原 著

犬毛包におけるメラニン輸送メカニズムの形態学的検討； 健康犬と Color dilution alopecia 罹患犬の比較

Ultrastructural Analysis of Melanin Transfer Mechanism in Canine Hair Follicles; Comparison between a Healthy Dog and a Dog with Color Dilution Alopecia

清水 篤^{1)*} 永田雅彦²⁾ 柴田久美子²⁾ 大山 学¹⁾ 石河 晃¹⁾

¹⁾慶應義塾大学医学部皮膚科学教室, ²⁾ASC どうぶつ皮膚病センター

Atsushi Shimizu^{1)*}, Masahiko Nagata²⁾, Kumiko Shibata²⁾, Manabu Ohyama¹⁾, Akira Ishiko¹⁾

¹⁾Department of Dermatology, Keio University School of Medicine, ²⁾Animal Dermatology Center, ASC

要 約：メラノサイトは樹状突起を經由し、周囲ケラチノサイトにメラノソームを供給するが、犬でそのメカニズムを検討した報告がない。そこで、健康犬とメラニン輸送機能異常が推測されている Color dilution alopecia (CDA) を比較し、犬毛包におけるメラニン輸送の形態学的検討を行った。健康犬毛母部では、メラノサイトの樹状突起が細胞間に伸展し、ケラチノサイト内へ挿入されていたが、細胞膜の融合像は確認できなかった。一方CDAの毛包において、成熟メラノソームを有したメラノサイトは楕円形で樹状突起に乏しく、周囲ケラチノサイト内にメラノソームは認められなかった。また表皮において細胞間に遊離したメラノソームがみられ、ごく僅かながらメラノソームが単独でケラチノサイト内に取り込まれていた。以上より、犬毛包のメラニン輸送は主に樹状突起の cytophagocytosis 経路によって行われ、表皮においては exocytosis 経路も関与することが推察された。
キーワード：ケラチノサイト、樹状突起、透過型電子顕微鏡、メラノサイト

Abstract: Melanocytes transfer the melanosomes to the neighboring keratinocytes *via* dendritic projections, however, mechanism of melanin transfer in canine hair follicles have not been fully elucidated. In this study, we investigated the ultrastructure of hair follicles, focusing on melanin transfer in a clinically healthy dog and a dog with color dilution alopecia (CDA), in which melanosome transporting dysfunction has been proposed. In the normal dog, melanocytes in the hair matrix extended dendrites to the intercellular space and inserted into keratinocytes, but fusion of plasma membranes between melanocytes and keratinocytes were not observed. In the dog with CDA, oval shaped melanocytes without dendritic processes were filled with mature melanosomes. In addition, keratinocytes in the hair matrix did not contain melanosomes. In CDA dog epidermis, a few melanosomes were observed in the extraspce with the decreased number of melanosomes in keratinocytes. These findings suggested that the cytophagocytosis pathway seems to be the mainstream of melanosomes transfer in canine hair follicles and exocytosis pathway may work, in part, only in the epidermis.

Key words: keratinocytes, dendritic process, transmission electron microscopy, melanocytes

(Jpn J Vet Dermatol 2007, 13 (3): 141–147)

* 連絡先：清水 篤（慶應義塾大学医学部皮膚科学教室） 〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35
TEL 03-3353-1211 FAX 03-3351-6880 E-mail: ash-s@sc.itc.keio.ac.jp

*Correspondence to: Atsushi Shimizu (Department of Dermatology, Keio University School of Medicine) 35 Shinanomachi, Shinjuku, Tokyo 160-8582, Japan

Fig. 1. Three melanosome transfer models. (A) Cytophagocytosis: A tip of melanocyte's dendrite containing the melanosomes becomes enfolded and is phagocytosed in a recipient keratinocyte. Then, phagocytosed dendrite is pinched off and melanosomes gradually disperse throughout the cytoplasm. (B) Plasma membrane fusion: A melanocyte fused the plasma membrane with a keratinocyte, and melanosomes are transported through the connecting cytoplasmic channel. (C) Exocytosis: Melanosomes are excreted from a melanocyte by fusion of the melanosomal membrane and the plasma membrane, and then taken up by endocytosis or phagocytosis.

