

培養ミルクと乳腺上皮細胞の培養モデル

小林 謙*

(北海道大学 大学院農学研究院 細胞組織生物学研究室, 〒060-8589 北海道札幌市北区北9条西9丁目)

Cell-based milk and a culture model using mammary epithelial cells

Ken Kobayashi

(Laboratory of Cell and Tissue Biology, Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University,
North 9, West 9, Sapporo, Japan, 060-8589)

要 旨

近年、新たな食料生産の方法として細胞農業が着目されている。細胞農業とは動物や植物から得られる収穫物を細胞培養によって生産する方法であり、必要なものは細胞と培養液、無菌管理された培養設備である。細胞農業の代表例として培養肉がある。培養肉が家畜から採取した筋細胞を増殖させることで生産することは広く一般的に知られている。しかし、培養ミルクをどのように生産するかを知る人は少ない。培養ミルクの生産は哺乳動物の母体から採取した乳腺上皮細胞を用いて行う。乳腺上皮細胞とは泌乳期の乳腺に存在する乳分泌細胞であり、ミルク成分の大半を合成、分泌する細胞である。この乳腺上皮細胞を培養下で増殖させ、ミルク成分を培地中に分泌するように誘導し、培養ミルクを生産する。本稿では培養ミルクの現状と乳腺上皮細胞に関する学術的知見を紹介した後、培養ミルク生産に関する技術的な原理と今後の課題を説明する。

1. 細胞農業と培養ミルク

1-1. 細胞農業による食料生産

近年、新たな食料生産の方法として細胞農業が着目されている。細胞農業とは、動物や植物から得られる収穫物を細胞培養によって生産する方法であり、必要なものは細胞と培養液、無菌管理された培養設備である。従来の農業とは異なり、広大な畑や牧草地を必要とせず、排泄物や温室効果ガスの排出も無い。また、気温や降水量の影響を受けず、植物や動物の成長を待つ必要が無い。管理された無菌設備で行うため、農薬や抗生物質も必要としない。さらに、場所を選ばないため、宇宙環境での食料生産方法としても期待されている。

細胞農業と聞くと最新技術に感じられるが、実はその歴史は長く、私たちは既に細胞培養によって生産する技術の恩恵を受けている。代表的な例として糖尿病治療薬のインスリンが挙げられる。インスリンとは膵臓のランゲルハンス氏島にあるB細胞が合成・分泌するホルモンであり、糖尿病治療薬に用いるインスリンは40年ほど前までブタやウシの膵臓から抽出されていた。しかし、遺伝子組換え技術の発展により細菌や酵母などの微生物にインスリンを産生させることが可能となり、1982年には微生物由来のヒトインスリン製剤の販売が開始された。抗がん剤などの製造にも同様の技術は利用されており、バイオ医薬品として現代医療に幅広く貢献している。また、チーズ製造に用いるレンネットも細胞農業の技術で製造されている。レンネットとは本

* E-mail : kkobaya@agr.hokudai.ac.jp

来、子牛や仔山羊の胃から分泌される酵素の混合物であり、チーズ製造の際に生乳中のカゼインを凝集させるために使用されるが、これも1990年代には遺伝子組換えした微生物による生産が始まり、現在ではレンネット市場の半分ほどのシェアを占めるに至っている。

上述のように、私たちは細胞農業に基づく生産物の恩恵を既に受けている。一方で細胞農業の技術で生産した穀物、肉、ミルクなどを食べたことがある人はほとんどいない。なぜなら、少ない生産量でも高価格で販売できるバイオ医薬品やレンネットと異なり、これらの一般的な食料は安価で大量に生産しなければならず、そのための技術力が無かったためである。しかし、ここ数年の技術進歩により製造コストを抑えることができるようになり、シンガポールやアメリカでは培養肉が販売される段階に到達した。さらに、現時点で懸念している世界的な食糧不足、反芻家畜が排出する温暖化ガスによる気候変動、家畜の飼育と動物愛護の両立、家畜への抗生物質投与による薬剤耐性菌の発生リスクなど、これらの諸問題を解決する方策として細胞農業が期待されており、今後も細胞培養技術の向上に伴って細胞農業がますます拡大することが予想される。

1-2. 細胞農業と培養ミルク

近年、培養肉を生産する設備や培養肉を実際に食べる映像をテレビやネットニュースで見ることが増え、多くの人にとって培養肉がつくられる過程をイメージすることが容易になった。しかし、培養ミルクがどのようにつくられるのかをイメージできる人は依然として少ない。なぜなら、現時点において培養ミルクに関する取り組みは日本国内でほとんど行われておらず、その製造方法や開発プロセスをメディアで紹介する機会が極めて少ないからである。また、世界的に見ても培養ミルクの製造は培養肉と比べて大幅に遅れており、培養ミルクの製造工程を一般公開する企業もほとんどないため、関係者以外が得られる培養ミルクの情報は限定的である。

