

分担研究報告書

分担研究課題 「モデル家畜細胞の分化増殖過程におけるハザード解析」

研究分担者 堀 正敏 (東京大学大学院農学生命科学研究科)

研究要旨

フードテックを応用した新開発食品のうち、これまでに食経験のない骨格筋細胞など家畜・家禽由来の様々な細胞を採取・培養し食肉の代用品を作る「培養肉」(本研究では「細胞培養食品」と呼ぶ)の研究開発が加速度的に進んでいる。しかし、細胞培養食品の上市化に際しその安全性評価に向けた課題の抽出や具体的な安全性基準については整備されていない。本研究では、牛の気管平滑筋や大動脈平滑筋など、実際の家畜の臓器を用いた細胞培養系を樹立し、その開発途上に現れる細胞の様々な変化を検証することで、細胞培養食品の安全性基準の礎となる基盤を構築する。

今年度は、成熟個体マウス(8週齢)と老個体マウス(36カ月齢)から様々な内臓臓器を採取し、各内臓臓器のPlatelet Derived Growth Factor (PDGF) α receptor (PDGFR α)を発現する繊維芽細胞様間質細胞をFACS Cell Sorterにより採取し、RNAseq解析を行い、発現遺伝子の相違について検証した。結果、繊維芽細胞の遺伝子変動は加齢による差よりも臓器間での差が大きいことがわかった。さらにすべての内臓臓器に共通して、加齢により細胞外マトリックス関連遺伝子群の発現が低下し、免疫・炎症関連遺伝子の発現が亢進することが判った。

次に、ウシ気管由来単離平滑筋細胞を用いて異なる実験者による実験技術による培養による発現遺伝子変動解析を、細胞培養食品バイオハザード研究モデルとして実施した。結果、実験者の細胞培養実験技術の差により継代による発現遺伝子群の変動が大きく異なることが判った。

ウシ気管培養平滑筋においては、初代培養から培養を15代まで継代した細胞群遺伝子発現解析をPCA解析によりYoung、Intermediate、Agedの3群にわけ生体にとって毒性のある化学物質について合成、分解系の遺伝子発現解析を行った。結果、15継代後にセロトニン系やノルアドレナリン系の分解系の遺伝子発現の低下、糖質コルチコイド系の合成経路の遺伝子発現亢進が認められた。

以上の成績から、1) 老齢動物では炎症誘発化学物質やがん関連遺伝子の発現増加の可能性が増加する可能性が示された。すなわち、老齢動物(あるいは老齢動物由来の臓器)からの培養細胞食品の製造は避けるべきであると考えられた。2) 細胞外マトリックス関連遺伝子群と免疫・炎症関連遺伝子群の発現増減は培養細胞食品の安全性評価の指標となる、ことが示唆された。また、細胞外マトリックス関連遺伝子群の発現変動は食感や味覚にも影響を与える可能性が考えられた。3) 培養細胞食品の品質管理において、培養工場ごとに安定した培養技術・環境が求められることが明らかになった。4) 生体にとって有害な活性物質の合成・分解系に係わる遺伝子発現変動の解析は安全性評価に有用と考えられた。

A. 研究目的

地球上の人口増加や異常気象を背景に、将来の食糧不足が問題となっている。この地球規模の問題を解決する一つの手法として、様々なフードテックの研究が進み、様々な代替肉の開発が手掛けられている。中でも骨格筋細胞をはじめとする家畜・家禽由来の様々な細胞を採取・培養し食肉の代用品を作る「培養肉」（本研究では以下「細胞培養食品」とする）の研究開発の進展は目覚ましい。

しかし、細胞培養食品の上市化に際しその安全性評価に向けた課題の抽出や具体的な安全性基準については整備されていない。本研究では、牛の気管平滑筋や大動脈平滑筋など、実際の家畜の臓器を用いた細胞培養系を樹立し、その開発途上に現れる細胞の様々な変化を検証することで、細胞培養食品の安全性基準の礎となる基盤を構築する。

（二年度の研究目的）細胞培養食品の品質の鍵を握る因子の一つとして、用いる細胞を採取する臓器の部位差や個体の年齢差が考えられる。本年度は、マウスを用いて成熟個体と老齢個体から肺、肝臓、小腸、骨格筋、脂肪、心臓の各臓器を摘出し、それぞれの若齢、老齢臓器から線維芽細胞を採取しそれらの遺伝子発現解析を比較解析することで、臓器間での老齢化による共通して変動する遺伝子群や、臓器特異的に変動する遺伝子群について解析し、細胞培養食品の品質の指標となる遺伝子群の同定を試みることを第一の目的とした。また、初年度に樹立したウシの気管平滑筋単離培養実験系において、異なる実験者による実験技術による培養による発現遺伝子変動解析を、細胞培養食品バイオハザード研究モデルとして実施した。さらに、発現遺伝子から生体にとって有害な活性物質の合成・分解系に係わる遺伝子発現変動について解析した。

