

## 博士論文

論文題目 毛周期・毛髪成長に対する酸素濃度の影響の解析と  
酸素療法の有用性についての検証

氏 名 加藤 晴之輔

## 目次

要旨.....	3
1. 背景.....	4
2. 方法.....	7
3. 結果.....	14
4. 考察.....	34
5. 引用文献.....	38
謝辞.....	44

## 要旨

脱毛症には様々な原因があるが、その中で虚血と脱毛症の関係、また酸素が毛髪成長や毛周期に与える影響については詳細には調べられていない。本研究では虚血と毛髪成長の関係を検証し、全身性正常圧高濃度酸素が毛髪成長・毛周期に与える影響を調べた。虚血モデルでは毛髪成長の遅延が認められた。毛髪の器官培養では、高濃度酸素濃度下の方が毛髪の伸長速度が速かった。動物モデルでは、全身性正常圧高濃度酸素下投与が毛髪の成長を促し、退行期移行を遅延させた。これらのことから脱毛症と虚血に関係性があり、全身性正常圧高濃度酸素投与による虚血性の脱毛症の改善の可能性が示された。

## 背景

脱毛症、いわゆる薄毛、禿は、遺伝、ホルモン代謝異常、外傷、感染症、化学療法、自己免疫異常、瘢痕など様々な原因で生じる。しかし、虚血が脱毛症を引き起こすかどうかはあまり調べられていない。また、虚血は血流の低下であり、それにより低酸素、低栄養が引き起こされるが、このうち酸素が毛髪の成長や毛周期に及ぼす影響も、やはり詳細に調べられていない。

数少ない報告の一つに、脱毛症における脱毛症部位と虚血・低酸素に関わる報告がある。男性型脱毛症では、健常者と比べて前頭部の組織酸素分圧が側頭部の組織酸素分圧より有意に低かったとし、これに対する推察として、側頭部や後頭部は後頭動脈や側頭動脈などの外頸動脈からの大きな分枝により十分な血行が確保されている一方で、頭頂部や前頭部は大きな分岐がなく、組織全体が慢性的な低酸素状態になっていることがあげられるとしている (1)。しかし、これらの現象は毛包の成長や毛周期に関係して基礎的な観点からは調べられていない。毛髪成長や毛周期の基礎研究を行う上で、最もよく用いられる実験動物は C57BL/6Jcl マウスであり、毛周期と週齢の相関やそれに伴う組織学的変化などが詳細に調べられている (2)。例えば、成長期にある 6 週令前後のマウス背部に検証すべき外的因子を投与して、それらが成長期を短縮するかどうか (3)、また、休止期にある 7 週齢マウスを成長期に移行させうる刺激、シグナル、薬剤などを同定することで、発毛を促す物質の

開発などに応用されてきた (4)。このような手法を行うことで、より基礎的な虚血と毛髪成長や毛周期の相関を検証できる。

虚血が脱毛症を引き起こしうるとすれば、その改善により虚血と関連した脱毛症治療・予防が可能となりうる。虚血の改善方法の一つは、血流改善である。例えばミノキシジルは外用発毛剤として FDA に認可された唯一の薬物であり、ミノキシジルにより成長期毛包の割合が増加、成長期の延長効果、DPC や毛母細胞増殖促進による毛髪伸長速度の促進効果などがあるといわれている。その作用機序は、ミノキシジルによる血管拡張作用と毛乳頭細胞の細胞膜にあるカリウムチャネルの SU レセプターに結合した後、アデノシン産生を介するメカニズムなどの総合的な作用であるといわれている (5)。この他の改善方法として、局所微小血行改善、いわゆる血管新生によるものとしては、成長因子、PRP (Platelet rich plasma) (6)、脂肪移植、脂肪由来幹細胞移植などや、プロスタグランジン投与、血行再建、血行改善や、近年ではボツリヌス毒素による血行改善 (7) の試みなども報告されている。しかし、いずれも虚血の改善であり血行の改善である。虚血の実態は、主に低酸素と低栄養であり、このうち我々は特に酸素に着目した。酸素自体が毛髪成長や毛周期に与える影響を基礎的に検証した報告は、渉猟しうる範囲では皆無である。酸素の投与方法については、高圧酸素投与に関して多くの報告があるが (8-10)、特殊な設備が必要であり、酸素毒性などによる細胞障害が問題となる。我々は高圧高濃度

酸素ではなく、正常圧高濃度酸素（Normobaric hyperoxygenation: NBO）の影響について調べた。NBO がラットの各臓器の酸素分圧に与える影響を確認されており、NBO により諸臓器・組織の酸素分圧が上昇し、毛包が存在する皮膚・皮下脂肪も 20%O<sub>2</sub> より 60%O<sub>2</sub>、60%O<sub>2</sub> より 100%O<sub>2</sub> の方で組織酸素分圧が上昇する。しかし、100%O<sub>2</sub> 下では酸素による肺胞障害により飼育したラットが死亡するため、安全性の面から 60%O<sub>2</sub> を NBO として、その効果を評価した。

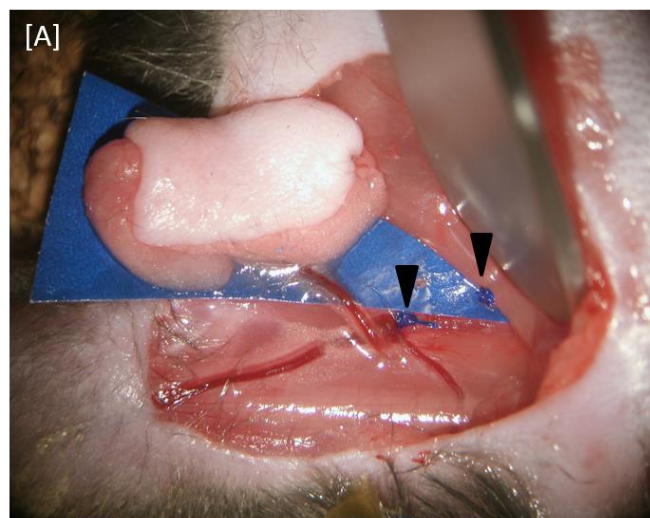
本研究ではまず、脱毛症が低酸素と関連性があるかどうかを小動物にて虚血環境を再現することで検証を行い、脱毛症と虚血・低酸素が相関するかどうかを検証した。また、NBO (60%O<sub>2</sub>) が毛髪成長・毛周期に与える影響を基礎的に検証した。

## 方法

### マウスの鼠径部虚血モデル

動物実験は東京大学の動物実験委員会の承認（承認番号：医-P10-055）のもとに行った。9週齢 C57BL/6JJcl マウス（♂）をソムノペンチルによる腹腔麻酔後、両側鼠径部を抜毛テープ（Veet, Reckitt Benckiser, Berkshire, United Kingdom）で抜毛した。次いで皮膚片が 1.5cm × 1.5cm の皮弁を拳上した。皮弁内毛包周囲皮膚の虚血環境を再現するために、大腿動脈を下腹壁動脈より中枢側で結紮切離し、皮弁への血流を大腿動脈の抹消側からのみとして虚血皮弁を作成した（図 1）。反対側をコントロールとした。両側鼠径部を経時的に観察し比較を行った。2週間後に皮弁上の体毛を抜毛により採取して体毛の長さを計測し、皮弁皮膚の組織学的評価を行った。また、サンプル採取とは別に、鼠径脂肪の酸素分圧の経時的变化を調べるために、組織酸素分圧計測用プローブ（直径 200μm）を鼠径脂肪に直に挿入し、酸素分圧モニター（Eiko Kagaku, Tokyo, Japan）にて計測を行った。深麻酔による心肺抑制によって組織酸素分圧が低下しないように最小限の麻酔で施行した。

(図1)



[B]

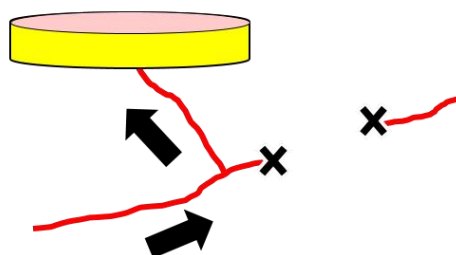


図 1. マウス虚血モデル

[A] 作成後の虚血皮弁。9 週齢 C57BL/6JJcl マウス (♂) の両側単徑部を抜毛テープにて抜毛した後、1.5cm × 1.5cm の皮弁を拳上した。大腿動脈の中枢側を結紮切離し、皮弁上皮膚の虚血環境を再現した。▲印は結紮切離部を示す。[B] 虚血皮弁のシェーマ。大腿動脈の抹消側から血液が流入することにより、血流が減少し、皮弁の虚血を再現した。×印は結紮切離部を、→は血行の方向を示す。

#### マウス髭・ヒト毛髪器官培養

6 週令 C57BL/6JJcl マウス (♂) を深麻酔にて安楽死させ、頬部より髭・皮膚・皮下組織・髭毛包を一塊にして採取した。次いで顕微鏡下に皮下組織に貫通している成



長期毛包のみを単離し（11）、周囲の結合組織を取り除いた。毛髪を含むヒト頭皮はフェイスリフト手術で本来切除破棄するものを使用した。その際、東京大学病院における倫理委員会の審査、了承を得た様式を用いて、事前に患者からのインフォームドコンセントを得た。採取した頭髪毛包を含む皮膚・皮下組織より、同様にして皮下組織に貫通している毛包を顕微鏡下で単離し、周囲の結合組織を取り除いた。単離したマウス髭（n=1）・ヒト毛包（n=5）は、24well プレートに 1ml ずつ入った Williams' medium E (Gibco<sup>®</sup> Life Technologies, Hamburg, Germany) 培地に、それぞれ個別に浸漬した。Williams' medium E 培地には、10 $\mu$ g/ml インスリン、0.4ng/ml ヒロドロコルチゾン、2.0mM L-グルタミン、100 U/ml ペニシリン、100 $\mu$ g/ml のストレプトマイシンを添加した（12-19）。各毛包は無作為に 1%、6%、20% 正常圧酸素濃度下培養の 3 群に分け、経時的に毛の伸びの長さを計測した。

