

# I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
令和4年度 総括研究報告書

フードテックを応用した細胞培養食品の先駆的な調査検討による食品衛生上のハザードや  
リスクに係る研究 -リスクプロファイルの作成とモデル細胞実験系による検証・還元-  
(22KA1005)

研究代表者 北嶋 聡

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部 部長

### 研究要旨

フードテック、すなわち食に関する最先端技術を活用した、食料システムの構築や国民の健康増進に資する食品の探索などの観点から、従来の生産方法とは異なる新たな方法で作られる、又はこれまでに食経験のない、若しくはこれまでとは違った方法により摂取されるような新規食品の研究開発が進められている。この代表例としては、骨格筋細胞といった家畜・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、「いわゆる培養肉」（肉と称するのは適切とは限らないため、以降「細胞培養食品」とする）の研究開発が国内外で進展している。現時点で国内では、技術の確立や市場化の目途は立っていないが、様々な研究会の設立をはじめ、研究開発の加速が見込まれ、将来、フードテックを活用した様々な「細胞培養食品」の上市化が想定され、その安全性確保に向けた課題の抽出について検討すべきタイミングを迎えている。本調査研究では、特に「細胞培養食品」に着目し、この食品衛生上の取扱いを検討するため、そのハザードやリスクの特定に向けた課題の抽出をおこない、リスクプロファイルの作成ならびに、想定される今後の動向と方策につき考察することを目的とする。この際、学術的に能動的な調査に努め、あわせて、「細胞培養食品」のモデルとなり得る独自の細胞培養実験系を用いて、抽出した課題の妥当性について検証し、またこの結果を調査の方に還元し、その確度について補強する（先駆的な調査検討）。<各年度の目標> 令和4年度：ハザードやリスクの特定に向けた課題の抽出、令和5年度：リスクプロファイルの検討と抽出した課題の妥当性についての検証、令和6年度：リスクプロファイルの作成及び安全管理の提案。

本研究では具体的には、1) 細胞培養食品の食品衛生上のハザードやリスクに係る調査を行い、2) 調査において懸念されたハザードの事象につき、エピジェネティクス解析等を検討し、また 3) モデルとなるウシやニワトリ由来の細胞の分化増殖過程におけるハザード解析を検討する。そして、これらの結果を調査(1)の方に還元し、その確度について補強する。併せて、各種モデル系に係る補完的検討も実施し連携の向上と円滑な進捗を図る。

令和4年度（初年度）は予定通り、1) 細胞培養食品の食品衛生上のハザードやリスクに係る先駆的な調査検討を、特に開発動向、ならびに安全性や衛生規制の動向を中心に、Web上の公開情報の調査を実施し、それぞれの特徴を抽出した。調査に先立ち、細胞培養食品に関する便宜的な分類表を用意し、これに基づき調査結果を整理した。それぞれの特徴の例として、開発動向としては、シンガポール政府による世界初の承認事例を挙げることができ、規制動向に関しては、シンガポールをはじめ、EU、オーストラリア・ニュージーランドでは、Novel Foodの枠組みの中で細胞培養食品を取り扱っていることを見出したことを挙げるができる。さらに、本調査における検討をもとに、細胞培養食品に関して想定され得る潜在的なハザードの抽出を行った（北嶋）。なお補完的な検討として、ハザード要因として懸念されるプリオンの発現制御に関し、レポーター遺伝子アッセイにより、正常型プリオン蛋白質の筋細胞での遺伝子発現制御につき検討中である。2) モデル細胞の分化増殖過程におけるエピジェネティクス解析では、個体生存に必須である様々な細胞応答に関与する約800遺伝子を同定し、この内、脂質代謝に関与する2遺伝子に着目し解析した結果、セラミド分子の量的変化により、胚葉分化の異常を伴う細胞の分化異常が生じることを明らかとした（仁科）。3) モデル家畜・家禽細胞の分化増殖過程におけるハザード解析では、家畜細胞については、年齢差及び部位差の比較検討を成熟及び老化マウス内臓（骨格筋、肝、肺、消化管、心）由来の線維芽細胞を用い発現遺伝子を解析した（堀）。一方、家禽細胞については、ニワトリ胚砂嚢平滑筋を用いて検討した結果、他の消化管平滑筋と異なり、細胞増殖時でも例外的に分化状態が維持されること、またこの培養条件を見出した。引き続き、この機序を探索中である（福田）。以上の解析結果は、細胞培養食品の作製に際しての、使用する年齢・臓器部位・培養条件などの様々な選択理由に資する成果と考える。

本研究により、「細胞培養食品」の食品衛生上の安全性確保に向けた課題や方策が明らかとなることが期待され、その安全性確保に資する基礎的資料の作成といった行政支援として寄与することが期待される。

研究分担者

仁科博史 東京医科歯科大学・難治疾患  
研究所・未来生命科学研究所・  
発生再生生物学分野・所長/教授  
堀 正敏 東京大学大学院・農学生命科学  
研究科・獣医薬理学研究室・  
教授  
福田公子 東京都立大学・理学研究科 生命  
科学専攻・准教授

