

ニワトリ胚動脈平滑筋の収縮性線維束の偏在と細胞外線維構造におけるフィブロネクチン分布

神宮司洋一¹⁾, 田中秀幸²⁾

1) 群馬県立県民健康科学大学診療放射線学部

2) 群馬大学医学部保健学科

ふ卵5日目から20日目のニワトリ胚動脈の中膜平滑筋における収縮性線維束の分布と細胞外のフィブロネクチン分布様式との関係を, 電子顕微鏡と蛍光染色法によって調べた。5日目から17日目胚の平滑筋では, アクチン線維を含む線維束が細胞長軸に沿って伸びるとともに, 内皮側に偏って位置していた。平滑筋の線維束が細胞膜に付着する場所の外側には細胞外の微細線維も付着していたが, この微細線維は中膜全体ではほぼ均一に分布した。細胞外の線維構造に含まれるフィブロネクチン分布を蛍光抗体法で調べると, ふ卵20日目までの発育過程全期間を通じてフィブロネクチン束は中膜内で立体的な網目状をなし, 平滑筋はこの網の中にあった。以上の結果から, 平滑筋内における線維束の一時的な偏在は, 細胞外のフィブロネクチン束の分布様式とは関連が低いものと考えられた。細胞外の線維構造が少ない若い胚の中膜平滑筋でも, 収縮性線維束が内皮側すなはち細胞内の管腔側で形成され始めることから, この線維束の細胞内分布は血流によって影響されることが示唆された。

キーワード：ニワトリ胚, 動脈平滑筋, 収縮性線維束, フィブロネクチン

緒言

ニワトリ胚動脈壁の発達過程を調べると, 内皮細胞, 平滑筋, 細胞外の線維構造それぞれに形態学的な変化に特徴がみられる。我々はニワトリ胚動脈を使って細胞外の微細構造の主要成分であるフィブロネクチンの分布と内皮の形態との関係を電子顕微鏡および蛍光染色によって調べた (Jinguji *et al.*¹⁾) が, その過程で, 中膜の未熟な平滑筋ではアクチン線維を含む収縮性線維束が内皮側に偏って分布することを観察した。平滑筋内の線維束の偏在は, すでに Hiruma *et al.*²⁾ が電子顕微鏡観察によって記載している。アクチン線維を含む線維束は筋細胞の機能を担う主要構造であるため, その分布に変化があるとすると細胞外部か

らの影響も考慮する必要がある。ただ, ふ卵3日目で観察されるほど線維束の偏在は早く (Hiruma *et al.*²⁾), まだ実験による研究はない。血管壁の発達はその主な構成細胞である内皮細胞と平滑筋細胞の増加や発達だけでなく, これらの細胞を支持する細胞外の様々な微細構造の発達も重要な要素である。細胞外の線維構造の分布様式が, 内皮直下や中膜といった血管壁の場所によって異なることは知られており (Jinguji *et al.*¹⁾, Rhodin³⁾, Murphy *et al.*⁴⁾, Buck⁵⁾), 細胞の伸長方向が明らかな平滑筋周辺での細胞外の線維構造の分布様式にも注目される。今回は蛍光抗体法も使って, 細胞の付着や運動と関係が深く, 器官形成の初期に多く出現すると考えられているフィブロネクチン (Clark *et al.*⁶⁾, Hynes *et al.*⁷⁾,

Risau⁸⁾の分布様式を調べ、この分布と平滑筋内部の線維束分布の偏りがどのように関わるのかを検討した。

研究対象

材料

ふ卵5日目から20日目のニワトリ胚の大動脈と腸間膜動脈を使った。受精卵は37°Cでふ卵した。

ローダミン-ファロイジンは Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) から、ウサギ抗フィブロネクチン IgG は Advance (Tokyo) から、ローダミン標識-抗ウサギ IgG は Cappel Laboratories (Malvern, PA, USA) からそれぞれ購入した。