#### Whole mount 染色

器官培養した毛包を PBS で 5 分間洗浄した後、Hoechst33342（5 $\mu$ g/ml, Dojindo, Kumamoto, Japan）で室温、30 分間インキュベートした。

#### 組織免疫染色

毛包を OCT compound (Sakura Finetek, Tokyo, Japan) に入れて液体窒素で凍結し、切

片作成までは $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。標準的な方法で  $10\mu\text{m}$  の凍結連続切片を作成し(20)、スライドグラスにのせた。染色時は、まず室温で 1 時間風乾した後、4%パラフォルムアルデヒドで固定した。次いで PBS で 5 分間洗浄した。全ての切片でヘマトキシリン・エオジン染色を標準的な方法で行った。その他の切片で組織免疫染色を行った。まず 5%FBS で室温、30 分間インキュベートしてブロッキングを行った。続いて 1 次抗体は rabbit anti-human Ki67 (clone SP6, dilution 1:200; Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA)、を使用し、アイソタイプ抗体を negative control として使用した。2 次抗体は Alexa Fluor 594-conjugated donkey anti-rabbit IgG (dilution 1:200; Invitrogen)を使用し、可視化した。また、アポトーシス細胞を評価するために、terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL)を In-Situ Cell Death Detection Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を使用した。核染色には Hoechst33342 を使用した。

#### NBO の毛周期に対する影響の検証

7 週令 C57BL/6JJcl マウス (♂) を腹腔麻酔にて麻酔をかけ、背部を  $2\text{cm} \times 2\text{cm}$  程度抜毛した。7 週令 C57BL/6JJcl マウスの背部体毛は休止期にあり、休止期体毛を抜毛すると毛包が強制的に成長期に誘導されることがわかっている。この性質を利用し

て、まず成長期誘導への NBO の影響を検証するために、早期成長期にあたる抜毛直後より 7 日間、マウスを 20%O<sub>2</sub> 環境下 (20%O<sub>2</sub> 群) と 60%O<sub>2</sub> 環境下 (60%O<sub>2</sub> 群) で飼育し、7 日目に体毛の伸びを定量し比較した (図 2A)。2 つ目に、成長途中の毛の成長に影響を与えるかどうかを検証するために、成長期中期にあたる抜毛後 1 週間後より、7 日間マウスを 20%O<sub>2</sub> 下 (20%O<sub>2</sub> 群) と 60%O<sub>2</sub> 下 (60%O<sub>2</sub> 群) で飼育し、毛の伸びを評価した (図 2B)。マウスの体毛には、Guard、Awl、Auchen、Zigzag の 4 種類が存在することが知られており (21,22)、このうち最も太く長い体毛が Guard である。体毛の長さを評価するにあたり、無作為に引き抜いた体毛のうち、Guard のみを選別し、顕微鏡下に長さを計測した。3 つ目に、60%O<sub>2</sub> 投与が退行期移行を遅延させ、結果的に成長期を延長させるかどうかを検証した。抜毛後 2 週間経過した後、即ち晩期成長期から退行期、休止期にかけての 7 日間 60% O<sub>2</sub> を投与して 20%O<sub>2</sub> 環境下 (20%O<sub>2</sub> 群) と 60%O<sub>2</sub> 環境下 (60%O<sub>2</sub> 群) で飼育し、毛の伸びを評価した (図 3C)。成長期から退行期に移行する際、毛母にはアポトーシスを示す TUNEL 陽性細胞が確認されるようになる。60%O<sub>2</sub> 投与がこれらに影響を与えるかを組織学的に評価した。いずれのグループについても、検体採取時は麻酔にて安楽死させ、背部皮膚・皮下組織を一塊にして採取した。

(図2)

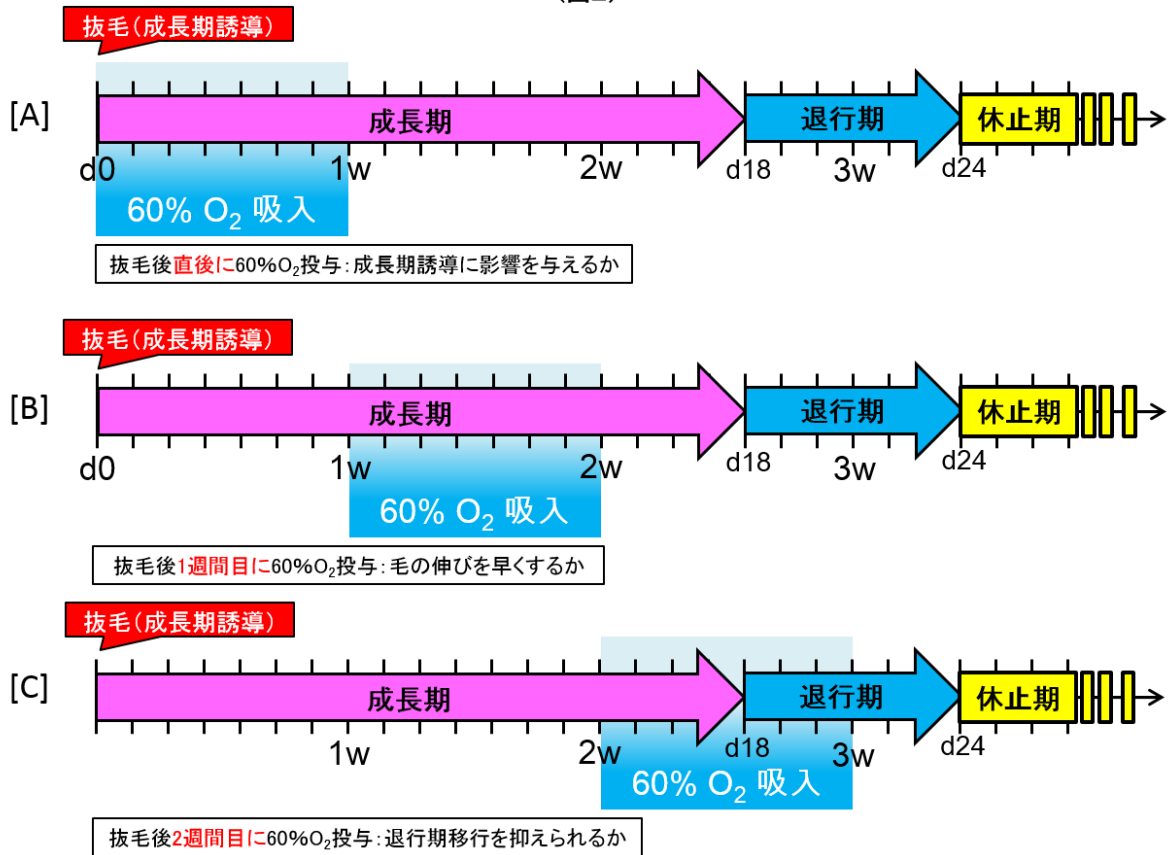


図 2. 各実験の酸素の投与時期

[A] 抜毛直後より 7 日間 60%O<sub>2</sub> 下で飼育し、その後 20%O<sub>2</sub> 下で飼育した。成長期誘導とその直後の体毛の成長への影響を評価した。[B] 抜毛後 20%O<sub>2</sub> 下で飼育し、1 週間後より 7 日間 60%O<sub>2</sub> 下で飼育し、その後再び 20%O<sub>2</sub> 下で飼育した。中期成長期における体毛の成長への影響を評価した。[C] 抜毛後 20%O<sub>2</sub> 下で飼育し、2 週間後より 7 日間 60%O<sub>2</sub> 下で飼育し、その後再び 20%O<sub>2</sub> 下で飼育した。退行期移行への影響を評価した。

## NBO の生理的成長期誘導の効果の検証

7 週令 C57BL/6Jcl マウスのオスを腹腔麻酔にて麻酔をかけ、背部を 2.5cm×4.5cm の範囲で剃毛を行った。休止期における抜毛は成長期誘導を引き起こすが、剃毛は休止期においても成長期誘導を引き起こさない。剃毛後、無作為にマウスを 60%O<sub>2</sub> 群と 20%O<sub>2</sub> 群にわけて 8 週間飼育し、7 日毎に背部体毛の変化を経時的に評価した。飼育方法は、20%O<sub>2</sub> 群は通常大気下で飼育した。60%O<sub>2</sub> 群は密閉ゲージ内で飼育した。60%O<sub>2</sub> 混合ガスをチューブにより密閉ゲージ内に流した。排気は自然排気とした。ゲージ内酸素をモニタリングするため、酸素モニターを設置し、随時ゲージ内酸素濃度が 60%であることを確認した。

## 統計学的分析

データは平均±標準誤差で表示した。鼠径部虚血モデルでは paired t 検定を用いた。NBO 投与による毛周期・体毛成長評価、生理的成長期誘導評価ではマンホイットニーU 検定を用いた。器官培養では多重比較検定 (Tukey-Kramer 法) を用いた。P<0.05 (両側検定) をもって統計学的有意差ありとした。