現時点で開発が進められている培養ミルクの製造

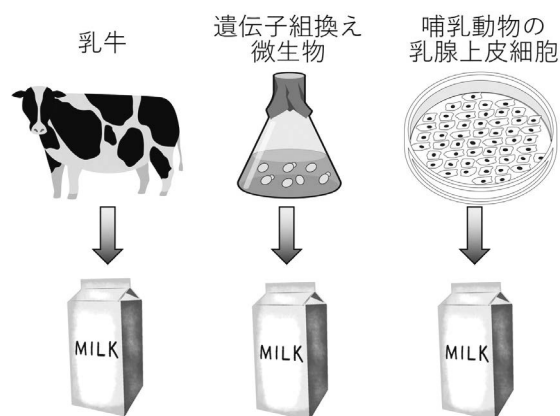


図1 乳牛と細胞農業による乳生産

方法を大別すると2つに分けられる(図1)。一つは、インスリンやレンネットと同様に遺伝子組換えした微生物による生産方法である。生産したい乳タンパク質の遺伝子を微生物に導入し、微生物を培養しながら乳タンパク質を合成させ、培養物から乳タンパク質を抽出・精製する。そのため、遺伝子導入した特定のミルク成分のみをつくることができる。例えば、代表的な乳タンパク質であるカゼイン、抗菌タンパク質のラクトフェリンなどである。もう一つは、哺乳動物の母体で実際にミルクをつくっている細胞(乳腺上皮細胞)を用いる方法である。この方法の場合、乳腺上皮細胞が生体同様に多種多様なミルク成分(カゼイン、ホエイタンパク質、乳脂質、乳糖、オリゴ糖)を合成・分泌するため、培養ミルクの組成は本物のミルクとほとんど変わらない(他細胞が産生する免疫グロブリンやアルブミンなどを除く)。

遺伝子組換え微生物による製造方法は既存のバイオ医薬品の技術と設備を利用することができるため、培養ミルク生産に向けての技術的ハードルは低い。現在、ImaginDairy(イスラエル)、Helaina(アメリカ)、Formo(ドイツ)などの企業が培養ミルクとして乳タンパク質の製造を進めている。一方、乳腺上皮細胞を用いた培養ミルクもTurtleTree Labs(シンガポール)、Opalia(カナダ)、およびBiomilk(アメリカ)などの企業が開発を進めている。公にはなっていないが、他にも数多くのベンチャー企業や大学研究室が培養ミルク生産に向けた研究を進め

ている。しかし、筆者が知る限りにおいて乳腺上皮細胞を用いた培養ミルクは製造段階に至っていない。

前述したように、哺乳動物の母体が産するミルクは多種多様な成分の混合液である。そのため、遺伝子組換え微生物によって産生される乳タンパク質は、本質的な意味で培養ミルクとは言えないかもしれない。一方、乳腺上皮細胞を用いた方法では主要なミルク成分が一通り生産されるため、紛れもない培養ミルクと言える。そこで以降の本稿では、乳腺上皮細胞による培養ミルクの生産方法に着目する。まず生体内で乳腺上皮細胞がどのようにミルク成分を合成・分泌しているかを基礎研究による学術的知見に基づいて紹介し、その後に培養ミルクを製造するための原理と今後の課題を説明する。

2. 乳腺上皮細胞がミルク成分を産生するメカニズム

2-1. 乳腺胞の乳腺上皮細胞

哺乳類の母体は分娩後にミルクの分泌を開始し、ミルクを与えながら子を育てる。そのため、ミルクには子の成長に必要な栄養素である乳タンパク質、脂質、乳糖などが豊富に含まれている。これらのミルク成分の大半を合成・分泌する細胞が乳腺実質に存在する乳腺胞の乳腺上皮細胞である。乳腺胞とは妊娠後期に形成される袋状の構造物であり、その内側には乳腺上皮細胞が一層に敷き詰められている(図2)。乳腺上皮細胞は乳腺胞を取り囲む血液から供給される栄養素を材料としてミルク成分を合成し、乳腺胞の内腔へと分泌する。分泌されたミルク成分は授乳刺激に応じて乳腺胞内腔から乳管に排出され、乳管を通過して乳頭口に届けられ、子が授乳できるようになる。したがって、細胞レベルで捉えると、ミルクとは乳腺上皮細胞の分泌液となる。

2-2. ミルク産生のために存在する乳腺胞の乳腺上皮細胞

乳腺胞の乳腺上皮細胞は子にミルクを供給する期間に限定して活躍する細胞であり、哺乳類の母体が

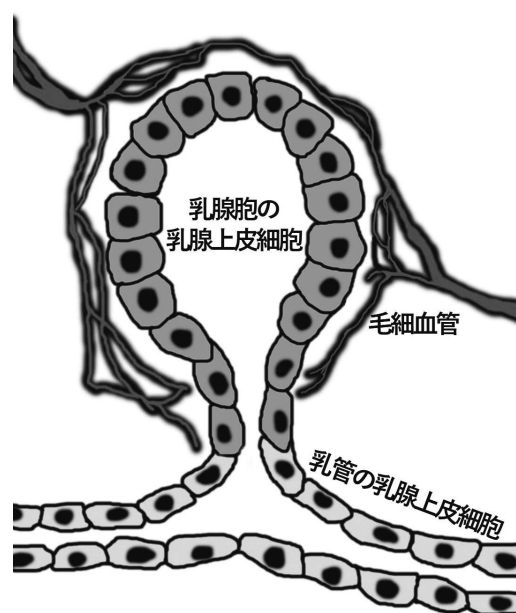


図2 乳腺胞の乳腺上皮細胞

妊娠する前には存在しない。妊娠した後、乳腺内の乳管末端に存在する細胞が分裂を繰り返す、乳腺胞の元となる細胞が増殖する¹⁾。妊娠中期から後期にかけて増殖した乳腺上皮細胞の一部が乳管から突出するように移動し、未熟な乳腺胞を形成する。妊娠末期になると乳腺胞の乳腺上皮細胞はミルク成分の合成・分泌に必要な能力を獲得し、同時に乳腺胞の内腔構造を発達させる。分娩後、乳腺胞の乳腺上皮細胞は本格的にミルク成分の合成を開始し、合成したミルク成分を乳腺胞腔へと分泌する。この合成と分泌は、授乳刺激と乳汁排出が定期的に行われている間は順調に続く。しかし、子が離乳して授乳刺激と乳汁排出が行われなくなると、乳腺上皮細胞のミルク産生能力は徐々に低下し、やがて過度に蓄積したミルク成分によって乳腺上皮細胞の細胞死が引き起こされる²⁾。その結果として乳腺胞とその構成細胞である乳腺上皮細胞は消失し、乳腺内の構造は妊娠前の状態に戻る。したがって、乳腺胞の乳腺上皮細胞とは、子にミルクを供給する時期だけに存在するようにプログラムされた細胞と言える。

