

## 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確保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。

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。屠場で得るウシの臓器を用いた細胞培養系では、細かい臓器の部位差や個体の年齢差を選択することは困難である。そこで、初年度はマウスを用いて同じ消化管でも大腸と小腸から繊維芽細胞様の細胞を採取した。また、老個体と若齢個体の骨格筋から同じく繊維芽細胞様の細胞を採取した。それぞれ採取した細胞の遺伝子発現解析をおこない、臓器部位と個体年齢という二つの因子について、細胞培養食品の安全性確認に関する事項について考察した。

（臓器の部位差）マウスの大腸筋層、ならびに小腸筋層を採取し、Platelet Derived Growth Factor (PDGF)  $\alpha$  receptor (PDGFR $\alpha$ )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、同じ消化管筋層の同じ繊維芽細胞様細胞であっても、大腸と小腸では発現遺伝子群は大きく異なることが明らかになった。

（個体の年齢）次に、成熟個体マウス（8週齢）と老個体マウス（36カ月齢）の腓腹筋よりPDGFR $\alpha$ 陽性の繊維芽細胞様間質細胞をFACS cell sorterにて採取してRNAseq解析を行った。その結果、老化個体より採取したPDGFR $\alpha$ 陽性繊維芽細胞様間質細胞では、炎症や線維化に関する遺伝子群の発現が亢進していることが明らかになった。

以上の成績から、細胞培養食品の安全性基準の一つとして、細胞を採取する臓器の部位の均一性、細胞を採取する個体年齢の均一性が重要と考えられた。

なお、本年度は、ウシの気管平滑筋細胞を用いたウシ胎児血清を用いた細胞培養系についても樹立したことから、次年度はウシの気管平滑筋細胞の培養系を用いた細胞培養食品の安全性確認に関する検証を実施する。

## 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確保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。

（初年度の研究目的） 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。しかし、屠場で得るウシの臓器を用いた細胞培養系では、細かい臓器の部位差や個体の年齢差を選択することは困難である。そこで、初年度はマウスを用いてこの2点について検討する。すなわち、同じ消化管でも大腸と小腸から繊維芽細胞様の細胞を、また、老個体と若齢個体の骨格筋から同じく繊維芽細胞様の細胞を採取し、それぞれの遺伝子発現解析を行い比較解析することで、同一臓器での部位差や細胞を採取する個体の年齢差に起因する細胞培養食品の安全性指針について考察することを目的とした。また、ウシの気管平滑筋を単離し、ウシ胎児血清下の培養条件を確定し、ウシ気管平滑筋の継代によって変動する遺伝子発現解析のためのRNAサンプルを集積する。

## 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マウスから、

大腸と回腸、並びに腓腹筋を採取した。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 Derived Growth Factor Receptor  $\alpha$  (PDGFR $\alpha$ ) を発現する繊維芽細胞様の間質細胞（以下P $\alpha$ 陽性繊維芽細胞様細胞）を採取した（CD31<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>細胞集団）。大腸と小腸筋層由来のP $\alpha$ 陽性繊維芽細胞様細胞は8週齢の雄マウスを用いた。腓腹筋からのP $\alpha$ 陽性繊維芽細胞様細胞は成熟マウス（8週齢雄）と老齢マウス（36カ月齢雄）から採取した。さらに、成熟マウスと老齢マウスの心臓、小腸、肺、脂肪、肝臓からもP $\alpha$ 陽性繊維芽細胞様細胞を採取した。

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%コンフレントの状態まで継代した。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実験者で同様に実験を行い、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

（消化管の異なる部位から採取した同一細胞の発現遺伝子変動）

マウス大腸と小腸の筋層よりP $\alpha$ 陽性繊維芽細胞様細胞を採取し遺伝子発現解析を行った。結果、大腸由来P $\alpha$ 陽性繊維芽細胞様細胞では細部外基質系、細胞外骨格系、外部カプセル構造体系の遺伝子群の発現が多かったのに対して、小腸由来P $\alpha$ 陽性繊維芽細胞様細胞では血液循環系、細胞間接着制御系、細胞接着の正の制御系の遺伝子群の発現が多く、大腸での結果と大きく異なっていた。以上の成績から、同じ消化管の同一細胞（P $\alpha$ 陽性繊維芽細胞様細胞）であっても、部位が異なるだけで両細胞の発現遺伝子は全く異なることが明らかに

なった。

(成熟個体と老齢個体から採取した同一細胞の発現遺伝子変動)

まず、成熟個体と老齢個体から採取したP $\alpha$ 陽性繊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、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共通して低かった。さらに骨格筋のP $\alpha$ 陽性繊維芽細胞様細胞に着目し、他の臓器に無く、骨格筋においてのみ老化によって発現が大きく変動する遺伝子について解析したところ、細胞外マトリックス系の1遺伝子の顕著な減少を見出した。この細胞外マトリックスの遺伝子欠損マウスでは、確かに筋力が低下し骨格筋の萎縮が生じることを確認した。このように、臓器特異的に老化によって変動する遺伝子があることが示された。

(ウシ気管平滑筋培養細胞)

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細胞培養した。得られた細胞は $\alpha$ SM-アクチン抗体陽性の平滑筋細胞であることを確認した。初代培養細胞並びに25代培養細胞よりそれぞれRNAを抽出し、RNAseq解析をおこなった。解析結果は次年度に得られる。

#### D. 結論

以上の成績から、細胞培養食品の安全性基準の礎となる考えとして、以下のことが考察された。1) 細胞培養に使用する細胞を採取する臓器の部位を一定部位に均一化することの重要性。2) 細胞培養に使用する細胞を採取する個体の年齢を一定の年齢にすることの重要性、がそれぞれ示された。2) において、採取する細胞の個体として老齢個体は不適であるか否か、明確な結論を出すことはできなかった。今後、生体に有害な炎症性物質を産生する酵素の発現変動や、発がん誘導に関与する物質産生に関与する遺伝子発現などについて別途解析を進めていくことが重要と考えられた。しかし、

今回骨格筋においてのみ老化によって低下する遺伝子を見出した例を考慮すると、成熟個体からの細胞採取が望ましいと考えられた。

#### 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) 34: 101478.

DOI: 10.1016/j.bbrep.2023.101478

##### 2. 学会発表

茶圓貴志、黒澤珠希、岸和寿、梶典幸、堀正敏、小腸、大腸PDGFR $\alpha$ +細胞の生理機能解明、第146回日本薬理学会関東部会 (2022. 6. 18)

#### 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