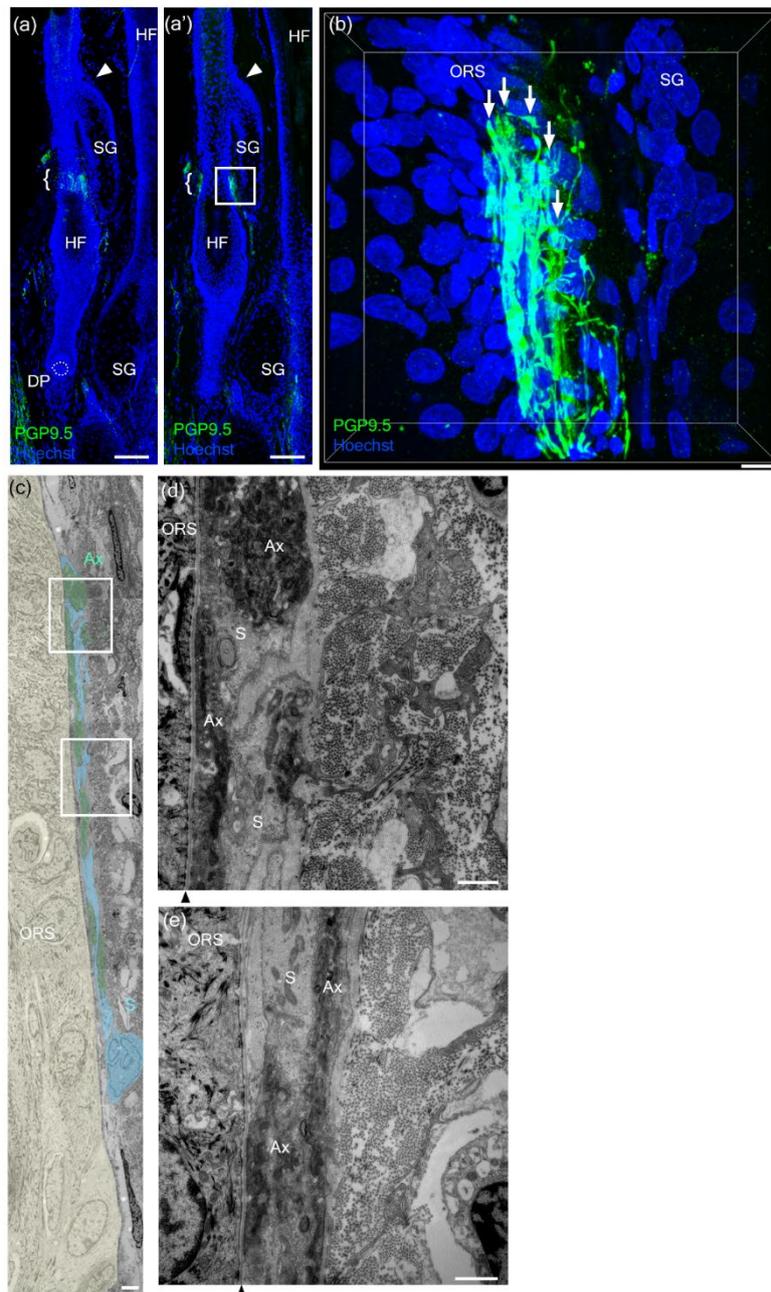
次にミニチュア化柵状神経の微細構造について CLEM 法を用いて解析した。

毛包に対して横断面に作製した連続切片に対し、PGP9.5 と S100 $\beta$  に対して免疫染色を行い、共焦点顕微鏡観察を用いて観察を行ったところ、柵状神経は毛包の全周に対し放射状に並んでいる様子が明らかとなった (Figs. 3-5a, b)。同一の切片に対し TEM 観察を行ったところ、ミニチュア化した毛包においても、終毛と同様に、ミトコンドリアが豊富な軸索が末端シュワン細胞で挟まれていた (Fig. 3-5c, d)。



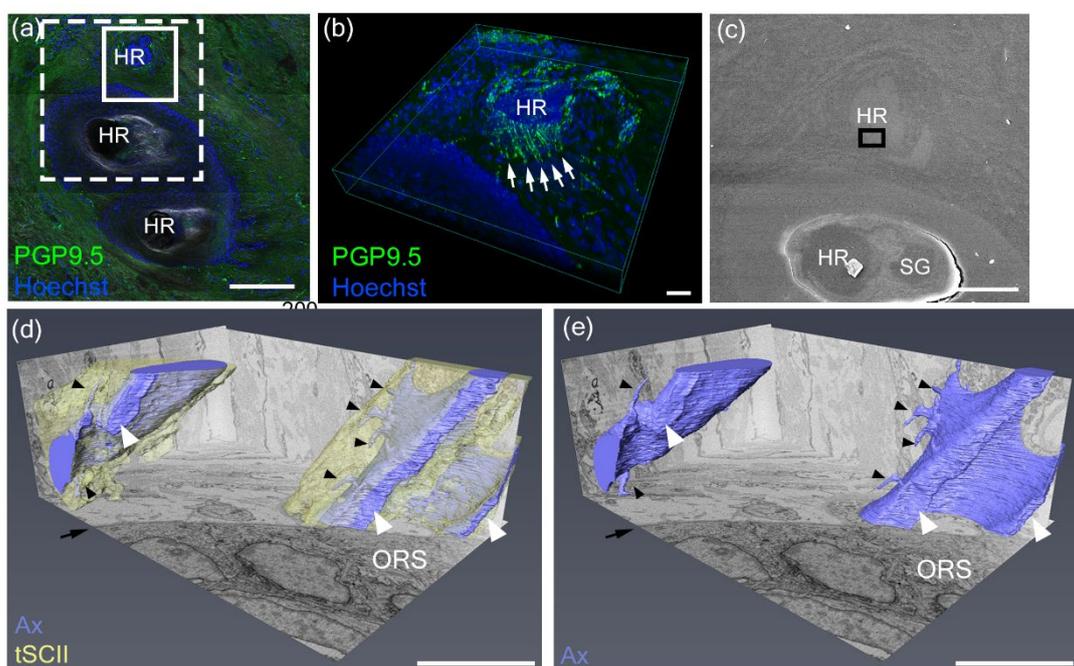
**Fig. 3-5** LNEs at the miniaturized HF by correlative confocal laser and electron microscopy. (a) Transverse section of two-hair follicular unit immunolabeled by PGP9.5 (green), S100 $\beta$  (red), and Hoechst 33342 (blue) merged with differential interference contrast image. (b) Magnified views of the white rectangle in panel a. LNEs encircle the HF. (c) Transmission electron micrograph shows the distribution of LNEs (white arrowheads) in panel b. (d) Magnified image of the white rectangle in panel c shows that LNEs are aligned along the basal lamina (black arrowhead) outside the ORS and sandwiched by tSC. Ax: axon; C: collagen; E: elastin; HR: hair root; ORS: outer root sheath; S: terminal Schwann cells; SG: sebaceous gland. Bars = 100  $\mu$ m (a), 20  $\mu$ m (b, c), and 500 nm (d). Images from 48-year-old male scalp skin.

ミニチュア化した毛包の長軸方向に対し、平行に作製した切片においても、  
柵状神経終末が毛包に沿って存在していた (Figs. 3-6a, a', b)。観察した毛包は、  
毛乳頭が真皮網状層上部に位置しており、ミニチュア化した毛包であると同定  
した (Fig. 3-6a)。軸索は毛包に沿って存在し、終末シュワン細胞に接していた  
(Figs. 3-6c-e)。また小さな突起が結合織鞘に向かって突出している様子も捉え  
られた (Fig. 3-6d)。



**Fig. 3-6** Cross-sectioned LNEs in the miniaturized hair follicle by correlative confocal laser and electron microscopy. (a, a') Miniaturized HF was immunolabeled with PGP9.5 (green) and Hoechst 33342 (blue) in the serial sections. (b, c) Transmission electron micrographs of the white rectangle of panel a'. Axon (green), terminal Schwann cell (pale blue), and ORS (yellow) are assigned pseudo colors (b). (d, e) Magnified images of white rectangles of panel c. Ax: axon; DP: dermal papillae HF: hair follicle; ORS: outer root sheath; S: terminal Schwann cells; SG: sebaceous gland; white arrowhead: sebaceous duct; black arrowheads: basal lamina. Bars = 100  $\mu\text{m}$  (a, a'), 2  $\mu\text{m}$  (b, c), and 500 nm (d, e). Images from 59-year-old male scalp skin.