2-3. 乳腺上皮細胞におけるシステマチックなミルク産生経路

乳腺胞の乳腺上皮細胞はミルク成分を効率的に合

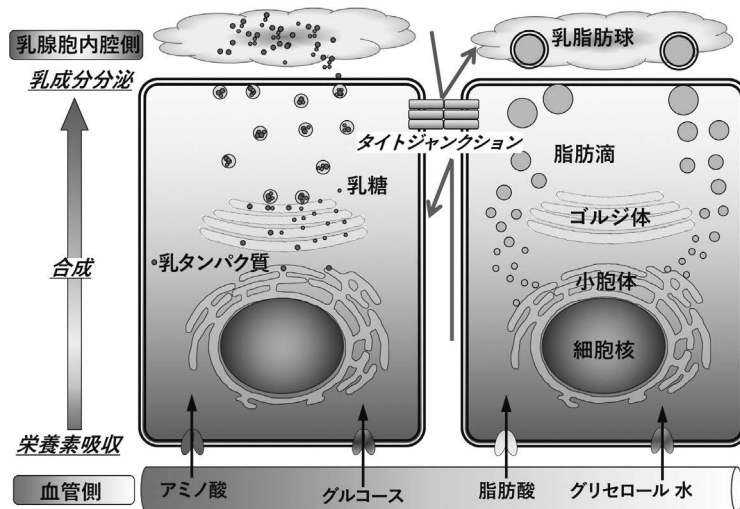


図3 乳腺上皮細胞におけるミルク産生経路とタイトジャンクション

成・分泌するための特別な経路をもっている³⁻⁵⁾ (図3)。まず、乳腺上皮細胞は血管に面した側底部側の細胞膜からアミノ酸、グルコース、脂肪酸などの栄養素を吸収する。しかし、ほとんどの栄養素は脂質二重層を通過することができないため、これらの栄養素は細胞膜に存在するアミノ酸輸送体、グルコース輸送体、脂肪酸輸送体などの膜タンパク質を通ることによって効率のかつ大量に細胞内へと取り込まれる。細胞内に取り込まれた栄養素は細胞質、小胞体、ゴルジ体、リボソームなどを移動しながら代謝変換され、最終的に乳糖、脂質、およびカゼインやラクトフェリンを含む多様な乳タンパク質が合成される。合成されたミルク成分の中でも乳タンパク質や乳糖などの水溶性成分はゴルジ体から分離した分泌小胞に含まれた状態で細胞質を移動し、乳腺胞内腔に面した頭頂部側の細胞膜から開口分泌によって細胞外に排出される。一方、小胞体で合成されたトリグリセリドは小さな乳脂肪滴として細胞質に放出され、細胞質を頭頂部側に移動しながら乳脂肪滴同士が融合を繰り返し、最終的に細胞膜に囲まれた状態で分泌される(離出分泌)。以上のように、乳腺上皮細胞は側底部側の細胞膜から栄養素を取り込み、細胞内でミルク成分へと代謝変換し、頭頂部側細胞膜から分泌するという一方通行のミルク産生経路を備えている。このシステムチックな経路はさながら工場の生産ラインの様であり、材料搬入(栄

養素吸収) ⇒製造ライン(ミルク成分の合成) ⇒製品の梱包(分泌小胞・脂肪滴融合) ⇒製品の出荷(開口分泌・離出分泌)として例えることもできる。

2-4. 乳腺上皮細胞のミルク産生を支えるタイトジャンクション

乳腺胞の乳腺上皮細胞が分泌したミルク成分は乳腺胞腔から体内側に漏れたり、体内側に向かってミルク成分が分泌されたりすることはない。当たり前のことだが、ミルク成分が体内側に逆流しないようにするためには乳腺上皮細胞に二つの条件が備わっていなければならない。一つは、乳腺上皮細胞と乳腺上皮細胞の間に隙間が無いことである。もう一つは、乳腺上皮細胞のミルク産生経路が側底部側(血管側)から頭頂部側(乳腺胞内腔側)に向かって一方通行で行われていることである。この二つの条件を満たすため、乳腺上皮細胞はタイトジャンクションと呼ばれる細胞間の接着構造を形成する⁶⁾(図3)。

通常、隣り合う細胞の細胞膜が直に隙間なく密着することはない。なぜなら、隣り合う細胞膜の外表面はともに親水性であり、なおかつ膜タンパク質や糖鎖などの突起物が存在するからである。そこで、乳腺上皮細胞は細胞間の隙間を塞ぐため、タイトジャンクションという特別な構造を形成する。このタイトジャンクション、細胞膜を貫通する複数の膜タンパク質とそれを支える細胞内のタンパク質(裏

打ちタンパク質)から構成されており、特に細胞外に突出した構造は Claudin と呼ばれる膜タンパク質によって形成されている⁷⁾。隣り合う細胞同士が形成した Claudin の構造が相互に結合することによって細胞の隙間が埋められ、ミルク成分が細胞間隙から漏出しなくなっている。このように細胞間隙の物質移動を制限する機能をタイトジャンクションのバリア機能と呼んでいる。