## A. 研究目的

(背景) フードテック、すなわち食に關する最先端技術を活用した、食料システムの構築や国民の健康増進に資する食品の探索などの観点から、従来の生産方法とは異なる新たな方法で作られる、又はこれまでに食経験のない、若しくはこれまでとは違った方法により摂取されるような新規食品の研究開発が進められている。この代表例としては、骨格筋細胞といった家畜・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「いわゆる培養肉」(肉と称するのは適切とは限らないため、以降「細胞培養食品」とする)の研究開発が国内外で進展している。現時点で国内では、技術の確立や市場化の目途は立っていないが、様々な研究会の設立をはじめ、研究開発の加速が見込まれ、将来、フードテックを活用した様々な「細胞培養食品」の上市化が想定され、その安全性確保に向けた課題の抽出について検討すべきタイミングを迎えている。

(目的) 本調査研究では、特に「細胞培養食品」に着目し、この食品衛生上の取扱いを検討するため、そのハザードやリスクの特定に向けた課題の抽出をおこない、リスクプロファイルの作成ならびに、想定される今後の動向と方策につき考察することを目的とする。この際、学術的に能動的な調査に努め、あわせて、「細胞培養食品」のモデルとなり得る独自の細胞培養実験系を用いて、抽出した課題の妥当性について検証し、またこの結果を調査の方に還元し、その確度について補強する(先駆的な調査検討)。

(必要性) 持続可能な開発目標(SDGs)の

課題に取り組む機運の高まりと呼応し、国内外ともに「細胞培養食品」の開発が革新的に迅速に進む一方で、食経験がない、あるいは従来法とは異なる方法により作製されることが想定されることから、その食品衛生上の安全性確保に向けた課題の抽出や方策だては急務となっている。

(特色・独創的な点) 申請者らは基礎発生学あるいは畜産獣医学の立場から、本調査研究の核心である細胞の分化・増殖に関する国内を代表するエキスパートであり、また研究代表者の所属する毒性部は、日本における食品の安全性確保に係るセンター的役割を担うべく、基礎的研究から応用研究まで幅広い活動を行っているという特徴を有する。

(期待される効果) フードテックを応用した新開発食品には大きく3種、すなわち、大豆などの「植物由来食肉様食品」、昆虫由来たんぱく質などの「代替たんぱく質製品」、及び、当該の「細胞培養食品」が存在するが、この内、食経験がなく、若しくはこれまでとは違った方法により作製されるという観点から、リスクプロファイルの作成が重要となる「細胞培養食品」に特に着目する。本調査研究により、「細胞培養食品」の食品衛生上の安全性確保に向けた課題や方策が明らかとなることが期待され、その安全性確保に資する基礎的資料の作成といった行政支援として寄与することが期待される。この際、調査研究だけではなく、この分野を代表する研究者らにより、実際にモデルとなる細胞培養系を用いて、検証とその検討結果の還元というサイクルを通して、ハザード予測の範囲と精度を含め、課題の妥当性を検証し、その確度について補強する。同時にこの課題への方策を通して、食品衛生上の安全性を担保した上での「細胞培養食品」の開発につながれば、その安全性について国際的にアピールする上でも重要な成果となり得る。

また成果物については言うまでもなく、国内のみならず国際的なコンセンサスを得られるレベルを以って、「細胞培養食品」に係る安全性確保への提案に繋がるように図る。以って、振興と規制の両面からの切れ

目のない俯瞰的・長期的政策立案に寄与することが期待される。

＜各年度の目標＞ 令和4年度：ハザードやリスクの特定に向けた課題の抽出、令和5年度：リスクプロファイルの作成と抽出した課題の妥当性についての検証、令和6年度：リスクプロファイルの作成及び安全管理の提案。

## B. 研究方法

本研究では具体的には、1) 細胞培養食品の食品衛生上のハザードやリスクに係る調査を行い、2) 調査において懸念されたハザードの事象につき、エピジェネティクス解析等を検討し、また3) モデルとなるウシやニワトリ由来の細胞の分化増殖過程におけるハザード解析を検討する。そして、これらの結果を調査(1)の方に還元し、その確度について補強する。併せて、各種モデル系に係る補完的検討も実施し、連携の向上と円滑な進捗を図る。これに呼応するかたちで、研究班を次の4つの分担課題によって構成し、研究を開始した。すなわち、細胞培養食品の食品衛生上のハザードやリスクに係る先駆的な調査検討と研究の総括(北嶋)、モデル細胞の分化増殖過程におけるエピジェネティクス解析(仁科)、モデル家畜細胞の分化増殖過程におけるハザード解析(堀)、モデル家禽細胞の分化増殖過程におけるハザード解析(福田)。

