

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：16201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12897

研究課題名(和文) 完全無血清培地の開発と基礎臨床研究への展開

研究課題名(英文) Development of serum-free medium and its application for basic and clinical research

研究代表者

中村 隆範 (Nakamura, Takanori)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：70183887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、動物血清に含まれる細胞増殖に関わる因子を分析・プロファイリングして、牛胎児血清を代替し得る基礎培地の開発を目的とした。Jurkat、Molt-4などのT細胞株の増殖を指標に実験を進め、インスリン、トランスフェリン、亜セレン酸(ITS)とリポタンパク質が、細胞増殖に有効であることや、脂肪酸を含有するアルブミンの存在が必須であることを見出した。また、血清中に多量に存在するアルブミン、フェツインなどのタンパク質に結合している新たな増殖因子の可能性を見出した。有機酸の中では、すでに培地に添加されているピルビン酸に高い増殖促進効果が見出され、脂肪酸の中ではオレイン酸が効果的であった。

研究成果の概要(英文)：In this research, we analyzed and profiled factors of the cell growth included in an animal serum, and I had development of the basic culture medium which can substitute for fetal calf serum for my object. Proliferation of T-cell lines, Jurkat, and Molt-4 was examined as model cells, and then, I found that insulin, transferrin, selenious acid (ITS) and lipoproteins are effective in a cell growth. I also found that existence of albumin which contains fatty acids is indispensable. A possibility of a novel growth factor that it may combine with the albumin & fetuin which exist much in the serum was found. The high growth-promoting effect was observed by the pyruvic acid, which is a well known effective substance in the organic acids, and oleic acid was effective in the fatty acids.

研究分野：細胞生物学

キーワード：血清 無血清 FBS 脂肪酸 増殖因子 アルブミン

1. 研究開始当初の背景

動物細胞培養においては、ほとんどの場合、10%牛胎児血清 (FBS) の添加を必要としている。また、FBS の添加量を減らすためには、細胞増殖に効果のあるインスリン、トランスフェリン、亜セレン酸、脂肪酸、コレステロールなどを、細胞毎に適宜加えるなど、研究者が個々に対応している。FBS の成分はタンパク質、脂質、糖質、電解質、微量元素など、多数の成分が幅広い量で含まれており、どの物質が細胞増殖に必須で、どれだけの量必要かは未だによくわかっていない。あくまでも、細胞毎に研究者が経験に基づいて選択しているのが現状である。

我々は、これまで既知のケモカインとは異なるガレクチン、galectin-9 の構造特性と生理活性の相関性を明らかにしてきた。また、galectin-9 の比較対象として使用した galectin-8 に強い好中球接着誘導作用と活性酸素産生誘導作用を見出し、好中球の細胞応答がインテグリン M と結合することで開始することを明らかにした (N. Nishi et al. *Glycobiology*, 13, 755-63 (2003))。さらに、各種血球由来培養細胞に対する細胞応答 (細胞接着とアポトーシスを指標) を調べ、細胞接着については細胞毎に発現しているインテグリンファミリーが、ガレクチン受容体であることを明らかにした (L.-H.Lu et al. *J. Biochem.*, 141, 157-172 (2007)、H. Yamamoto et al. *J. Biochem.*, 143, 311-324 (2008))。最近、ガレクチン-9 の構造変化や立体構造解析を通じて、臨床応用に向けた改変ガレクチン-9 の開発にも取り組んでいる (A. Ito et al. *Glycobiology*, 23, 920-925 (2013)、Y. Nonaka et al. *J. Biochem.*, 153, 463-471 (2013))。

ガレクチンファミリーは β -ガラクトシドを持った糖鎖を特異的に認識する動物レクチンで、細胞増殖、アポトーシスや細胞接着・遊走など基本的な生物活性に関わる。また、炎症反応やがんの発症・転移・進行など病態との関連性も深く、新たな免疫抑制剤、がんの治療薬としての利用も検討されている。一方、ガレクチンによるアポトーシスや細胞接着誘導実験中に、無血清下で各種血球細胞が、ガレクチンの有無に関わらず培養プレートに強く接着し、増殖抑制あるいはアポトーシス・ネクローシスを誘導することも分かった。つまり、血清には血球系細胞の非特異的接着を抑制する因子が存在し、これらはアルブミン、IgG など血清中の主要な蛋白質でないことが分かった。また、動物血清に含まれる血球細胞の増殖阻害因子の一つが IgM であることも見出した。こうした、ガレクチンの研究を通して、本来浮遊性の血球系細胞の非特異的接着を抑制したり、増殖促進

/阻害する因子群を同定・プロファイリングをして、FBS を代替し得る新たな無血清培地を開発するという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、動物血清に含まれる細胞増殖に関わるタンパク因子群および脂質、有機酸を、浮遊血球系細胞をモデルに同定・プロファイリングし、100%輸入牛胎児血清 (FBS) に頼る、現在の細胞培養法の改善を図る。さらに、同定した増殖因子、脂質、有機酸に加えて、微量元素や各種ホルモンの添加による新しい無血清培地を構築する。また、構築した無血清培地を利用した細胞増殖に対する簡便な毒性検査法を開発する。無血清培地は iPS 細胞を利用した各種分化細胞の樹立・大量生産に寄与し、有用なタンパク製剤やワクチン用ウイルスの生産にも役立つことが期待できる。

3. 研究の方法

平成 28 年度は、FBS や各種血清から増殖に必須のタンパク質因子群の同定と脂質、有機酸、微量元素、ホルモンの細胞増殖効果を調べ、インスリン、トランスフェリン、亜セレン酸 (ITS) とリポタンパク質 (LDL, HDL)、組換えアルブミン、脂肪酸などの有効な成分からなるプロト型無血清培地を構築する。また、高い LDL 要求性有する Jurkat 細胞の増殖に血清中の低分子物質 (200-1000Da 程度) がわかったので、この低分子物質 (有機酸を想定) の解析を行う。

(1) 増殖因子群のプロファイリング: T 細胞株 (Jurkat, Molt-4) をモデルに各種動物血清の細胞増殖活性を解析したところ、FBS の硫安 50-75% 画分に強い増殖活性が検出され、30-50% 画分で (主成分はフェツイン、リポタンパク質) 増殖と阻害の両活性が認められたので、50-75% 画分 (主成分はアルブミン) を中心に細胞増殖物質の同定を進めて、インスリン以外に必須な細胞増殖因子が存在するかどうかを検討しつつ、その実体を明らかにする。また、必須脂肪酸であるリノレン酸、リノール酸やクエン酸、ピルビン酸などの有機酸、微量元素 (Cu, Zn, Mn, Mo など) や、カテコールアミン、コルチゾールなどのホルモンの細胞増殖効果を調べる。血清中の低分子物質 (200-1000Da) は受託解析サービスにより解析する。

(2) プロト型無血清培地の構築と検証: ITS, HDL, 組換えアルブミン, ホルモン, 有機酸, 脂質, 微量元素を加えたプロト型無血清培地を構築し、その効果を T 細胞株や動物体内にある正常なマウスの骨髄細胞やヒト末梢血リンパ球を用いて細胞増殖性につ

いて FBS と比較検討する。また、各種接着性細胞株やヒト血管内皮細胞 (HUVEC) などの細胞増殖性についてもその効果を調べる。

平成29年度は、平成28年度の研究成果から、29年度は血清からインスリン以外の細胞増殖因子が同定できていれば、この新規増殖因子をプロト型無血清培地 (無血清基礎培地) に加えて、FBSの活性に相当する無血清培地カクテルの構築を試みる。さらに、コレステロール、合成脂質、植物由来脂質成分などを組み合わせてリポタンパク質の機能を代替する脂質供給源を構築し、最終的にはあらゆる血清由来成分を排除して、必要最小限の組換えタンパク質と脂質、有機酸、微量元素、ホルモンなどの由来の明確な無血清培地を確立する。そうして、構築した完全無血清培地の有効性を細胞毒性検査法の確立や組換えタンパク質の生産性を指標に検証する。

(1) 血清中の新規細胞増殖因子の効果の検証と脂質供給源の開発: FBSなどの血清で同定した新規増殖因子をITS, HDL, 組換えアルブミン、脂質、微量元素からなるプロト型基礎培地に添加してT細胞の増殖性を検証する。また、現在用いている最も効率的な脂質供給源はHDLであるが、HDLはあくまで血液由来成分であるため、HDLを代替するコレステロール、合成脂質、植物由来脂質成分などで置き換えることを試みる。

(2) 無血清培地の有効性の検証: 酸化LDLは生体内では動脈硬化症のリスク要因であることが知られている。我々は酸化LDLがT細胞に対して高い細胞毒性を示すことを見出し、細胞培養系では高濃度のFBS存在下でその毒性は低下する。低濃度のFBSや無血清基礎培地ではこの酸化LDLの細胞毒性はより顕著であることがわかっているため、新たに構築した完全無血清培地による酸化LDLの毒性評価、近年問題にされている食品のトランス脂肪酸の毒性評価なども行う。HEK293, COS, CHOタンパク発現系に広く利用される細胞株について、開発した無血清培地中での高効率なリコンビナントタンパク質の調製法を検討する。

4. 研究成果

平成28年度

(1) FBSから細胞増殖因子群を同定することが最も重要な課題であったが、同定にまでは至らなかった。(2) 有機酸の効果を調べたところ、ピルビン酸が無血清下の培養に有効であることが確認できたことから、無血清培地に加えるべきコンポーネントの一つとして確定できた。(3) 脂質の中ではオレイン酸などの脂肪酸が必須であることがわかったが、これはFBS中の主にアルブミンと結合した状態で存在することが予想された。市販されている脂質混合物は、これまでの実験から

強い毒性を示すことが多かったが、アルブミンとコンジュゲートしていることで脂肪酸は機能を発揮すると共に、その毒性を抑制されているものと考えられた。今後、脂質成分はアルブミンと同時に加えることが必要である。現在では、アルブミンは既に組換体が市販されているので、血液由来成分として使用しなくても良い。(4) 脂質のうちコレステロールは、T細胞株の中でJurkat細胞の増殖に必須であることがわかっていたが、今回、コレステロールの供給源として、市販のコレステロールと可溶化剤を組み合わせることで、ほぼHDLの機能を代替できることがわかった。

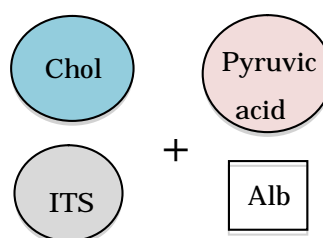
平成29年度

(1) FBS中にインスリンなど細胞増殖因子が存在する強い証拠を得ることができた。FBSをHClなどの強酸で抽出することでアルブミンと部分的に増殖活性を分離することができた。この増殖因子は還元アルキル化の処理によっても安定で、95℃の加熱処理、6Mグアニジン塩酸中でもその生理活性を失うことはなかった。代表的なポリペプチド性増殖因子は、インスリンをはじめとしてほとんどが分子内にCysを含有し、ジスルフィド結合を有していることから、本増殖因子は新規増殖因子である可能性が高い。また、この増殖因子はインスリンと同等の活性を有することから、もしかしたら、インスリンの増殖シグナルとクロストークしている可能性も示唆される。

(2) 本研究において確定した最少の無血清培地カクテルは、インスリン(組換え体)、トランスフェリン(組換え体)、亜セレン酸、ピルビン酸、アルブミン(オレイン酸を含む組換え体)である。

(3) この最少無血清培地の中で、新規増殖因子はインスリンの機能を代替できる可能性がある。

最少無血清培地用カクテル



Chol: Cholesterol

ITS: Insulin, Transferrin, Selenite

Organic acid: Pyruvate

Alb: recombinant human albumin conjugated with oleic acid

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1 Ito A, Nonaka Y, Ogawa T, Nakamura T, Nishi N. (2017) Small Leucine-rich repeat proteoglycans associated with mature insoluble elastin serve as binding sites for galectin. Biosci. Biotechnol. Biochem. 81 2098-21049) 査読あり

〔学会発表〕(計 1 件)

1 The roles of lipids on the growth of T-cell lines under serum-free condition

Takanori Nakamura, Kayoko Yamashita, Yasuhiro Nonaka & Takashi Ogawa

2017 年度 生命科学系学会合同年次大会
(2017 年 12 月 8 日) 神戸ポートアイランド

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 隆範 (Nakamura, Takanori)
香川大学・医学部・教授

研究者番号：70183887

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者
なし ()

研究者番号：

(4) 研究協力者
山下 賀容子 (Yamashita, Kayoko)
香川大学医学研究科・学生