乳腺上皮細胞のミルク産生経路が一方通行になるためには、栄養素を吸収する血管側(側底部側)の細胞膜とミルク成分を分泌する乳腺腔側(頭頂部側)の細胞膜が完全に分けられなければならない。この分けを行うために必要な構造がタイトジャンクションである⁸⁾。なぜなら、タイトジャンクションを構成する膜タンパク質は牧柵のような構造を形成しながら細胞膜を一周し、その構造を超えて細胞膜のリン脂質や膜タンパク質が自由に行き来できないようにしているからである。そして、タイトジャンクションが細胞膜成分の行き来を制限することによって、側底部側と頭頂部側の細胞膜に異なる種類のリン脂質や膜タンパク質を配置させることが可能となり、栄養素吸収に特化した側底部側の細胞膜とミルク成分の分泌に特化した頭頂部側の細胞膜が形成されるようになる。このようなタイトジャンクションの機能をフェンス機能と呼んでいる。

タイトジャンクションのバリア機能とフェンス機能を備えた乳腺上皮細胞では、ミルク成分が細胞と細胞の隙間から体内側に漏出することもなく、ミルク成分が体内側に向かって分泌されることもなくなる。そのため、乳腺上皮細胞がタイトジャンクションを形成することはミルク成分の合成と分泌を適切に行うために必要不可欠である。

2-5. 乳腺上皮細胞を調節する内因性因子

妊娠末期から分娩直後にかけて、ミルク成分の産生能力と強固なタイトジャンクションの形成が乳腺の乳腺上皮細胞に誘導される。この誘導の中心的役割を担っているものが、プロラクチンとグルココルチコイドである。どちらも妊娠末期に急増するホ

ルモンであり、乳腺上皮細胞に発現する受容体と結合すると、その結合刺激がバトンリレーのようなメカニズムで細胞内に伝わっていき(細胞内シグナル経路)、ミルク成分の産生とタイトジャンクションの形成に必要なタンパク質の発現量を増加させたり、タイトジャンクションタンパク質の局在を変化させたりする⁹⁾。泌乳期において、血中グルココルチコイド濃度は大きく変動しないが、プロラクチン濃度は授乳刺激に応じて上昇する。そのため、泌乳期における乳腺上皮細胞のミルク成分産生量は授乳刺激の有無によって増減することになる。

乳腺上皮細胞のミルク産生能力とタイトジャンクションはプロラクチン以外にも多種多様な内因性成分によって調節されている。例えば、血糖値調節や糖尿病でおなじみのインシュリン、細胞増殖を促進する上皮成長因子(EGF)やインシュリン様成長因子(IGF)、子供から大人に成長する際に活躍する成長ホルモンなどである¹⁰⁻¹²⁾。これらの内因性成分は、乳腺上皮細胞のミルク産生を上方調節する。一方、TNF- α やIL-1 β などの炎症性サイトカイン、性周期にともなって増減するプロゲステロンやエストロゲン、脂肪細胞から分泌されるレプチン、神経伝達物質であるセロトニンなどはミルク産生に対して抑制的な内因性成分である^{13,14)}。いずれの内因性成分も乳腺上皮細胞の受容体に結合し、特定の細胞内シグナル経路を活性化させることによって、ミルク産生やタイトジャンクションの形成を調節する。代表的な細胞内シグナル経路としては、プロラクチンによるJAK2/STAT5経路、インシュリンによるmTOR/Akt経路、炎症性サイトカインによるNF κ B経路やJAK2/STAT3経路などが挙げられる^{10,15,16)}。逆に言えば、これらの細胞内シグナル経路の活性化状態を調べることによって、乳腺上皮細胞がどのような内因性成分に調節されているかを知ることができ、乳腺上皮細胞のミルク産生能力とタイトジャンクションがどのような状態であるかを推測することもできる。

2-6. 乳腺上皮細胞を調節する外因性成分

乳腺上皮細胞のミルク産生能力とタイトジャンクションの形成を調節する成分は、母体が経口摂取する食品中にも含まれている。例えば、枝豆や豆腐、もやし、大豆、味噌などに含まれるイソフラボン類である。イソフラボン類の種類と含有量はマメ科植物の種類によって異なり、大豆にはゲニステインとダイゼイン、ひよこ豆や赤クローバーにはビオカニン A、アルファルファにはホルモノネチンやクメストロールが多く含まれている。筆者らの研究の結果、乳腺上皮細胞のミルク産生とタイトジャンクションはビオカニン A、ゲニステイン、ホルモノネチンによって抑制的に、ダイゼイン、パラエチルフェノール、エクオールによって促進的に調節されることが明らかになっている¹⁷⁾。他にも消化吸収されたアミノ酸や脂肪酸などの栄養素や食品添加物の非糖質系甘味料、食品ではないが向精神薬や煙草のニコチンが乳腺上皮細胞と結合し、そのミルク産生能力を上方調節あるいは下方調節することが報告されている¹⁸⁻²¹⁾。

乳頭口から侵入した細菌とその由来成分も乳腺上皮細胞のミルク産生能力とタイトジャンクションの形成を調節する。例えば、大腸菌とその細胞壁成分であるリポポリサッカライド、黄色ブドウ球菌とその構成成分であるリポタイコ酸などである^{22,23)}。乳頭口から侵入した微生物とその構成成分は乳腺上皮細胞の頭頂部側の細胞膜にある受容体と結合し、乳腺上皮細胞のミルク成分の産生能力の低下やタイトジャンクションバリアの脆弱化を引き起こす。また、微生物とその構成成分は乳中や乳腺間質に存在する免疫細胞を活性化し、炎症性サイトカインの分泌量を増加させる。増加した炎症性サイトカインは乳腺上皮細胞に結合し、ミルク産生能力とタイトジャンクションバリアをさらに下方調節する^{13,14)}。そのため、感染による炎症が起きている乳腺では、乳腺上皮細胞のミルク産生が著しく阻害された状態になる。