方法

蛍光顕微鏡法：胚の動脈は、心臓から2%パラホルムアルデヒド-リン酸緩衝生理学的食塩水 (PBS) で10分間還流固定したのち切り出した。ローダミン-ファロイジン染色では組織片をPBSで100倍希釈した染色液で20分間、室温で処理した後、PBSで洗い観察した。蛍光抗体法による染色は、固定された試料をPBSで洗い、Triton X-100の0.1% PBS溶液で5分間処理した後さらに1時間PBSで洗った。PBSで100倍希釈した抗フィブロネクチン IgG で冷所で一晩標識した後、組織片を1時間PBSで洗い、更にPBSで200倍希釈したローダミン標識-抗ウサギ IgG で4時間処理した。蛍光標識した試料片は Zeiss Axiophot (Carl Zeiss, Germany) を使い、40倍 (Plan-NEOFLUAR, N.A. 0.75) と63倍 (Plan-APOCHROMATIC, N.A. 1.4) の対物レンズによって観察した。また、Zeiss Axiophot に装着した Bio Rad MRC600型レーザー走査型共焦点蛍光顕微鏡も使用した。

電子顕微鏡法：心臓から10分間の還流固定を行った。固定液は2%パラホルムアルデヒド、2.5%グ

ルタルアルデヒド、0.1%タンニン酸を含む Na-カコジル酸緩衝液、pH7.4である。緩衝液で洗った後、0.5% OsO₄ 水溶液で氷冷下1時間後固定した。水洗後エタノール系列で脱水し、エポキシ樹脂に包埋した。超薄切片は日立H800型電子顕微鏡で観察した。

結果

動脈中膜の未熟な平滑筋内では線維束が細胞質の管腔側すなはち内皮側に偏って分布していた。今回調べた最も若いふ卵5日目の胚で観察され、9日胚で線維束の偏在は明瞭であった。9日胚では中膜平滑筋は内皮細胞の長軸とは直交する方向すなはち血管壁を輪走するように伸長した (図1)。ローダミン-ファロイジンによるアクチン線維染色では、紡錘形の細胞の長軸と平行な線維束が形成されていた (図3)。電子顕微鏡によってこれらの細胞は発達した粗面小胞体やゴルジ体を含むが、線維束は少なく、平滑筋細胞としては発達途中であることがわかった。線維束の一部は細胞膜

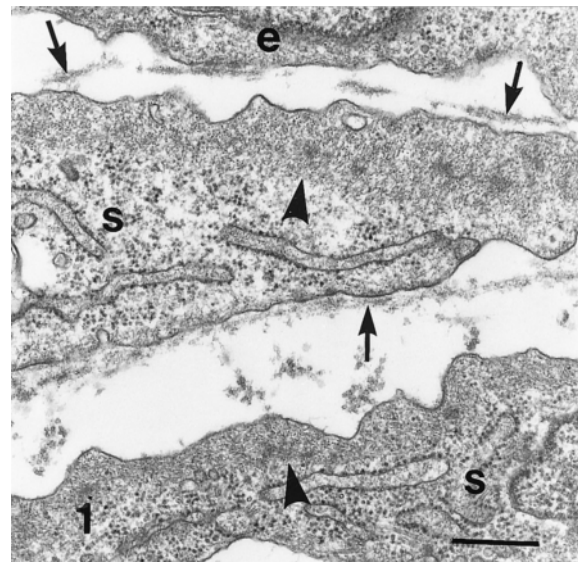


図1 9日胚大動脈の縦断面。平滑筋細胞 (s) は発達した粗面小胞体やゴルジ体を含むが、内皮 (e) 側に偏在する筋原線維束はまだ少ない。細胞間の線維構造 (矢印) は内皮直下においても少ない。血管長軸は図の左右方向にある。矢尻は横断された平滑筋の線維束。横線は0.5 μ m。