## 結果

### 低酸素がマウス毛包に与える影響

虚血皮弁を作成し、虚血側の単径脂肪とコントロール側の単径脂肪の組織酸素分圧を経時的に計測したところ、コントロール側は約 60mmHg で推移するのに対し、虚血側は抜毛・皮弁作成後 2 週目までは約 30mmHg 前後で推移し、3 週目以降で血流が急激に回復し、5 週目でほぼ同程度となった (図 3A)。抜毛・皮弁作成を行い (図 3B 上図)、その 2 週後、サンプルを採取した (図 3B 下図)。C57BL/6Jcl マウスの体毛には、Guard、Awl、Auchen、Zigzag の 4 タイプある (図 3C)。Guard は最も長くストレート、Awl は短いストレート、Auchen は 1 か所折れており、Zigzag は 2 か所以上折れている。抜毛した体毛を比較すると、顕微鏡下でも虚血側の体毛がコントロール側の体毛に比べ短かった (図 3D)。体毛のタイプ別に長さを計測したところ、Guard hair はコントロール側で  $4095.9 \pm 127.9 \mu\text{m}$  (n=7)、虚血側で  $3503.6 \pm 420.8 \mu\text{m}$  (n=10)、Awl hair はコントロール側で  $3156.5 \pm 261.0 \mu\text{m}$  (n=21)、虚血側で  $2642.6 \pm 249.9 \mu\text{m}$  (n=21)、Auchen hair はコントロール側で  $2683.5 \pm 118.9 \mu\text{m}$  (n=15)、虚血側で  $2267.0 \pm 130.1 \mu\text{m}$  (n=20)、Zigzag hair はコントロール側で  $2574.6 \pm 249.4 \mu\text{m}$  (n=7)、虚血側で  $1812.7 \pm 512.2 \mu\text{m}$  (n=7)、となり、全てのタイプでコントロール側が虚血側より有意に長かった (図 3E)。皮弁部を採取し切片の HE 染色を確認したところ、虚血側で毛包の伸びが遅かった (図 3F)。切片あたりの毛包の数をカウントしたとこ

ろ、コントロール側では  $41.8 \pm 7.0$  個 ( $n=8$ )、虚血側では  $27.7 \pm 6.2$  個 ( $n=8$ ) で、コントロール側が虚血側に比較して有意に成長期毛包の数が多かった。これらの結果からマウスでも同様に、虚血により毛の伸びが遅延し、虚血が毛周期に影響を与えることが示唆された。

(図3)

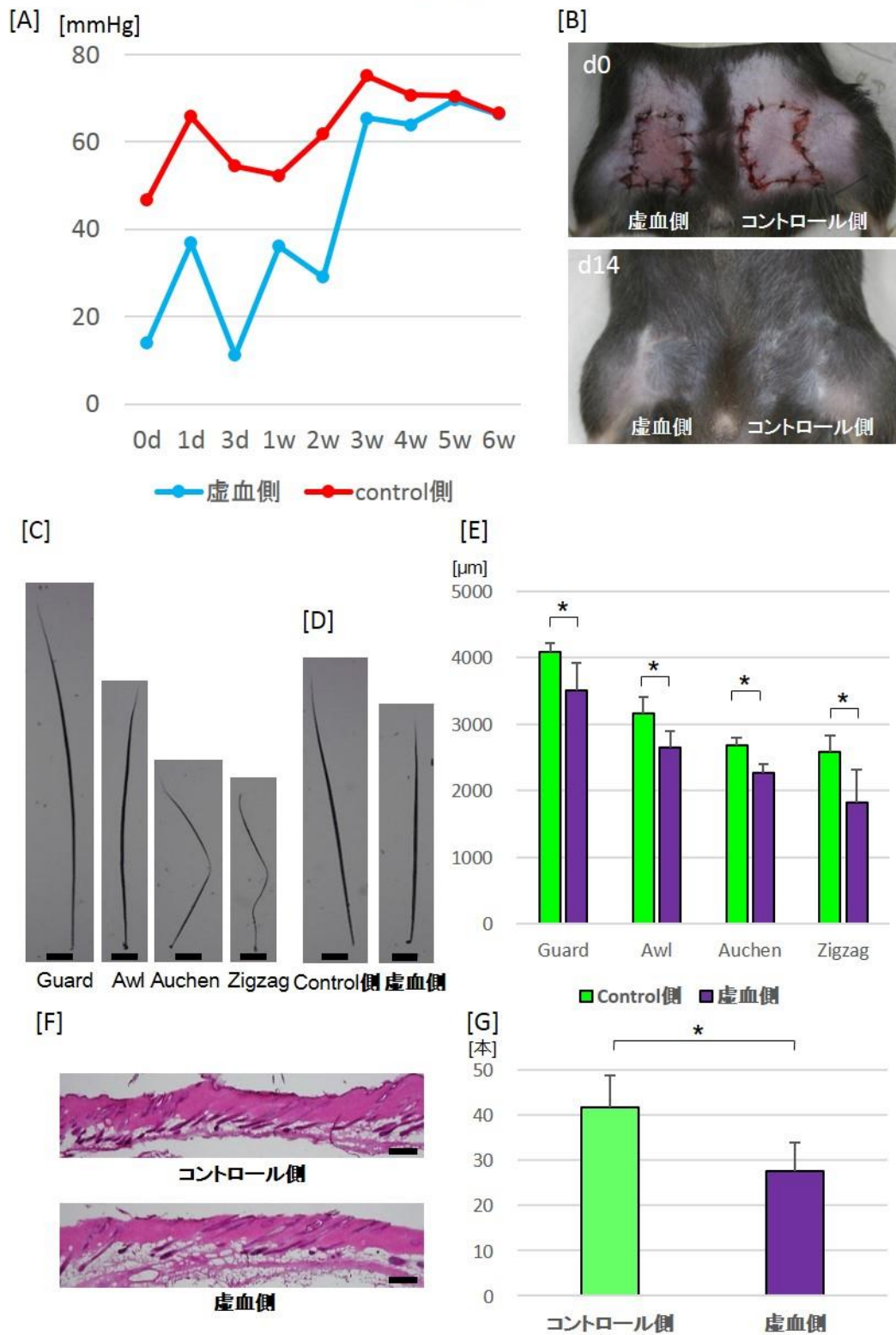




図 3. マウス虚血皮弁の組織酸素分圧の経時的変化及び低酸素がマウス毛包へ及ぼす影響

[A] マウス単径皮弁の組織酸素分圧。2 週間まではコントロール側が約 60mmHg、虚血側が約 30mmHg となっている。[B] 単径部虚血モデル。抜毛し成長期誘導を行うと同時に皮弁を作成し、右側を虚血側、左側をコントロール側とした（上図）。14 日後、肉眼的に体毛が薄くなった（下図）。[C] 4 タイプの体毛。Guard、Awl、Auchen、Zigzag hair。Black bars = 300 $\mu$ m [D] 14 日後に抜毛比較した体毛 (Awl hair)。Black bars = 300 $\mu$ m [E] 虚血側とコントロール側で抜毛した体毛の長さを定量した。全てのタイプでコントロール側が虚血側より有意に長かった。[F] 抜毛・皮弁作成後 2 週間目の組織切片 HE 染色。[G] 切片あたりの毛包の数を定量した。

### マウス髭の器官培養

正常圧酸素濃度 1%O<sub>2</sub>、6%O<sub>2</sub>、20%O<sub>2</sub>%下でマウス髭毛包を器官培養したところ、毛の伸長は酸素濃度 20%で最も速かった（図 4A）。経時的に毛の伸びを計測したところ、7日目で伸びた長さが 1% O<sub>2</sub> で 0mm、6% O<sub>2</sub> で 0.8mm、20% O<sub>2</sub> で 1.8mm であった。また、濃度依存性に毛が伸びた（図 4B）。

(図4)

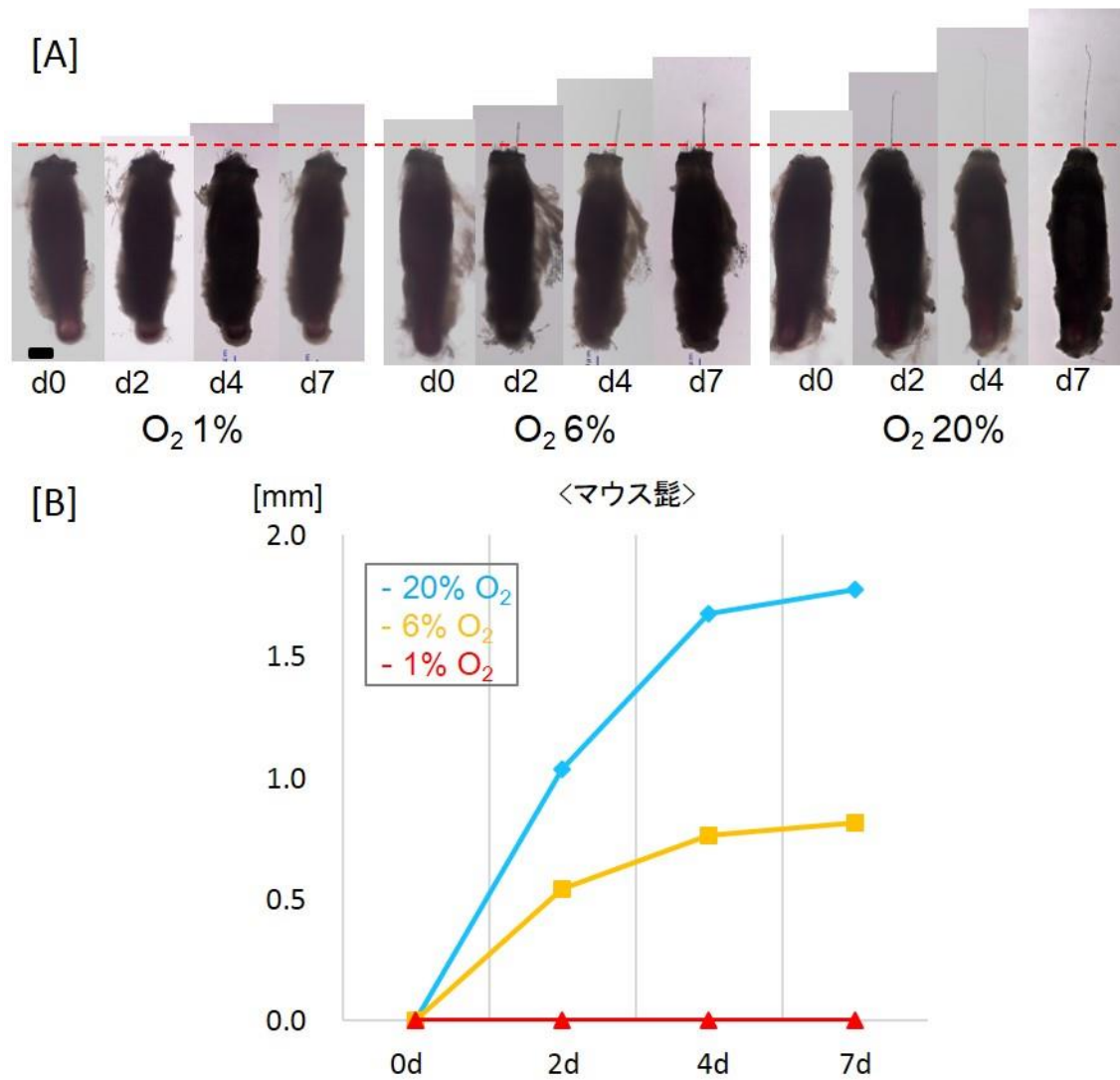


図 4. 酸素濃度別のマウス髭毛包の器官培養

正常圧酸素濃度 1%O<sub>2</sub>、6%O<sub>2</sub>、20%O<sub>2</sub> の 3 群でマウス髭を器官培養した。[A] 正常圧酸素濃度 1%O<sub>2</sub> (左)、6%O<sub>2</sub> (中央)、20%O<sub>2</sub> (右) 下での器官培養により、伸びたマウス髭の経時的変化。Black bars = 300μm [B]マウス髭の伸びを定量した。