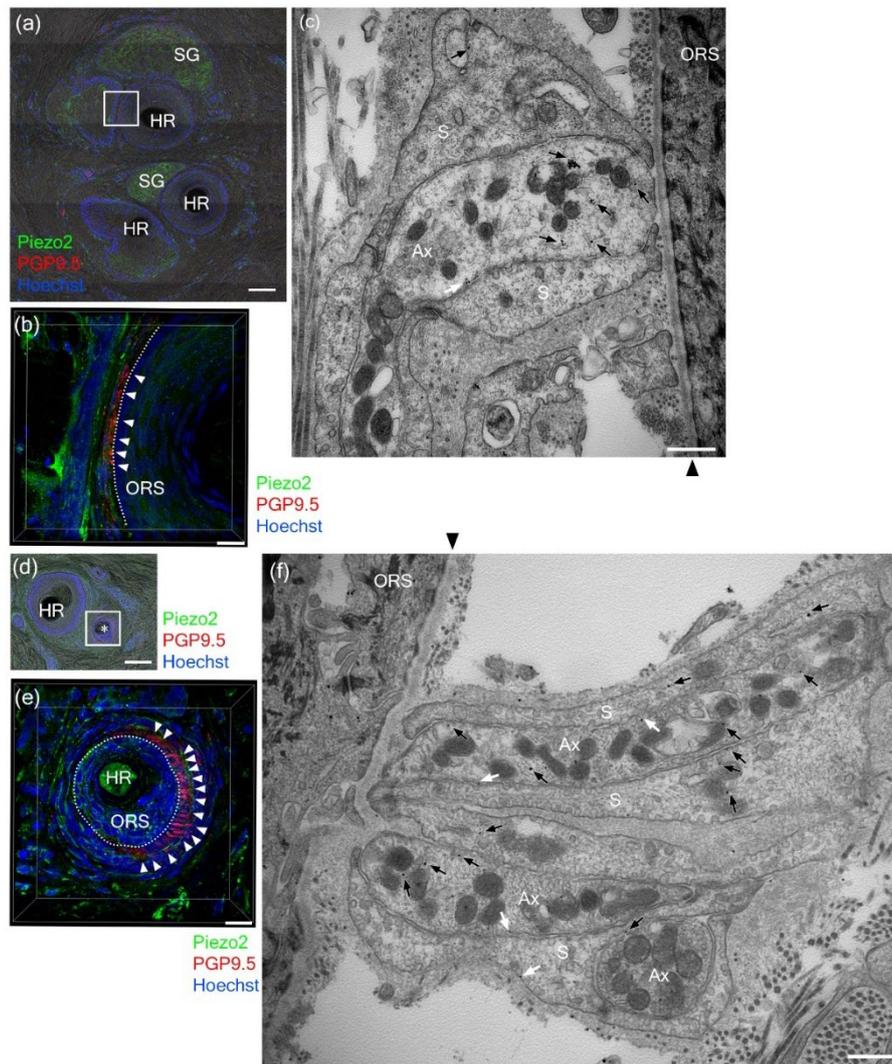
さらに、共焦点顕微鏡と FIB-SEM を組み合わせた 3D-CLEM 法を用いて、ミニチュア化した毛包を観察したところ (Figs. 3-7a-c)、柵状神経終末が終末シュワン細胞に覆われている様子が捉えられた (Figs. 3-7d, e)。



**Fig. 3-7** Three-dimensional reconstructed images of LNEs in a miniaturized hair follicle by 3D-CLEM. (a) Transverse section of a three-hair follicular unit immunolabeled with PGP9.5 (green) and Hoechst 33342 (blue) merged with differential interference contrast image. (b) Magnified view of the white dashed rectangle in panel a. White arrows mark LNEs. (c) Surface of the follicular unit embedded in resin indicated by dashed line in panel a. (d, e) 3D reconstruction of two LNEs in the black rectangle of panel c. Axons (purple) face the basal lamina (black arrows). Nerve endings with branched processes (black arrowheads) are enclosed within terminal Schwann cells (yellow). Ax: axon; HR: hair root; ORS: outer root sheath; tSCII: type II terminal Schwann cells; SG: sebaceous gland. Bars = 200  $\mu\text{m}$  (a), 30  $\mu\text{m}$  (b), 100  $\mu\text{m}$  (c), and 6  $\mu\text{m}$  (d, e). Images from 51-year-old male scalp skin.

### 3-3-3. ヒト頭皮終毛およびミニチュア化毛の柵状神経における Piezo2 の発現

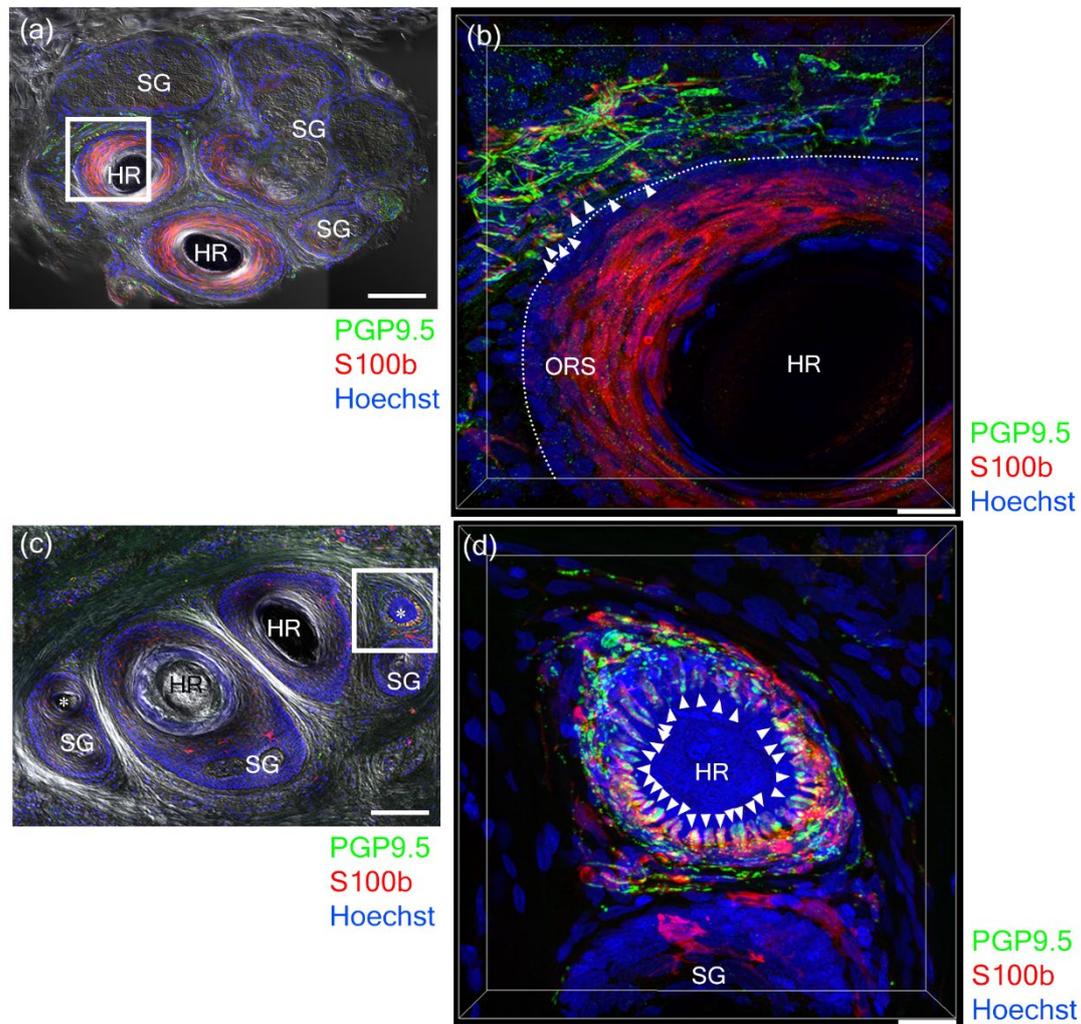
頭皮の毛包に存在する柵状神経が機械受容器として機能するか調べるため、柵状神経における Piezo2 の発現を包埋前免疫電子顕微鏡で調べた。毛包の長軸方向に対し、横断面で作製した切片を Piezo2 および PGP9.5 に対する免疫染色を行い、共焦点顕微鏡を用いて観察を行ったところ、終毛およびミニチュア化毛において柵状神経終末が局在している様子が捉えられた (Figs. 3-8a, b, d, e)。Piezo2 に対して標識した金コロイドは、軸索および終末シュワン細胞に発現している (Figs. 3-8c, f)。一部の Piezo2 に対して標識した金コロイドは、軸索および末端シュワン細胞の細胞膜に隣接していた (Fig. 3-8c, f 白矢印)。



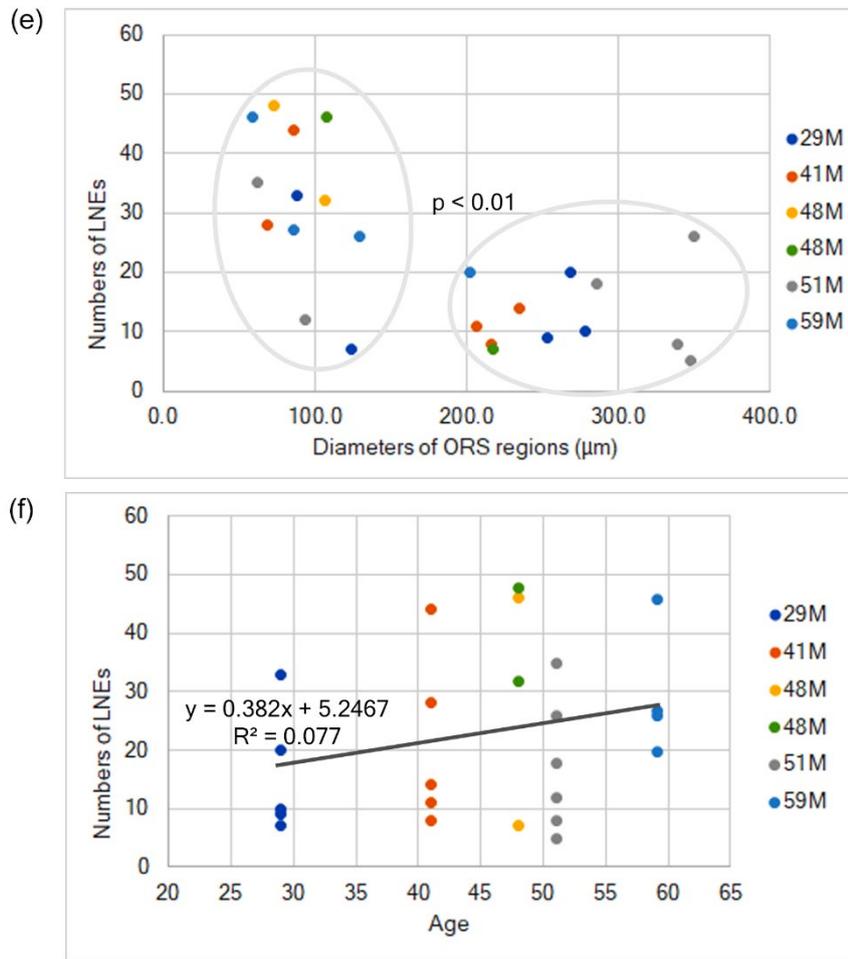
**Fig. 3-8** Piezo2 is expressed at LNEs and tSCs in terminal and miniaturized HF revealed by pre-embedding immunoelectron microscopy. (a) Transverse section of a three-hair follicular unit immunolabeled with Piezo2 (green), PGP9.5 (red), and Hoechst 33342 (blue) merged with differential interference contrast image. (b) Magnified view of the white rectangle in panel a. LNEs (white arrowheads) are located along part of the terminal HF. (c) The distribution of Piezo2 (black arrows) in axons and tSC of lanceolate endings of the terminal HF by pre-embedding immunoelectron microscopy. (d) Transverse section of a two-hair follicular unit immunolabeled with Piezo2 (green), PGP9.5 (red), and Hoechst (blue) merged with differential interference contrast image. (e) Magnified view of the white rectangle in panel a. LNEs (white arrowheads) encircle the miniaturized HF. (f) The distribution of Piezo2 (black arrows) in lanceolate endings of the miniaturized HF by pre-embedding immunoelectron microscopy. Ax: axon; HR: hair root; ORS: outer root sheath; S: terminal Schwann cells; SG: sebaceous gland; Asterisk: miniaturized HF. Bars = 100  $\mu$ m (a, d), 30  $\mu$ m (b, e), and 500 nm (c, f). Images from 29-year-old male scalp skin.

#### 3-3-4. 終毛およびミニチュア化毛における柵状神経終末の数の比較

終毛とミニチュア化毛の小型化された HF と末端 HF の間の LNE の数を比較するため、毛包に対し横断面に切片を作製し PGP9.5 および S100 $\beta$  で免疫染色をし、共焦点顕微鏡観察を行った (Fig. 3-9a-d)。散布図に、6 名のドナーから得られた 76 本の毛包のうち、蛍光免疫染色により柵状神経終末を有する 24 本の毛包について柵状神経の数と外毛根鞘の直径を示した (Fig. 3-9e)。外毛根鞘の直径の中央値は 166.1  $\mu\text{m}$  であった。中央値により 2 つのクラスターに分け、マン・ホイットニーの U 検定を行ったところ、柵状神経の数は 2 つのクラスター間で、有意差が認められた ( $p = 0.0021$ )。ドナーの年齢と柵状神経終末の数については、散布図より回帰直線および相関係数を求めた。年齢と柵状神経終末の数の間には、相関は認められなかった (Fig. 3-9f)。



**Fig. 3-9** Comparison of lanceolate nerve ending morphology between terminal and miniaturized HF. (a) Transverse section of two-hair follicular unit immunolabeled with PGP9.5 (green), S100 $\beta$  (red), and Hoechst 33342 (blue) merged with differential interference contrast image. (b) Distribution of LNEs (white arrowheads) in terminal HF. (c) Transverse section of a four-hair follicular unit immunolabeled with PGP9.5 (green), S100 $\beta$  (red), and Hoechst 33342 (blue) merged with differential interference contrast image. (d) Distribution of LNEs (white arrowheads) in a miniaturized HF.



**Fig. 3-9 Continued.** (e) Quantitative analysis between number of LNEs and diameter of ORS in HF<sub>s</sub> from six donors. (f) Quantitative analysis between number of LNEs and donors' age. HR: hair root; ORS: outer root sheath; SG: sebaceous gland; Asterisk: miniaturized HF<sub>s</sub>. Bars = 100  $\mu$ m (a, c) and 20  $\mu$ m (b, d). Images from 48-year-old male scalp skin.