令和4年度(初年度)は予定通りに、それぞれの分担研究課題に取り組んだ。以下に実験方法の概要を示す。

### B-1: 細胞培養食品の食品衛生上のハザードやリスクに係る先駆的な調査検討：

細胞培養食品に関し、国内外ともに主として以下の4項目について調査を実施する。すなわち、1) 開発の動向、2) 安全性や衛生規制の動向、3) 新たなリスク管理方法の動向、及び4) 食肉産業界ならびに消費者の受け止め(含、リスクコミュニケーション)についての情報。この際、単調な情報収集・整理に終始するのではなく、初代培養系なのか細胞株培養系なのか等、学術的な基軸を拠り所とした能動的な調査に努める。また

併行して、研究分担者の各種モデル系に係る補完的検討も実施し、また連携の向上と円滑な進捗を図る。

令和4年度(初年度)は、1) 開発動向、ならびに2) 安全性や衛生規制の動向を中心に、Web上の公開情報の調査を実施した。「開発動向」については、細胞培養食品に関する研究開発を資金面などで推進する米国のGFI (Good Food Institute) が公開している関連企業データベースから、知名度や予算獲得状況、開発の進捗状況等を勘案して、なるべく国や開発品の種類が偏らないように開発企業12社を選定して事例調査の対象とした。各企業の開発状況についての情報は、当該企業のホームページを中心に調査を行った。

「安全性や衛生規制の動向」に関する調査対象国は、日本、比較的議論が進んでいると思われるシンガポール、米国、欧州、オーストラリア及びニュージーランドとした。各国における規制の主体となる組織、法律、安全性確保措置などを調査対象とした。規制に関する組織として、例えば、日本では内閣府食品安全委員会、厚生労働省、農林水産省、環境省、消費者庁を、シンガポールではSFA (Singapore Food Agency)、米国ではFDA (Food and Drug Administration)、USDA-FSIS (United States Department of Agriculture - Food Safety and Inspection Service)、欧州ではEUレベルでのEFSA (European Food Safety Authority)、各国レベルではイギリスのFSA (Food Standards Agency) 及びオランダのNVWA (Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit (オランダ語名称)、Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority (英語名称))、オーストラリア及びニュージーランドではFSANZ (Food Standards Australia New Zealand) を中心に調査した。

また、インターネット検索においては、培養肉を意味する以下のキーワードで検索を行った: クリーンミート、細胞農業、純肉、培養肉、animal free meat、cell-based meat、cellular agriculture、clean meat、cultivated meat、cultured meat、in-vitro

meat, lab-grown meat, slaughter-free meat. 包括的な情報収集を行った期間は、令和4年(2022年)6月下旬から8月下旬であり、個別に各項目において情報更新の都度、随時反映した。

＜補完的検討としてのプリオンの発現制御に関するレポーター遺伝子アッセイ＞

補完的検討により、連携の向上と円滑な進捗を図る。具体的には、ハザード要因として懸念されるプリオンの発現制御に関し検討することとした。正常型プリオン蛋白質の筋細胞での遺伝子発現制御を明らかにするため、株化筋細胞を用い組織特異的に転写制御される培養条件(増殖期間、ストレス等)や培地成分(増殖因子や分化因子等)の有無について検討するため、マウス横紋筋由来細胞株 C2C12 及び比較対象としてマウス神経由来細胞株 Neuro-2a を用い、レポーター遺伝子アッセイ系として pNL2.2[NlucP/Hygro]ベクターにプリオン遺伝子のプロモーター領域約1000bpを導入したベクターを作製し検討した。

B-2:モデル細胞の分化増殖過程におけるエピジェネティクス解析:

細胞培養食品作製過程においてがん化や、DNA やヒストンへの後天的な化学修飾により制御される遺伝現象である「エピジェネティクス」を介した有害影響が誘発される可能性が懸念される。そこで調査の結果を待たずして、「細胞培養食品」のモデルとして、独自に工夫した発がんマウスと老化促進マウスの細胞の培養系を用いて、正常細胞との比較を行い、食の安全性について考察する。次世代シーケンサーと質量分析装置を用いた遺伝子解析とメタボローム解析により、がん化や老化時のエピジェネティクスや遺伝子発現、代謝産物の変化を明らかにする。本評価系の研究成果を、調査によって得られる食品衛生上のハザードの妥当性に還元し、補強する。

初期胚発生に観察される原始線条 (PrS) は中胚葉を生成し、その後の中胚葉以外の内胚葉や外胚葉由来のほぼすべての器官形成にも影響を及ぼす。それゆえ、PrS 形成の

理解は正常器官形成の理解に重要である。しかしながら、PrS は微小で一過性の組織であるため、その形成機構の解明は困難である。研究分担者らは、先ず PrS 形成に必須な遺伝子を同定する目的に、PrS の形成不全が致死的事であることに基づき、2種類のノックアウトマウスデータベースを用いて包括的なスクリーニングを実施した。