## 酸素濃度別のヒト頭髪の器官培養

正常圧酸素濃度 1%O<sub>2</sub>、6%O<sub>2</sub>、20%O<sub>2</sub> 下でヒト頭髪毛包を器官培養したところ、いずれも成長期毛包は 7 日間成長を継続した (図 5A)。経時的に毛の伸びを計測したところ、7 日目で伸びた長さが 1%O<sub>2</sub> で  $0.7 \pm 0.6$  mm (n=4)、6%O<sub>2</sub> で  $1.0 \pm 0.5$  mm (n=4)、20%O<sub>2</sub> で  $2.1 \pm 0.8$  mm (n=4) であり、濃度依存性に毛が速く伸びた (図 5B)。ヒトの皮下脂肪内の酸素濃度は約 6%前後と言われており、正常圧正常濃度である。特筆すべきことに正常圧正常濃度である 6%O<sub>2</sub> より正常圧高濃度である 20% O<sub>2</sub> の方が、頭髪が伸びた。20%O<sub>2</sub> で器官培養したヒト毛包の切片では、成長期毛包から退行期毛包に移行すると、毛幹は毛乳頭から離れ抜けてしまうが、器官培養 7 日目でも毛幹が抜けることなく成長期毛包を維持しており (図 6A 上)、毛幹周囲も毛根鞘を付随して伸長していた (図 6A 上から 2 段目)。HE 染色でも、周囲結合組織は伸びることなく、外内毛根鞘を付随して毛が伸びたことを確認できた (図 6A 下から 2 段目、下)。免疫染色では主に毛母において、細胞増殖を示す Ki67 陽性となる毛母細胞が多数散見された (図 6B)。

(図5)

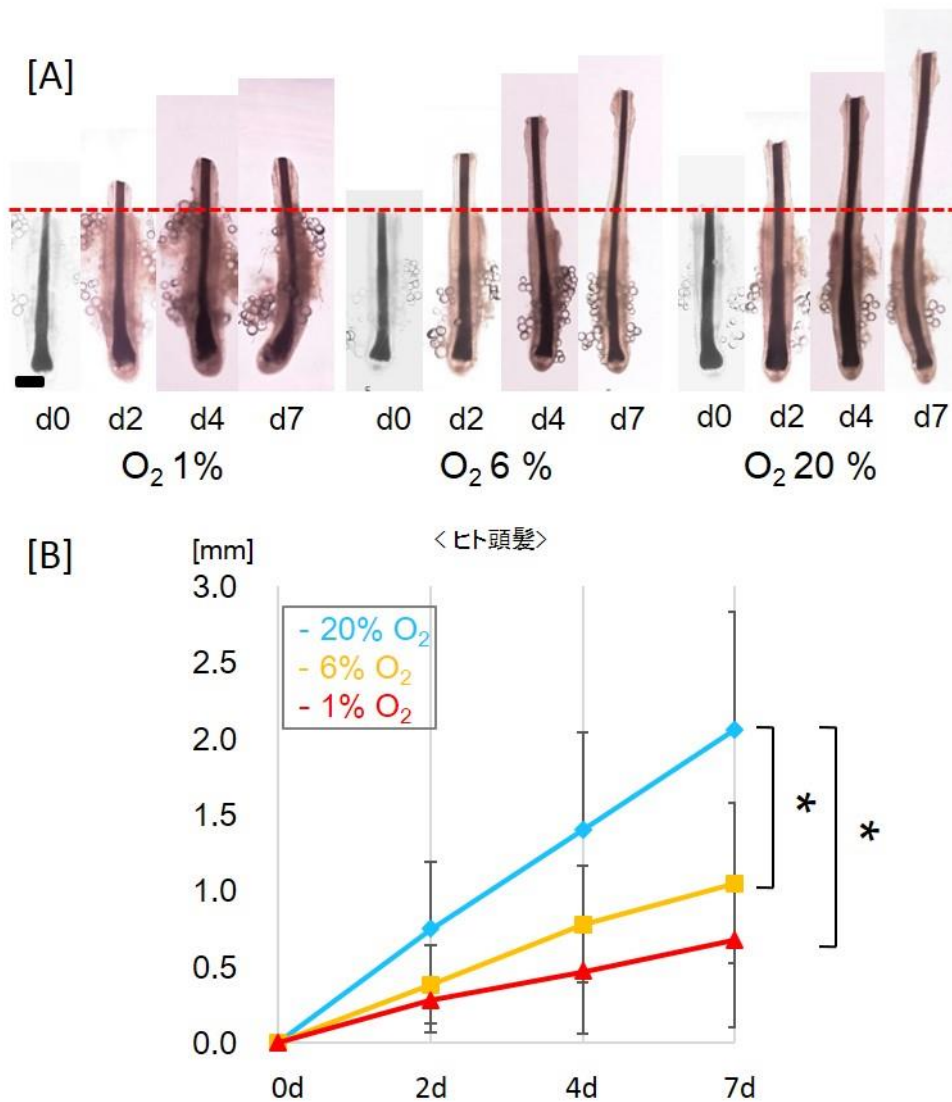


図 5. ヒト毛髪 of 器官培養

正常圧酸素濃度 1%O<sub>2</sub>、6%O<sub>2</sub>、20%O<sub>2</sub> の 3 群でヒト頭髪を器官培養した。[A] 正常圧酸素濃度 1%O<sub>2</sub> (左)、6%O<sub>2</sub> (中央)、20%O<sub>2</sub> (右) 下での器官培養により、伸びたヒト頭髪の経時的変化。Black bars = 300μm [B] ヒト頭髪の伸びを定量した。n=4。各酸素濃度における毛の伸びの長さの違いの有意差を \**P*<0.05 と表示。

(図6)

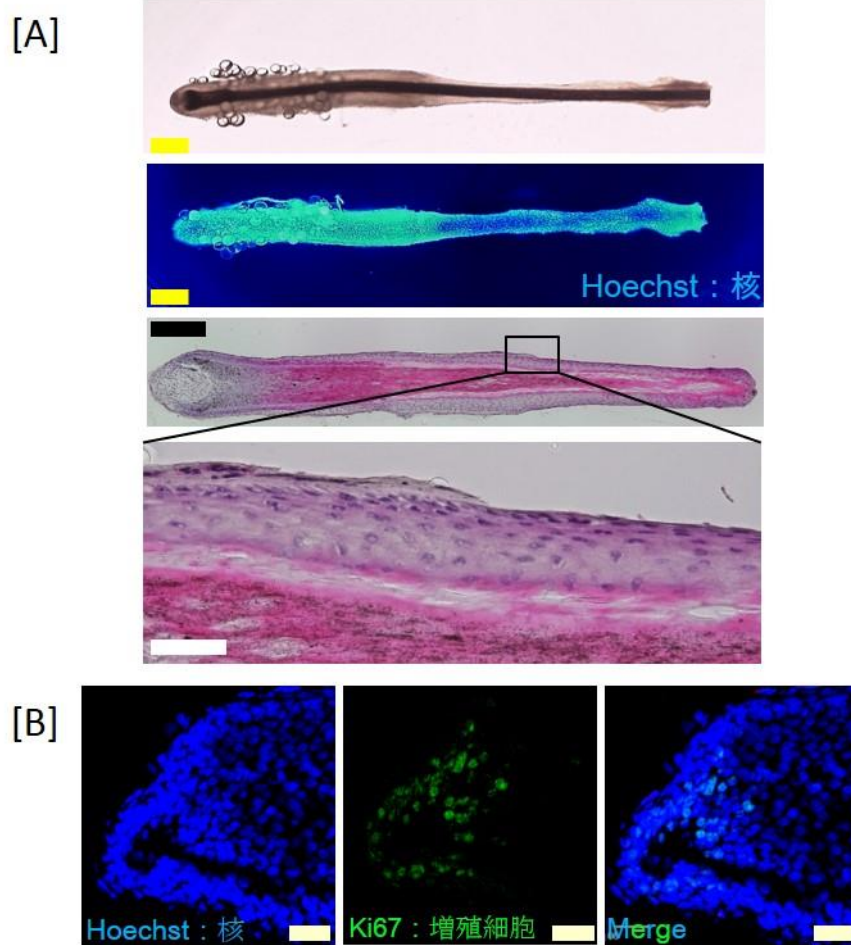


図 6. 20%O<sub>2</sub> 器官培養下でのヒト頭髮の組織切片

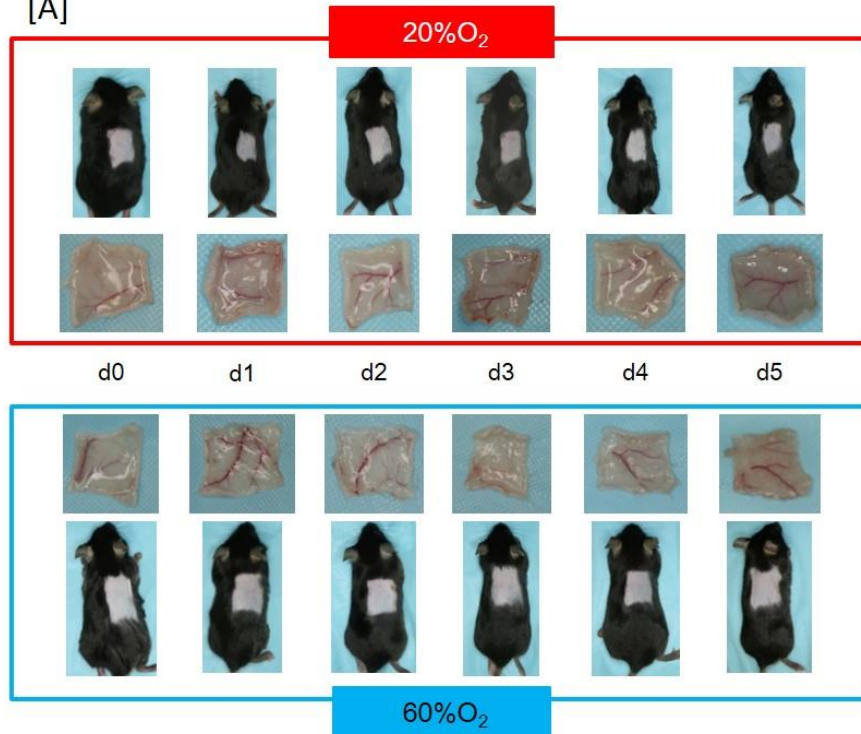
[A] 器官培養下 7 日目のヒト頭髮 (上)。Whole mount 染色 (上から 2 段目)。長軸断面での HE 染色。周囲結合組織は伸びることなく、外毛根鞘を含めた毛幹の伸長が認められた。Yellow bars = 50 $\mu$ m、Black bars = 300 $\mu$ m、White bars = 100 $\mu$ m [B] 毛根部の免疫染色。毛母において毛母細胞の増殖が確認された。White bars = 100 $\mu$ m

## NBO が成長期誘導に与える影響

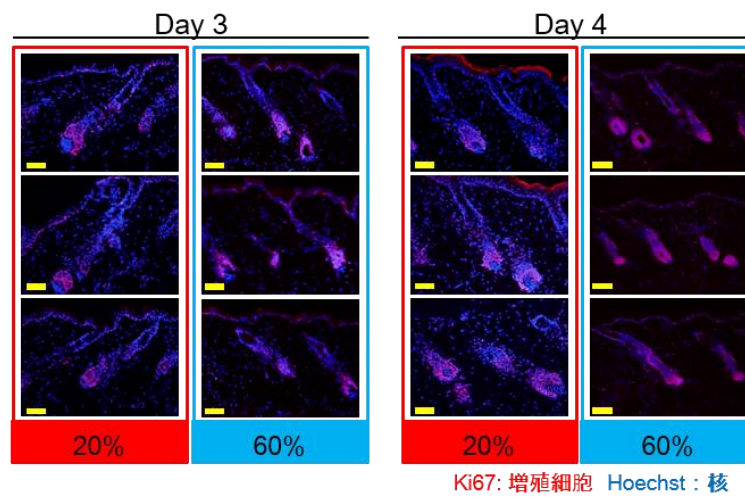
C57BL/6Jcl 7 週令マウスの体毛は休止期にあり、抜毛を行うことで成長期に誘導される。毛包から体毛が伸びてくると、皮内の毛包により肌の色がピンク色から灰色に変化する。NBO が成長期誘導に影響を与えるかどうかを検証するために、抜毛直後より 7 日間 60%O<sub>2</sub> 群) 環境下でマウスを飼育し、20%O<sub>2</sub> 環境下 (20%O<sub>2</sub> 群) で飼育下マウスとその体毛の経時的変化を比較した。抜毛後 6 日頃より 20%O<sub>2</sub> 群、60% O<sub>2</sub> 群ともに背部が灰色に変化していることが確認された (図 7A)。検体を採取した後、皮下組織側を肉眼的に見ても同様に灰色へを確認できた。20%O<sub>2</sub> 群と 60%O<sub>2</sub> 群に肉眼的な差異は認められなかった。成長期毛包では Ki67 陽性となる増殖細胞が毛母で確認できる。抜毛後 3, 4 日目では、20%O<sub>2</sub> 群と 60%O<sub>2</sub> 群共に Ki67 陽性細胞である毛母細胞が多数確認された (図 7B)。1 本の毛包内の毛母細胞全体に対する Ki67 陽性細胞の割合を定量評価したところ、抜毛後 3 日後は、60%O<sub>2</sub> 群  $49.0 \pm 9 \%$  (n=5)、20%O<sub>2</sub> 群  $33.9 \pm 7 \%$  (n=5)、4 日後は 60%O<sub>2</sub> 群は  $58.3 \pm 8 \%$  (n=5)、20%O<sub>2</sub> 群は  $43.6 \pm 10 \%$  (n=5) でいずれも 60%O<sub>2</sub> 群の方が 20%O<sub>2</sub> 群よりも Ki67 陽性毛母細胞が有意差をもって多かった (図 7C)。これらのことは正常圧高濃度酸素が成長期誘導後の毛髪の伸びを促進する効果があることを示している。

(図7)

[A]



[B]



[C]

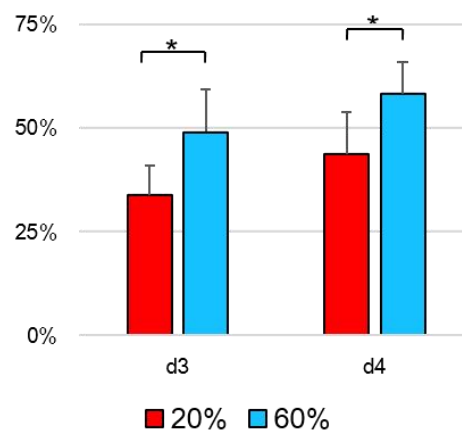




図 7. 抜毛直後 7 日間 60%O<sub>2</sub> と 20%O<sub>2</sub> 群の比較

抜毛後 1 週間 60%O<sub>2</sub> 下と 20% O<sub>2</sub> 下で飼育したマウス背部の経時的変化。

[A]抜毛後のマウス背部。休止期を示すピンク色の皮膚が、成長期に移行するに従い灰色に変化する。抜毛後 6 日目で 20%O<sub>2</sub> 群と 60%O<sub>2</sub> 群共に色調の変化が認められた。

[B]毛包の免疫染色。20%O<sub>2</sub> 群と 60%O<sub>2</sub> 群共に増殖している毛母細胞が確認された。

Yellow bars = 50μm. [C]Ki67 陽性毛母細胞の全毛母細胞に対する割合。抜毛後 3 日後・4 日後のいずれも有意差をもって 60%O<sub>2</sub> 群で多かった。

### NBO が成長期での毛の成長に与える影響

C57BL/6Jcl 7 週令マウスにおける、休止期抜毛後 7 日目から 14 日目は中期成長期に相当し、体毛は伸長している過程にある。60%酸素投与が体毛の成長を促すかどうかを確認するために、抜毛後 7 日目から 7 日間 60%酸素投与を行い、その効果を 20%酸素環境下で飼育した 20%O<sub>2</sub> 群マウスと比較した。酸素投与 7 日目では 60%O<sub>2</sub> 群でより体毛が伸びていた (図 8A)。体毛の長さを定量したところ、60%O<sub>2</sub> 群は  $7.7 \pm 0.50$  mm (個体数 n=4、毛包数 n=4)、20%O<sub>2</sub> 群は  $6.9 \pm 0.42$  mm (個体数 n=4、毛包数 n=4) で、60%O<sub>2</sub> 群で有意に体毛が伸びていた (図 8B)。これは 60%O<sub>2</sub> により、体毛の成長が促されたことを示している。

(図8)

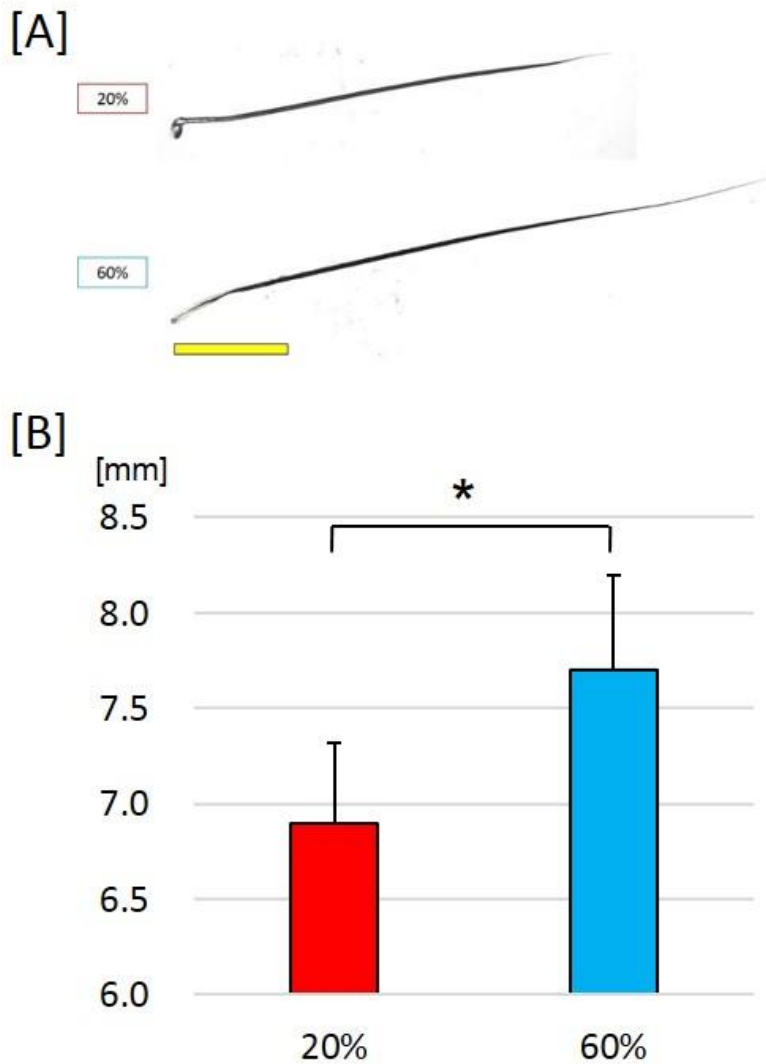


図 8. 抜毛 1 週間から 7 日間 60%O<sub>2</sub> を投与した群と 20%O<sub>2</sub> 群の比較

抜毛してから 1 週間経過した中期成長期に、60%O<sub>2</sub> を 7 日間投与し、その背部体毛の伸びを比較した。[A]抜毛した体毛 (Guard hair)。60%O<sub>2</sub> を投与群の方が肉眼的にも長い。Yellow bars = 1mm [B]抜毛した体毛の長さを計測し評価した。

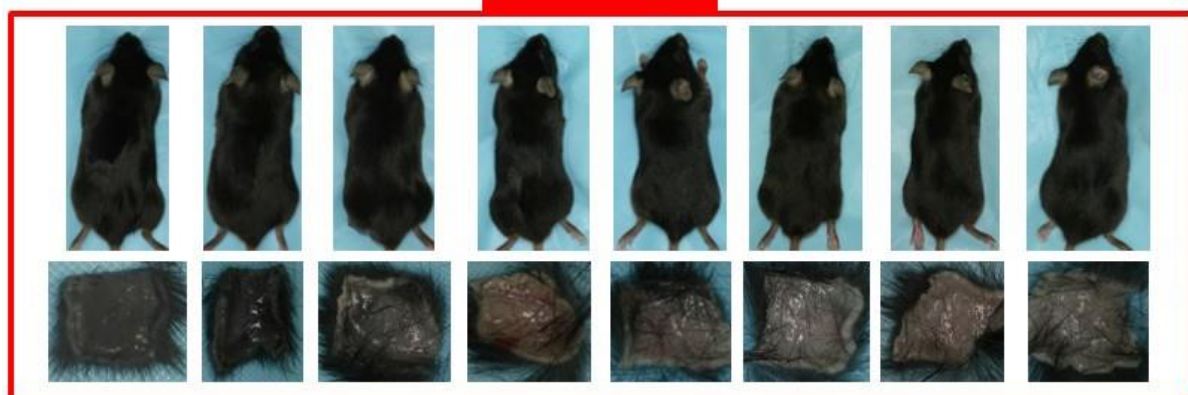
## NBO が退行期移行に与える影響

C57BL/6Jcl マウスの体毛は抜毛により成長期誘導された後、抜毛後 17 日～19 日目で成長期から退行期に移行する。背部皮膚の色調は、皮下に貫通していた毛包が再び皮内に戻ることで灰色からピンク色に変化する。60%O<sub>2</sub> が退行期移行を抑制するかどうかを検証するために、抜毛後 2 週間後より 7 日間 60%酸素環境下でマウスを飼育し、20%酸素環境下で飼育下マウスとその体毛の経時的变化を比較した。20%O<sub>2</sub> 群と 60%O<sub>2</sub> 群において、体表側からと皮下組織側からの肉眼的な差異は認められなかった (図 9A)。退行期毛包では TUNEL 陽性となるアポトーシス細胞が毛母で確認できる。抜毛後 19 日目では、20%O<sub>2</sub> 群と 60%O<sub>2</sub> 群共に TUNEL 陽性細胞である毛母細胞が多数確認された (図 9B)。1 本の毛包内の毛母細胞全体に対する TUNEL 陽性細胞の数を定量評価したところ、抜毛後 19 日後は、60%O<sub>2</sub> 群  $2.8 \pm 1.0$  個、20%O<sub>2</sub> 群  $9.2 \pm 3.1$  個、で 60%O<sub>2</sub> 群の方が 20%O<sub>2</sub> 群よりも TUNEL 陽性毛母細胞が有意差をもって少なかった (図 9C)。これらのことは正常圧高濃度酸素が退行期移行を抑制し、結果として成長期を延長する効果があることを示している。

(図9)

[A]

20%O<sub>2</sub>



d15

d16

d18

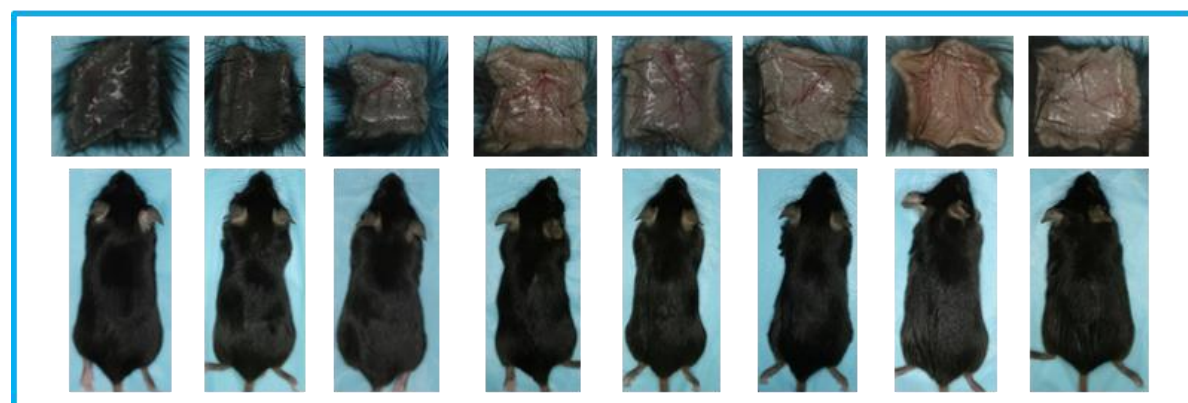
d19

d20

d21

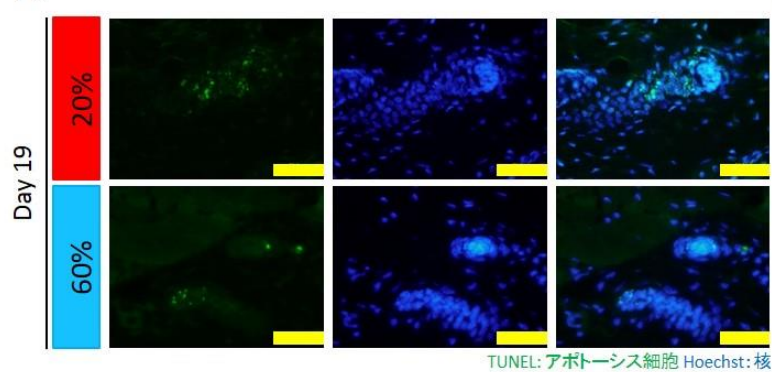
d22

d23



60%O<sub>2</sub>

[B]



Day 19

20%

60%

TUNEL: アポトーシス細胞 Hoechst: 核

[C]

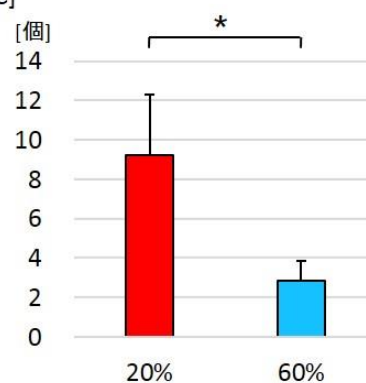


図 9. 抜毛 2 週間後から 7 日間酸素を投与した群（60%O<sub>2</sub> 群）と対照群（20%O<sub>2</sub> 群）の比較

抜毛後 2 週間経過後、7 日間 60%O<sub>2</sub> 下と 20%O<sub>2</sub> 下で飼育したマウス背部の経時的変化。

[A] 抜毛後のマウス背部。休止期を示すピンク色の皮膚が、成長期に移行するに従い灰色に変化する。抜毛後 6 日目で 20%O<sub>2</sub> 群と 60%O<sub>2</sub> 群共に色調の変化が認められた。

[B] 毛包の免疫染色。20%O<sub>2</sub> 群と 60%O<sub>2</sub> 群共に増殖している毛母細胞が確認された。

Yellow bars = 50μm. [C] 毛母における TUNEL 陽性細胞の数。抜毛後 19 日後、有意差をもって 60%O<sub>2</sub> 群で多かった。

## NBO による生理的成長期誘導の検証

C57BL/6Jcl 7 週令マウスの体毛は休止期にあり、抜毛を行うことで成長期に誘導された。剃毛では成長期誘導は起こらず休止期が維持される。60%O<sub>2</sub> が成長期誘導を引き起こすかどうかを検証するために、剃毛後より 8 週間 60%酸素環境下でマウスを飼育し、20%酸素環境下で飼育下マウスとその体毛の経時的変化を比較した（図 10）。剃毛の際、表皮を傷つけるなどの injury による外的刺激により成長期誘導を起こしてしまった個体は 20%O<sub>2</sub> 群で 4 匹、60%O<sub>2</sub> 群で 2 匹認められ、これらは評価対象より外した。35 日以降で成長期誘導が起きた個体の、成長期誘導が起きた日数の平均は、20%O<sub>2</sub> 群で  $47.3 \pm 14.43$  日、60%O<sub>2</sub> 群で  $45.5 \pm 9.65$  日であり、有意差は認められなかった ( $P = 0.82$ )。



(图10)