### 3-4. 考察

本検討では、光シート顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡、および TEM、FIB-SEM を用いて、ヒト頭皮毛包における柵状神経の分布を調べた。柵状神経終末について、これまでに用いられてきた手法および本検討に用いた手法について Table 3.1 に示した。ヒト頭皮における硬毛は、これまでに研究されてきた動物の体毛

に比べ大きく、柵状神経終末は動物の洞毛ほど発達していない。ヒト頭皮の硬毛における柵状神経終末の形態学的観察においては、毛群レベルで広範囲に観察が可能である光シート顕微鏡や、あらかじめ共焦点レーザー顕微鏡で柵状神経終末を同定したのち、TEM や FIB-SEM を組み合わせて観察する手法が有効であると考えられた。

光シート顕微鏡観察において終毛の近傍に認められた神経クラスターは、CLEM 法による毛包の横断面観察から柵状神経であると同定された (Figs. 3-1a, 2b, 2e)。柵状神経の断面の観察から、毛包の峽部に位置する柵状神経の微細構造は、以前に報告されたヒトの軟毛の柵状神経と類似していることが明らかになった (Fig. 3-2e) [5]。また、柵状神経は外毛根鞘の外側に密に存在していた (Figs. 3-2c, 3b, 8b, 9b)。一方、ミニチュア化毛包における柵状神経の微細構造と分布は、軟毛のものと同様であった (Figs. 3-1c, 1d, 5b, 5c, 7b, 8e, 9d)。

さらに、3D-CLEM を用いたヒト頭皮における終毛の柵状神経の 3 次元微細構造解析から、I 型および II 型の終末シュワン細胞の突起と軸索の空間的關係が明らかとなった (Figs. 3-4d-g)。柵状神経の 3 次元再構築像は、以前に報告されたラットの体毛における柵状神経の解析から予測されたモデルに類似していた [33, 88]。終毛に存在する柵状神経の構造に加え、包埋後免疫電子顕微鏡観察により、Piezo2 がヒト頭皮の終毛およびミニチュア化毛の軸索および II 型終末シ

ユワン細胞に発現していることが認められた (Figs. 3-8c, 8f)。以上のことから、ヒト頭皮における毛包の柵状神経終末は、接触刺激の機械受容器として機能すると考えられた。

さらに、ヒト頭皮においても、柵状神経がバルジ領域の CD200 陽性の外毛根鞘に近接して存在することから、毛包上皮系幹細胞ニッチが柵状神経終末の構造の維持に寄与している可能性が示唆された (Fig. 3-3g)。柵状神経終末が毛群内のどの毛包に形成されるかという選択には、柵状神経終末の軸索誘導に寄与する Semaphorin 3C や、柵状神経終末の適切なパターン形成と接着刺激の応答に必要な epidermal growth factor-like protein 6 (EFG6) などの分子が関与しているかもしれない [87, 101]。

ヒトの産毛や lanugo hair における柵状神経終末については報告がなされている [95, 102, 103]。本検討では、毛包の横断面の CLEM によって、終毛の柵状神経は、1 毛群あたり 1 本または 2 本の毛包に存在することが明らかとなった。今後、毛群内の柵状神経終末が形成される頻度についてはさらに検討しなければならないが、立毛筋は、毛群に含まれるすべての毛包に共有されるとするモデルが提唱されており、毛群に対して立毛筋の自律神経が支配する可能性が考えられる [104]。柵状神経終末と毛包との関係だけでなく、柵状神経終末と毛群の関係を考慮しなければならないだろう。毛包は胎児期の妊娠 4 ヶ月から 5 ヶ月に

発生し、その後毛包に対する神経支配が形成される [32]。神経支配が形成される期間に柵状神経も形成され同時に柵状神経終末の形成が決定されることが考えられる。さらに、毛包のミニチュア化により柵状神経の数が増加することが示された (Fig. 3-9e)。正常な終毛からミニチュア化により柵状神経終末の劇的な構造変化が認められた。柵状神経終末は創傷治癒によって再生されることが報告されているが [83]、男性型脱毛症や加齢によっても構造変化が起こると考えられた。

	Light microscopy	SEM	TEM	SBF-SEM	Light-sheet	CLEM	3D-CLEM
Rat (vibrissae)	Overall views [105]	Protrusions of axons on sinus side [35]	Longitudinal - sectioned and ultrastructure [35]	Spatial relationship among glassy membrane, Merkel cells and LNEs [31]			
Rat (pelage)	Development of innervation in pup [32]		Cross-sectioned and ultrastructure [93]				
Mouse (pelage)	Distribution of LNEs in ear skin [106] Structure and genetic identification [89, 107, 108]		Cross-sectioned and ultrastructure [91]				
Monkey (pelage)			Cross-sectioned and ultrastructure [92, 109]				
Human (vellus hair, face)	Overall views [95] Development of innervation in fetus [32]		Cross-sectioned and ultrastructure [30, 36, 95]				
Human (terminal hair, scalp) This study					Distribution within follicular units	Distribution within HF and cross-sectioned and ultrastructural images	Distribution within HF and cross-sectioned and 3D ultrastructural images

**Table 3-1 Comparison of techniques in morphological studies of LNEs**

## 第4章 総括

本研究では、FIB-SEM を中心とした最新の観察機器を用いて従来の SEM や TEM ではで明らかにできなかった毛包の3次元微細構造を明らかにできるかどうか検討を行った。具体的には、毛包における間葉系幹細胞と考えられている DS 細胞および DP 細胞について、また、バルジ領域の毛包上皮系幹細胞の多能性に関与するとされ、毛包峽部に位置する柵状神経終末について3次元微細構造の観察を行った。

毛周期の司令塔である DP 細胞、およびそのリソースである DS 細胞は、毛球部を維持する幹細胞としての重要な役割を持つ [18]。また、柵状神経終末は、機械受容器だけでなく毛包上皮幹細胞ニッチであるバルジ領域と密接な関係がある [37,38]。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、これまでヒト毛包での検討は殆ど行われておらず、頭皮の正常な毛包の構造についての基礎的な知見が不十分であると考えられた。これまで結合織鞘 (dermal sheath ; DS) に存在する間葉系細胞 (DS 細胞) は線維芽細胞様と報告されるのみで、細胞の3次元形態は明らかにされていなかった。さらにヒト頭皮の毛包に柵状神経終末が存在するかについても報告はなかった。それは、第1章で述べたように、これまで毛髪の構造解析に用いられてきた SEM および TEM では、

3次元微細構造が原理的にも技術的にも観察できないためである。そこで本研究ではFIB-SEMを用いて、ヒト頭皮毛包の3次元微細構造解析を試みた。電界放出形走査電子顕微鏡（FE-SEM）は低加速電圧での試料観察が可能で、さらに反射電子を利用することにより、高分解能でTEMに類似した像が得ることが可能である。加えて、FIB-SEMは試料を薄く切削するガリウムイオンビームが搭載されており、試料表面の加工と画像取得を連続的に行うことが可能であり、画像処理により電子顕微鏡レベルでの3次元像を再構築できる。

第2章では、ヒト毛球部の結合織鞘（dermal sheath；DS）および毛乳頭（dermal papilla；DP）における間葉系細胞の微細な形態解析を行った。ヒト頭皮から単離した毛球部を含む毛包を用いてFIB-SEMを用いた3次元微細構造解析を確立し、毛球部の部位ごとの間葉系細胞の形態の相違について明らかにした。FIB-SEMにより得られた3次元再構築像から、結合織鞘に存在するDS細胞、基底床（basal plate）に存在するDSC（dermal sheath cap）細胞の形態は扁平であり、一方で毛乳頭に存在するDP細胞は多数の分岐構造を持ち、基底床のstalkに存在するDSC細胞は扁平な形態細胞と、分岐構造を持つ細胞が存在することが分かった（Fig. 4-1a, 1b）。この結果から、毛球部の間葉系細胞の形態の変化は基底床のstalkで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も明らかになった。DS細胞、DSC細胞では指のような細胞突起で接着し、DP細胞

では手のひらのような細胞突起で接着することが明らかとなったが、このような細胞接着形態の違いが生じた理由は不明である。(Fig. 4-1b)。DP 細胞間、DS 細胞間、DSC 細胞間の接着は TEM 像および FIB-SEM 像から、ギャップ結合であると考えられた。ギャップ結合を介し、毛球部全体に間葉系細胞のネットワークを形成し、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。成長期から退行期へと移行する際に、ギャップ結合より Ca イオンが流入することで、 $\alpha$ -smooth muscle actin が収縮し、DS 細胞の収縮にも関与する可能性が考えられた。また、免疫組織染色より、DP 細胞に神経軸索の細胞質全体に足場を形成する  $\beta$ II スペクトリン (SPTBN1) が発現することから、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。正常な頭皮の毛包は毛球部が大きく、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、間葉系細胞どうしの細胞間接着を介した細胞のネットワークを形成することが示唆された。