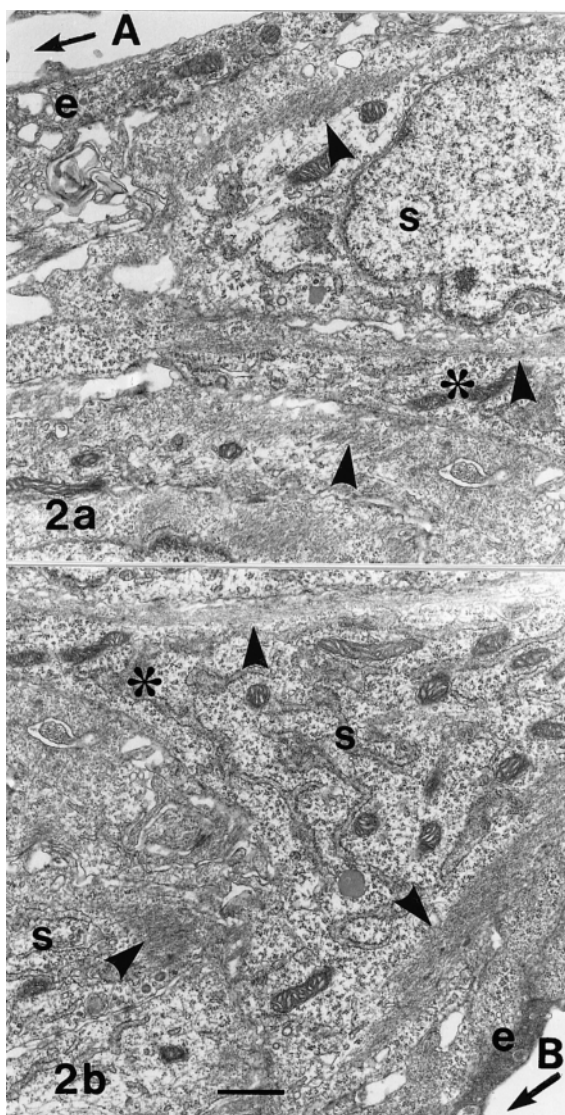


図2 9日胚腸間膜動脈 (aのA) とそれから分かれた直後の細い動脈 (bのB) の血管壁。細い血管 (B) では線維束 (矢尻) が内皮側 (e) にある平滑筋細胞 (s) は1層だけである。矢印は血流の方向。(*)はaとbにおいて同一の細胞を示す。横線は1 μ m。

直下の暗斑部に付着し、この部分の細胞外側には微細な線維が付着していた。細胞内の線維束は、核に近い部分のみでなく、周辺に伸びた細胞質においてもほとんどが内皮側にみられた (図1)。

9日胚の腸間膜動脈から分岐直後の細い動脈枝で形態を調べたところ、中膜平滑筋は数層が主幹と枝双方の共通した壁をなしていた。この平滑筋層では、線維束の内皮側への偏在は、主幹に近い部分では数層の平滑筋で、支流側では内皮直下の平

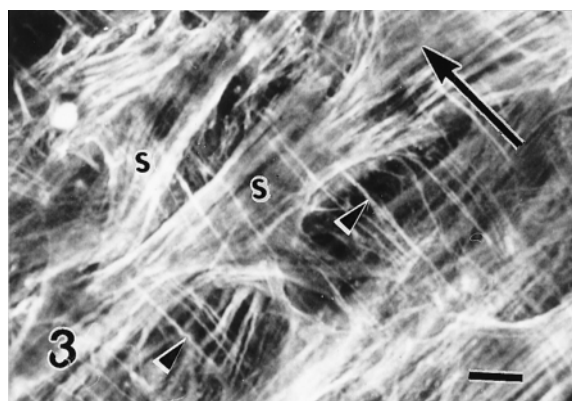


図3 9日胚の大動脈におけるアクチン線維束の分布。ローダミン-ファロイジン染色による共焦点蛍光顕微鏡像。内皮細胞内で細胞長軸と平行に伸びるストレスファイバー (矢尻) と、これに直交する平滑筋細胞 (s) 内の多数の線維束がみえる。矢印は血流の方向。横線は10 μ m。

