

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

一般的に、分化と増殖は相反していると考えられている。しかし、胚の器官ではある程度分化した細胞が増殖していることが見られる。そのため、胚内の条件を再現できれば、分化を維持したまま増殖させることが可能と考えられる。このような系を確立することで、あらためて「細胞培養食品」作出に関わるリスク因子を抽出したり、確認したりすることを目指した。昨年度までに、ニワトリ14日胚の砂囊平滑筋層の細胞塊を平面に撒いて、また3Dで培養する方法を確立した。本年度はこれらの培養で細胞塊がどのように変化していったかを解析した。3D培養ではハンギングドロップ法を用いたが、そのときの細胞塊の大きさが重要であることがわかった。0.6mmの直径のものは、どのような培養液でも、内部でおそらくネクロシスが起り、細胞が死んでいた。一方、0.4mmの直径の細胞塊の培養では細胞死は起こらなかった。また、培養液によっても細胞の振る舞いがかかなり違うことがわかった。1% FBS入りのDMEMで培養したときには、細胞塊はあまり大きくならなかったが、7日間の培養期間を通して塊全体で平滑筋マーカーである α Smooth muscle actinおよびcalponinを発現していた。また、細胞塊にはEdU陽性細胞が多く見られ、平滑筋が分裂していることが示唆された。一方、10% FBS入りのDMEMで培養すると、7日間の培養で、細胞塊は2倍程度まで大きくなったが、培養4日以降、細胞塊の外側にcalponinを発現していない細胞が現れ、calponin陽性細胞と明瞭に区別される区画を作っていた。calponin陽性より、陰性細胞の方に分裂細胞が多く見られるという特徴もあった。Calponin陰性細胞の細胞腫を特定するために、砂囊筋層に含まれると考えられる、神経細胞と間充織のマーカーの発現を調べたところ、Calponin陰性細胞の領域では、神経マーカーTuji1陽性細胞はあまり存在してなかった。間充織マーカーでもあるN-CAM1は存在している場合と、していない場合があった。今年度の研究で、砂囊平滑筋は低濃度FBS存在下でも増えることができること、高濃度FBS存在下では2次元培養と同様、平滑筋の脱分化が起きているか、間充織などの他種の細胞が増殖することがわかった。細胞培養時には、元々の組織に少量の多種細胞が混ざっており、これを完全に取り除くことは難しい。培養条件によっては、ターゲット外の細胞がより増殖するリスクがあることを示している。

A. 研究の目的

細胞培養食品の作成の際に、胚の細胞はターゲットになりうる。これは、胚の細胞がある程度の分化をしながらも、胚内で増殖するためである。しかし、胚の器官でどのような因子が働いているのか完全に解明されている例は少なく、胚細胞を分化形質を維持したまま培養に成功している例は少ない。例えば、ニワトリの胃の一つである砂嚢（筋胃）は他の消化器官に比べ、厚い平滑筋層を持つことが知られている。砂嚢では、平滑筋の前駆細胞の時点から、増殖能が高いが、平滑筋が分化し、特徴的な収縮タンパク質を発現した後でも、高い増殖能を維持していることが知られている。しかし、これまで、砂嚢平滑筋を単離して培養すると、ウシ胎児血清（FBS）などを添加した増殖条件では分化を保てず、収縮できなくなること、インスリン添加で増殖させない条件だと、分化を維持できることが示されている。昨年度まで、我々は砂嚢平滑筋細胞塊を2次元的に培養し、細胞塊から這い出した直後は分化が維持されているものの、その後の増殖でディッシュ内で散らばり、脱分化してしまうことを示した。そこから、細胞同士の接触が平滑筋分化維持に関わっている可能性を考え、昨年度後半から、より胚の組織に近い、3D培養を試みた。

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（A6-20）に従って実施した。

細胞塊の作成

単離した14日胚の砂嚢の平滑筋層を眼科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、直径0.4または0.6 mmの細胞塊を作成した。

平面細胞培養

細胞塊をDMEM培地1または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。細胞は5% CO₂インキュベーターで1，4，7日間培養した。培養後に残った細胞塊は細胞塊は固定後、凍結切片作成し、 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20ul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、5% CO₂インキュベーターで培養した。

1，4，7日間培養した細胞塊は、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。さらにTuji-1及びN-CAM1抗体でも染色した。

EdUによる増殖細胞の検出

2次元およびハンギングドロップ法で培養中に、Click-iT™ EdU Cell Proliferation Kit for Imaging, Alexa Fluor™ 488 dye (Invitrogen)を用いて、増殖細胞を検出した。培養液を100 uM EdUを含む培養液に変換し、4時間後に固定後、細胞塊を回収し、薄切、マニュアルに従って染色した。

C. 研究結果及び考察

C-1. 3D培養条件の検討

これまで、砂嚢平滑筋細胞の培養では、増殖を抑えるような条件でのみ、分化状態を保ったまま培養できるとされていた。昨年度、平滑筋細胞塊をつかった2次元培養では、細胞塊から這い出た直後は平滑筋の形態、収縮タンパク質の発現から平滑筋の特徴を保っていると考えられるが、その外側では細胞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。このことから平滑筋細胞塊を這い出させることなく、3Dで培養すれば、胚の砂嚢内と同様に、平滑筋が分化を維持したまま増殖できるのではないかと考えた。

① 細胞塊の大きさの検討

昨年度の終わりに、0.2-0.6mm程度の平滑筋細胞塊でハンギングドロップ法で3D培養を試みたが、結果が安定しなかった。これが、細胞塊の大きさが違うことによる可能性を追求するため、細胞塊の大きさが直径0.4 mmのものと、0.6mmのもののみを選び、培養した。厚さはどちらも0.2mm程度だった。直径0.4 mmの細胞塊では培養液によらず、培養2日までに細胞塊の直径は0.3mm程度に縮み、細胞密度が上がり、かつ球状になった。その後、DMEM-10%FBS条件では、4日、7日と培養が進むにつれ細胞塊が大きくなり、0.6-7mmほどの直径の球となった。DMEM-1%FBS条件では、それほど大きくはならず、7日目の直径は0.4mmほどだった。直径0.6 mmの細胞塊では0.4mmの細胞塊と同様に2日目までに細胞塊が縮んだが、その後、細胞塊は大きくなり、4日を過ぎてから徐々に中心部が黒くなって、ネクロシスが疑われた。そこで、この後の解析は直径0.4 mmの細胞塊を使用することにした。

② EE培地の検討

ニワトリ消化管の器官培養では、ニワトリ胚抽出液(EE)をFBSの代わりに使うことが多い。そこで、DMEM-50%EE条件で細胞塊を培養したところ、2日までは同様だったが、4日には塊の中心部が黒くなり、7日には黒い部分が増えていた。切片からは細胞塊中心部に細胞が見られず、ネクロシスと思われた。このため、今後の解析ではEEを使用しないことにした。EEを細胞塊の2次元培養で使った時は、細胞が2日でコンフルエントになるなど、EE条件の増殖刺激が高いことが考えられ、それが細胞死の原因となっている可能性が高い。

③ DMEM-1, 10%FBS条件での細胞分化の解析
ハンギングドロップ法で培養した細胞塊内の細胞の分化を解析するため、細胞塊の切片を作成し、2次元培養の時と同様に、平滑筋

初期マーカーである α SMA、分化した平滑筋マーカーとされるcalponinの発現を免疫抗体法で調べた。DMEM-1%FBS条件では2日、4日、7日を通して、 α SMA、calponinともに、細胞塊の最も外側に位置する細胞で非常に強いものの、内部も満遍なく発現していた。ただし、砂嚢で見られた平滑筋の束構造は見られず、細胞は全体で同様の方向に並んでいるだけだった。DMEM-10%FBS条件では、2日まではDMEM-1%FBS条件と同様の組織構築、マーカータンパク質の発現だったが、4日では細胞塊の一部に、 α SMA、calponinが両方とも出ていない領域が見られた。7日ではそれがさらに顕著になっており、細胞塊の外側に α SMA、calponinが両陰性の領域が広がっていた。さらに、細胞塊の最も外側の α SMA強陽性の細胞ではcalponinが発現していないものが多かった。ここでは、2次元培養でも見られたように、平滑筋が脱分化している可能性が高い。

DMEM-10%FBS条件で4, 7日に見られるcalponin陰性の領域がどのような細胞でできているのかに興味を持った。そこで、胚の平滑筋細胞層に含まれると考えられる、間充織細胞と神経叢の細胞に注目した。切片をTuji-1(神経マーカー)およびN-CAM1(神経および砂嚢間充織細胞マーカー)で染色したところ、Tuji-1はcalponin陽性細胞に隣接して発現が少数見られたものの、塊にはなっておらず、神経叢の細胞が増殖し、 α SMA、calponin陰性領域ができたとは考えづらかった。一方、N-CAM1はTuji-1と重なる、少数の強い染色のほかに、弱い染色が細胞塊内に見られた。この染色は α SMA、calponin陰性領域にあることもあったが、calponin陽性領域と重なることもあった。このことは、間充織細胞はcalponin陽性の平滑筋と混じって存在していること、間充織細胞が増えて α SMA、calponin陰性領域を作ることがあることを示唆している。

④ DMEM-1, 10%FBS条件での細胞増殖の解析
DMEM-10%FBS条件では、必ずしも平滑筋だけが増えているわけでないことが示唆された

ため、本当に平滑筋細胞塊ハンギングドロップ培養で平滑筋が増殖したのかをEdUの細胞への取り込みとcalponinの免疫染色を重ねることで解析した。DMEM-1%FBS条件では、培養4日、7日ともにcalponin陽性細胞が、EdUを取り込んでいることがわかった。また、EdU陽性細胞は細胞塊全体に散らばっていた。このことは、平滑筋が分化を維持しながら増殖していることを強く示唆している。一方、DMEM-10%FBS条件では、4日ではcalponin陽性細胞、陰性細胞の両方にEdUの取り込みが見られ、細胞塊全体に散らばっていた。7日では、calponin陰性細胞の方にEdU陽性細胞が多く、また外側にEdU陽性細胞が局在するのが見られた。これはDMEM-10%FBS条件が平滑筋より他の細胞種の増殖条件に合っている可能性がある。

C-2 2次元培養での細胞塊の分化解析

平滑筋細胞塊のDMEM-1%FBS条件の3次元培養で、砂嚢平滑筋の分化を維持しながら増殖させることに成功したが、2次元培養でも塊の部分では同じことが起こっている可能性があるため検証した。直径0.4mmの細胞塊をコラーゲンコートしたディッシュにまき、DMEM-1%FBS条件で培養後、残った細胞塊を回収し、calponinの発現、EdUの取り込みを解析した。2次元培養では細胞が次々と這い出すので、細胞塊は小さくなっていたが、細胞塊の中には、calponin、EdU両陽性の細胞が存在しており、ここでも平滑筋が分化を維持しながら増殖していることが示された。

D. 結論と今後の展望

本年度の実験で、砂嚢平滑筋は細胞塊で培養することで、少なくとも7日間は平滑筋が分化を維持しながら増殖できることを示した。細胞塊の外側、つまり、細胞接着が弱い細胞が α SMA 強陽性、calponin陰性になり、脱分化したことを示していることは、昨年度2次元培養で示された、細胞接着が平滑筋の分化に重要であることをさらに裏付ける結果と考えられる。また、平滑筋細胞が一般的な細胞の増殖刺激条件である10%FBSよりも

かなり低い濃度である1%FBSで増殖を維持していることは非常に興味深い。これが砂嚢平滑筋が消化管の他の領域よりよく増殖し、平滑筋層が著しく厚くなる理由の一つの可能性はある。また、今回の培養でDMEM-10%FBS条件下では、細胞塊は大きくなったが、その原因は平滑筋の増殖が1%FBS条件よりも上がったというよりは、間充織細胞などの他の細胞種が盛んに増殖したためと考えられる。このことは「細胞培養食品」を作製する際に、条件をよく整えないと、一見増殖し収量は上がるものの、ターゲットではない、コンタミネーションまたは元々組織中に存在していた少数の細胞の割合が上昇してしまう可能性を示唆しており、細胞培養食品作製におけるリスクと考えられる。今回、DMEM-1%FBS条件で培養中の細胞塊中の増殖細胞には、calponin陽性細胞だけでなく、陰性細胞もあった。血管平滑筋では、収縮型と増殖型があり、増殖型では収縮タンパク質の発現が落ちることが報告されている。砂嚢平滑筋でも増殖型が存在するのか、今後、calponin陰性の増殖細胞の子孫細胞を調べることで明らかにできると考えている。また、今回の培養では砂嚢の組織構築の維持ができていない。これには更なる細胞外因子が必要と考える。

E. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

金佳誼、福田公子：砂嚢平滑筋細胞塊からの平滑筋細胞培養、第47回日本分子生物学会年会、福岡、2024年11月27-29日

金佳誼、福田公子：A 3D Culture System to Maintain Proliferation and Differentiation of Gizzard Smooth Muscle Cells. 第58回日本発生生物学会、第77回細胞生物学会合同大会、名古屋、2025年7月16-18日

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