第 3 章では、頭皮の毛包峽部における柵状神経の分布とその 3 次元の微細構造を、光シート顕微鏡観察法と、CLEM 法および FIB-SEM を組み合わせることによって解析可能とした。さらに、本方法によって毛包器官および細胞内での標的分子の局在から、3 次元の超微細構造として解析可能とした。

解析の結果、毛群を形成する全ての毛包にではなく、一部の毛包にのみ柵状神

神経終末が存在することが明らかとなった (Fig. 4-2)。頭皮の硬毛における柵状神経終末の構造は、これまで報告されてきたうぶ毛に存在している柵状神経終末の微細構造と同様に神経軸索がシュワン細胞に挟まれている構造であったが、柵状神経終末の分布はうぶ毛とは異なり、硬毛の一部分にしか存在していなかったことが明らかとなった。毛の動く際の振動が柵状神経終末に伝わり感覚刺激を受容するためには、機械刺激開口チャンネルが柵状神経終末に発現していることが必要である。そこで Piezo2 の免疫電子顕微鏡観察を行った。免疫電子顕微鏡観察により、Piezo2 がヒトの頭皮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、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の数と比較して有意に多く、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た。また、柵状神経終末は毛包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系幹細胞との関連が示唆された。さらに、柵状神経終末の数と年齢に相関が見られないことから、年齢と関係なく毛包のミニチュア化が起こればそれに対応して柵状神経終末の数が増加すると考えられた。その理由については今の時点では不明である。ミニチュア毛では、硬毛に比べ、毛包の峽部が表皮近くに位置する。

ミニチュア毛において柵状神経終末の数が多いことは、毛の振動を感知するために、理にかなっていると考えられた。

本研究の結果より、FIB-SEM を用いた 3 次元構造解析は、毛を構成する細胞の 3 次元形態を調べるうえで非常に有効な手段であった。また、共焦点レーザー顕微鏡と FIB-SEM を組み合わせた 3 D-CLEM 法は、毛群内に限局的にしか存在しない柵状神経終末のような構造の観察にも有効な手段であった。成長期毛包における、毛球部の間葉系細胞の 3 次元形態が明らかとなった。さらに頭皮に柵状神経終末の存在が明らかとなった。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頭皮においても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。加えてヒト毛包において、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。

本研究の成果は、毛髪科学の発展に貢献し、ヒト頭皮における毛包の微細構造への理解、さらには将来の育毛剤開発や毛髪再生医療の基盤技術開発に有益と考えられる。



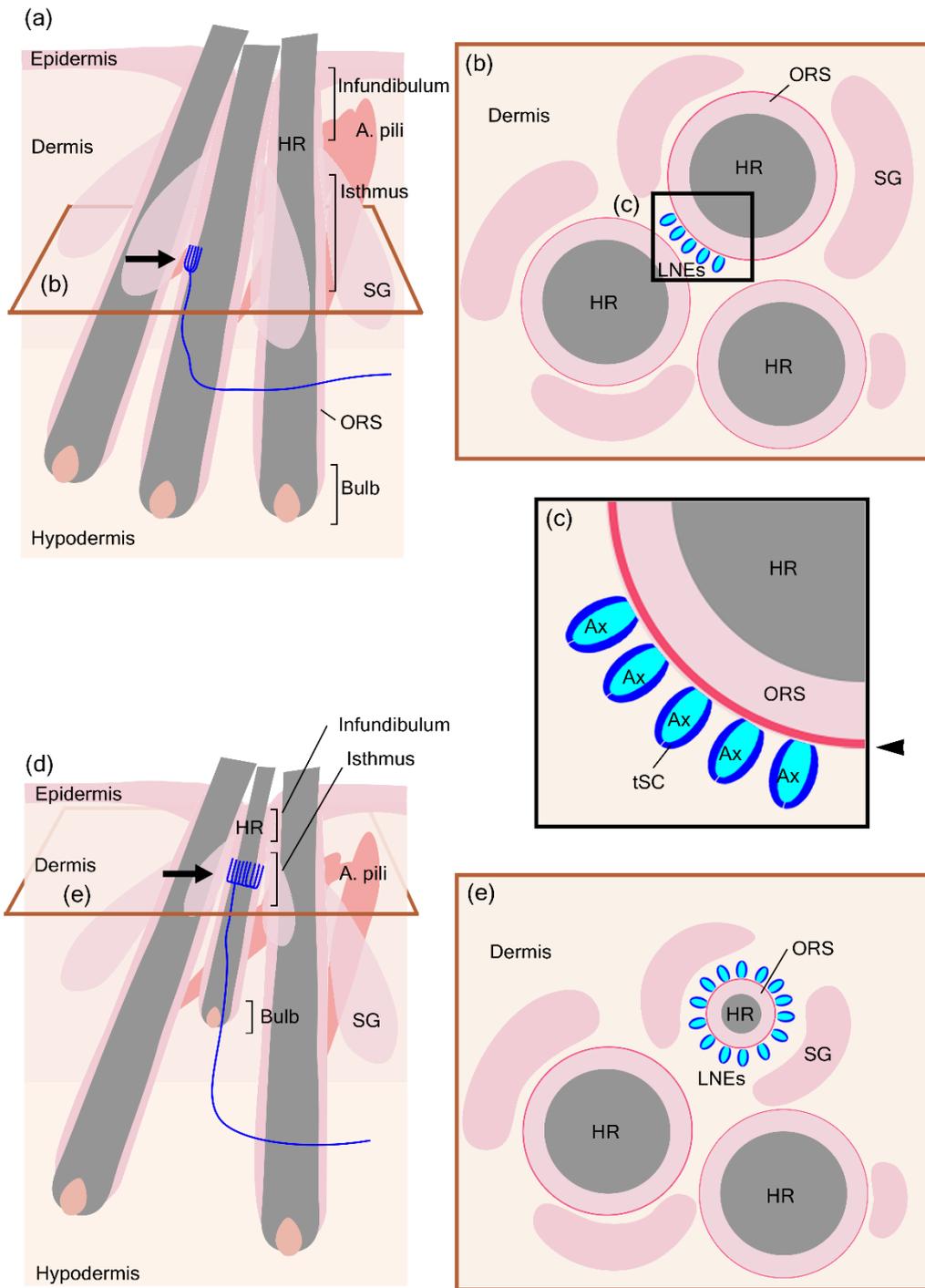


Fig. 4-2. Summary of the research. (a) Normal terminal hair structure in a follicular unit. (b) Cross sectioned image at the isthmus level. (c) Magnified image of panel b. (d) The follicular unit including miniaturized HF. (e) Cross sectioned image at the isthmus level.in panel d.

## 参考文献

1. Mota-Rojas D., Titto C.G., De Mira Geraldo A., Martinez-Burnes J., Gomez J., Hernandez-Avalos I., Casas A., Dominguez A., Jose N., Bertoni A., Reyes B., Pereira A.M.F., Efficacy and function of feathers, hair, and glabrous skin in the thermoregulation strategies of domestic animals. *Animals* 2021. 11.
2. Lee J., Rabbani C.C., Gao H., Woodruff B.M., Steinhart M.R., Liu Y., Shipchandler T.Z., Koehler K.R., Hair-bearing human skin generated entirely from pluripotent stem cells. *Nature*, 2020. 582, 399-404.
3. Schneider M.R., Schmidt-Ullrich R., Paus R., The hair follicle as a dynamic miniorgan. *Curr Biol*, 2009. 19, R132-142.
4. McElwee K.J., Kissling S., Wenzel E., Huth A., Hoffmann R., Cultured peribulbar dermal sheath cells can induce hair follicle development and contribute to the dermal sheath and dermal papilla. *J Invest Dermatol*, 2003. 121, 1267-1275.
5. Rushton D.H., Westgate G.E., Van Neste D.J., Following historical "tracks" of hair follicle miniaturisation in patterned hair loss: Are elastin bodies the forgotten aetiology? *Exp Dermatol*, 2022. 31, 102-109.
6. Pinkus H., Differential patterns of elastic fibers in scarring and non-scarring alopecias. *J Cutan Pathol*, 1978. 5, 93-104.
7. Ito M., Sato Y., Dynamic ultrastructural changes of the connective tissue sheath of human hair follicles during hair cycle. *Arch Dermatol Res*, 1990. 282, 434-441.
8. Headington J.T., Transverse microscopic anatomy of the human scalp. *Arch Dermatol*, 1984. 120, 449-456.
9. Ishino A., Takahashi T., Suzuki J., Nakazawa Y., Iwabuchi T., Tajima M., Contribution of hair density and hair diameter to the appearance and progression of androgenetic alopecia in Japanese men. *Br J Dermatol*, 2014. 171, 1052-1059.
10. Vogt A., Hadam S., Heiderhoff M., Audring H., Lademann J., Sterry W., Blume-Peytavi U., Morphometry of human terminal and vellus hair follicles. *Exp Dermatol*, 2007. 16, 946-950.
11. Paus R., Cotsarelis G., The biology of hair follicles. *N Engl J Med*, 1999. 341, 491-497.
12. Montagna W., Parakkal P.F., The pilary apparatus, in *The structure & function of skin* (third edition). 1974, Academic Press. 172-258.
13. Muller M., Jasmin J.R., Monteil R.A., Loubiereb R., Embryology of the hair follicle. *Early Hum Dev*, 1991. 26, 159-166.
14. Oliver R.F., Jahoda. C.A.B., Dermal-epidermal interactions. *Clin Dermatol*, 1988.