滑筋細胞のみでそれぞれみられ (図2)、線維束の偏在する細胞が太い血管側で多いことが示された。

17日胚では平滑筋細胞の数と長さが増し、細長い平滑筋が互いに接するように密に分布するようになった。細胞内の線維束の分布は、細胞のほぼ全体にみられる場合もあるが、まだ内皮側に多い傾向にあった。20日胚では細胞内での線維束分布の偏りはみられなかった。なお、外膜側で血管を縦走する平滑筋の分布は、ふ化前の19日胚では明らかとなった。

血管内皮直下および中膜平滑筋を囲む微細構造は、発育の早い時期には細い線維の集合であり、発育が進むとともに厚く、連続的な線維の束となった。10日胚では内皮直下の基底膜も連続的にみられるようになった。平滑筋内で細胞膜に線維束が付着した暗斑部の細胞外側からは細胞外の細い線維束が細胞内の線維束の延長方向に伸びていたが、これら細胞外の線維も中膜内の隙間で様々な方向に向かう線維と絡み合っていた。17日胚以降には内皮直下と中膜平滑筋層に内弾性板が形成された。

細胞外の線維構造に含まれるフィブロネクチン

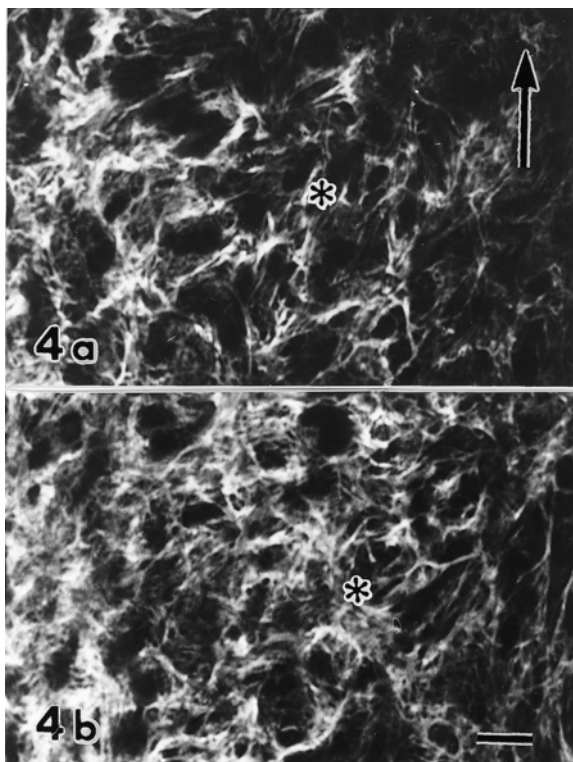


図4 8日胚大動脈壁のフィブロネクチン束の分布. 抗フィブロネクチンIgGによる共焦点蛍光顕微鏡像. 内皮直下(a)と中膜平滑筋層内(b)のフィブロネクチン束は全体として網目をなしている. 矢印は血管および内皮細胞の長軸方向. (b)は(a)の約1.4 μ m外膜側の画像. (*)は(a)(b)で対応する場所. 横線は10 μ m.