緒 言

メラノサイトは、メラノソームと呼ばれる色素顆粒を産生し内包する細胞である。その起源は神経堤に由来し、皮膚を経て毛包へ遊走し、毛包幹細胞のニッチであるバルジ領域へ取り込まれる¹⁰⁾。その後、毛周期に同調し、増殖、分化、細胞死を繰り返しながら、周囲のケラチノサイトに、それ自身が産生したメラノソームを供給することで、固有の皮膚色や被毛色を規定するほか、紫外線から皮膚を保護するなどの重要な役割を果たしている。例えばヒトのメラノサイトは、その周囲にあるおよそ36個のケラチノサイトへ、樹状に伸ばした突起を用いてメラノソームを供給しているが⁵⁾、一般にメラノソームがケラチノサイト内へ輸送されるメカニズムには未だ不明点が多い。これまでに報告されている有力な説は(1) Cytophagocytosis: メラノサイトから伸びたメラノソームを含む樹状突起が、隣接するケラチノサイト内へ挿入され、挿入された樹状突起はケラチノサイトの細胞膜により押しつぶ

される様にメラノサイトから切り離され、ケラチノサイトに貪食される説^{11, 16)}。(2) Plasma membrane fusion: メラノサイトから伸びた樹状突起が隣接するケラチノサイトの細胞膜と融合しチャンネルを形成、次いでそれらチャンネルを経由してメラノサイト内のメラノソームがケラチノサイトへ移動する説^{13, 16)}。(3) Exocytosis: 細胞膜内部に付着したメラノソームが exocytosis により細胞外に放出された後、周囲のケラチノサイトに貪食される説^{14, 16)}などある(Fig. 1)。これらの解析は、主に培養細胞を用いた *in vitro* による実験系、もしくはヒトおよびマウスの皮膚や毛包を用いた形態学的解析によりなされてきたが、犬で検討した報告はない。今回我々は、イタリアン・グレーハウンドにおける健常犬とともにメラニン輸送障害が推測されている色素異常性脱毛性疾患の Color dilution alopecia (CDA)^{3, 12)}に罹患した犬の毛包および皮膚を電顕的に観察し、メラノサイト、ケラチノサイト間におけるメラニン輸送メカニズムを形態学的に比較検討した。

材料と方法

健常犬

症例は臨床的に皮膚病変を認めない白と茶色の被毛を有したイタリアン・グレーハウンド(6歳齢, 雄)で, 左胸部茶色被毛領域より, 局所麻酔下にて6 mm パンチ生検より皮膚を採取した。

CDA 罹患犬

症例は白と淡いグレーの被毛を有したイタリアン・グレーハウンド(6歳齢, 雌)で, 3歳齢頃より体幹部に再発を繰り返す皮疹を認めた。6歳齢頃より体幹の脱毛が顕著になり, 平成16年11月5日ASC どうぶつ皮膚病センター紹介受診となった。体幹背側のグレー毛に薄毛が目立ち, 体幹体側部に多数の膿疱, 丘疹が認められた。毛検査で寄生体はなく, 毛幹に粗大なメラニン色素塊が顕著にみられた。膿疱内容の細胞診では, マクロファージを混じた好中球浸潤がみられ, 血液検査, 血液化学検査で特記すべき異常は認められなかった。胸部背側のグレー薄毛部における皮膚病理組織検査では, 角質肥厚に伴う漏斗部の開大と毛包内および毛幹に粗大なメラニン色素塊が, また真皮では毛包周囲にメラノファージの浸潤が認められた。以上より, 膿皮症を合併したCDAと診断した。なお同時に大腿部における白色健常被毛領域の生検も実施したが, 特記すべき異常はみられなかった。試料は, グレー薄毛部より, 局所麻酔下にて6 mm パンチ生検により採取した。

