

分担研究報告書

分担研究課題 「モデル家禽細胞の分化増殖過程におけるハザード解析」

研究分担者 福田 公子 東京都立大学理学研究科生命科学専攻

研究要旨

分化した細胞は増殖しにくい。そのため、「細胞培養食品」のための細胞培養では株化や不死化などの過程を経ることが必要となる。しかし、この過程で何が起きているのか、培養後の細胞はソース細胞と同じ細胞なのかなどの解析は困難であり、リスク因子となりうる。本分担研究では、分化した胚の細胞をその性質を保ったまま増殖させることで、胚の平滑筋がリスクの少ない「細胞培養食品」のソースとなるかを検討すると同時に、その時の培養リスクの解析を行った。昨年度確立した、ニワトリ14日胚の砂嚢平滑筋層の細胞塊からの培養をより詳細に解析したところ、細胞塊から這い出した直後、細胞は密に集まり、平滑筋の性質を保っているが、その後細胞密度が下がり、継代を経て筋線維芽細胞へと変化していることが判明した。さらに、単離した平滑筋細胞は細胞塊からの培養に比べ、早く筋線維芽細胞へと変化することから、平滑筋の細胞間接着がその分化の維持に必要ではないかと考えた。細胞間接着を保ったまま培養するために、3D培養を試みた。ウシ胎児血清またはニワトリ胚抽出液を添加した培養液でハンギングドロップ法を用いて平滑筋細胞塊を培養したところ、細胞塊が大きくなるのが観察された。また細胞塊中では器官培養で見られるネクロシスは起こっておらず、全ての細胞が平滑筋収縮タンパク質である α Smooth muscle actinを発現していた。ウシ胎児血清添加培地では、全ての細胞で別の平滑筋収縮タンパク質であるcalponinを発現していたが、ニワトリ胚抽出液では一部の細胞のみがcalponinを発現し、calponin陽性細胞は固く塊状に集まっていた。この後は3D培養での細胞形態、増殖、2つの因子での組織構築の違いの機序などを研究してゆきたい。

A. 研究の目的

細胞培養し、それを加工したいいわゆる「細胞培養食品」のリスクとして培養中に細胞が変化してしまうことが考えられる。これはほとんどの細胞にとって、「増殖」と「分化」はトレードオフになっているためである。特に成体の分化細胞はほとんど増殖しないため、効率の良い培養には、培養中に偶然または何らかの因子を用いて株化または、不死化した細胞を増殖させるしかない。これらの細胞はゲノムに何らかの変化が起きていると考えられ、もとの細胞の性質とはかけ離れてしまっている可能性が高いが、それを解析するのは非常に困難であり、食品のリスク因子になりうる。

一方、胚の細胞には、胚に必要な細胞分化をしているが、増殖能も併せ持つものがある。例えば、ある程度成長した胚の消化管の上皮は胚型の消化酵素を分泌し、蠕動運動を起こすことから、平滑筋や神経、ペースメーカーなどの細胞が分化していることがわかる。ニワトリ胚の砂嚢は成体では、咀嚼器官として働くため平滑筋層が著しく発達しているが、胚でもすでに平滑筋の種々の収縮タンパク質を発現し、分化した平滑筋が、著しく増殖することで大きくなることが知られている。このような胚で分化を保ったまま増殖できる細胞をソースとして、もとの分化状態を保ったまま培養することができれば、より安全な「細胞培養食品」を作ることができると考えられる。本研究では、ニワトリ胚砂嚢平滑筋細胞を分化を保ったまま培養する条件を探ることを目的とした。

既に先行研究で砂嚢平滑筋は単離細胞培養において、インスリン添加条件では分化を保って培養でき、ウシ胎児血清(FBS)添加条件では筋線維芽細胞(myofibroblast)に脱分化すると言われている。また、分化を保つような培養条件ではほとんど増殖していないことも報告されている。そこで、昨年度は単離細胞の培養ではなく細胞塊からの培養を用い、FBS添加条件下で平滑筋が増殖培養可能かを調べた。本年度は、昨年度確立し

た培養条件で、より詳細に平滑筋細胞の分化状態を調べたところ、細胞塊から這い出した直後は平滑筋分化を維持できているが、その後、筋繊維芽細胞へ変化してゆくこと、単離細胞の方がその変化が早いことを見出した。この違いが細胞間接着の違いではないかと考え、ハンギングドロップ法での砂嚢平滑筋3D培養法の確立を目指した。