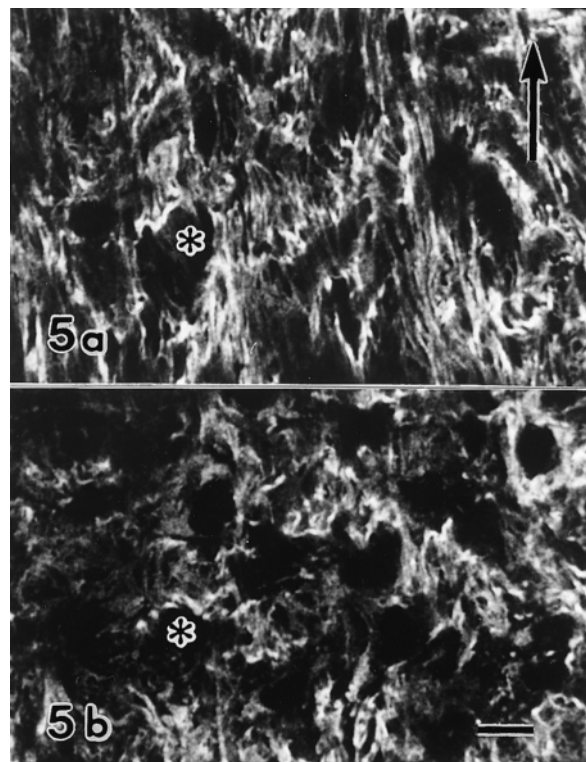


図5 15日胚大動脈壁のフィブロネクチン束の分布. 抗フィブロネクチンIgGによる共焦点蛍光顕微鏡像. 内皮直下(a)と中膜平滑筋層内(b). 内皮直下のフィブロネクチン束は大部分が内皮細胞および血管長軸と平行に配列しているが, 平滑筋層内では線維束が全体として網目をなしている. 矢印は血管長軸の方向. (b)は(a)の約1.5 μ m外膜側の画像. (*)は(a)(b)で対応する場所. 横線は10 μ m.

束の分布を抗フィブロネクチンIgGを使った蛍光像で調べると, 6日胚から20日胚までの中膜平滑筋層の間では全体として粗い網目状をなし, 細胞間隙で束状にみられることもあった(図4b, 5b). 血管壁の横断面についての蛍光染色像でも同様に粗い網目状の分布様式であった. 一方, 同じ試料内でも, 内皮と平滑筋の間では9日胚までは中膜平滑筋層内と同様にフィブロネクチン束は網目状に分布したが(図4a), 10日胚以降は内皮細胞の長軸すなわち血流に平行な束が大部分を占めるようになった(図5a).

考 察

成熟した平滑筋細胞では, 通常, 細胞内に発達

した収縮性線維束が均一に広がる. しかし, ニワトリ胚の動脈中膜では一時的に線維束が平滑筋内の内皮側に偏って分布する. 平滑筋のアクチンを含む線維束は収縮機能を担っており, その形成過程や細胞内分布には細胞の生理学的環境が反映されることも考えられる. ただ, 血管以外の器官の平滑筋についてその線維束の分布に特徴があるという報告は少ない.

ニワトリ胚の動脈でみられた線維束の偏在は, 未熟な平滑筋内に早い時期から内皮側—外膜側といった機能的な方向性が存在することを示唆する. 血管壁の場合, 生理学的な環境として血流による機械的刺激が存在しうるのであろうし, これへ

の反応が線維束の内皮側への偏在として観察された可能性がある。分岐直後の細い動脈の平滑筋でも線維束は内皮側へ分布し、主幹と枝それぞれの血流に大小はあろうが、内皮側への偏りは共通していた。静脈の中膜平滑筋においても動脈の場合よりも胚の発育時期で遅れるが、線維束の一時的な内皮側への偏在はみられた。同様の所見はウサギの静脈壁についての研究によっても示されている (Rhodin³⁾)。

液体が流れるという特殊な環境に対する細胞の動態が実験によって調べられているのは、血管の内皮細胞であり、血流による機械的刺激に応じて細胞の伸長の方向を変化させたり、アクチン線維束 (ストレスファイバー) が血流に沿って形成されることが知られている (Franke *et al.*⁹⁾, Levesque *et al.*¹⁰⁾, Kim *et al.*¹¹⁾, Girard *et al.*¹²⁾)。中膜平滑筋も血流による刺激に対し何らかの形態学的な反応を示すことは考えられるが、線維束の分布との関わりはわかっていない。ストレスファイバーは、平滑筋の収縮性線維構造と同様の蛋白質を含み、平滑筋の場合と同様に電子密度の高い暗斑部を介して内皮細胞の基底膜への接着を補強するものと考えられている (Hynes *et al.*⁷⁾, Herman *et al.*¹³⁾, Geiger¹⁴⁾)。

今回調べた細胞外の線維構造におけるフィブロネクチン束の分布様式は、観察した発育段階を通じて血管壁を立体的に支えるような網目状であり、電子顕微鏡観察で得られた中膜内の線維構造が全体として均一な網目状である所見と一致する。これまでの報告例は、血管中膜における細胞外の線維構造の立体的な分布様式にはほとんど触れていなかった (Hiruma *et al.*²⁾, Murphy *et al.*⁴⁾, Risau *et al.*⁸⁾)。フィブロネクチン束を含む細胞外の線維構造が平滑筋の間で網目状に分布することは、血管壁全体を包む平滑筋を接着、補強するという機能に適応している。内皮と平滑筋層との間では細胞外の線維束が血流と平行に分布するとの

報告があり (Buck⁵⁾)、この特異な方向性は内皮側が血流に反応した結果と考えられている (Jinguji *et al.*¹¹⁾)。今回の観察では、細胞外の線維構造の集合部が平滑筋の内皮側で外膜側よりも接近しているようにみえる場所もあったが、中膜全体で検討すると偏った分布はしていなかった。平滑筋と内皮細胞をコラーゲンゲル内で培養した研究によれば、平滑筋の線維束の分布に内皮細胞の存在位置は無関係である (Baul-Wortelboer *et al.*¹⁵⁾)。フィブロネクチン束は血管発達の早い時期に増加し (Murphy *et al.*⁴⁾, Clark *et al.*⁶⁾)、平滑筋が他の微細構造へ接着する際の媒体として機能しているようであるが、今回の結果からはフィブロネクチン束の分布様式が細胞内の収縮性線維束の位置まで決めているとは考えられない。

動脈平滑筋内で線維束を細胞膜に付着させる暗斑部が細胞の外膜側に多いという報告がある (Gabella¹⁶⁾)。この報告例は今回観察した線維束とは反対側への偏在であるが、細胞内外の線維構造の詳細な分布には触れていない。ニワトリ胚砂囊の平滑筋について調べた結果と比較すると、未熟な平滑筋では暗斑部を含む小規模な線維束が早い時期から細胞内に分散して形成され、線維束も暗斑部も特定領域への偏った分布は示さなかった (日本細胞生物学会, 1990)。

以上の考察から、器官の内腔を囲むように形成される平滑筋も、そこに含まれる収縮性線維束の分布が所属器官による機能の特徴を反映しており、血管壁では血流の存在に関係が深いことを示唆する。

結 論

ニワトリ胚動脈の中膜平滑筋に含まれる収縮性線維束は、胚発育の5日目から17日目にかけて内皮側に偏在した。一方、中膜における細胞外の線維構造とその主要成分であるフィブロネクチン束は全体として均一な網目状に分布し、細胞内の収

縮性線維束の偏在との強い関わりはみられなかった。胚の血管発達の過程では、平滑筋内の収縮性線維束の分布に血流が影響を及ぼしていることが示唆された。

謝 辞

レーザー走査型共焦点蛍光顕微鏡と電子顕微鏡は群馬大学医学部旧第2解剖学教室管理の装置を使わせて頂いた。本研究の一部は旧文部省科学研究費補助金（基盤研究C）によって行われた。