3. 培養ミルクを生産する乳腺上皮細胞の培養モデル

3-1. 培養ミルクを生産する際に求められるもの

前述したように乳腺胞の乳腺上皮細胞は一方通行のミルク産生経路とミルク成分漏出を防ぐタイトジャンクションを備えている。このシステムチックな機構が不完全な場合、乳腺上皮細胞は本来の能力を発揮できず、ミルク成分の産生量は減少する。そのため、乳腺上皮細胞を用いて培養ミルクを生産するには生体同様に乳腺上皮細胞のミルク産生経路とタイトジャンクションの形成を再現した培養モデルが必要になる。また、上記 2-5. で示したように乳腺胞の乳腺上皮細胞のミルク産生能力は多種多様な内因性成分によって調節されており、上記 2-6. で示したようにミルク産生とタイトジャンクションを調節する外因性成分も様々である。すなわち、乳腺上皮細胞の性状は幅広い成分によって調節されている。そのため、培養モデルに用いる培地成分の選択には細心の注意が必要である。他にも乳腺上皮細胞を大量に入手する方法や培地中に分泌されたミルク成分を効率的に回収する方法など、培養ミルクを実現化の際に確立すべきことがある。以降の本稿ではこれらの点について説明する。

3-2. 乳腺上皮細胞の供給源

乳腺上皮細胞の合成・分泌する乳タンパク質の種類やアミノ酸配列は哺乳動物の種類によって異なる。そのため、牛乳と同じ乳タンパク質を含む培養ミルクを生産したい場合、ウシ乳腺から採取した乳腺上皮細胞を用いることになる。ミルク産生量の多い乳牛の乳腺には乳腺上皮細胞が多く存在するので、細胞供給源としては申し分ない。しかし、ミルク産生量の多い乳牛の経済的価値は高く、酪農家も手放さないため細胞の供給源とすることは難しい。一方、乳房炎や外傷、周産期病や繁殖障害で生乳が搾れなくなった乳牛、あるいは乳量が低下した乳牛は廃用牛としてと畜（屠畜）される場合がある。日本国内の廃用乳牛の頭数は毎年 30 万頭を超えてい

るが、それらの乳腺には特に有効活用法が無く、経済的価値も低い。そこで、廃用乳牛の乳腺を乳腺上皮細胞の供給源として活用することができれば、乳腺に新たな有効活用方法が創出され、その利益は酪農家に還元されることが期待される。すなわち、培養ミルクの生産と既存の酪農業は両立できるのである。

乳腺上皮細胞の供給源を搾乳したばかりのミルクにする方法もある。なぜなら、ミルク中には乳腺胞から剥離した乳腺上皮細胞が含まれているからである。例えば、ヒト母乳 1 mL には約 500 個以上、ブタ母乳になると 6 万個以上の乳腺上皮細胞が含まれる²⁴⁾。実際にヒト母乳から乳腺上皮細胞を単離し、培養下で増殖させる報告もある²⁵⁾。この方法を用いれば母体に対して非侵襲的に乳腺上皮細胞が採取することができるため、ヒトの乳腺上皮細胞を用いた培養ミルクの生産も可能かもしれない。

3-3. 乳腺上皮細胞の単離方法

生体において、乳腺胞は乳腺間質のコラーゲン線維に埋もれた状態で存在する。そのため、乳腺胞の乳腺上皮細胞を単離するにはまずコラーゲン線維を酵素で分解する必要がある。その際に用いる酵素はコラーゲンを特異的に分解する酵素のコラゲナーゼであり、トリプシン、ディスパーゼ、ヒアルロニダーゼ、DNase など他の酵素と併用する場合もある。これらの酵素を含む培地に細切した乳腺を浸漬し、乳腺間質のコラーゲン線維を分解する。続いて、乳腺片をピペッティングでさらに解きほぐし、乳腺上皮細胞を含む細胞懸濁液にする。なお、この段階での乳腺上皮細胞はデスモソームなどの接着構造によって細胞同士が強固に結合しており、数百個の細胞が集まった細胞塊として存在している（図 4）。

細胞懸濁液には乳腺上皮細胞塊のみならず、乳腺内に存在する多種多様な細胞が含まれている（筋上皮細胞、脂肪細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、マクロファージ、形質細胞など）。そこで、細胞懸濁液の中から乳腺上皮細胞のみを単離する必要

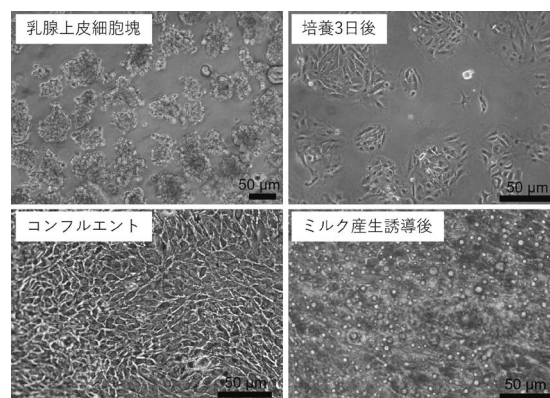


図 4 培養下のウシ乳腺上皮細胞

がある。設備の整った研究室では、Fluorescence activated cell sorter (FACS) や Magnetic Cell Sorter (MACS) などの専用機器を用いて乳腺上皮細胞塊を高純度で単離することができる。しかし、FACS は数千万円以上する高額な機器であり、MACS はランニングコストが高い。そこで筆者らは乳腺上皮細胞を単離する方法として密度勾配遠心法を採用している。密度勾配遠心法は高比重の溶液 (Percoll や血清など) と細胞懸濁液を混合した後に遠心分離することで、サイズや密度の異なる細胞を振り分ける方法である。大きな細胞塊を形成した状態の乳腺上皮細胞は沈殿しやすく、この密度勾配遠心法を繰り返すことによって、他の細胞を混入させずに単離することができる。

3-4. 乳腺上皮細胞の保存方法

泌乳牛の乳房には数十兆個の乳腺上皮細胞が存在する。仮に 25 兆個の乳腺上皮細胞を平面状に播種したとすると、その広さは 2,500 平方メートル、50 m プール 2 面分に匹敵する。廃用乳牛の頭数も年間 30 万頭であるため、廃用乳牛の乳房を用いることができれば、培養ミルクの製造に用いる乳腺上皮細胞に困ることは無い。さらに、大量に単離した乳腺上皮細胞を凍結保存すれば、任意の時期に任意の場所で培養ミルクの生産が可能になる。

乳腺上皮細胞の生存力は高く、凍結保存することによって長期保存することが容易である。凍結保存の際に特別な細胞凍結保存液や凍結方法を必要とせず、市販されている一般的な細胞凍結保存液 (セル

バンカー、バンバンカーなど)や自作の細胞凍結保存液(DMSO, ウシ胎児血清, 培地の混合液)で十分である。これらの細胞凍結保存液に単離した乳腺上皮細胞塊を懸濁し、 -80°C に凍結する。これだけで半年ほど保存できる。さらに長期保存したい場合は液体窒素のタンクに保存する(9年前に凍結させた乳腺上皮細胞も生存していることは確認済み)。これだけで解凍後の生存率は90%以上ある。したがって、乳腺上皮細胞塊を事前に凍結保存することによって、時期や場所を選ばずに培養ミルクの生産に用いることができる。実際、筆者らは数十グラムほどの乳腺から単離した乳腺上皮細胞塊を数十本に分けて冷凍保存し、適宜解凍して実験に使用している。

3-5. 乳腺上皮細胞の増殖方法

ウシ乳腺上皮細胞の増殖性は高く、一般的な組成の増殖培地(EGF, インシュリン, ウシ胎児血清を含むDMEMなど)を用いて1000倍以上に増やすことも容易である。しかし、乳腺上皮細胞の性質は培養下で増殖する間に変化しやすく、増殖させる期間が長いほど本来の性質が失われる。一般的にミルク産生の潜在力が高い細胞はコンフルエント(細胞が隙間なく敷き詰められた状態)の際に敷石状を呈する。しかし、増殖を重ねた乳腺上皮細胞は紡錘状(縦長の形状)の形態を呈するようになり、タイトジャンクションの形成やミルク産生能力の誘導が難しい。そのため、筆者らや共同研究者は乳腺上皮細胞を高密度になるように播種し、少ない増殖回数でコンフルエントに到達させるように培養している(図4)。将来的に培養ミルクの製造を実現化するには、増殖回数を重ねても本来の性質を失わないようにする増殖培地の開発が必要と考えられる。

3-6. 乳腺上皮細胞におけるミルク産生の誘導

乳腺上皮細胞にミルク産生を誘導する際に重要なことは、乳腺上皮細胞がコンフルエントの状態に到達していることである。その理由はタイトジャンクションにある。前述の2-4.で述べたように、乳腺

上皮細胞が適切なミルク産生を行うためには、タイトジャンクションのフェンス機能によって細胞膜が頭頂部側と側底部側に区画化される必要がある。この細胞膜の区画化が行われることによって、乳腺上皮細胞は側底部側の細胞膜にグルコースやアミノ酸を細胞内に取り込むための膜タンパク質(輸送体やチャネル)を配置し、細胞内で合成したミルク成分を頭頂部側の細胞膜から分泌することができるようになる。しかし、タイトジャンクションの細胞外構造の幅は10 nmほどであり、タイトジャンクションの形成には乳腺上皮細胞同士が10 nm以内に近接する必要がある。そのため、ミルク成分産生を誘導する際、乳腺上皮細胞が隙間なく敷き詰められたコンフルエントの状態になるまで増殖させ、細胞同士を密接させなければならない(図4)。

コンフルエントに到達した乳腺上皮細胞にミルク産生能力を誘導するため、適切な培地で培養することが重要である。適切な培地とは何かというと、生体の乳腺胞において乳腺上皮細胞に届けられるミルク成分産生に必要な栄養素やミルク産生を促進する内因性成分を含んでいる培地である。すなわち、『2-3. 乳腺上皮細胞におけるシステムチックなミルク成分産生経路』と『2-5. 乳腺上皮細胞を調節する内因性因子』で述べた成分である。さらに、『2-6. 乳腺上皮細胞を調節する内因性因子』におけるミルク産生促進性の成分を追加で加えることによって、通常よりも多いミルク成分を産生させることも可能であると考えられる。

乳腺上皮細胞がミルク産生を開始した後は適切な方法で培地交換をしなければならない。実はこの適切な方法の培地交換、一般的な培養で使用されるシャーレで行うことはできない。その理由は乳腺上皮細胞のミルク産生経路における方向性とタイトジャンクションにある。生体の乳腺胞において、乳腺上皮細胞は側底部側の細胞膜で栄養素を吸収し、細胞内でミルク成分を合成し、頭頂部側に向かいながらタンパク質の修飾や脂肪滴の融合を進め、最終的に頭頂部側の細胞膜からミルク成分を分泌する。この一方通行のミルク産生経路の方向性を

獲得するためには、タイトジャンクションのフェンス機能によって細胞膜が頭頂部側と側底部側に分けられる必要がある。しかし一方で、乳腺上皮細胞の細胞間隙がタイトジャンクションによって完全に塞がれた場合、乳腺上皮細胞層の頭頂部側にある培地中の栄養素が側底部側の細胞膜に拡散することができなくなる。そのため、タイトジャンクションを形成した乳腺上皮細胞に栄養素を供給する場合、乳腺上皮細胞層の下側（側底部細胞膜側）から栄養成分を供給する必要がある。この供給に最適なものが小さな穴の開いた膜（ニトロセルロース膜やポリエステルメッシュメッシュ膜）を細胞の足場とする細胞培養インサート（Cell culture insert）である。

Cell culture insert を用いれば、生体の乳腺上皮細胞と同様に、乳腺上皮細胞の側底部側の細胞膜から培地中の栄養素が供給できるようになる。そして Cell culture insert は培養ミルクの生産においてメリットにもなる。それは膜の上に播種した乳腺上皮細胞層がタイトジャンクションを形成した際、膜の上側の培地（上槽培地）と膜の下側の培地（下槽培地）が隔離され、ミルク成分の分泌が上槽培地のみになる点である。この状態の培養モデルでは、下槽培地の栄養素供給と上槽培地のミルク成分回収を独立した流れで行うことができるようになる。

4. 培養ミルクの実現化に向けた解決すべき課題

筆者らはウシ乳腺上皮細胞を用いてミルク成分を産生する培養モデルを確立している^{26,27)}。しかし、現時点の培養モデルでは乳腺上皮細胞のミルク産生能力は十分に発揮されていない。それは培養モデルの培地交換の頻度に問題があるからである。乳腺上皮細胞のミルク産生能力を十分に発揮するためには、生体の血流と搾乳を模した培地交換システムがそれぞれ必要である。

血液を模した培地交換システムが必要な理由は、乳腺上皮細胞はアミノ酸やグルコースなどの栄養素をミルク成分合成の材料に使用するからである。この栄養素の供給が滞ったり、栄養素の濃度が不安定

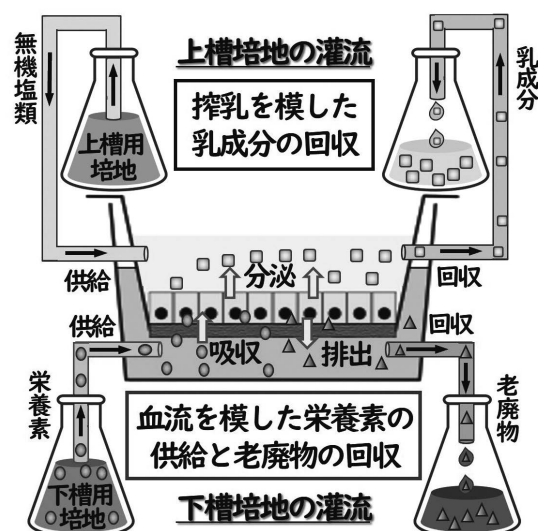


図5 二系統灌流培養システム

に増減したりすると、乳腺上皮細胞のミルク成分産生量は減少する。そのため、生体の血流と同様に絶えず安定した栄養素を供給する流動的な培地交換システムが求められる。

搾乳を模した培地交換システムが必要な理由は、乳腺上皮細胞が分泌するミルク成分の中には自身のミルク産生能力を低下させる成分も含まれているからである。このミルク産生に対して抑制性の成分は本来、離乳後に乳腺上皮細胞のミルク産生を停止させるために存在している。しかし、培養下においては乳腺上皮細胞のミルク産生を低下させる成分として機能してしまう。そのため、ミルク産生抑制性の成分が過度に蓄積しないように培地交換するシステムが必要になる。現在、筆者らはこの問題を解決するため、血液と搾乳を模した2系統灌流培養システムの開発を進めている（図5）。

現時点の培養モデルに2系統灌流培養システムを組み込むことによって、乳腺上皮細胞の能力を十分に発揮させながらミルク成分を生産することは可能である。しかし、培養ミルクを実用化するために解決しなければならない課題が他にもある。まず、現時点の培養モデルは実験用の高価な試薬や培養基質を用いており、培養ミルクの製造原価は通常の牛乳と比較にならないほど高い。また、実験室用の小さな培養モデルなので、生産できる培養ミルク量も少ない。さらに、培養作業が全て手作業であるため、

熟練した培養技術者が求められる。そのため、培養ミルクの実現化に向けた大きな課題として、①培地コストの削減、②培養モデルの拡大化、③培養作業のオートメーション化が挙げられる。

以上、培養ミルクの実現化までには課題が多く残る。しかし、ここ数年で細胞農業に関する培地成分の開発と自動培養システムの発展が世界的に進んでいる。これらの新規技術は、培養ミルクの実現化に向けた課題にも応用できることが期待される。培養ミルクの実現までに要する年数は予想よりも短いかもしれない。

参 考 文 献

- 1) Macias H, Hinck L. Mammary gland development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, **1**, 533–57 (2012)
- 2) Watson CJ. Alveolar cells in the mammary gland: lineage commitment and cell death. *Biochem J*, **479**, 995–1006 (2022)
- 3) Zhao FQ. Biology of glucose transport in the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **19**, 3–17 (2014)
- 4) Truchet S, Chat S, Ollivier-Bousquet M. Milk secretion: The role of SNARE proteins. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **19**, 119–30 (2014)
- 5) Rudolph MC, Neville MC, Anderson SM. Lipid synthesis in lactation: diet and the fatty acid switch. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **12**, 269–81 (2007)
- 6) Stelwagen K, Singh K. The role of tight junctions in mammary gland function. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **19**, 131–8 (2014)
- 7) Baumgartner HK, Rudolph MC, Ramanathan P, Burns V, Webb P, Bitler BG et al. Developmental Expression of Claudins in the Mammary Gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **22**, 141–57 (2017)
- 8) Chiba H, Osanai M, Murata M, Kojima T, Sawada N. Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochim Biophys Acta*, **1778**, 588–600 (2008)
- 9) Kobayashi K, Tsugami Y, Matsunaga K, Oyama S, Kuki C, Kumura H. Prolactin and glucocorticoid signaling induces lactation-specific tight junctions concurrent with beta-casein expression in mammary epithelial cells. *Biochim Biophys Acta*, **1863**, 2006–16 (2016)
- 10) Pauloin A, Chanut E. Prolactin and epidermal growth factor stimulate adipophilin synthesis in HC11 mouse mammary epithelial cells via the PI3-kinase/Akt/mTOR pathway. *Biochim Biophys Acta*, **1823**, 987–96 (2012)
- 11) Neville MC, Webb P, Ramanathan P, Mannino MP, Pecorini C, Monks J et al. The insulin receptor plays an important role in secretory differentiation in the mammary gland. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **305**, E1103–14 (2013)
- 12) Wang MZ, Ji Y, Wang C, Chen LM, Wang HR, Looor JJ. The preliminary study on the effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on kappa-casein synthesis in bovine mammary epithelial cells in vitro. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, **100**, 251–5 (2016)
- 13) Kobayashi K, Kuki C, Oyama S, Kumura H. Pro-inflammatory cytokine TNF-alpha is a key inhibitory factor for lactose synthesis pathway in lactating mammary epithelial cells. *Exp Cell Res*, **340**, 295–304 (2016)
- 14) Matsunaga K, Tsugami Y, Kumai A, Suzuki T, Nishimura T, Kobayashi K. IL-1beta directly inhibits milk lipid production in lactating mammary epithelial cells concurrently with enlargement of cytoplasmic lipid droplets. *Exp Cell Res*, **370**, 365–72 (2018)
- 15) Clarkson RW, Boland MP, Kritikou EA, Lee JM, Freeman TC, Tiffen PG et al. The genes induced by signal transducer and activators of transcription (STAT) 3 and STAT5 in mammary epithelial cells define the roles of these STATs in

- mammary development. *Mol Endocrinol*, **20**, 675–85 (2006)
- 16) Beaton A, Broadhurst MK, Wilkins RJ, Wheeler TT. Suppression of beta-casein gene expression by inhibition of protein synthesis in mouse mammary epithelial cells is associated with stimulation of NF-kappaB activity and blockage of prolactin-Stat5 signaling. *Cell Tissue Res*, **311**, 207–15 (2003)
 - 17) Tsugami Y, Wakasa H, Kawahara M, Nishimura T, Kobayashi K. Isoflavones and their metabolites influence the milk production ability of bovine mammary epithelial cells in a type-specific manner. *Anim Sci J*, **93**, e13720 (2022)
 - 18) Kobayashi K, Han L, Koyama T, Lu SN, Nishimura T. Sweet taste receptor subunit T1R3 regulates casein secretion and phosphorylation of STAT5 in mammary epithelial cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, **1870**, 119448 (2023)
 - 19) Li Q, Chen J, Liu J, Lin T, Liu X, Zhang S et al. Leucine and arginine enhance milk fat and milk protein synthesis via the CaSR/G(i)/mTORC1 and CaSR/G(q)/mTORC1 pathways. *Eur J Nutr*, **62**, 2873–90 (2023)
 - 20) Farmer C, Palin MF. Providing domperidone throughout lactation enhances sow lactation performance. *J Anim Sci*, **99**, (2021)
 - 21) Kobayashi K, Tsugami Y, Suzuki N, Suzuki T, Nishimura T. Nicotine directly affects milk production in lactating mammary epithelial cells concurrently with inactivation of STAT5 and glucocorticoid receptor in vitro. *Toxicol In Vitro*, **63**, 104741 (2020)
 - 22) Tsugami Y, Wakasa H, Kawahara M, Nishimura T, Kobayashi K. Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid influence milk production ability via different early responses in bovine mammary epithelial cells. *Exp Cell Res*, **400**, 112472 (2021)
 - 23) Chen Y, Ma Y, Ji Q, Yang X, Feng X, Yao R et al. Intracellular *Staphylococcus aureus* Infection Decreases Milk Protein Synthesis by Preventing Amino Acid Uptake in Bovine Mammary Epithelial Cells. *Front Vet Sci*, **8**, 756375 (2021)
 - 24) Boutinaud M, Jammes H. Potential uses of milk epithelial cells: a review. *Reprod Nutr Dev*, **42**, 133–47 (2002)
 - 25) Witkowska-Zimny M, Kaminska-El-Hassan E. Cells of human breast milk. *Cell Mol Biol Lett*, **22**, 11 (2017)
 - 26) Kobayashi K. Culture Models to Investigate Mechanisms of Milk Production and Blood-Milk Barrier in Mammary Epithelial Cells: a Review and a Protocol. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **28**, 8 (2023)
 - 27) Tsugami Y, Suzuki N, Kawahara M, Suzuki T, Nishimura T, Kobayashi K. Establishment of an in vitro culture model to study milk production and the blood-milk barrier with bovine mammary epithelial cells. *Anim Sci J*, **91**, e13355 (2020)