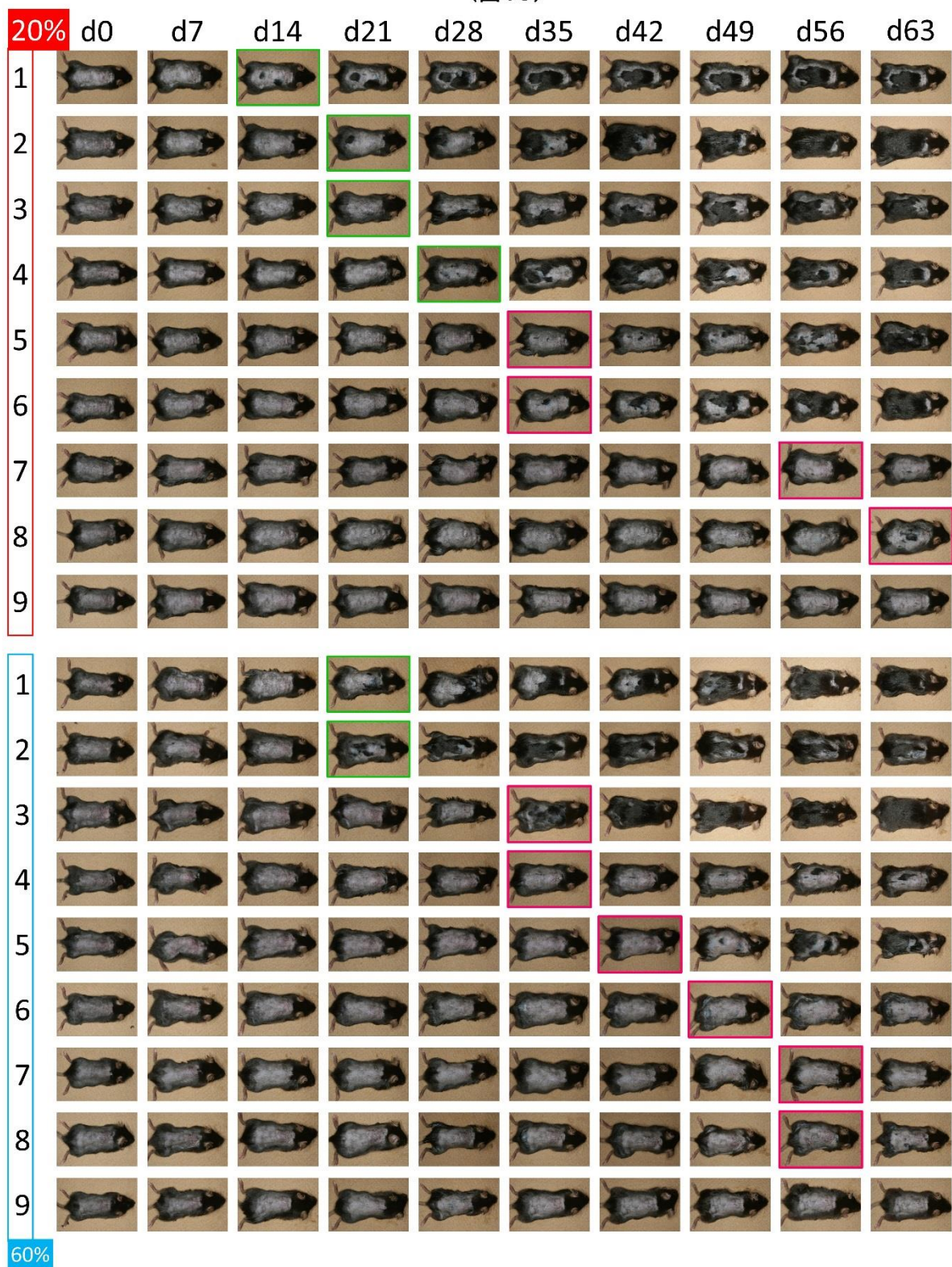




図 10 剃毛後の 60%O<sub>2</sub> 群と 20%O<sub>2</sub> 群での成長期移行の比較

7 週令マウスを剃毛後 60%O<sub>2</sub> 下と 20%O<sub>2</sub> 下で飼育して休止期から成長期への移行を検証した。緑枠は剃毛時のテクニカルな刺激により誘導されたと判定した発毛。ピンク枠は NBO により生理的に成長期誘導されたと判定した発毛。

## 考察

本研究ではまず、虚血と脱毛症の相関について検証した。マウスに成長期を誘導した後、虚血皮弁を作成して毛包周囲の虚血環境を再現した。コントロール側と虚血側を比較すると、マウスの全タイプの体毛で各々の体毛の伸長速度が遅くなった。また、虚血皮弁における切片内の、成長期毛包の数が有意に少なかった。これらの結果から、虚血により、成長期毛包の成長スピードが遅延し、脱毛症いわゆる薄毛につながるのではないかと推察される。早期の男性型脱毛症の前頭部の皮下の血流は、健常人のそれよりも約 2.6 倍少ないことが報告されており (23)、本研究は虚血側がコントロール側に対し約 1/3 程度の酸素分圧になっていることから、この報告を裏付ける結果となった。

マウス髭、ヒト頭髮を用いて 1%O<sub>2</sub>、6%O<sub>2</sub>、20%O<sub>2</sub> の酸素濃度別に器官培養を行ったところ、いずれも濃度依存性に毛が伸びた。一般に吸入気酸素分圧は約 150mmHg であり、吸入気酸素濃度は約 20% である。皮下脂肪組織酸素分圧は約 60mmHg といわれているので、インキュベーター内でこれを再現しようとする、インキュベーター内酸素濃度は約 6% に相当する。すなわち 6% が生理的状态に相当し、1%O<sub>2</sub> は低酸素、20%O<sub>2</sub> が高濃度に相当する。器官培養では、高酸素下の方が生理的状态に比べ有意に成長期毛包が伸びた。また、低酸素下の方が生理的状态比べて成長期毛包の伸長速度が遅かった。これらの結果から NBO が成長期毛包の成長を促すことが示

唆された。95%O<sub>2</sub> 下と 20%O<sub>2</sub> 下ヒト毛髪 of 器官培養を行っている報告がある (24)。

95%O<sub>2</sub> と 20%O<sub>2</sub> で比較を行うと、毛母の構造が 95%O<sub>2</sub> 下の方が、20%O<sub>2</sub> と比較して毛母の構造をより長く維持でき、毛母細胞の degeneration を抑制できたとしている。

これは成長期毛髪 of 退行期移行抑制効果を示唆していると考えられる。毛髪 of 伸長速度については検証していないので、本研究 of 着眼である伸長速度 of 促進効果とは異なるが、退行期移行抑制効果としての、高濃度酸素 of 有効性を示している。

酸素が毛周期に与える影響を、正常圧 of 60%O<sub>2</sub> 環境下と 20%O<sub>2</sub> 環境下で C57BL/6Jcl マウスを飼育して比較した。正常圧高濃度酸素は高圧高濃度酸素と比べて、臨床において幅広く利用されてきたものである (25-29)。

In vivo では、マウス背部体毛を成長期誘導後、7 日間 NBO 下で飼育することにより、20%O<sub>2</sub> 下より、60%O<sub>2</sub> 下の方が毛母における Ki67 陽性が多いことが明らかとなった。これは 60%O<sub>2</sub> 下において結果的に体毛 of 伸び of 速さが促進されたことを意味している。また、マウスを抜毛し成長期誘導をかけてから 7 日経過した後、7 日間 NBO 下で飼育した場合においても抜毛した毛 of 長さが 20%O<sub>2</sub> 下より、60%O<sub>2</sub> 下の方が長いことが明らかとなった。これは成長期における毛髪 of 伸びを NBO が促すことを示唆している。これらの結果は、臨床において毛髪 of 成長を促す可能性を示しており、NBO of 育毛効果を期待できると考えられる。

C57BL/6Jcl マウスを成長期誘導した後、約 16 日から 19 日付近で退行期移行に移

行することがわかっている。この退行期移行にかけて 7 日間 NBO 下で飼育したところ、TUNEL 陽性細胞の数が 20%O<sub>2</sub> 下より、60%O<sub>2</sub> 下の方が少なかった。成長毛包が退行期に移行する際は、毛母細胞が TUNEL 陽性となることが知られており、この結果は NBO による退行期移行の遅延効果の可能性が考えられる。この退行期移行は臨床においては、毛周期における自然な脱毛に相当するが、退行期移行の遅延が自然な毛周期脱毛の低下につながるのではないかと考えられる。

これまで成長期から退行期に移行する毛周期過程に対する NBO の効果を評価してきたが、休止期から成長期に移行する際の NBO の効果を評価した。C57BL/6Jcl 7 週令マウスの体毛は休止期にあることが知られており、この体毛を抜毛ではなく、剃毛し、そこに NBO を行うことで、休止期毛包を成長期毛包に移行するかどうかを再現することができる。すなわち、NBO の発毛効果を評価するものである。健常毛周期においては 60%O<sub>2</sub> 下において、休止期から生理的な成長期に移行を促す程の発毛効果は得られなかった。しかし、この実験においては、休止期体毛を剃毛する際の技術的な障害による人為的な成長期誘導がかなり起こることが実際に行ってみると明らかとなった。

細胞が低酸素状態に暴露されると、HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia inducible factor) が誘導される。vascular endothelial growth factor (VEGF) やエリスロポエチン (EPO) などの遺伝子発現を誘導し血管新生や造血などをうながす一方で、炎症やアポトーシスを促

進や誘導された血管新生自体が炎症細胞の供給などを介して炎症を増悪する方向に作用することも明らかとなっている (30)。本研究において作成した虚血皮弁においても、毛包や毛包周囲は虚血の結果、低酸素状態になっているので、HIF-1 $\alpha$  の誘導が推察される。また、成長期、成長期から退行期、休止期、休止期から成長期などにそれぞれ関わる遺伝子、蛋白、シグナルが報告されており (31-33)、酸素によりこれらの因子が影響を受けることが推測されるが、いずれも本研究においては、酸素と毛周期や毛髪成長に関わる分子生物学的アプローチまでは行っていないので、今後更に追究すべき点である。

本研究を通して毛包周囲の虚血により、毛包の成長速度が遅くなった。また、成長期における毛包の伸長速度が促進され、退行期移行が遅延した。これらのように、酸素が毛包成長や毛周期に影響を与えることを基礎的に示した研究はほかに見られない。虚血によって脱毛症が起こりうるという可能性が示唆された。また酸素による脱毛症治療・予防の確立が期待できる。また、加齢による老年期の脱毛や、脱毛症に対する外科的治療法として行われる植毛手術 (34) や、現在注目されている毛髪再生治療(35-38)などへの補助療法としての NBO の幅広い応用が期待できると考えられる。

## 引用文献

1. Goldman BE, Fisher DM, Ringler SL. Transcutaneous PO<sub>2</sub> of the scalp in male pattern baldness: a new piece to the puzzle. *Plast Reconstr Surg* 97:1109-1116, 1996.
2. Müller-Röver S, Handjiski B, van der Veen C, Eichmüller S, Foitzik K, McKay IA, Stenn KS, Paus R. A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *J Invest Dermatol* 117:3-15, 2001.
3. Paus R, Handjiski B, Czarnetzki BM, Eichmüller S. A murine model for inducing and manipulating hair follicle regression (catagen): effects of dexamethasone and cyclosporin A. *J Invest Dermatol* 103:143-147, 1994.
4. Stenn KS, Paus R. Controls of hair follicle cycling. *Physiol Rev* 81:449-494, 2001.
5. Li M, Marubayashi A, Nakaya Y, Fukui K, Arase S. Minoxidil – induced hair growth is mediated by adenosine in cultured dermal papilla cells: possible involvement of sulfonylurea receptor 2B as a target of minoxidil. *J Invest Dermal* 117:1594-1600, 2001.
6. Takikawa M, Nakamura S, Nakamura S, Ishirara M, Kishimoto S, Sasaki K, Yanagibayashi S, Azuma R, Yamamoto N, Kiyosawa T. Enhanced effect of platelet-rich plasma containing a new carrier on hair growth. *Dermatol Surg* 37:1721-1729, 2011.
7. Freund BJ, Schwartz M. Treatment of male pattern baldness with botulinum toxin: a pilot study. *Plast Reconstr Surg* 126:246e-248e, 2010.

8. Godman CA, Joshi R, Giardina C, Perdrizet G, Hightower LE. Hyperbaric oxygen treatment induces antioxidant gene expression. *Ann N Y Acad Sci* 1197:178-183, 2010.
9. Thom SR. Hyperbaric oxygen: its mechanisms and efficacy. *Plast Reconstr Surg* 127: 131S-141S, 2011.
10. Friedman HI, Fitzmaurice M, Lefaivre JF, Vecchiolla T, Clarke D. An evidence-based appraisal of the use of hyperbaric oxygen on flaps and grafts. *Plast Reconstr Surg* 117: 175S-190S, 2006.
11. Williams D, Profeta K, Stenn KS. Isolation and culture of follicular papillae from murine vibrissae: an introductory approach. *Br J Dermatol* 130: 290-297, 1994.
12. Philpott M, Green MR, Kealey T. Studies on the biochemistry and morphology of freshly isolated and maintained rat hair follicles. *J Cell Sci* 93: 409-418, 1989.
13. Philpott MP, Green MR, Kealey T. Human hair growth in vitro. *J Cell Sci* 97: 463-471, 1990.
14. Philpott MP, Kealey T. Effects of EGF on the morphology and patterns of DNA synthesis in isolated human hair follicles. *J Invest Dermatol* 102: 186-191, 1994.
15. Xing Y, Xu W, Yang K, Lian X, Yang T. Immunolocalization of Wnt5a during the hair cycle and its role in hair shaft growth in mice. *Acta Histochem* 113:608-612, 2011.
16. Hwang KA, Hwang YL, Lee MH, Kim NR, Roh SS, Lee Y, Kim CD, Lee JH, Choi KC.

- Adenosine stimulates growth of dermal papilla and lengthens the anagen phase by increasing the cysteine level via fibroblast growth factors 2 and 7 in an organ culture of mouse vibrissae hair follicles. *Int J Mol Med* 29:195-201, 2012.
17. Xu W, Fan W, Yao K. Cyclosporine A stimulated hair growth from mouse vibrissae follicles in an organ culture model. *J Biomed Res* 26:372-380, 2012.
18. Buhl AE, Waldon DJ, Kawabe TT, Holland JM. Minoxidil stimulates mouse vibrissae follicles in organ culture. *J Invest Dermatol* 92:315-320, 1989.
19. Zhang S, Hu H, Zhang H, Liu S, Liu S, Zhang Y, Lei X, Ning L, Cao Y, Duan E. Hair follicle stem cells derived from single rat vibrissa via organ culture reconstitute hair follicles in vivo. *Cell Transplant* 21:1075-1085, 2012.
20. Paus R, Müller-Röver S, Van Der Veen C, Maurer M, Eichmüller S, Ling G, Hofmann U, Foitzik K, Mecklenburg L, Handjiski B. A comprehensive guide for the recognition and classification of distinct stages of hair follicle morphogenesis. *J Invest Dermatol* 113: 523-532, 1999.
21. Chi W, Wu E, Morgan BA. Dermal papilla cell number specifies hair size, shape and cycling and its reduction causes follicular decline. *Development* 140:1676-1683, 2013.
22. Sharov AA, Sharova TY, Mardaryev AN, Tommasi di Vignano A, Atoyan R, Weiner L, Yang S, Brissette JL, Dotto GP, Botchkarev VA. Bone morphogenetic protein signaling



- regulates the size of hair follicles and modulates the expression of cell cycle-associated genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:18166-18171, 2006.
23. Klemp P, Peters K, Hansted B. Subcutaneous blood flow in early male pattern baldness. *J Invest Dermatol* 92:725-726, 1989.
  24. Imai R, Miura Y, Mochida K, Jindo T, Takamori K, Ogawa H. Organ culture conditions of human hair follicles. *J Dermatol Sci* 3:163-171, 1992.
  25. Moore DP, Weston AR, Hughes JM, Oakley CM, Cleland JG. Effects of increased inspired oxygen concentrations on exercise performance in chronic heart failure. *Lancet* 339:850-853, 1992.
  26. Warltier DC, Pagel PS, Kersten JR. Approaches to the prevention of perioperative myocardial ischemia. *Anesthesiology* 92:253-259, 2000.
  27. Tretinyak AS, Lee ES, Uema KM, d'Audiffret AC, Caldwell MP, Santilli SM. Supplemental oxygen reduces intimal hyperplasia after intraarterial stenting in the rabbit. *J Vasc Surg* 35:982-987, 2002.
  28. Qadan M, Akça O, Mahid SS, Hornung CA, Polk HC Jr. Perioperative supplemental oxygen therapy and surgical site infection: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Surg* 144:359-366, 2009.
  29. Lumb AB, Nair S. Effects of increased inspired oxygen concentration on tissue

- oxygenation: theoretical considerations. *Eur J Anaesthesiol* 27:275-279, 2010.
30. Semenza GL. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology* 19:176-182, 2004.
31. Plikus MV, Baker RE, Fare C, de la Cruz D, Andl T, Maini PK, Millar SE, Widelitz R, Chuong CM. Self-organizing and stochastic behaviors during the regeneration of hair stem cells. *Science* 332:586-589, 2011.
32. Plikus MV, Mayer JA, de la Cruz D, Baker RE, Maini PK, Maxson R, Chuong CM. Cyclic dermal BMP signalling regulates stem cell activation during hair regeneration. *Nature* 451:340-344, 2008.
33. Oshimori N, Fuchs E. Paracrine TGF- $\beta$  signaling counterbalances BMP-mediated repression in hair follicle stem cell activation. *Cell Stem Cell* 10:63-75, 2012.
34. Williams KL. Current practices and controversies in cosmetic hair restoration. *Dermatol Surg* 39:797-801, 2013.
35. Stenn KS, Cotsarelis G. Bioengineering the hair follicle: fringe benefits of stem cell technology. *Curr Opin Biotechnol* 16:493-497, 2005.
36. Nakao K, Morita R, Saji Y, Ishida K, Tomita Y, Ogawa M, Saitoh M, Tomooka Y, Tsuji T. The development of a bioengineered organ germ method. *Nat Methods* 4:227-230, 2007.
37. Asakawa K, Toyoshima KE, Ishibashi N, Tobe H, Iwadate A, Kanayama T, Hasegawa T,

- Nakao K, Toki H, Noguchi S, Ogawa M, Sato A, Tsuji T. Hair organ regeneration via the bioengineered hair follicular unit transplantation. *Sci Rep* 2:424, 2012.
38. Veraitch O, Kobayashi T, Imaizumi Y, Akamatsu W, Sasaki T, Yamanaka S, Amagai M, Okano H, Ohyama M. Human induced pluripotent stem cell-derived ectodermal precursor cells contribute to hair follicle morphogenesis in vivo. *J Invest Dermatol* 133:1479-1488, 2013.

## 謝辞

最初に、本研究において、東京大学医学部形成外科の吉村浩太郎先生には具体的な研究の立案から論文執筆に至るまでのご指導、ご鞭撻を頂きましたことを、光嶋勲先生には、指導教官として研究にご指導、ご支援を頂きましたことを深く御礼申し上げます。

研究室で共に仕事をしてまいりました東京大学医学部形成外科の井上啓太先生、菅浩隆先生、江藤ひとみ先生、青井則之先生、土居健太郎先生、荒木淳先生、久野慎一郎先生、木下佳保里先生、峯田一秀先生、には実際の実験において様々なご指導、ご協力を頂きました。更に、大阪大学大学院医学系研究科皮膚・毛髪再生医学寄附講座の板見智先生には毛髪研究に関わる貴重なご指導、ご助言を頂きました。

また、実験助手の佐藤綾子氏、稗田麻記子氏には実際の実験において多大なるご協力を頂きました。非常に多くの方々に支えられ、この研究を行うことができましたことを幸せに思います。この場をお借りして改めて皆様に心より感謝の意を表したいと思います。