B. 研究方法

組織

ニワトリ(ヒペコネラ種)の14日胚の砂嚢平滑筋層を単離し、用いた。動物実験は「東京都立大学研究倫理委員会規程」および「東京都立大学動物実験管理規程」に基づいて計画し、承認されたもの(A5-4)に従って実施した。

細胞塊の作成

単離した4日胚の砂嚢の平滑筋層をハサミで細かく切断した後、パスツールによるピペッティングを行い、数100個の細胞を含む細胞塊または、0.2-0.5mmの細胞塊を作成した。

平面細胞培養

細胞塊をDMEM培地1, 10%ウシ胎児血清(FBS)条件で、コラーゲンコートしたチャンバースライドに播種した。また、細胞塊をさらにピペッティングし、単離細胞にしたものも同様の条件で播種した。細胞はCO₂インキュベーターで培養した。6-7日後コンフルエントになったものは継代を行い、1/10の細胞を最播種し、6代まで継代した。培養した細胞は α Smooth muscle actin(α SMA)およびcalponin抗体で免疫染色をおこなった。

ハンギングドロップ培養

DMEM培地0.2, 1, 10%ウシ胎児血清(FBS)条件または、DMEM培地50%ニワトリ胚抽出液(EE)条件を用いた。EEは12日胚の胚全体を取り出してDMEM培地に1:1で混ぜ、ブレンダーにかけたものを遠心し、その上澄を用いた。シャーレの蓋に20 μ lの培地を滴下し、培地

の中に細胞塊を入れた後、PSBを入れたシャーレに蓋を被せることでハンギングドロップにし、CO₂インキュベーターで培養した。培養した細胞塊は、凍結切片作成後、 α SMAおよびcalponin抗体で免疫染色をおこなった。

C. 研究結果及び考察

C-1. 培養中の砂囊平滑筋細胞の分化状態

昨年度の研究で確立したDMEM培地1, 10% FBS条件での砂囊平滑筋の細胞塊からの培養で、培養後の平滑筋は α SMA 陽性ではあったが、その形態はスピンドル型から広がって仮足が見られる形態まで様々だった。そこで、 α SMA や calponin の強度、細胞内局在も含めてその分化状態を確認した。

① 細胞塊からの這い出しと培養平滑筋細胞の性質

培養すると、平滑筋細胞塊から著しく細いスピンドル型の細胞が分裂しながら這い出してくる。この時、細胞は密で、核は小さく、 α SMA は弱陽性、calponin は細胞全体で見られた。これは、培養前の14日砂囊平滑筋組織と同様であるため、分化型平滑筋の状態だと考えられる。一方、這い出した細胞は細胞塊から離れると、細胞密度が下がり、形態はスピンドル型で α SMA は陽性、calponin は細胞の一部、核周辺のみで見られた。これは、平滑筋から筋線維芽細胞へと変化する途中であると考えられる。

これらの細胞を継代すると、細胞は徐々に密度を下げ、それと同時に核は大きくなり、 α SMA が強く発現、calponin は細胞の一部みに発現または見られなくなることが判明した。

この結果から、培養した細胞は細胞塊から離れると、細胞形態、密度、核の形態、収縮タンパク質の発現が変化することが示唆された。また、培養を続けると、細胞はさらに変化し、筋線維芽細胞の特徴を示すことがわかった。

② FBS 濃度と培養平滑筋細胞の性質

FBS の濃度を変えると、高濃度(10%)の方が、低濃度(1%)の時よりも増殖が早いことが、昨年度の研究からわかっていた。一方、細胞塊からの這い出しは、1%では培養2, 4, 6日の全てで見られたが、10%では培養2日より後ではほとんど見られなかった。さらに10%の培養4, 6日では、細胞塊の近辺でも細胞密度

が下がり、形態はスピンドル型で α SMA は陽性、calponin は細胞の一部、核周辺のみで見られたため、筋線維芽細胞様に変化をおじていることが示唆された。

③ 細胞塊の大きさの違いと培養平滑筋細胞の性質

次に細胞塊の大きさで培養細胞の状態を比較した。比較的大きな細胞塊からは著しく細いスピンドル型の細胞が這い出し、細胞は密で、核の大きさ、 α SMA, calponin の発現様式から、分化型平滑筋の状態と考えられた。一方、小さな細胞塊から這い出した細胞は、すぐに変化し、筋線維芽細胞様になった。

④ 単離細胞の培養と細胞階からの培養の比較

細胞塊の大きさが培養細胞の分化に影響しているという結果が出たため、単離細胞と細胞塊培養の比較をおこなった。細胞塊からの培養では、1%FBS条件、培養2, 4, 6日で細胞塊の周辺で分化型平滑筋が維持され、細胞塊から離れたところで、スピンドル型で α SMA は陽性、calponin は細胞の一部という、筋線維芽細胞様になった一方、同様の培養液を使った単離細胞の培養では、培養2日ですべての細胞が筋線維芽細胞様となり、6日では広がった線維芽細胞状の形態を示し、筋線維芽細胞となったことが示唆された。

このように単離細胞からの培養では、砂囊平滑筋はその特徴を早く失う。単離細胞の細胞密度は初めから疎であることが原因の一つであると考えられる。

C-2 細胞塊の3D培養方法の確立

細胞塊の培養からは、這い出してすぐの細胞は蜜で平滑筋の特徴を保っているが、その外側では密度が下がり筋線維芽細胞様に変化すること、また、単離細胞の培養では、すぐに平滑筋の特徴を失うことがわかった。これらの結果から、培養時の平滑筋細胞の密度が分化の維持に重要なのではないかと仮説を立てた。平面培養では、細胞は単層で増殖するのに対し、3D培養では細胞同士が密着したまま培養できる。そこでハンギングドロップ法で砂囊平滑筋細胞塊の培養を試みた。

まず、DMEM培地0.2, 1, 10% FBS条件で平面細胞塊培養と同様の大きさの細胞塊を10個程度入れ、ハンギングドロップ法で培養した。6日間の培養を行ったが、細胞塊培養どうしはあまり接着しなかった。そこで、0.2-0.5mm程の大きめの14日砂囊組織片をハンギング

ドロップ法で培養した。すると、DMEM 培地 0.2, 1 %FBS 条件下では、細胞塊はあまり大きくならなかったが、DMEM 培地 10%FBS 条件下では、細胞塊の直径は 1.5-2 倍程度大きくなった。この後、この細胞塊を 28 日間培養したが、培養 7 日以降、その直径は大きくなり、14 日から 21 日の間に細胞塊は小さくなった。

次に DMEM 培地 10%FBS 条件にくわえ、ニワトリ消化管器官培養でよく用いられるニワトリ胚抽出液 (EE) を 50%含む DMEM でも 1, 4, 6 日間ハンギングドロップ法で培養し、細胞塊内部の細胞の状態を調べた。

培養 1 日では、どちらの培養液でも細胞塊全体に α SMA, calponin が発現しており、内部の細胞の並びは砂囊平滑筋組織と似ていた。その後 4 日や 6 日では、FBS を添加した DMEM で培養した細胞塊はそのまま組織片全体で α SMA, calponin が発現したが、平滑筋特有の組織構築は消失し、細胞は方向性なく並んでいた。一方、EE を含む DMEM で培養した細胞塊では、 α SMA は組織全体で発現したが、一部の細胞が calponin を発現する非常に密な塊を作っていた。この calponin 陽性細胞塊は細胞塊の内部、または一方の端に存在し、細胞塊は明瞭な二層構造になっていた。また EE を含む培養液で培養した細胞塊は、明視野での観察でも光の透過性が低く、細胞が密であることを示していた。どちらの培養でも組織培養で細胞塊の中心によく見られるネクロシスは観察されなかった。

D. 結論と今後の展望

本年度の実験で、細胞塊からの平面培養では細胞が密でいるところでは平滑筋分化を維持できるが、細胞間の接着が無くなると、筋線維芽細胞への変化が促進されることが示唆された。また、分化状態を保つため、細胞を密着させたまま培養する、砂囊平滑筋の 3D 培養系を確立しつつある。今後は、3D 培養での細胞の形態の観察、FBS と EE での培養で違う組織構築ができる機構、それぞれの条件での増殖効率、他の因子を加えることでより平滑筋組織に近い培養ができるかなどを調べて行く予定である。また、砂囊平滑筋の 3D 培養系の確立後は、細胞接着だけでなく、細胞増殖が平滑筋分化にどのような影響を与えるかを調べるため、YAP/TAZ シグナルに注目して解析する予定である。

E. 研究発表

1. 論文発表
なし
 2. 学会発表
なし
- F. 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