

<令和4年度助成>

培養肉実現に向けた 培地添加物メチルーベーターシクロデキストリンの効果

岡村 大治

(近畿大学 農学部 生物機能科学科)

1. 目的

本研究は「培養肉」実現に向け、高価なウシ胎児血清や成長因子と呼ばれるタンパク質の添加に依存せず、筋肉細胞を増幅する培養システムを構築することを目指すものである。現在の食肉システムは工業的畜産に依存しており、持続可能な開発目標(SDGs)を達成する上でいくつかの課題に直面している。その課題とは、水や穀物の過剰消費、飼育スペース確保のための森林伐採、家畜の排泄物による水質汚染などである。また、家畜の排泄物や牛のげっぷのメタン発酵による大量のメタンガスの放出は、地球温暖化に悪影響を及ぼすとされている。これらの課題に対し、特に今後予想される人口増加を考慮し、持続可能な食肉生産システムの確立が急務となっている。植物性タンパク質を原料とする「グリーンミート」や、家畜の筋肉細胞を培養・組織化した「培養肉」は、その解決策として期待されている。しかし、培養肉は工業的畜産が抱える問題を解決する可能性があるにもかかわらず、社会実装の面でいくつかの課題を抱えている。筋肉細胞やがん細胞などの動物細胞を培養液中で効率よく増殖させるためには、ウシ胎児血清や成長因子と呼ばれるタンパク質を培養液に補充する必要があり、高コスト且つ倫理的な課題が残されている。さらには、培養肉生産の目的は家畜への依存を減らし、家畜による環境破壊を軽減することであるにもかかわらず、その生産にウシ胎児血清を使用することは培養肉生産の目的とも矛盾しており、持続可能性という点で問題である。上記を踏まえ、筋肉細胞を用いた培養肉を大規模に生産するには、無血清や低血清条件だけでなく、

コストの主要因である成長因子に依存しない培養技術が必要であるが、現在までにこの条件を達成した技術報告はない。本研究では上記課題の解決を目的として、デンプン由来の環状オリゴ糖であるメチルβシクロデキストリン(以下、MβCD)に着目し、マウス骨格筋細胞株_C2C12細胞の低血清培地での分化抑制と増殖促進効果について詳細な解析を行った。なお本研究成果は、助成期間において下記に示す国際科学誌に掲載されたものである¹⁾。

2. 方法

C2C12細胞の増殖および分化誘導

マウス骨格筋芽細胞(C2C12細胞)は、高濃度のウシ胎児血清(10%)を含む培地において筋芽細胞として活発に増殖を続ける一方で、低濃度(2%)のウマ成体血清に切り替えることで、速やかに筋管細胞に分化するという特徴を持つ。C2C12細胞を10%ウシ胎児血清(FBS)およびDMEM培地からなる「DF10」培地で増殖培養を行った。分化誘導を目的とする場合、まずはDF10培地で播種し、播種から2~3日後、細胞のコンフルエントが90~100%に達した時点で培地を2%ウマ成体血清(Horse Serum)含有DMEM培地の「DH2」培地に変更した。適宜MβCDを3mMになるように加えた。

ニワトリ胚性筋芽細胞の初代培養

10日齢のニワトリ胚を材料にし、大腿骨を外科的に除去し分離した大腿筋組織を2mg/mlのコラゲナーゼⅡ型で37℃、40~60分間、細胞の剥離に応じて10~15分ごとにピペットしながら消化させ

た。解離した筋芽細胞を 40 μm のセルストレーナーに通して単細胞懸濁し、DF10 培地で播種した。翌日、M β CD を添加した DH2 培地に変更して分化誘導を行った。

蛍光免疫染色

筋管細胞の分化状態を検出するため、筋管細胞特異的なタンパク質 MHC (Myosin Heavy Chain) に対する抗体 (R&D Systems、MAB4470) を用いて、蛍光免疫染色を行った。また、筋肉細胞の増殖やアポトーシス状態を検出するため、抗リン酸化ヒストン H3 抗体 (C-2) (Santa Cruz、sc-374669) と抗活性型カスパーゼ 3 抗体 (Asp175) (5A1E) (Cell Signaling Technology、#9664) を用い、観察は蛍光顕微鏡 BZ-X710 (株式会社キーエンス) で行った。

3. 結果と考察

筋芽細胞の分化を抑制し、且つ増殖を促進するための培地添加剤として M β CD を候補成分として検証した。M β CD はデンプン由来の環状オリゴ糖であり、安全性の高い培地添加物でありながら細胞膜のコレステロール除去効果が非常に大きい物質として知られている。低血清条件下で培養する C2C12 細胞に M β CD を添加すると、分化した筋管の特徴である伸長細胞の出現が著しく減少した。M β CD が筋管細胞への分化に与える影響を調べるため、主要な分化マーカーである MHC タンパクの発現を免疫染色の結果から評価したところ、M β CD を含む条件で培養した細胞では MHC 陽性細胞数が著しく減少し、さらには MHC 陽性細胞においてもその核数が有意に減少していた。低血清条件下で M β CD は C2C12 細胞の筋管分化を効果的に阻害することが示された (図)。

アポトーシス細胞死は、隣接する細胞との接触依存的なシグナル伝達を通じて、分化した筋芽細胞同士の融合を促す役割を果たすことが報告されている。M β CD を用いた筋管分化の観察では、低血清培地条件下で起こる筋芽細胞の細胞死が、M β CD 含有

条件下では著しく減少していることを発見した。このことから、M β CD による細胞内コレステロールの枯渇は、コレステロール依存性のアポトーシス細胞死の誘導を強力にブロックし、筋芽細胞の融合を障害し、結果として筋管分化を阻害する可能性があると考えた。我々は、アポトーシスマーカーである活性型カスパーゼ 3 タンパクを検出することでアポトーシス細胞死を検証した。これらの結果は、M β CD がアポトーシス細胞死を効果的に遮断し、コレステロールがそれを有意に回復させることを示唆していた。さらに、コレステロール単独では、活性型カスパーゼ 3 陽性細胞が有意に誘導された。このように、M β CD によるコレステロールの枯渇によって引き起こされる C2C12 筋芽細胞の分化過程におけるアポトーシス細胞死の遮断は、アポトーシスによる死細胞が筋芽細胞融合を誘導することによって隣接する筋芽細胞の筋管への分化を促すため、M β CD が C2C12 細胞の筋管分化を阻害するメカニズムの一つと考えられる (図)。

RNA シーケンス解析により、M β CD を投与した細胞では、コントロールと比較して細胞周期関連遺伝子の発現が高いことが確認された。そこで、低血清条件下での細胞増殖能力に対する M β CD の効果を調べた。低血清条件下で 3 日間細胞を増殖させたところ、細胞数の相対値だけでなく、有糸分裂マーカーであるリン酸化ヒストン H3 陽性細胞の頻度が、M β CD 処理条件ではコントロールと比較して有意に増加することが確認された。C2C12 筋芽細胞に対する M β CD の増殖促進効果は低血清条件下でのみ観察され、高血清条件下では観察されなかったことから、C2C12 筋芽細胞に対する M β CD の増殖促進効果は、筋芽細胞の細胞増殖を直接促進するのではなく、筋管への分化に対する抑制効果によるものであることを強く支持している (図)。

培養肉生産における M β CD の有効性を検証するためには、畜産動物における M β CD の効果を調べることが重要である。そこで我々はニワトリ筋芽細胞の初代培養を用いて、前述の C2C12 筋芽細胞で見られたような M β CD の分化抑制効果と増殖促進を評価

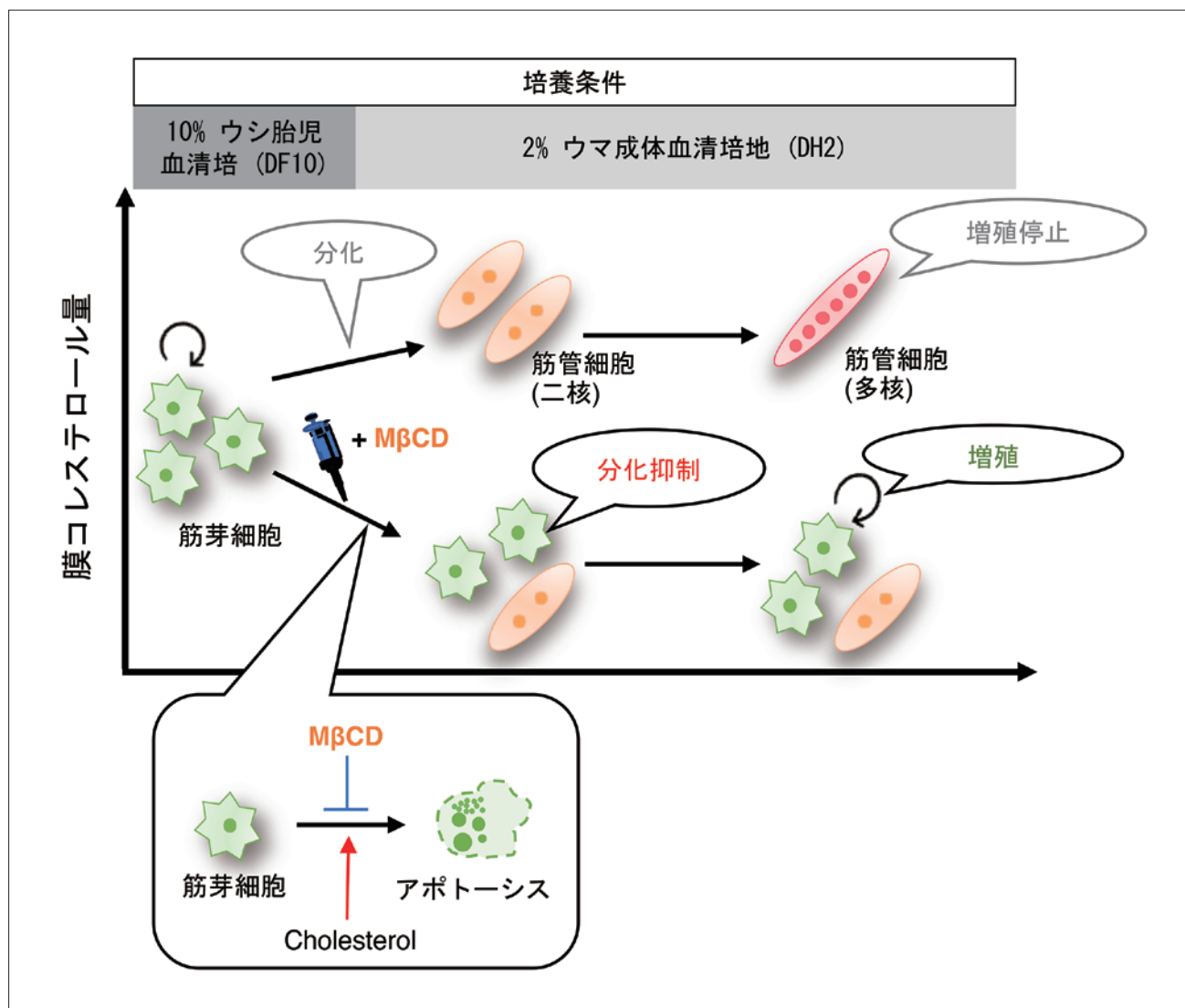


図 骨格筋分化と MβCD の効果

マウスやニワトリの筋芽細胞を低濃度のウマ成体血清培地で培養すると筋管細胞への分化が進行し、それに伴い細胞増殖は停止する（上段）。一方、培養液に MβCD を添加すると、筋芽細胞の細胞コレステロールレベルを低下させることで、筋管への筋芽細胞分化を強力に阻害する。これによって、低血清培地条件下でも筋芽細胞の継続的な増殖が可能になる。MβCD は筋芽細胞の細胞膜コレステロールレベルを低下させることによって、筋芽細胞の分化に必要なコレステロール依存的なアポトーシス細胞死を抑制すると考えられる（下段）。

した。ニワトリ大腿筋細胞は、10 日齢のニワトリ胚から採取し、低血清条件下で筋管の分化と細胞増殖に対する MβCD の効果を評価したところ、MβCD の添加により MHC 陽性筋管の成熟が阻害され、細胞あたりの核の数が著しく減少した。さらにリン酸化ヒストン H3 陽性細胞の増加によって、筋芽細胞の増殖促進効果も実証されたことから、MβCD は動物種を超えて、筋肉細胞の分化抑制と増殖促進効果を発揮することがわかった（図）。

無血清培地を用いた安全で費用対効果の高い筋肉細胞の培養法の確立は、培養肉の将来的な商業的・

社会的確立に不可欠である。MβCD の使用により筋細胞の分化を抑制し、増殖能を維持できることを示した本研究の結果は、筋芽細胞が分化して増殖を停止してしまう無血清および低血清条件下での培養肉生産において重要な洞察を与える。この結果は培養肉実現への第一歩としてはあるが、安全性の高い培地添加物を用いて筋芽細胞の分化を抑制することが、ウシ血清に依存しない筋肉細胞の増殖技術実現への有効なアプローチとなり得るという我々の主張を強く支持するものである。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼を申し上げます。

参考文献

- 1) The ensured proliferative capacity of myoblast in serum-reduced conditions with Methyl- β -cyclodextrin. Tomoka Katayama, Yuta Chigi, Daiji Okamura* (*責任著者). *Front Cell Dev Biol.* 11: 1193634., 2023 May 12. DOI: 10.3389/fcell.2023.1193634

The ensured proliferative capacity of myoblasts in serum-reduced conditions with Methyl- β -cyclodextrin

Daiji OKAMURA

*Department of Advanced Bioscience, Faculty of Agriculture,
Kindai University, Nara, Japan*

To produce muscle fibers for cultured meat on a large scale, it is important to expand myoblasts in a serum-reduced or serum-free medium, to avoid cost, ethical, and environmental issues. Myoblasts such as C2C12 cells differentiate quickly into myotubes and lose their ability to proliferate when serum-rich medium is replaced with a serum-reduced medium. This study demonstrates that Methyl- β -cyclodextrin (M β CD), a starch-derived agent that depletes cholesterol, can inhibit further differentiation of myoblasts at the MyoD-positive stage by reducing plasma membrane cholesterol on C2C12 cells and primary cultured chick muscle cells. Furthermore, M β CD efficiently blocks cholesterol-dependent apoptotic cell death of myoblasts, which is one of the mechanisms by which it inhibits the differentiation of C2C12 myoblast cells, as dead myoblast cells are necessary for the fusion of adjacent myoblasts during the process of differentiation into myotubes. Importantly, M β CD maintains the proliferative capacity of myoblasts only under differentiation conditions with a serum-reduced medium, suggesting that its mitogenic effect is due to its inhibitory effect on myoblast differentiation into myotubes. In conclusion, this study provides significant insights into ensuring the proliferative capacity of myoblasts in a future serum-free condition for cultured meat production.