- 6, 74-82.
15. Oliver R.F., The experimental induction of whisker growth in the hooded rat by implantation of dermal papillae. *J Embryol Exp Morphol*, 1967. 18, 43-51.
  16. Jahoda C.A., Horne, K., Oliver, R. , Induction of hair growth by implantation of cultured dermal papilla cells. *Nature*, 1984. 311, 560-562.
  17. Higgins C.A., Chen J.C., Cerise J.E., Jahoda C.A., Christiano A.M., Microenvironmental reprogramming by three-dimensional culture enables dermal papilla cells to induce de novo human hair-follicle growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. 110, 19679-19688.
  18. Rahmani W., Abbasi S., Hagner A., Raharjo E., Kumar R., Hotta A., Magness S., Metzger D., Biernaskie J., Hair follicle dermal stem cells regenerate the dermal sheath, repopulate the dermal papilla, and modulate hair type. *Dev Cell*, 2014. 31, 543-558.
  19. Shin W., Rosin N.L., Sparks H., Sinha S., Rahmani W., Sharma N., Workentine M., Abbasi S., Labit E., Stratton J.A., Biernaskie J., Dysfunction of hair follicle mesenchymal progenitors contributes to age-associated hair loss. *Dev Cell*, 2020. 53, 185-198 e187.
  20. Randall V.A., Hormonal regulation of hair follicles exhibits a biological paradox. *Semin Cell Dev Biol*, 2007. 18, 274-285.
  21. Price V.H., Treatment of hair loss. *N Engl J Med*, 1999. 341, 964-973.
  22. Ando Y., Yamaguchi Y., Hamada K., Yoshikawa K., Itami S., Expression of mrna for androgen receptor, 5 $\alpha$ -reductase and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in human dermal papilla cells. *Br J Dermatol*, 1999. 141, 840-845.
  23. Hibberts N.A., Howell A.E., Randall V.A., Balding hair follicle dermal papilla cells contain higher levels of androgen receptors than those from non-balding scalp. *J Endocrinol*, 1998. 156, 59-65.
  24. Inui S., Itami S., Molecular basis of androgenetic alopecia: From androgen to paracrine mediators through dermal papilla. *J Dermatol Sci*, 2011. 61, 1-6.
  25. Matsumura H., Mohri Y., Binh N.T., Morinaga H., Fukuda M., Ito M., Kurata S., Hoeijmakers J., Nishimura E.K., Hair follicle aging is driven by transepidermal elimination of stem cells via coll17a1 proteolysis. *Science*, 2016. 351, aad4395.
  26. Rebera A., Guarrera M., Kenogen: A new phase of the hair cycle? *Dermatology*, 2002. 205, 108-110.
  27. Williams R., Pawlus A.D., Thornton M.J., Getting under the skin of hair aging: The impact of the hair follicle environment. *Exp Dermatol*, 2020.
  28. Munger B.L., Ide C., The structure and function of cutaneous sensory receptors.

- Arch Histol Cytol, 1988.
29. Ghitan N., Bari A., Szczot M., Thompson J.H., Li C., Le Pichon C.E., Krashes M.J., Chesler A.T., Specialized mechanosensory nociceptors mediating rapid responses to hair pull. *Neuron*, 2017. 95, 944-954 e944.
  30. Hashimoto K., Fine structure of perifollicular nerve endings in human hair. *J Invest Dermatol*, 1972. 59, 432-441.
  31. Furuta T., Bush N.E., Yang A.E., Ebara S., Miyazaki N., Murata K., Hirai D., Shibata K.I., Hartmann M.J.Z., The cellular and mechanical basis for response characteristics of identified primary afferents in the rat vibrissal system. *Curr Biol*, 2020. 30, 815-826.
  32. Payne J., Middleton J., Fitzgerald M., The pattern and timing of cutaneous hair follicle innervation in the rat pup and human fetus. *Brain Res Dev Brain Res*, 1991. 61, 173-182.
  33. Seguchi H., Yagyu Y., Kobayashi T., Three dimensional observations of the palisade-shaped nerve endings of normal hair of rat's snout. *Anat Anz*, 1989. 169, 225-234.
  34. Rice F.L., Albrecht P.J., Cutaneous mechanisms of tactile perception: Morphological and chemical organization of the innervation to the skin, in *The senses: A comprehensive reference*. 2008. 1-31.
  35. Takahashi-Iwanaga H., Three-dimensional microanatomy of longitudinal lanceolate endings in rat vibrissae. *J Comp Neurol*, 2000. 426, 259-569.
  36. Halata Z., Sensory innervation of the hairy skin (light- and electronmicroscopic study). *J Invest Dermatol* 1993. 101, 75S-81S.
  37. Brownell I., Guevara E., Bai C.B., Loomis C.A., Joyner A.L., Nerve-derived sonic hedgehog defines a niche for hair follicle stem cells capable of becoming epidermal stem cells. *Cell Stem Cell*, 2011. 8, 552-565.
  38. Cheng C.C., Tsutsui K., Taguchi T., Sanzen N., Nakagawa A., Kakiguchi K., Yonemura S., Tanegashima C., Keeley S.D., Kiyonari H., Furuta Y., Tomono Y., Watt F.M., Fujiwara H., Hair follicle epidermal stem cells define a niche for tactile sensation. *Elife*, 2018. 7.
  39. Muto K., Ono T., Arao T., Ultrastructural observations on the glassy membrane of the human hair follicle. *J Clin Electron Microscopy*, 1981. 14, 5-6.
  40. Sueki H., Telegan B., Murphy G.F., Computer-assisted three-dimensional reconstruction of human dermal dendrocytes. *J Invest Dermatol*, 1995. 105, 704-708.
  41. Braverman I.M., Sibley J., Keh-Yen A., A study of the veil cells around normal,

- diabetic, and aged cutaneous microvessels. *J Invest Dermatol*, 1986. 86, 57-62.
42. Yamaguchi M., Chibana H., A method for obtaining serial ultrathin sections of microorganisms in transmission electron microscopy. *J Vis Exp*, 2018.
  43. Narisawa Y., Hashimoto K., Hiromu K., Two- and three-dimensional observations of human terminal and vellus hair follicles. *J Dermatol Sci*, 1994.
  44. Sakita S., Ohtani O., Nakatani T., Morohashi M., Three-dimensional microvasculature of the hair follicle. *J Dermatol Sci*, 1994. 7, S1-S4.
  45. Manelli A., Sangiorgi S., Ronga M., Reguzzoni M., Bini A., Raspanti M., Plexiform vascular structures in the human digital dermal layer: A sem--corrosion casting morphological study. *Eur J Morphol*, 2005. 42, 173-177.
  46. Ohta K., Sadayama S., Togo A., Higashi R., Tanoue R., Nakamura K., Beam deceleration for block-face scanning electron microscopy of embedded biological tissue. *Micron*, 2012. 43, 612-620.
  47. Denk W., Horstmann H., Serial block-face scanning electron microscopy to reconstruct three-dimensional tissue nanostructure. *PLoS Biol*, 2004. 2, e329.
  48. Yamanishi H., Soma T., Kishimoto J., Hibino T., Ishida-Yamamoto A., Marked changes in lamellar granule and trans-golgi network structure occur during epidermal keratinocyte differentiation. *J Invest Dermatol*, 2019. 139, 352-359.
  49. Laws R., Steel D.H., Rajan N., Research techniques made simple: Volume scanning electron microscopy. *J Invest Dermatol*, 2022. 142, 265-271 e261.
  50. Koga D., Kusumi S., Watanabe T., Backscattered electron imaging of resin-embedded sections. *Microscopy (Oxf)*, 2018. 67, 196-206.
  51. den Hollander L., Han H., De Winter M., Svensson L., Masich S., Daneholt B., Norlen L., Skin lamellar bodies are not discrete vesicles but part of a tubuloreticular network. *Acta Derm Venereol*, 2016. 96, 303-308.
  52. Cretoiu D., Gherghiceanu M., Hummel E., Zimmermann H., Simionescu O., Popescu L.M., Fib-sem tomography of human skin telocytes and their extracellular vesicles. *J Cell Mol Med*, 2015. 19, 714-722.
  53. Lindberg E., Baumer Y., Stempinski E.S., Rodante J.A., Powell-Wiley T.M., Dey A.K., Nakajima S., Playford M.P., Bleck C.K.E., Mehta N.N., Nanotomography of lesional skin using electron microscopy reveals cytosolic release of nuclear DNA in psoriasis. *JAAD Case Rep*, 2021. 9, 9-14.
  54. Godman G.C., Morgan C., Breitenfeld P.M., H.M. R., A correlative study by electron and light microscopy of the development of type 5 adenovirus. Ii. Light microscopy. *J Exp Med* 1960. 112, 383-402.
  55. Schwarz H., B.M. H., Correlative light and electron microscopy using

- immunolabeled resin sections. *Methods Mol Biol*, 2007. 369:, 229-256.
56. Mildner K., Breitsprecher L., Currie S.M., Stegmeyer R.I., Stasch M., Volkery S., Psathaki O.E., Vestweber D., Zeuschner D., Landmark-based retrieval of inflamed skin vessels enabled by 3d correlative intravital light and volume electron microscopy. *Histochem Cell Biol*, 2022. 158, 127-136.
  57. Jahoda C.A., Oliver R.F., Reynolds A.J., Forrester J.C., Horne K.A., Human hair follicle regeneration following amputation and grafting into the nude mouse. *J Invest Dermatol*, 1996. 107, 804-807.
  58. Clavel C., Grisanti L., Zemla R., Rezza A., Barros R., Sennett R., Mazloom A.R., Chung C.Y., Cai X., Cai C.L., Pevny L., Nicolis S., Ma'ayan A., Rendl M., Sox2 in the dermal papilla niche controls hair growth by fine-tuning bmp signaling in differentiating hair shaft progenitors. *Dev Cell*, 2012. 23, 981-994.
  59. Rendl M., Polak L., Fuchs E., Bmp signaling in dermal papilla cells is required for their hair follicle-inductive properties. *Genes Dev*, 2008. 22, 543-557.
  60. Elliott K., Stephenson T.J., Messenger A.G., Differences in hair follicle dermal papilla volume are due to extracellular matrix volume and cell number: Implications for the control of hair follicle size and androgen responses. *J Invest Dermatol*, 1999. 113, 873-877.
  61. Tsuboi R., Niiyama S., Irisawa R., Harada K., Nakazawa Y., J. K., Autologous cell-based therapy for male and female pattern hair loss using dermal sheath cup cells: A randomized placebo-controlled double-blinded dose-finding clinical study. *J Am Acad Dermatol*, 2020 83, 109-116.
  62. Tobin D.J., Gunin A., Magerl M., Handijski B., Paus R., Plasticity and cytokinetic dynamics of the hair follicle mesenchyme: Implications for hair growth control. *J Invest Dermatol*, 2003. 120, 895-904.
  63. Jahoda C.A., Mauger A., Bard S., Sengel P., Changes in fibronectin, laminin and type iv collagen distribution relate to basement membrane restructuring during the rat vibrissa follicle hair growth cycle. *J Anat*, 1992. 181, 47-60.
  64. Iguchi M., Hara M., Manome H., Kobayasi H., Tagami H., Aiba S., Communication network in the follicular papilla and connective tissue sheath through gap junctions in human hair follicles. *Exp Dermatol*, 2003. 12, 283-288.
  65. Iida M., Ihara S., Matsuzaki T., Hair cycle-dependent changes of alkaline phosphatase activity in the mesenchyme and epithelium in mouse vibrissal follicles. *Dev Growth Differ*, 2007. 49, 185-195.
  66. Nicholas Heitman, Rachel Sennett, Ka-Wai Mok, Nivedita Saxena, Devika Srivastava, Pieter Martino, Laura Grisanti, Zichen Wang, Avi Ma'ayan,

- Panteleimon Rompolas, Rendl M., Dermal sheath contraction powers stem cell niche relocation during hair cycle regression. *Science* 2020. 367, 161-166.
67. Soma T., Tsuji Y., Hibino T., Involvement of transforming growth factor-beta2 in catagen induction during the human hair cycle. *J Invest Dermatol*, 2002. 118, 993-997.
  68. Kloepper Je S.K., Al-Nuaimi Y, Gáspár E, van Beek N, Paus R. , Methods in hair research: How to objectively distinguish between anagen and catagen in human hair follicle organ culture. *Exp Dermatol* 2010. 19, 305-312.
  69. Oh J.W., Kloepper J., Langan E.A., Kim Y., Yeo J., Kim M.J., Hsi T.C., Rose C., Yoon G.S., Lee S.J., Seykora J., Kim J.C., Sung Y.K., Kim M., Paus R., Plikus M.V., A guide to studying human hair follicle cycling in vivo. *J Invest Dermatol*, 2016. 136, 34-44.
  70. Colin A. Jahoda, Amanda J. Reynolds, Christine Chaponnier, James C. Forester, Gabbiani G., Smooth muscle  $\alpha$ -actin is a marker for hair follicle dermis in vivo and in vitro. *J Cell Sci*, 1991. 99, 627-636.
  71. Susuki K., Zollinger D.R., Chang K.J., Zhang C., Huang C.Y., Tsai C.R., Galiano M.R., Liu Y., Benusa S.D., Yermakov L.M., Griggs R.B., Dupree J.L., Rasband M.N., Glial betaii spectrin contributes to paranode formation and maintenance. *J Neurosci*, 2018. 38, 6063-6075.
  72. Braverman I.M., Keh-Yen A., Ultrastructure of the human dermal microcirculation. Iii. The vessels in the mid- and lower dermis and subcutaneous fat. *J Invest Dermatol*, 1981. 77, 297-304.
  73. Braverman I.M., The cutaneous microcirculation. *J Investi Dermatol Symp Proc*, 2000. 5, 3-9.
  74. Hadate S., Takahashi N., Kametani K., Iwasaki T., Hasega Y., Tangkawattana P., Kawasaki T., Ueda H., Hosotani M., Watanabe T., Ultrastructural study of the three-dimensional tenocyte network in newly hatched chick achilles tendons using serial block face-scanning electron microscopy. *J Vet Med Sci*, 2020. 82, 948-954.
  75. Mcneilly C.M., Banes A.J., Benjamin M., Ralphs J.R., Tendon cells in vivo form a three dimensional network of cell processes linked by gap junctions. *J Anat* 1996. 189, 593-600.
  76. Murata K., Hirata A., Ohta K., Enaida H., Nakamura K.I., Morphometric analysis in mouse scleral fibroblasts using focused ion beam/scanning electron microscopy. *Sci Rep*, 2019. 9, 6329.
  77. Kligman A.M., The human hair cycle. *J Invest Dermatol*, 1959. 33, 307-316.
  78. Parakkal P.F., Morphogenesis of the hair follicle during catagen. *Zeitschrift für*

- Zellforschung und Mikroskopische Anatomie, 1970. 107, 174-186.
79. Young R.D., Morphological and ultrastructural aspects of the dermal papilla during the growth cycle of the vibrissal follicle in the rat. *J Anat*, 1980. 131, 355-365.
  80. Tobin D.J., Basal lamina-like material and hemidesmosome-like structures associated with dermal papilla cells in the normal human anagen hair follicle. *Arch Dermatol Res*, 1992. 284.
  81. Urabe A., Furumura M., Imayama S., Nakayama J., Hori Y., Identification of a cell layer containing  $\alpha$ -smooth muscle actin in the connective tissue sheath of human anagen hair. *Arch Dermatol Res*, 1992. 284, 26-249.
  82. Nutbrown M., Randall V.A., Differences between connective tissue-epithelial junctions in human skin and the anagen hair follicle. *J Invest Dermatol*, 1995. 104, 90-94.
  83. Zimmerman A., Bai L., Ginty D.D., The gentle touch receptors of mammalian skin. *Science*, 2014. 346, 950-954.
  84. Narisawa Y., Hashimoto K., Kohda H., Perifollicular clear space under skirt-like epithelial structure of human small vellus hair follicle. *J Dermatol Sci*, 1995. 10, 110-117.
  85. Blanpain C., Lowry W.E., Geoghegan A., Polak L., Fuchs E., Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell*, 2004. 118, 635-648.
  86. Ohya M., Terunuma A., Tock C.L., Radonovich M.F., Pise-Masison C.A., Hopping S.B., Brady J.N., Udey M.C., Vogel J.C., Characterization and isolation of stem cell-enriched human hair follicle bulge cells. *J Clin Invest*, 2006. 116, 249-260.
  87. Cheng C.-C., Tsutsui K., Taguchi T., Sanzen N., Nakagawa A., Kakiguchi K., Yonemura S., Tanegashima C., Keeley S.D., Kiyonari H., Furuta Y., Tomono Y., Watt F.M., Fujiwara H., Hair follicle epidermal stem cells define a niche for tactile sensation. *Elife*, 2018. 7.
  88. Kaidoh T., Inoue T., N-cadherin expression in palisade nerve endings of rat vellus hairs. *J Comp Neurol*, 2008. 506, 525-534.
  89. Li L., Ginty D.D., The structure and organization of lanceolate mechanosensory complexes at mouse hair follicles. *Elife*, 2014. 3, e01901.
  90. Ranade S.S., Woo S.H., Dubin A.E., Moshourab R.A., Wetzel C., Petrus M., Mathur J., Begay V., Coste B., Mainquist J., Wilson A.J., Francisco A.G., Reddy K., Qiu Z., Wood J.N., Lewin G.R., Patapoutian A., Piezo2 is the major transducer

- of mechanical forces for touch sensation in mice. *Nature*, 2014. 516, 121-125.
91. Yamamoto T., The fine structure of the pallas-type sensory endings in relation to hair follicles. *J Electron Microsc (Tokyo)*, 1966.
  92. Loo S.-K., Halata Z., Innervation of hairs in the facial skin of marsupial mammals. *J Anat*, 1991. 174, 207-219.
  93. Toshiyuki. Kaidoh, Takao. Inoue, Intercellular junctions between pallas nerve endings and outer root sheath cells of rat vellus hairs. *J Comp Neurol*, 2000. 420, 427.
  94. Montagna W., Giacometti L., *Histology and cytochemistry of human skin: Xxxii. The external ear. Achieves of Dermatology*, 1969. 99, 757-767.
  95. Munger Bl H.Z., The sensorineural apparatus of the human eyelid. *Am J Anat*, 1984. 170, 181-204.
  96. Whiting D.A., Possible mechanism of miniaturization during androgenetic alopecia or pattern hair loss. *J Am Acad Dermatol*, 2001.
  97. Renier N., Wu Z., Simon D.J., Yang J., Ariel P., Tessier-Lavigne M., Idisco: A simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell*, 2014. 159, 896-910.
  98. Miyai M., Matsumoto Y., Yamanishi H., Yamamoto-Tanaka M., Tsuboi R., Hibino T., Keratinocyte-specific mesotrypsin contributes to the desquamation process via kallikrein activation and lekti degradation. *J Invest Dermatol*, 2014. 134, 1665-1674.
  99. Kiyokage E., Kobayashi K., Toida K., Spatial distribution of synapses on tyrosine hydroxylase-expressing juxtglomerular cells in the mouse olfactory glomerulus. *J Comp Neurol*, 2017. 525, 1059-1074.
  100. Yamanishi H., Soma T., Ishida-Yamamoto A., Iwabuchi T., Focused ion beam scanning electron microscopy reveals distinct mesenchymal morphology in human anagen hair follicles. *J Dermatol Sci*, 2022.
  101. Zhong H.B., Spatial association of sema3c with nerve endings/terminal schwann cells in hair follicle isthmus region. *Int J Dev Neurosci*, 2020. 80, 737-741.
  102. Montagna W., Parakkal P.F., *Cutaneous innervation, in The structure & function of skin (third edition)*. 1974, Academic Press. 157-171.
  103. Hashimoto K., Ito, M., Suzuki, Y, Innervation and vasculature of the hair follicle. In: Orfanos, c.E., Happle, r. (eds) *hair and hair diseases.*, in *Hair and hair diseases*. 1990, Springer, Berlin, Heidelberg. 117–147.
  104. Poblet E., Ortega F., Jiménez F., The arrector pili muscle and the follicular unit of the scalp: A microscopic anatomy study. *Dermatol Surg*, 2002. 28, 800-803.

105. Ebara S., Kumamoto K., Matsuura T., Mazurkiewicz J. E., Rice F. L., Similarities and differences in the innervation of mystacial vibrissal follicle-sinus complexes in the rat and cat: A confocal microscopic study. *J Comp Neurol*, 2002. 449, 103-119.
106. Suzuki M., Ebara S., Koike T., Tonomura S., Kumamoto K., How many hair follicles are innervated by one afferent axon? A confocal microscopic analysis of palisade endings in the auricular skin of thy1-yfp transgenic mouse. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 2012. 88, 583-595.
107. Li L., Rutlin M., Abaira V.E., Cassidy C., Kus L., Gong S., Jankowski M.P., Luo W., Heintz N., Koerber H.R., Woodbury C.J., Ginty D.D., The functional organization of cutaneous low-threshold mechanosensory neurons. *Cell*, 2011. 147, 1615-1627.
108. Bai L., Lehnert B.P., Liu J., Neubarth N.L., Dickendesher T.L., Nwe P.H., Cassidy C., Woodbury C.J., Ginty D.D., Genetic identification of an expansive mechanoreceptor sensitive to skin stroking. *Cell*, 2015. 163, 1783-1795.
109. Bressler M., Munger B.L., Embryonic maturation of sensory terminals of primate facial hairs. *J Invest Dermatol*, 1983. 80, 245-260.

本学位論文に使用した論文

(1) Yamanishi H., Soma T., Ishida-Yamamoto A., Iwabuchi T., Focused ion beam scanning electron microscopy reveals distinct mesenchymal morphology in human anagen hair follicles. *J Dermatol Sci*, 2022. 106, 123-126.

(2) Yamanishi H., Iwabuchi T., Three-dimensional correlative light and focused ion beam scanning electron microscopy reveals the distribution and ultrastructure of lanceolate nerve endings surrounding terminal hair follicles in human scalp skin. *J Anat.* (in press)

## 謝辞

本研究の実施において、終始丁寧なご指導とご鞭撻を賜りました東京工科大学応用生物学部 岩淵徳郎教授に心から感謝を申し上げます。また、実験の進行にあたってご指導を賜りました川崎医科大学医学部解剖学 樋田一徳主任教授、旭川医科大学皮膚科 山本明美主任教授にお礼申し上げます。また研究の機会を与えてくださいました故日比野利彦博士に深くお礼申し上げます。