B. 研究方法

マウスは東京大学大学院農学生命科学研究科の動物倫理委員会で初認を得た実験計画（P21-006）で使用するC57BL/6Jマウス（8週令

の成熟雄マウス、ならびに36カ月齢の老齢雄マウス）から、腓腹筋、肝臓、心臓、肺臓、小腸、脂肪を採取した。それぞれの臓器をコラゲナーゼ処理し、FACS Cell Sortingを用いてPlatelet Growth Factor Receptor α (PDGFR α) を発現する線維芽細胞様の間質細胞（以下P α 陽性線維芽細胞様細胞）を採取した（CD31⁻CD45⁻PDGFR α ⁺細胞集団）。得られた細胞よりmRNAを抽出し、タカラバイオによるRNAseqデータファイルを作成し、得られた結果についてPCA解析などの遺伝子発現解析を行った。

屠場よりウシの気管を入手し、気管平滑筋細胞をコラゲナーゼ/エラスターゼカクテルにて単離し、DMEM培地10% ウシ胎児血清下で培養した。細胞は70%コンプレントの状態ですべて継代した。これらの実験を実験開始時は同一ロットの細胞を用いて二人の大学院生に同様に実験を行い、初代培養細胞と15代培養細胞よりそれぞれRNAを抽出した。

C. 研究結果及び考察

（6種類の臓器の同一細胞における老齢化による遺伝子発現変動）

まず、成熟個体と老齢個体から採取したP α 陽性線維芽細胞様細胞の発現遺伝子変動について、心臓、肺、小腸、骨格筋、脂肪、肝臓について比較検討したところ、線維芽細胞の遺伝子変動は加齢による差よりも臓器間での差が大きいことが明らかになった。また、老齢個体から採取した細胞では、炎症関連遺伝子群の発現がすべての臓器に共通して高かった。また、逆に、線維化関連遺伝子群の発現は全ての臓器に共通して低かった。

（ウシ気管平滑筋培養細胞系を用いたバイオハザード研究）

ウシの気管より平滑筋細胞を単離し、ウシ胎児血清を用いて同じロットの細胞から二人の実験者AとBが同時にそれぞれ細胞培養を行い、15代まで細胞を継代した。初代培養細胞（P0）、初代継代細胞（P1）、2代継代細胞（P2）、5代継代細胞（P5）、10代継代細胞（P10）、ならびに15

代培養細胞（P15）よりそれぞれRNAを抽出し、RNAseq解析をおこない、実験者AとBによる実験手技に由来するであろう発現遺伝子の変動について解析した。比較的細胞培養実験に熟練している実験者Aについては、P0からP15まで継代を追ってPCA解析での分散が変化したのに対して、細胞培養実験技術に熟練していない実験者Bについては、P0からP15までの継代数に関係なくPCA解析での分散がばらつく成績を得た。

また、生体にとって有害な活性物質の合成・分解系に係わる遺伝子の細胞継代による発現変動解析において、セロトニン系やノルアドレナリン系の分解系の遺伝子発現の低下と、糖質コルチコイド系の合成経路の遺伝子発現の亢進が認められたが、ヒスタミン系については遺伝子発現に継代による有意な差は認められなかった。

D. 結論

老齢個体からの細胞を使用することにより細胞外マトリックス関連遺伝子群の発現低下し、免疫・炎症関連遺伝子群の発現が増加したことから、1) 老齢個体の細胞を使うことで食感や味覚に影響する可能性、2) 老齢個体の細胞を使うことで、炎症誘発化学物質やがん関連遺伝子発現の増加の可能性、3) 上記二つの遺伝子群の変動は細胞培養食品の品質管理の指標となること、が示された。

実験者の手技により細胞の発現遺伝子は継代によって大きく変動したことから、4) 培養細胞食品の品質管理において、培養工場ごとに安定した培養技術・環境が求められることが明らかになった。

細胞培養によっていくつかの生理活性物質関連遺伝子に変動が認められたことから、5) 生体にとって有害な活性物質の合成・分解系に係わる遺伝子発現変動の解析は安全性評価に有用と考えられた。

E. 健康機器情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Takashi Chaen, Tamaki Kurosawa, Kazuhisa Kishi, Noriyuki Kaji, Madoka Ikemoto-Uezumi, Akiyoshi Uezumi, Masatoshi Hori. Transcriptome analysis of mesenchymal stromal cells of the large and small intestinal smooth muscle layers reveals a unique gastrointestinal stromal signature. *Biochemistry and Biophysics Reports*, (2023) vol. 34, 101478.

DOI: 10.1016/j.bbrep.2023.101478

2. 学会発表

細胞培養食品バイオハザード研究1

マウス線維芽細胞とウシ気管平滑筋細胞を用いた遺伝子発現解析

堀 正敏、三原大輝、後藤 もも、徳永弥生、伊藤浩人、茶園貴志、黒澤珠希、北嶋 聡

日本毒性学会 第50回学術年会 (2023)6月19-21日 (横浜市)

G. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし