

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

昨今、培養肉（細胞培養食品）作成がさまざまな企業から発表されているが、その多くは骨格筋由来細胞を培養し、加工しているものである。本分担研究では、筋細胞のまま分裂できる胚の平滑筋の特徴を生かして、新たな細胞培養食品のソースとなりうるかを検証し、併せて分化増殖過程におけるハザードについて検討した。特に注目するのは、ニワトリ胚の砂嚢である。鳥類での二番目の胃である砂嚢は、一番目の胃である前胃や後方につながる十二指腸などと比べて著しく発達した平滑筋を持つ臓器で、この発達した平滑筋で機械的消化を担っている。砂嚢では、平滑筋の前駆細胞である間充織でも分裂能が高いが、平滑筋に分化してからもよく分裂し、平滑筋層が厚くなる。そこで、砂嚢平滑筋細胞の培養下における分裂能を調べることにした。血管平滑筋では、増殖刺激を与えると平滑筋は種々の収縮タンパク質の発現量が落ち、脱分化することが知られている。砂嚢の細胞培養でも脱分化がどのような条件で起こるかを調べた。

ニワトリ 14 日胚の砂嚢から平滑筋層を取り出し、ピペッティングで数 100 個の細胞が含まれる細胞塊を作り、コラーゲンコートしたディッシュに撒き、0、5、10%ウシ胎児血清を含む DMEM 培地で培養したところ、単離細胞の培養と比べ増殖が速く、細胞塊から多くのスピンドル型の細胞が這い出し、7 日でコンフルエントになった。これらの細胞は α Smooth muscle actin および calponin 陽性の細胞だった。これを継代してゆくと、徐々に、仮足を伸ばし広がった形態の細胞が増え、6 代目には多くが広がった細胞になった。それと同時に calponin 陽性細胞の割合も減っていった。また、核の大きさが大きくなっているのも観察できた。

次に、砂嚢と比べ、平滑筋の発達が悪い小腸の平滑筋は砂嚢と同条件で培養した際に、どのような動態を見せるかも調べた。砂嚢で増殖が盛んな条件で小腸の平滑筋細胞塊を培養したが、あまり増殖せず、7 日目になっても細胞数は増えなかった上、形態も広がった繊維芽細胞状だった。

以上の結果から、ニワトリ胚砂嚢は、細胞塊で培養するとよく増殖し、分化状態も保っていることから、新たな細胞培養食品のソースになりうると考えられる。ただし、単離細胞での培養と細胞塊での培養では、増殖能、細胞形態に違いがあったことから、培養方法による脱分化リスクへの対応が必要となると考える。すなわち、分化増殖過程におけるハザードとしては、単離細胞と細胞塊という培養条件の違いにより細胞の分化状態が異なり、目的とする細胞と異なる性質を生じる可能性が高く、この分子機序解明がその方策につながるものと考えられる。さらに継代すると脱分化が進むことも示唆された。平滑筋が脱分化した筋線維芽細胞と分化した平滑筋を見分ける方法として、核の大きさが使えるかを今後検討したい。また、小腸平滑筋を培養すると、増殖刺激に対してあまり反応せず、形態も筋線維芽細胞に近かった。このため、砂嚢平滑筋の高い増殖能は消化管平滑筋に共通の性質ではなく、砂嚢特異的であると考えられる。また、今回は増殖刺激としてウシ胎児血清を加えたが、より直接的に増殖を刺激する YAP/TAZ シグナル調節因子を加えて、増殖能を上げたときに細胞分化がどうなるかを調べていきたい。

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」は、現在のところ骨格筋をターゲットにしている場合が多い。多核で分裂しない筋細胞をもつ骨格筋では、前駆細胞である筋芽細胞または生体幹細胞であるサテライト細胞を培養したのち、分化させて筋細胞を作る方法が使われている。一方、平滑筋は筋細胞が分裂可能であり、より簡便な細胞培養食品のソースの候補として有効と考えられる。しかし、平滑筋をこの観点から研究した報告はほとんどなく、培養方法やソース組織による増殖能の差や、脱分化の危険性などの基礎的知見を積み上げる必要がある。本分担研究では、本年度消化管平滑筋、特に砂囊平滑筋が細胞培養食品のソースになりうるか、またそのリスクの解析を研究目的とした。

平滑筋は血管壁、消化管壁、呼吸器壁、泌尿生殖器壁などに豊富にみられる。そのうち血管平滑筋は増殖の研究が進んでおり、分化した血管平滑筋は増殖刺激を与えると、収縮型から脱分化し、収縮タンパク質の発現が下がった増殖型になると言われている。一方、消化管平滑筋に関しては血管平滑筋に比べ、脱分化しにくいと言われているが、培養方法や部域による増殖能や脱分化を研究したものは少ない。そこで本研究では消化管平滑筋に注目した。特に、咀嚼器官として働くため、平滑筋が著しく発達し、筋胃とも呼ばれている鳥類胚の砂囊に注目した。砂囊の平滑筋は多くの平滑筋が単離できること、平滑筋としては珍しく収縮がPhasic型であることなどから、平滑筋の生化学、生理学的な研究の材料としてよく使われている。

砂囊平滑筋は内臓板中胚葉に由来する間充織から分化する。消化管は発生初期では、食物の通る穴に面した上皮と、それを取り囲む間充織から成る。上皮は消化管の各部域で全く違った形態及び遺伝子発現を行い、さまざまな形態を取ることで、さまざまな消化機能を担うことが知られている。一方、間充織は上皮ほどバリエーションがなく、まず、上皮に近い内側から結合組織と平滑筋に分かれ、移動してきた神経堤細胞が神経叢として最外層に位置する三層構造をとる。その後、上皮を中心として同心円状に粘膜固有層、粘膜筋板、粘膜下層、筋層、神経叢、漿膜

という、どの領域でも似た構造となることが知られている。砂囊では、筋層が他の領域に比べ、早く分化し、かつ著しく厚い。既に、6日胚で隣接する小腸よりも厚い間充織を持つ。この間充織の大半が10、11日胚でsmooth muscle actinを発現する平滑筋へと分化し、その後も盛んに増殖することで、厚い筋層を獲得する。

ここで砂囊では、間充織の増殖が高いだけでなく、平滑筋に分化した後も増殖能できることは、細胞培養食品のソースとして注目に値する。ただし、砂囊平滑筋は単離細胞培養では、インスリンによる増殖刺激で分化を保って培養でき、FBSによる増殖刺激で筋線維芽細胞(myofibroblast)に脱分化すると言われている。本研究では、砂囊が細胞培養食品のソースとなりうるかを、単離細胞の培養ではなく細胞塊からの培養を行うことで調べた。また、継代による増殖、脱分化への影響も調べた。

砂囊平滑筋に比べ、小腸平滑筋層は薄い。2つの隣接する臓器の平滑筋の違いはどの様に生まれるのか。可能性の一つは砂囊と小腸の平滑筋は同様の増殖能を持つが、砂囊には増殖促進因子があるため、増殖するというもので、もう一つは砂囊の平滑筋は小腸の平滑筋と比べ、増殖能が元々高いというものである。これを明らかにするため、ニワトリ胚の砂囊、小腸の平滑筋の培養を行った。砂囊平滑筋の分裂能が消化管平滑筋に共通のものなのか、砂囊平滑筋特異的なのかを調べた。

B. 研究方法

ヒペコネラ種のニワトリ14日胚を用いた。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(A4-11)に従って実施した。14日胚の砂囊、小腸を取り出し、平滑筋層を単離した。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を作成した。この細胞塊をDMEM培地0、5、10%ウシ胎児血清条件で、コラーゲンコートしたディッシュ、チャンバースライドに播種した。砂囊に関しては、細胞塊をさらにピペッティングし、シングルセルにしたものも、同様の条件で播種した。

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. 砂囊平滑筋単離細胞と細胞塊の培養

砂囊平滑筋の細胞塊からの培養では、DMEM培地5または10% ウシ胎児血清条件下で細胞塊から α Smooth muscle actin陽性細胞が這い出し、7日でコンフルエントになった。これらの細胞はスピンドル型でcalponin陽性だった。一方、単離細胞ではDMEM培地10% ウシ胎児血清条件下で細胞は増殖したものの、細胞塊からの培養ほどは増殖せず、9日後にもコンフルエントにはならなかった。全ての細胞は α Smooth muscle actin陽性ではあったが、スピンドル型の形態をとる細胞と薄く広がった形のもの混じっていた。

C-2. 継代に伴う細胞の形態変化

コンフルエントになった砂囊平滑筋培養細胞を1/10希釈して播種すると、約7日間の培養で再度コンフルエントになり、継代を続けることができた。6回目の継代の後、7日間の培養でコンフルエントにならなくなったため、培養を中止した。6代の培養を通じ、全ての細胞は α Smooth muscle actin陽性だったが、calponin陽性細胞は始め100%陽性だったが、徐々に下がり、6代目では約5%にまで下がった。形態も最初の2代の継代ではスピンドル型だったが、その後薄く広がり仮足をたくさん出す形のもの現れ、4代目以降は細いスピンドル型のは非常に少なくなった。

C-3. 小腸平滑筋の培養

小腸平滑筋は砂囊平滑筋とくらべ、シャーレ底面への接着が悪く、接着したのも増殖能は砂囊平滑筋と比べて著しく低かった。そのため、這い出してくる細胞数は少なく、コンフルエントになることはなかった。7日培養後に調べたところ、全ての細胞は α Smooth muscle actin陽性だったが、calponinの発現は弱いものと強いものがあり、細胞塊の近傍ではスピンドル型をしているが、すぐ外側では薄く広がり仮足をたくさん出す形のもの

が見られた。

C-4. 考察

砂囊平滑筋は細胞塊での初代培養をすることで、よく増殖し、かつタンパク質の発現やその形態から分化を維持していることが考えられる。単細胞で播種した時とかなり違う培養結果になったが、細胞接着因子やそれに伴う細胞内のシグナルの違いがあったと考えられる。

また、小腸平滑筋に対しては同様の培養が同じ効果にならないことから、増殖刺激に対する反応性が高いことは消化管平滑筋の特徴というよりも、砂囊平滑筋の特徴と言える。

一方継代を続けるとcalponin非陽性細胞が現れること、形態も仮足の多い線維芽細胞型になることなどから、筋線維芽細胞に脱分化が進んだと考えられる。本培養で平滑筋の分化をどこまで保っているかはsmoothelinの発現やカルバコール投与による収縮が見られるかなどを調べてゆく必要がある。

D. 結論と今後の展望

本研究で、ニワトリ胚砂囊平滑筋は増殖刺激に反応し、盛んに増殖することから、細胞培養食品のソース組織の候補であることが示唆された。ただし、培養方法（単離細胞or細胞塊）や継代回数などによっては脱分化した筋線維芽細胞の出現がリスクファクターとなると考える。すなわち、分化増殖過程におけるハザードとしては、単離細胞と細胞塊という培養条件の違いにより細胞の分化状態が異なり、目的とする細胞と異なる性質を生じる可能性が高く、この分子機序解明がその方策につながるものとする。筋線維芽細胞と平滑筋の明確な区別は難しいが、培養を続けると、核が大きい細胞が出現することが観察された。今後は培養における核の大きさのばらつきとcalponinの発現を比べ、脱分化した細胞の簡便な区別ができるかどうかを試すつもりである。

また、今回は増殖刺激としてウシ胎児血清を加えたが、より直接的に増殖を刺激するYAP/TAZシグナル調節因子を加えて、増殖能

を上げたときに細胞分化がどうなるかを調べていきたい。

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