文 献

- 1) Jinguji Y, Fujiwara K (1994) : Stress fiber dependent axial organization of fibronectin fibrils in the basal lamina of the chick aorta and mesenteric artery, *Endothelium*, 2 : 35-47
- 2) Hiruma T, Hirakow R (1992) : Histogenesis of tunica media of the chick aorta, *Acta Anat Nippon*, 76 : 749-761
- 3) Rhodin JAG (1968) : Ultrastructure of mammalian venous capillaries, venules, and small collecting veins, *J Ultrastruct Res*, 25 : 452-500
- 4) Murphy ME, Carlson EC (1978) : An ultrastructural study of developing extracellular matrix in vitelline blood vessels of the early chick embryo, *Am J Anat*, 151 : 345-376
- 5) Buck R (1979) : The longitudinal orientation of structures in the subendothelial space of rat aorta, *Am J Anat*, 156 : 1-14
- 6) Clark RAF, Pelle PD, Manseau E, *et al.* (1982) : Blood vessel fibronectin increase in conjugation with endothelial cell proliferation and capillary ingrowth during wound healing, *J Invest Dermatol*, 79 : 269-276
- 7) Hynes RO, Yamada KM (1982) : Fibronectins : Multifunctional modulator glycoproteins, *J Cell Biol*, 95 : 369-377
- 8) Risau W, Lemmon V (1988) : Changes in the vascular extracellular matrix during embryonic vasculogenesis and angiogenesis, *Developmental Biol*, 125 : 441-450
- 9) Franke R-P, Grufe M, Schnittler H, *et al.* (1984) : Induction of human vascular endothelial stress fibers by fluid shear stress, *Nature*, 307 : 648-649
- 10) Levesque MJ, Nerem RM (1985) : The elongation and orientation of cultured endothelial cells in response to shear stress, *J Biomech Eng*, 107 : 341-347
- 11) Kim DW, Gotlieb AI, Langille BL (1989) : In vivo modulation of endothelial F-actin microfilaments by experimental alterations in shear stress, *Arteriosclerosis*, 9 : 439-445
- 12) Girard PR, Nerem RM (1993) : Endothelial cell signaling and cytoskeletal changes in response to shear stress, *Frontier Med Biol Engng*, 5 : 31-35
- 13) Herman, IM, Pollard, TD, Wong, AJ (1982) : Contractile proteins in endothelial cells, *Annals N Y Aca Sci*, 401 : 50-60
- 14) Geiger B (1983) : Membrane-cytoskeleton interaction, *Biochem Biophys Acta*, 737 : 305-341
- 15) Buul-Wortelboer MF, Brinkman HJM, Dingemans KP, *et al.* (1986) : Reconstitution of the vascular wall in vitro, *Exp Cell Res*, 162 : 151-158
- 16) Gabella, G (1983) : Asymmetric distribution of dense bands in muscle cells of mammalian arterioles, *J Ultrastr Res*, 84 : 24-33

Asymmetric Distribution of Filament Bundles in Smooth Muscle Cells and Fibronectin Distribution Pattern in Extracellular Space of Chick Embryonic Arteries

Yoichi Jinguji¹⁾ and Hideyuki Tanaka²⁾

1) School of Radiological Technology, Gunma Prefectural College of Health Sciences,

2) Department of Health Sciences, Faculty of Medicine, Gunma University, Maebashi, Gunma

The distribution pattern of the contractile filament bundle in smooth muscle cells and fibronectin fibrils in extracellular space were studied in chick embryonic arteries. Arteries obtained from embryos from 5 to 20 days in ovo were examined with electron microscopy and histochemistry using rhodamine-labeled phalloidin and anti-fibronectin IgG.

Actin-containing filament bundles were present predominantly in cytoplasmic areas below the luminal end of smooth muscle cells in embryos younger than 17 days. These bundles became thick and were distributed uniformly through the cell body of muscle during embryonic development. Immunofluorescent staining with anti-fibronectin IgG showed a mesh-like pattern in the matrix of the arterial media during whole embryonic stages. The pattern of actin-containing filament bundles and fibronectin fibrils were also observed in small branches of arteries.

Morphological results suggest that fibronectin distribution may not play a decisive role in inducing luminal side localization of contractile filament bundles in developing smooth muscle cells.

Key words : chick embryo, arterial smooth muscle, contractile filament bundle, fibronectin