

分担研究報告書（R6年度：最終年度）

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。

最終年度（令和 6 年度）は、まず、ウシの大動脈平滑筋細胞を用いてウシ胎児血清（FBS）10%による培養と、無血清培地+GF 代替ペプチド添加での細胞増殖活性について検証した。10 月に FGF2 代替ペプチドが上市され、既に市販されている HGF 代替ペプチドとともにウシの大動脈平滑筋細胞無血清培地での細胞増殖について検証を試みたが、細胞増殖活性などの明確な結果を得ることができなかった。今後、濃度設定や混合適用、将来上市される予定の PDGF-BB や IGF-1 の代替ペプチドなどを用いて、無血清培地での細胞増殖培養条件の探索をさらに行っていく必要があると考えられた。ウシ気管平滑筋を FBS 10%による血清培地で培養した後、無血清培地で培養することで変動遺伝子群が血清培地培養前（Primary cells）での遺伝子発現に戻る可塑性を有するか否かを検証した。結果、血清培地での細胞培養継代によって変動した遺伝子群は、無血清培地での培養によっても初代培養時の状態に戻ることはなく、遺伝子変動に可塑性は認められなかった。

以上、3 年間の解析により、培養肉安全性評価における一般的なターゲットバリデーションを示すことがきたが、平滑筋細胞を用いた無血清培地による細胞増殖培養条件については更なる検討を要する。

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。

（最終年度の研究目的） ウシの大動脈平滑筋細胞を用いてウシ胎児血清（FBS）10%による培養と、無血清培地下 GF 代替ペプチド添加での細胞増殖活性について検証し、無血清環境下でのウシ由来平滑筋細胞の増殖条件を見出すことを目的とした。また、ウシ気管平滑筋をFBS10%による血清培地で培養した後、無血清培地で培養することで変動遺伝子群が血清培地培養前（Primary cells）での遺伝子発現に戻る可塑性を有するか否かを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

ウシ大動脈平滑筋細胞（第2継代細胞株、TOYOB0 CAB35405）を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て実験に供した。5代継代した細胞をDMEM無血清培地にて24時間培養した後、肝細胞増殖因子（Hepatocyte Growth Factor : HGF）c-Metアゴニスト、または線維芽細胞増殖因2（Fibroblast Growth Factor2 ; FGF2）FGFR1c アゴニスト（PepitiGrowth, Tokyo, 日本）各30 ng/mLを添加し培養し、72時間後に細胞増殖活性を測定した。

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。その時の細胞を集めtotal RNAの抽出を行った。また、5代まで継代した後に無血清培地にて24時間ごと3回無血清培地にて培養を継続した細胞を採取し、total RNAの抽出を行った。得られたtotal RNAをもとに、RNAseq解析を行い変動する遺伝子の比較解析を行った。

C. 研究結果及び考察

（ウシ大動脈平滑筋の無血清培養）

ウシ大動脈平滑筋細胞は5代まで10% FBS存在下で継代を継続したところ、安定した平滑筋細胞の形態と増殖を維持していた。5代継代した細胞を無血清培地に交換し24時間培養後、c-MetアゴニストまたはFGFR1c アゴニスト30 ng/mLを添加し培養し、さらに72時間後に細胞増殖活性を測定した。結果、c-Metアゴニスト添加の有無によって細胞数に有意な変動はなく、有意な細胞増殖活性は得られなかった。今後、c-MetアゴニストならびにFGFR1c アゴニストの濃度設定や、将来上市される予定のPDGF-BBやIGF-1の代替ペプチドなどを用いて、無血清培地での細胞増殖培養条件の探索をさらに行っていく必要があると考えられた。

（ウシ気管平滑筋細胞の可塑性）

ウシ気管平滑筋を10% ウシ胎児血清下で培養と継代を重ねると発現遺伝子群に変動が認められ、細胞の脱分化の可能性が考えられた（二年度の成果）。そこで、本年度は血清培地下での変化が無血清培地に戻すことで発現遺伝子が血清培養前に戻るか否か、発現遺伝子変動の可塑性について検証した。結果、ウシ胎児血清下で5代まで培養したウシ気管平滑筋細胞の遺伝子発現パターンは、5代まで培養した細胞を24時間x3日間無血清培地にて培養した細胞から得られた遺伝子発現パターンとの間に差は認められず、継代によって変動した遺伝子変動に可塑性はないことがわかった。すなわち、一旦血清存在下で培養したウシ気管平滑筋細胞は増殖型に脱分化し、発現する遺伝子パター

ンは生体内での細胞とは異なり、もとには戻らない可能性が考えられた。今後、無血清培地での培養法の確立後に、発現する遺伝子群が生体内での遺伝子発現パターンと同じであるのか検証することが必要と考えられた。

D. 結論

ウシ大動脈平滑筋細胞を用いた無血清培地での細胞増殖活性維持方法については、完全合成ペプチドの技術を利用して条件を見出していくことが肝要と考えられた。また、細胞培養食品の実用化を考えた場合、ある程度までウシ胎児血清培地にて細胞を増やしたのちで、完全無血清培地での培養を行うことで食品としての安全性を担保できる可能性があると考えられる。しかし、本研究により一旦血清培養して変動した遺伝子発現はその後の無血清培地での培養によって培養前の遺伝子パターンに戻ることはなく、遺伝子発現変動に可塑性は得られなかった。この成績はウシ気管平滑筋における成績であるが、今後、ここの対象となる細胞において無血清、血清での培養によって変動する遺伝子群やその可塑性について検証することが重要と考えられた。

以上の3年間の解析結果を踏まえ、細胞培養食品の安全性評価における適切な指標を選定しその妥当性を評価し、まとめることができた。一般的なターゲットバリデーションについてまとめた。すなわち、細胞培養食品に使用する動物に老齢個体は不向きであること、安定した培養技術・環境が求められること、及び、製品ごとに、生理活性物質の増減を含め、網羅的な遺伝子発現の確認が必要であること、である。

E. 健康機器情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

細胞培養食品バイオハザード研究 2

培養細胞の遺伝子発現における老齢個体の影響と継代による生体内有害物質合成/分解系の遺伝子変動

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51回学術年会 (2024)7月3-5日 (福岡市)

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