電子顕微鏡検査

採取した検体は, 1 mm³角に細切し, 2%グルタルアルデヒドおよび1%四酸化オスミウムにて二重固定を行った後に, エタノールにより脱水後, Epon 812に包埋した。1 μ m切片を作成し, 0.1%トルイジンブルー染色を行い, 光学顕微鏡にて観察した。90 nm 超薄切片は酢酸ウラン, クエン酸鉛による電子染色を行い, 透過型電子顕微鏡 (JEOL-1200EX-II, JEOL, Tokyo, Japan) にて詳細な観察を行った。

結 果

1 μ m 切片所見

健常犬では, 毛乳頭周囲の毛包マトリックスに局在するセラチノサイトにメラニン色素が均一に分布していた (Fig. 2A)。一方罹患犬では, メラノサイト内にメラニン色素が異常に蓄積し腫大した, いわゆるメラニクランピングを呈していた。また, 周囲のセラチノサイトにメラニン顆粒は認められなかった (Fig. 2B)。

電子顕微鏡所見

健常犬の毛包: 毛乳頭周囲の毛包マトリックスの上方に, 多数のメラノサイトが均一に配列していた (Fig. 3)。それぞれのメラノサイト内には, 幼弱なI型メラノソームから成熟したIV型メラノソームまで認められた。さらに, メラノサイト周囲のセラチノサイト内にも多数の成熟したメラノソームが分布していた (Fig. 4A)。拡大像から, メラノサイトの周囲を取り囲

Fig. 2. Light microscopy of the hair matrix in a normal dog and a dog with CDA. (A) Hair matrix in a normal dog. Melanin granules were evenly distributed within melanocytes and keratinocytes. (B) Hair matrix in a dog with CDA. Large oval-shaped melanocytes were highly pigmented in the hair matrix, while adjacent keratinocytes contained no melanin granules. DP: Dermal papilla. MP: Melanophagocyte. Toluidine blue, semithin section. Bar = 15 μ m.

Fig. 3. Electron microscopy of the anagen hair follicle matrix in a normal dog. Highly melanogenic melanocytes (MCs) were located at upper part of hair matrix in anagen hair follicles. These bulbar melanocytes contained all stages of melanosomes, including matured type IV melanosomes in the cytoplasm. Numerous melanosomes uniformly distributed in keratinocytes. DP: Dermal papilla. Bar = 5 μ m.

むケラチノサイトの細胞間および細胞質内に、メラノソームを内包した樹状突起の横断面が多数認められた (Fig. 4B および C)。

CDAの毛包および皮膚: 毛乳頭周囲の毛包マトリックスに局在するメラノサイト内部には、成熟したIV型メラノソームが多量に蓄積していた (Fig. 5A)。また、メラノサイトは楕円形で樹状突起の伸展はほとんどなく、周囲のケラチノサイトにメラノソームが取り込まれている像は認められなかった (Fig. 5B)。表皮においても同様に、多量のメラノソームを蓄積した楕円形のメラノサイトが認められた。毛包のメラノサイトと同様、樹状突起の伸展はほとんど認められなかった。しかし、周囲のケラチノサイト内に、わずかではあるがメラノソームが認められた (Fig. 6A および B)。また、メラノサイトとケラチノサイトとの細胞間には、メラノソームが膜様構造物に包まれることなく細胞外に存在していた (Fig. 6C)。

考 察

毛包において色素を産生する部位は毛球部であり、高度に分化しメラニン形成能を有したメラノサイトが多数局在している¹⁵⁾。分化、活性化したメラノサイトは、毛球部マトリックス上方に位置し、樹状突起を伸展させケラチノサイト内へメラニンを供給している。健常犬における我々の観察においても、毛球部マトリックス上方に均一に局在し、内部に成熟したメラ

Fig. 4. Electron microscopy of dendrites of melanocytes in hair follicles of a normal dog. (A) Melanocytes extended dendrites into the intercellular spaces (arrowhead), and inserted into keratinocytes (arrows). (B) A cross-section of a inter-cellular dendrite contained mature melanosomes (arrowhead). (C) Cross-sections of dendrites were seen in the cytoplasmic area of a keratinocyte (arrows). Bar = (A) 2 μ m, (B and C) 1 μ m.

Fig. 5. Electron microscopy of the anagen hair follicle in a dog with CDA. (A) Hyper-pigmented melanocytes contained large number of the stage IV melanosomes in the hair matrix of the anagen hair follicle. These melanocytes had no dendritic processes. Few melanosomes were seen in the intercellular space. (B) Adjacent keratinocytes lacked melanosomes. MC: Melanocyte. DP: Dermal papilla. Bar = (A) 10 μm , (B) 5 μm .

Fig. 6. Electron microscopy of the epidermis in a dog with CDA. (A) Hyper-pigmented melanocytes were observed at the basal layer of the epidermis. (B) Surrounding keratinocytes contained only small number of melanosomes. (C) A few melanosomes were seen in the intercellular space in the epidermis. These melanosomes were not surrounded by a membrane structure (arrow). MC: Melanocyte. KC: Keratinocyte. Bar = (A) 2 μm , (B) 1 μm , (C) 500 nm.

ノソームを蓄えるメラノサイトを確認することができた。また、周囲のケラチノサイト細胞間には、メラノソームを含んだ樹状突起の横断面像が多数認められ、それらは同様にケラチノサイト内部においても観察できた。これらの所見は、Okazakiら(1976)¹¹⁾によって示された、Cytophagocytosis経路によるメラニン輸送の可能性を形態学的に示唆する所見であった。

CDAは黒または茶色等の褐色被毛領域の淡色化に一致して脱毛が生じる遺伝性の色素異常症であり^{2,4)}、毛包内にはメラニクランプと呼ばれる巨大なメラニン色素塊が多数認められる¹⁾。近年、遺伝子多型による連鎖解析の結果、CDAが*Melanophilin (MLPH)* 遺伝子と強く連鎖し、この遺伝子の変異がこれらの疾患の発症に関与している可能性が高いと報告された^{3,12)}。*MLPH*は、ヒトのGriscelli症候群と呼ばれる非常にまれな、白皮症を呈する遺伝性疾患の責任遺伝子の一つとして知られている^{6,9)}。*MLPH*は細胞内メラニン輸送に重要な役割を果たす分子の一つであり、この分子の働きが障害されると周囲にメラノソームを供給することが困難になることが知られている^{7,8)}。Griscelli症候群患者のメラノサイトは、電顕的にメラノソームが異常に蓄積した楕円形の樹状突起に乏しい像を呈しており、周囲のケラチノサイト内にメラノソームをほとんど供給していない⁶⁾。今回我々が観察したCDAのメラノサイトにおいても、Griscelli症候群と同様の形態学的特徴が認められた。なおメラノサイト樹状突起の伸展は、表皮においてもほとんど確認できなかったが、周囲のケラチノサイト内にわずかながらメラノソームが取り込まれていた。さらに、メラノサイトとケラチノサイトの細胞間には膜用構造物に包まれず細胞外に放出されたメラノソームが認められたことから、CDAの表皮ではExocytosis経路によるメラニンの供給が行われている可能性も示唆された。

以上より、犬毛包および皮膚におけるメラニン輸送は、主にCytophagocytosis経路により行われているものと考えられ、表皮ではExocytosis経路によるメラニンの輸送も関与している可能性が示唆された。また、CDAの病態として*MLPH* 遺伝子変異によるメラニン輸送障害と類似の障害が関与している可能性が形態学的にも示唆された。

引用文献

- 1) Beco, L., Fontaine, J., Gross, T.L. and Charlier, G. 1996. Colour dilution alopecia in seven Dachshunds. A clinical study and the hereditary, microscopical and ultrastructural aspect of the disease. *Vet. Dermatol.* 7: 91–97.
- 2) Briggs, O.M. and Botha, W.S. 1986. Color mutant alopecia in a blue Italian greyhound. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 22: 611–614.
- 3) Drögemüller, C., Philipp, U., Haase, B., Günzel-Apel, A.R. and Leeb, T. 2007. A noncoding melanophilin gene (*MLPH*) SNP at the splice donor of exon 1 represents a candidate causal mutation for coat color dilution in dogs. *J. Hered.* 98: 468–473.
- 4) Ferrer, L., Durall, I., Closa, J. and Mascort, J. 1988. Colour mutant alopecia in Yorkshire terriers. *Vet. Rec.* 122: 360–361.
- 5) Fitzpatrick, T.B. and Breathnach, A.S. 1963. The epidermal melanin unit system. *Dermatol. Wochenschr.* 147: 481–489.
- 6) Griscelli, C., Durandy, A., Guy-Grand, D., Daguillard, F., Herzog, C. and Prunieras, M., 1978. A syndrome associating partial albinism and immunodeficiency. *Am. J. Med.* 65: 691–702.
- 7) Kuroda, T.S. and Fukuda, M. 2004. Rab27A-binding protein Slp2-a is required for peripheral melanosome distribution and elongated cell shape in melanocytes. *Nat. Cell Biol.* 6: 1195–1203.
- 8) Kuroda, T.S., Ito, T. and Fukuda, M. 2005. Functional analysis of slac2-a/melanophilin as a linker protein between Rab27A and myosin Va in melanosome transport. *Methods Enzymol.* 403: 419–431.
- 9) Menasche, G., Ho, C.H., Sanal, O., Feldmann, J., Tezcan, I., Ersoy, F., Houdusse, A., Fischer, A. and de Saint Basile, G. 2003. Griscelli syndrome restricted to hypopigmentation results from a melanophilin defect (GS3) or a MYO5A F-exon deletion (GS1). *J. Clin. Invest.* 112: 450–456.
- 10) Nishimura, E.K., Yoshida, H., Kunisada, T. and Nisikawa, S.I. 1999. Regulation of E- and P-cadherin expression correlated with melanocyte migration and diversification. *Dev. Biol.* 215: 155–166.
- 11) Okazaki, K., Uzuka, M., Morikawa, F., Toda, K. and Seiji, M. 1976. Transfer mechanism of melanosomes in epidermal cell culture. *J. Invest. Dermatol.* 67: 541–547.
- 12) Philipp, U., Hamann, H., Mecklenburg, L., Nishino, S., Mignot, E., Günzel-Apel, A.R., Schmutz, S.M. and Leeb, T. 2005. Polymorphisms within the canine *MLPH* gene are associated with dilute coat color in dogs. *BMC Genet.* 16: 34.
- 13) Scott, G., Leopardi, S., Printup, S. and Madden, B.C. 2002.

- Filopodia are conduits for melanosome transfer to keratinocytes. *J. Cell Sci.* 115: 1441–1451.
- 14) Swift, J.A. 1964. Transfer of melanin granules from melanocytes to the cortical cells of human hair. *Nature* 203: 976–977.
- 15) Tobin, D.J. and Bystryń, J.C. 1996. Different populations of melanocytes are present in hair follicles and epidermis. *Pigment Cell Res.* 9: 304–310.
- 16) Yamamoto, O. and Bhawan, J. 1994. Three modes of melanosome transfers in Caucasian facial skin: hypothesis based on an ultrastructural study. *Pigment Cell Res.* 7: 158–169.