データベーススクリーニング

候補遺伝子は、本文に記載したように MGI データベース (Mouse Genome Informatics, <http://www.informatics.jax.org/>) および IMPC データベース (International Mouse Phenotyping Consortium) 33, 34 をスクリーニングすることにより選定した。本研究で使用したデータは、2021年5月時点のものである。MGI データベースにおいて、表現型用語「embryonic lethality between implantation and placentation」(ID: MP:0009850) は、E4.5~E9 の間に胚死が起こったことを意味し、この基準で候補遺伝子を選択した。また、E14 以前に胚死滅したことを意味する “embryonic lethality, complete penetrance” は補助的な基準として使用した。IMPC データベースでは、KO マウス系統のアノテーションを行い、その致死表現型を報告している。KO マウスが E9 以前に死亡する遺伝子を実験の候補として選択した。ネットワーク解析には、NetworkAnalysist 3.0 (<https://www.networkanalyst.ca>) を使用した。

ES 細胞の培養と分化

マウス ES (mES) 細胞は、先に述べたように LIF の存在下で培養することにより未分化状態に維持した。簡単に説明すると、フィーダー細胞非依存性の E14K mES 細胞は、15%ウシ仔牛血清 (SFBM30-2362; Equitech-bio, Texas, USA) を補充したダルベッコ改変イーグル培地 (26400044; Gibco, Massachusetts, USA) および 0.1 mM 2-mercaptoethanol (M3148; Sigma, Burlington, USA)、LIF を入れたゼラチンコ

ート皿で保持した。LIFは、当研究所で以下のように自家生産した。簡単に説明すると、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)細胞に、LIF-ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)を発現するベクターをトランスフェクションさせた。ベクターの増幅を誘導するために、メトトレキサート(MTX)(M8407; Sigma, Burlington, USA)を $0.1\mu\text{M}$ でトランスフェクトしたCHO細胞に添加した。MTX処理を1週間行った後、CHO-LIF細胞をMTXフリー培地に移し、LIF産生を行った。24時間後、LIF含有培養上清を回収し、E14K mES細胞で試験し、多能性維持能力およびmES細胞の心筋細胞またはニューロンへの分化効率を確認した。

mES細胞( $3\times 10^3$ )をLIFを含まない培地で $25\mu\text{l}$ の吊り下げ滴下で培養し、角皿(栄研化学、東京、日本)内でEBsを形成させた。2日後、EBをノンコート細菌シャーレ(IWAKI、東京、日本)に移し、懸濁培養を行った。6日目に、EBをゼラチンコーティングされた組織培養皿(Corning, New York, USA)に移して、自発的な「心拍」を示す組織の領域が顕微鏡で検出できるようになる10日目まで付着培養を行った。EBは、特に断りのない限り、培養の3~6日目に阻害剤で処理した。

#### メタボローム解析

メタボローム解析は、株式会社ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ(HMT、山形県)に委託した。LC-TOF-MS分析前に酵素を不活性化するため、EBを10mlの5%マンニトール溶液で洗浄し、内部標準物質を含む1mlのエタノールで処理した。サンプルを氷上で5分間ウルトラソニケーションによりホモジナイズし、その後 $4,400\times\text{g}$ 、 $4^\circ\text{C}$ で5分間遠心分離を行った。上清を乾燥させ、 $200\mu\text{l}$ の50%2-プロパノールに溶解させた。LC-TOF-MSは、Agilent 1200シリーズRRLCシステムSLを用いて実施された。化合物は、正および負のイオン極性モードの両方で分析された。検出されたピークは、Master Hands ver. 2.17.1.11。ピーク面積を評価し、内部標準物質の面積に正規化した。HMT代謝物ライブラリは、m/z値と

リテンションタイムに基づいてピークに注釈を付けるために使用した。

#### RNAseq解析

RNA配列解析は、タカラバイオ株式会社(日本、滋賀)に委託した。RNeasy Mini Kits(74104; QIAGEN, Hilden, German)を用いて、製造者の指示に従ってtotal RNAを抽出した。抽出したRNAをDNase I(2270B; Takara, Shiga, Japan)とインキュベートし、ゲノムを分解させた。RNAの品質は、まず1.5%アガロースゲルでの電気泳動で評価し、その後、吸光光度計で評価した。遺伝子は、fold-changeが2より大きいとき、差次的に発現しているとみなされた。GO解析は、Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) tool(<https://david.ncifcrf.gov/>)を用いて行った。

#### B-3: モデル家畜・家禽細胞の分化増殖過程におけるハザード解析:

上述の調査とエピジェネティクス解析と併行し、モデル家畜・家禽細胞培養系を用いたハザードの検証をおこなう。具体的には、ウシの気管平滑筋細胞や大腸筋線維芽細胞を用い(堀)、他方ニワトリでは胚消化管平滑筋細胞を用い(福田)、継代による遺伝子発現変動をエンドポイントとして、増殖効率の違い、エピジェネティクスやがん化を検討し、調査によって得られる食品安全性上のハザードの妥当性に還元し、補強する。

#### B-3-1: モデル家畜細胞の分化増殖過程におけるハザード解析:

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-CD45-PDGFR $\alpha$ +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

月玲雄) 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に 25 代まで継代した。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。

#### B-3-2: モデル家禽細胞の分化増殖過程におけるハザード解析 :

ヒペコネラ種のニワトリ 14 日胚を用いた。14 日胚の砂嚢、小腸を取り出し、平滑筋層を単離した。パスト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。砂嚢に関しては、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 の細胞を再播種し、6 代まで継代した。培養した細胞は  $\alpha$  Smooth muscle actin および calponin 抗体で免疫染色をおこなった。

#### (倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、所属の研究機関が定める動物実験に関する規程、指針を遵守した。組換え DNA 実験については「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」、およびこれに基づく政省令・告示に示される基準に適合し、かつ所属機関の承認を得ている。

### C. 研究結果と考察

#### C-1: 細胞培養食品の食品衛生上のハザードやリスクに係る先駆的な調査検討 (北嶋) :

令和 4 年度 (初年度) は、1) 開発動向、ならびに 2) 安全性や衛生規制の動向を中心に、Web 上の公開情報の調査を実施した。調査に先立ち、とりまとめに際しての基本的な考え方を整理し、細胞培養食品の種類に関する便宜的な分類表を用意した。分類表では、出発材料の種類として、A) 生物個体由来、及び B) 細胞株由来の 2 つの基軸 (縦軸) を設け、各々の横軸として、食品衛生上、考慮しなければならない要因、すなわち「由来する種、遺伝子組換えの有無、分化過程の有無、培養培地中の未知因子の有無 (血清を参照)、培地中の抗菌剤の種類、選択培地の使用の有無、加熱 (調理) 処理の有無、抽出物としての使用の有無、細胞の足場の種類、培養装置の種類」という項目を準備した。その結果、1) 開発動向として、シンガポール政府による世界初の承認事例となった培養チキンナゲットを含む 12 件の開発事例の情報を収集し、安全性の観点で予め用意した細胞培養食品の種類に関する分類表に基づいて整理した。出発材料の種類 (初代培養細胞と株化細胞の区別) がそもそも不明なものが多いたことが明らかとなった。血清や抗菌剤等のなるべく人為的なものを使用しない方向で開発が進められている傾向がみとれた。細胞の大量培養の実現に向けて Hippo-YAP シグナル伝達経路が注目されていることも見出した。また、2) 規制動向に関しては、シンガポールをはじめ、EU、オーストラリア・ニュージーランドでは、Novel Food の枠組みの中で細胞培養食品を取り扱っていることを見出し、シンガポールの安全性評価の要件や EU の申請項目に関する概要の情報を収集した。さらに、細胞培養食品に関して想定され得る潜在的なハザードの抽出を行い、当初の予定通り進捗した。令和 5 年度 (来年度) は計画に則り、新たなリスク管理方法の動向を中心とした調査を実施、検討し、引き続き、リスクプロファイルの検討と抽出した課題の妥当性について検証する予定である。

＜補完的検討としてのプリオンの発現制御に関するレポーター遺伝子アッセイ＞

補完的な検討として、レポーター遺伝子アッセイにより、正常型プリオン蛋白質の筋細胞での遺伝子発現制御につき検討中であるが、この制御が明らかとなれば、ハザード要因として懸念されるプリオンの発現に対する方策に役立つものと考ええる。

## C-2: モデル細胞の分化増殖過程におけるエピジェネティクス解析 (仁科):

### C-2-1 致死率に基づくスクリーニングにより、器官形成に必須な遺伝子を発見:

PrS 形成に関わる遺伝子を網羅的に同定するため、MGI データベース (15,211 遺伝子) と IMPC データベース (7,590 系統の KO マウス) の 2 つの KO マウスデータベースをスクリーニングし、その欠損が E10 までに胚性致死につながる遺伝子を探した。MGI データベースの遺伝子のうち、463 遺伝子のいずれかが欠損すると、E4.5 から E9 の間に胚性致死となることがわかった。同様に、IMPC データベースの遺伝子のうち、417 遺伝子のいずれかを欠損すると、E9.5 以前の胚性致死が認められた。合計で 812 個の注目遺伝子が同定され、予想通り PrS 制御遺伝子 Brachyury T が含まれていた。812 個の候補遺伝子のエンリッチメント解析により、65 の注目すべき細胞機能パスウェイが同定された。これらの機能パスウェイは、DNA 複製、RNA 代謝、エネルギー代謝、シグナル伝達に必要な遺伝子や、細胞周期や細胞接着などの多様な細胞応答に関わるネットワークを形成していた。最も多くの遺伝子 (103 個) が含まれるカテゴリーは「代謝パスウェイ」(24 位) であった。そこで、この 103 個の遺伝子を DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) を用いて分類し、グルコース、ミトコンドリア、核酸、脂質の代謝に関わる遺伝子を同定した。これらの代謝経路は、エネルギー供給に必要なだけでなく、細胞成分の合成や遺伝子発現のエピジェネティックな制御など、適切な生命活動に欠かせないプロセスとして重要であることがわかった。これらの結果から、初期胚の発生には、代謝を中心とし

た様々な細胞機能のインタクトが必要であることが示された。

### C-2-2 スフィンゴ脂質代謝経路の阻害によるマウス ES 細胞の心筋分化の抑制と神経分化の促進:

我々は以前、メバロン酸代謝阻害による PrS 形成不全時に、EB 中のスフィンゴミエリンとスフィンゴシンが増加することを確認した。今回、これらの変化の生物学的意義を明らかにするため、スフィンゴ脂質の代謝に着目した。スフィンゴ脂質代謝には 3 つの遺伝子 (Serine Palmitoyltransferase Long Chain Base Subunit 2 (Sptlc2), UDP-Glucose Ceramide Glucosyltransferase (Ugcg), N-Acylsphingosine Amidohydrolase 1 (Asa1)) が寄与することがわかっている。PrS 形成における SPTLC2、UGCG、ASAHI タンパク質の役割を調べるため、これらの酵素の特異的阻害剤 (SPTLC2 は Myriocin16、UGCG は NB-DNJ17、ASAHI は D-NMAPPD18) のマウス ES 細胞分化への影響を調べた。阻害剤は培養 3-6 日目に適用し、10 日目に ES 細胞の分化を光学顕微鏡で心筋細胞拍動を、 $\beta$ -チューブリン III 免疫染色で神経突起形成を検出することで解析した。その結果、ミリオシンは心筋細胞の拍動と  $\beta$ -チューブリン III 陽性の神経突起の形成をともに阻害し、PrS 形成前に細胞死を起こすことがわかった。一方、NB-DNJ および D-NMAPPD は、EB の拍動を阻害する一方で、これらの薬剤は用量依存的に  $\beta$ -チューブリン III 陽性神経突起の形成を促進した。これらのデータは、UGCG と ASAHI が正常な PRS 形成に重要であることを示唆している。

NB-DNJ による UGCG の阻害や D-NMAPPD による ASAHI の阻害が、どの時点で細胞拍動を阻害するかを明らかにするため、各阻害剤で細胞を 6 期間 (1-2 日、3-4 日、5-6 日、7-10 日、1-4、3-6) 処理し、10 日目の細胞拍動や神経突起伸長を解析した。1-4 日目、3-4 日目、3-6 日目に NB-DNJ を投与すると、細胞拍動は効率的に低下し、神経突起の伸長が促進された。D-NMAPPD を用いて ASAHI を阻害した場合も、同様の結果が得られた。このように、EB の発生 3-6 日目は、特にス

フィンゴ脂質代謝に依存していることが示唆された。

UGCG 阻害による PRS 形成の時空間的影響を明らかにするため、PRS マーカーである Brachyury T の発現を in situ hybridization で検出した。EB を NB-DNJ で 3-4 日または 3-6 日処理し、Brachyury T レベルを 3、4、5 および 6 の組み合わせで 4 パターンで調べた。コントロールの無処理 EB では、3 日目には Brachyury T の発現は見られなかったが、4 日目にピークを迎え、5 日目から 6 日目にかけて徐々に減少した。一方、3 日目から 6 日目にかけて NB-DNJ を処理すると、Brachyury T の発現はほぼ抑制された。興味深いことに、3-4 日目から NB-DNJ のみを適用した場合、Brachyury T の発現は 4 日目に抑制されたが、NB-DNJ を除去した 5 日目には回復した。このように、EB 発生 3-4 日目に ASAHI または UGCG を阻害すると、PRS 形成が阻害され、心筋細胞分化が抑制される一方で、神経分化が誘導されることがわかった。この他、メタボローム解析や RNAseq 解析から、セラミド代謝が PrS 形成に必須の役割を果たすことが明らかとなった。スフィンゴシン-1-リン酸 (セラミド誘導体) は、神経細胞の成熟をポジティブに制御することを明らかにした。これらの結果は、セラミド代謝が PrS の形成と神経細胞分化の誘導の両方を制御していることを示す。以上のように、細胞分化に影響を与える因子の一つとして、セラミド代謝を新たに同定した。

### C-3 : モデル家畜・家禽細胞の分化増殖過程におけるハザード解析 :

#### C-3-1: モデル家畜細胞の分化増殖過程におけるハザード解析 (堀) :

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、今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。以上の解析結果は、細胞培養食品の作製に際しての、使用する年齢・臓器部位選択理由に資する成果と考える。加えて今年度は、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、来年度はウシの気管平滑筋細胞の培養系を用い、特に培養継代数の差異について検討し、細胞培養食品の安全性確認に関する検証を実施する予定である。

#### C-3-2: モデル家禽細胞の分化増殖過程におけるハザード解析 (福田) :

モデル家禽細胞培養系として、ニワトリの胚消化管平滑筋細胞に着目し、その中でも特に砂嚢平滑筋に注目した。一般に細胞の増殖と分化の維持は相反しているが、砂嚢平滑筋は発生中に高効率で増殖することが知られているため、砂嚢平滑筋は他の消化管平滑筋に比べて、高い増殖下でも平滑

筋細胞の分化の維持ができるのではないかと考え、砂嚢平滑筋を効率的に増殖させる培養条件を検討し、そのときの分化状態を調べた。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  $\alpha$  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。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く予定である。

#### D. 結論

令和 4 年度 (初年度) は、1) 細胞培養食品の食品衛生上のハザードやリスクに係

る先駆的な調査検討では、1) 開発動向、ならびに 2) 安全性や衛生規制の動向を中心に、Web 上の公開情報の調査を実施し、それぞれの特徴を抽出した。調査に先立ち、細胞培養食品に関する便宜的な分類表を用意し、これに基づき調査結果を整理した。そして、細胞培養食品に関して想定され得る潜在的なハザードの抽出を行った。2) モデル細胞の分化増殖過程におけるエピジェネティクス解析では、器官形成に必須の役割を果たす PrS 組織の正常分化に必須である複数の候補遺伝子を同定することに成功した。個体生存に必須である様々な細胞応答に関与する約 800 遺伝子を同定し、この内、脂質代謝に関与する 2 遺伝子に着目し解析した結果、セラミド分子の量的変化により、胚葉分化の異常を伴う細胞の分化異常が生じることを明らかとし、セラミド代謝が実際に PrS 形成に必須であることをマウス ES 分化誘導系を用いて実証した。3) モデル家畜細胞の分化増殖過程におけるハザード解析では、年齢差及び部位差の比較検討を成熟及び老化マウス内臓 (骨格筋、肝、肺、消化管、心) 由来の線維芽細胞を用い発現遺伝子を解析し、それぞれの場合で遺伝子発現プロファイルが大きく異なることを明らかにした。モデル家禽細胞の分化増殖過程におけるハザード解析では、ニワトリ胚砂嚢平滑筋を用いて検討した結果、他の消化管平滑筋と異なり、細胞増殖時でも例外的に分化状態が維持されること、またこの培養条件を見出した。引き続き、この機序を探索中である。以上の解析結果は、細胞培養食品の作製に際しての、使用する年齢・臓器部位・培養条件などの様々な選択理由に資する成果と考えられる。

引き続き、次年度も計画に則り、同様な調査・実験を実施、検討する。本調査研究により、「細胞培養食品」の食品衛生上の安全性確認に向けた課題や方策が明らかとなることが期待され、その安全性確保に資する基礎的資料の作成といった行政支援として寄与することが期待される。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表 (抜粋)

Kanno S, Okubo Y, Kageyama T, Yan L, Kitajima S, Fukuda J: Establishment of a Developmental Toxicity Assay based

on Human iPSC Reporter to Detect Fibroblast Growth Factor Signal Disruption. *iScience*. 2022, 25, 103770. doi:10.1016/j.isci.2022.103770

相崎健一, 小野竜一, 菅野 純, 北嶋 聡 : Percellome プロジェクト~トランスクリプトミクスとエピジェネティクスによる毒性分子機序の探求~, *日本薬理学雑誌*, 2022; 157: 200-206. doi.org/10.1254/fpj.21122

Hirotooshi Soyama, Miki Nishio, Junji Otani, Toshiko Sakuma, Shintaro Takao, Shigeo Hara, Takaaki Masuda, Koshi Mimori, Shinya Toyokuni, John P Lydon, Kazuwa Nakao, Hiroshi Nishina, Takumi Fukumoto, Tomohiko Maehama and Akira Suzuki, Hippo-TAZ signaling is the master regulator of the onset of triple negative basal-like breast cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 119 (29) e2123134119, 2022.

Caleb Kwame Sinclair, Junichi Maruyama, Shunta Nagashima, Kyoko Arimoto-Matsuzaki, Joshua Agbemefa Kuleape, Hiroaki Iwasa, Hiroshi Nishina, Hata, Yutaka, Protein kinase C $\alpha$  activation switches YAP1 from TEAD-mediated signaling to p73-mediated signaling. *Cancer Science* 113, 1305-1320, 2022.

Takeaki Shibata, Hiroki Kawana, Yuri Nishino, Yoshiko Ito, Hiroyasu Sato, Hirofumi Onishi, Kuniyuki Kano, Asuka Inoue, Yoshitaka Taketomi, Makoto Murakami, Satoshi Kofuji, Hiroshi Nishina, Atsuo Miyazawa, Nozomu Konol and Junken Aoki, Abnormal male reproduction and embryonic development induced by downregulation of a phospholipid fatty acid-introducing enzyme *Lpgatl* in zebrafish. *Scientific Reports* 12, 7312, 2022.

Chiyumi Oda, Kenya Kamimura, Osamu Shibata, Shinichi Morita, Yuto Tanaka, Toru Setsu, Hiroyuki Abe, Takeshi Yokoo, Akira Sakamaki, Hiroteru

Kamimura, Satoshi Kofuji, Toshifumi Wakai, Hiroshi Nishina, Shuji Terai, HBx and YAP Expression Could Promote Tumor Development and Progression in HBV-related Hepatocellular Carcinoma. *Biochem. Biophys. Rep.* 32, 101352, 2022.

Sakurako Kobayashi, Nobuhiko Ogasawara, Satoshi Watanabe, Yosuke Yoneyama, Sakura Kirino, Yui Hiraguri, Masami Inoue, Sayaka Nagata, Yoshimi Okamoto-Uchida, Satoshi Kofuji, Hiromichi Shimizu, Go Ito, Tomohiro Mizutani, Shinichi Yamauchi, Yusuke Kinugasa, Yoshihito Kano, Yasuhiro Nemoto, Mamoru Watanabe, Kiichiro Tsuchiya, Hiroshi Nishina, Ryuichi Okamoto, Shiro Yui (2022) Collagen Type I mediated mechnotransduction controls epithelial cell fate conversion during intestinal inflammation. *Inflammation and Regeneration* 42, 49, 2022.

Hiroshi Nishina (2022) [review] Physiological and pathological roles of the Hippo-YAP/TAZ signaling pathway in liver formation, homeostasis and tumorigenesis. *Cancer Science* 113, 1900-1908, 2022.

仁科博史: 動物における臓器サイズ制御機構 再生医療 Vol 21 No 2 p74-79 (2022)

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*, (in press) DOI: 10.1016/j.bbrep.2023.101478

## 2. 学会発表 (抜粋)

北嶋 聡: 創薬研究における薬理-病理連携の必要性: 毒性学の立場から 一食品トキ

シコゲノミクスと薬理学一、第 96 回日本薬理学会年会、(2022. 12. 2)、横浜

相崎健一、小野竜一、菅野 純、北嶋 聡：Percellome プロジェクト ～トランスクリプトミクスとエピジェネティクス、インフォマティクスによる毒性分子機序の探求～、第 96 回日本薬理学会年会、(2022. 12. 2)、横浜

小野 竜一、田塾 慶子、安田 智、佐藤 陽治、内田 恵理子、平林 容子、北嶋 聡 ゲノム編集技術を利用した際の、オンターゲット部位における非意図配列の挿入と、その検出方法の確立 日本食品衛生学会第 118 回学術講演会 2022. 11. 11 長崎 (口頭発表)

J. Kanno, K.-I. Aisaki, R. Ono, S. Kitajima : Histone Modification, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposure to a Chemical. The XVITH International Congress of Toxicology (ICT2022), (2022. 9. 19), Maastricht, The Netherlands Oral.

五十嵐智女、松村万里、小川いづみ、矢川千織、早川孝彦、越智美代子、齊藤 洋克、栗形麻樹子、北嶋聡：「新規の食品」の安全性を確保するための諸外国の制度比較 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022. 7. 1)

五十嵐智女、藤井咲子、釣本真理子、高橋祐次、北嶋 聡、栗形麻樹子：ビスフェノール類似体 4,4'-(1,3-dimethylbutylidene)diphenol の卵巣摘出マウスにおける皮下および経口投与による子宮肥大試験 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022. 7. 2)

菅野 純、相崎健一、小野竜一、北嶋 聡：新型反復曝露トランスクリプトミクスから見た発癌エピジェネティクスの考察 第 49 回日本毒性学会学術年会(2022. 6. 30)

菅野 純、相崎健一、小野竜一、北嶋 聡：Percellome project からみた毒性 AI の展望

第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022. 7. 2)

大久保佑亮、菅野聖世、北嶋 聡、平林容子、福田淳二：ヒト iPS 細胞を用いたシグナル伝達かく乱作用のダイナミクスに基づく高精度かつ網羅的ヒト発生毒性試験法の開発

第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022. 7. 1)

小野竜一、山本雄介、成瀬美衣、田邊思帆里、吉岡祐亮、相崎健一、広瀬明彦、落谷孝広、平林容子、北嶋 聡：cfDNA による毒性評価

第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022. 7. 2)

仁科博史：肝臓の形成と恒常性維持、第 24 回 長崎大学細胞制御セミナー (2022. 10. 21.) 長崎

仁科博史：肝臓の形成と恒常性維持、第 1 回旭川医科大学大学院セミナー (2023. 1. 27.) 旭川

仁科博史：肝臓の発生と再生、新潟大学消化器内科サイエンスセミナー(2023. 3. 16.) 新潟

仁科博史：生物の大きさと再生医療、第 22 回 日本再生医療学会 (2023. 3. 24.) 京都

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)

## F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし