

## 小倉淳郎先生 説明資料

第29回生命倫理専門調査会 ヒアリング資料

平成16年3月30日

## 動物を用いた体細胞核移植クローンの現状について

(具体的なデータなどはスライドで説明)

### 1. 体細胞核移植クローンの位置付けについて

核移植クローンには、その用いるドナー細胞により、受精卵クローンと体細胞クローンに分けられる。体細胞クローンはさらに、胎仔細胞クローンと成体細胞クローンに分けられる。これらは技術的にはほぼ類似している。しかし、体細胞核移植クローンは、受精卵核移植クローンと比べて出産効率が著しく低く(胚移植当たり 5%程度)、異常な出産が多い。胎仔体細胞クローンと成体体細胞クローンでは差がない。

よって、着床後に生じる何らかのゲノムの修飾に対する変化が、正確なゲノム再プログラム化を妨げていると考えられる。

### 2. 動物種間差について

・体細胞核移植クローンにより産子が得られた動物種(年代順)

ヒツジ、マウス、ウシ、ヤギ、ブタ、ウサギ、ネコ、ラバ、ウマ、ラット

・動物種により、産子にいたるまでの効率、異常産子の頻度、胚・胎仔の死亡時期が異なる。例えば、マウスは出産率は著しく低い、出産時の表現型は正常であることが多い。逆に、ウシは出産率が高い動物であるが、出産時の病的な異常が多い。

これは核移植クローンに限らず生殖生物学全般に言えることであるが、マウス(しばしばラットも)は、他の哺乳動物と大きく異なる側面が多い。例えば、不完全な性周期(4-5日しかない)、明らかに小さい卵子、特殊な形状の精子、受精時における特異的な中心体の動き、早期の胚特異的遺伝子発現、ES細胞の性質の特殊性などがある。

### 3. 低効率および異常個体出現の原因

大きく分けて、遺伝的(genetic)と非遺伝的(non-genetic あるいは epigenetic)な原因がある。

#### (1) 遺伝的な原因(子孫に伝わる)

- ・顕微鏡下での体細胞および卵子の操作による染色体や紡錘糸へのダメージ
- ・レシピエント卵子の染色体除去による、ドナー染色体配置の不安定化

これらはすべて、染色体異常あるいは遺伝子異常の原因となる。

#### (2) 非遺伝的な原因(子孫に伝わらない)

- ・体細胞ゲノムの再プログラム化のエラー
- ・卵子活性化の不備など

これらはすべて、遺伝子発現の異常そして発生停止あるいは異常な表現型の原因となる。

実際には、遺伝的および非遺伝的両者の原因が相加的に作用してクローン作出効率を低下させていると考えられるが、その本態解明および技術的な障害除去が最も難しいのは、「再プログラム化のエラー」である。これは、体細胞ゲノムが受精卵のゲノムへ変化する際に、生殖細胞ゲノムを経ていないために生じる。

#### 4．発生停止あるいは異常出現のステージ分類

- (1) 胚発生(着床前)期
- (2) 早期胎仔発生・胎盤形成期
- (3) 後期胎仔発生期
- (4) 周産期
- (5) 発育期～成体

(1)から(5)になるにつれて、異常パターンが定型的(予測可能)から非定型的(予測不可能)になる。たとえば、着床直後のクローンマウス胎盤の異常病理組織はほぼ均一な像が見られるが、成体における免疫不全や炎症などは予測が不能である。この原因は、時間の経過とともに異常が蓄積という可能性、そしてより複雑な生命体としての構造を形作るにつれて代謝や機能も複雑化するという可能性がある。

#### 5．各領域における現在の実用性

##### (1) 実験動物

ほとんどが基礎的な研究への応用。ゲノム再プログラム化、ゲノム刷込みなど重要な生物学的現象に極めて大きな情報を与え続けている。子孫作出や系統保存などには、まだ実用化していない(顕微授精は実用化している)。

##### (2) 産業動物

最近、特に種牛のクローンによる優良遺伝子の保存に期待が大きい。優れた種牛をクローンで複製することにより、そのクローンの後代に優れた形質が保存されることが明らかにされてきている(すなわち、体細胞クローン世代に非遺伝的な異常があったとしても、生殖細胞を経て次世代へ伝わればその異常が消去されることを利用している)。

##### (3) 愛玩動物

現在は非実用的。

#### 6．将来の技術改善について

1996年に初の体細胞クローンヒツジそして1997年に初の成体体細胞クローンヒツジ(ドリー)が生まれてから既に7-8年が経過しているが、目に見える技術的改善は、動物種のレパートリーが増えたということのみであると言える。これは上に述べた通り、生殖細胞中で生じるゲノムの変化を体細胞クローン技術では再現できていないからである。将来の技術改善のためには、クローンの異常がなぜ生じるかだけでなく、この生殖細胞で何が起

こっているかを明らかにすることが必要であると思われる。

補足：体細胞核移植クローンの誕生により生じた主な疑問点の現在の考え方

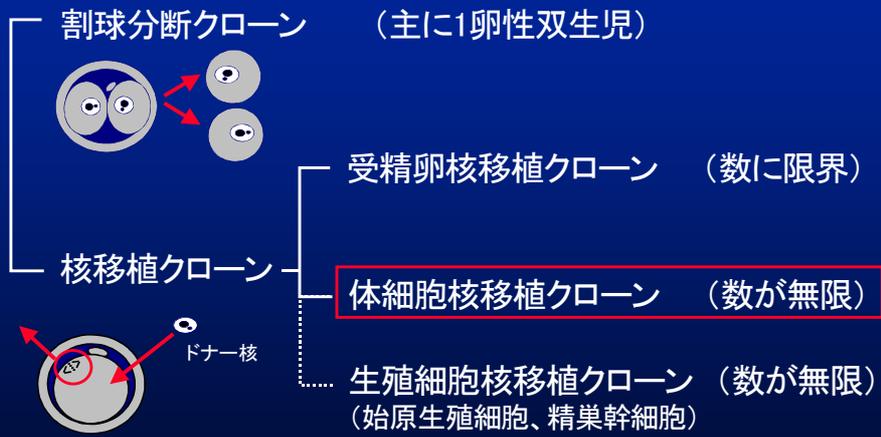
(1) ミトコンドリア DNA 伝達について

哺乳類のミトコンドリア DNA は、卵子から子孫へ伝達する。しかし、核移植クローンでは、基本的に核 DNA は体細胞から、ミトコンドリア DNA は卵子から子孫に伝わる矛盾が生じる。しかも両者のミトコンドリアが混在したヘテロプラズミーという状態になる頻度も高い。しかし、生物学的な表現型としては、同種間クローンである限り、ミトコンドリア DNA の伝達に起因するクローンの異常は生じないと考えられている。

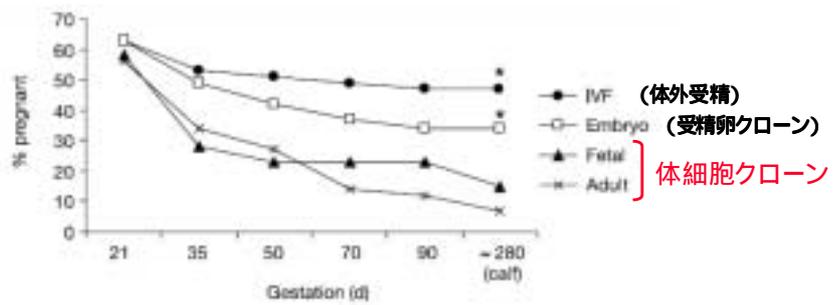
(2) テロメア長について

細胞の分裂に伴い、テロメアと呼ばれる染色体の末端領域が徐々に短縮し、それが一定以上に短くなると細胞が分裂できなくなると言われている。体細胞の多くはテロメア長が短縮中であると考えられるが、その体細胞を用いたクローン個体ではテロメア長がドナー細胞中よりも長くなっていることが明らかにされている。すなわち、クローン個体は新たに寿命を得ていると言える。しかし、その長さにはクローン個体や臓器によりばらつきがあること、生殖細胞である精子のみに正常なテロメア長が観察されることが報告されている。

# 1. 体細胞核移植クローンの位置付けについて



体外胚操作後のウシ胎仔生存率



妊娠後期でのウシ胎仔死亡率

体外受精由来 : 0%  
 受精卵クローン : 4.3%  
 胎仔体細胞クローン : 33.3%  
 成体体細胞クローン : 43.7% } **体細胞クローン**

Heyman et al., Biol. Reprod. 2002

### 体細胞核移植クローンの効率

ドナー核			クローン効率 (%)	
由来組織	細胞	動物種	生存産子/移植胚	生存産子/再構築胚
胎仔・新生仔				
胎仔組織	線維芽細胞	多数	0.1-2	0.05-1.2
精巢	未成熟セルトリ	マウス	2.5	0.6
生殖巣	線維芽細胞?	マウス	2.3	1.2
肝臓	線維芽細胞?	ウシ	10	3.1
皮膚	線維芽細胞?	ウシ	18	7.0
脳	神経細胞	マウス	5-12	1.1-4.3
成体				
乳腺	上皮?	ウシ、ヒツジ	3-4	0.4-0.7
卵胞	顆粒層細胞	ウシ、ブタ	1-10	0.3-6.9
卵胞	卵丘細胞	マウス、ネコ、ウサギ	0-5.3	0-4.3
精巢	セルトリ	マウス	0	0
卵管	上皮?	ウシ	12	4.0
尾	線維芽細胞	マウス	1	0.4
皮膚	線維芽細胞?	ウシ	7	2.3
胸腺	リンパ球	マウス	0	0
腹腔	マクロファージ	マウス	0	0
脾臓	白血球	マウス	0	0
血液	白血球	ウシ	2	0.4
脳	神経細胞?	マウス	0	0

Oback and Wells (2002) に追加

## 2. 動物種間差について

**ウシ、ヒツジ、ヤギ:** 比較的容易。異常産子の率が高い。

**ブタ:** 数カ所の研究室で高い再現性。  
(卵子準備、胚培養、胚移植の基本手技のノウハウ)

**マウス:** 数カ所の研究室から報告。低効率。産子は正常が多い。

**ウサギ:** 1報告のみ(2002年)。

**ネコ:** 1報告のみ(2002年)。

**ラット:** 1報告のみ(2003年)。

**サル:** 成功例なし。染色体異常が生じやすい。

### 3. 低効率および異常個体出現の原因

#### 1) 遺伝的(genetic) 原因 = (DNA や染色体の異常)

卵子およびドナー細胞の体外操作に起因する異常  
除核ー核移植に起因するドナー染色体の不安定化  
核移植前のドナー細胞に生じていた異常

——→ 染色体異常・遺伝子変異へ(子孫に伝わる)

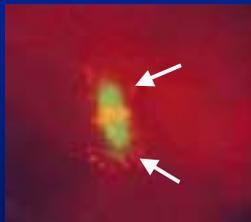
#### 2) 非遺伝的(epigenetic) 原因 = (ゲノム修飾の異常)

体細胞ゲノム再プログラム化のエラー  
卵子活性化の不備  
核移植前のドナー細胞に既に生じていた異常(ゲノム刷込みなど)  
胚体外培養などにより生じる異常(ゲノム刷込みなど)

——→ 遺伝子発現異常・表現型異常(子孫に伝わらない)

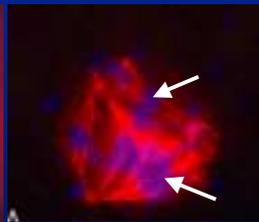
#### 体細胞核移植クローンによる染色体異常の例

ウサギ



Yin et al., 2002

アカゲザル



Simerly et al., 2003

染色体と紡錘系の形成異常 (95%以上)

マウス

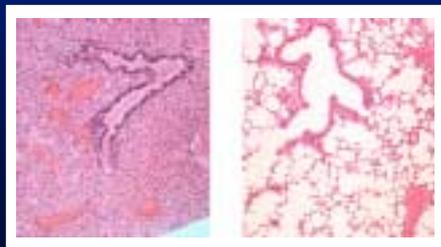


紡錘系中に正常な染色体が形成される

体細胞クローン再構築卵子の染色体

## 体細胞核移植クローンによる遺伝子発現・表現型異常の例

マウス: 肥満、肺炎、免疫能低下、肝臓炎症、胎盤過形成、新生仔呼吸不全  
ウシ: 死産、過大仔、免疫能低下、胎盤水腫、心肥大、関節炎、出血、糖尿病  
ヤギ: 死産、免疫能低下  
ブタ: 脳脊髄膜炎  
ヒツジ: 死産、過大仔、腎臓・肝臓機能不全



クローンマウスの肺炎(左)



クローンマウスの肝細胞壊死

## 体細胞核移植クローンと顕微授精技術の比較

### 共通点

- ・ 基本的には未受精卵子をレシピエントとして用いる
- ・ 顕微操作により核を卵子へ移植する(注入または膜融合)
- ・ 移植された核ゲノムを初期化する  
(移植された核のゲノム刷込みは保たれる)

### 相違点

- ・ 卵子染色体の有無(クローンでは除核)
- ・ 細胞質と移植核の同期化のステージ
- ・ 必要なゲノム初期化のレベル(精子 < ES細胞 < 体細胞)
- ・ クローンでは 遺伝的と非遺伝的、両方のエラーが出やすい

では、核移植クローンの低効率に遺伝的および非遺伝的な原因はそれぞれどの程度関与しているのか

参考：顕微授精の例（非遺伝的な異常はほとんどない）

マウス未受精卵子を用いた顕微授精技術の効率（B6D2F1 卵子の場合）

	構築胚率/ 供試卵	桑実期-胚盤 胞率/構築胚	着床率/ 移植	産子率/ 移植	産子率/ 供試卵 (MAX)
精子の顕微授精(ICSI)	75-90%	70-95%	70-90%	50-80%	50%
伸張精子細胞の顕微授精	75-90%	70-95%	50-70%	30-60%	35%
円形精子細胞の顕微授精	85-95%	70-85%	50-60%	10-30%	15%
一次精母細胞の顕微授精	40-60%	50-70%	0-70%	0-4%	2%



円形精子細胞

非遺伝学的な異常がなくても、やや高度な操作のみで効率は著しく低下する  
（卵子の人為的活性化、柔らかい核の注入）

体細胞核移植クローンの低効率の原因分類

1) 遺伝的(genetic) 原因 = (DNA や染色体の異常)

卵子およびドナー細胞の体外操作に起因する異常  
除核-核移植に起因するドナー染色体の不安定化  
核移植前のドナー細胞に生じていた異常

——> 染色体異常・遺伝子変異へ(子孫に伝わる)

2) 非遺伝的(epigenetic) 原因 = (ゲノム修飾の異常)

体細胞ゲノム再プログラム化のエラー

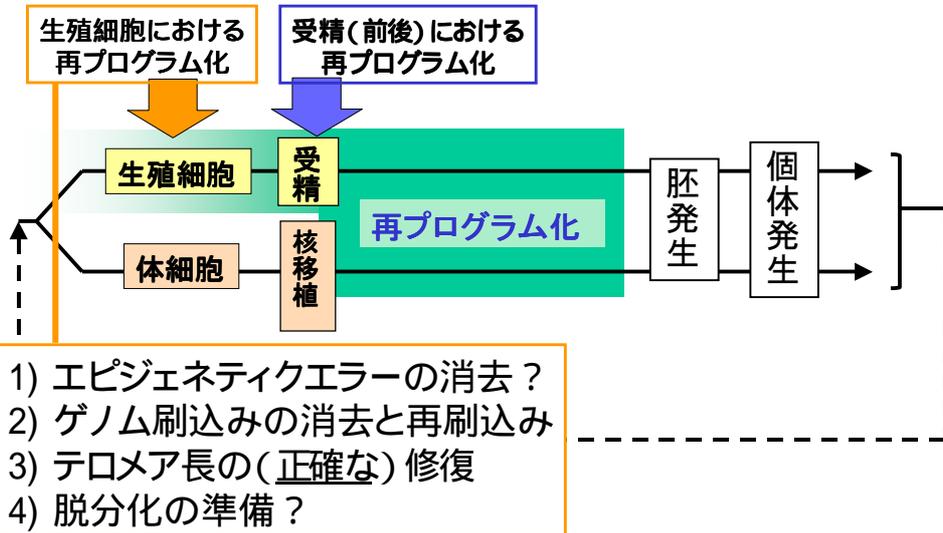
卵子活性化の不備

核移植前のドナー細胞に既に生じていた異常(ゲノム刷込みなど)

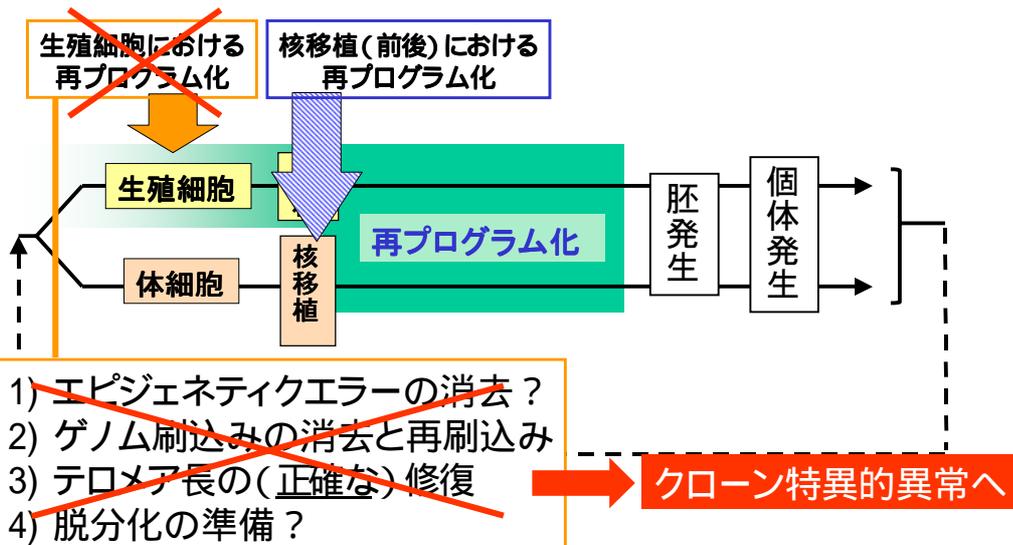
胚体外培養などにより生じる異常(ゲノム刷込みなど)

——> 遺伝子発現異常・表現型異常(子孫に伝わらない)

## 核移植特異的異常はなぜ生じるのか？



## 核移植特異的異常はなぜ生じるのか？



#### 4. 発生停止あるいは異常出現のステージ分類

- (1) 胚発生(着床前)期: 現在のベストの条件では問題はない。
- (2) 早期胎仔発生・胎盤形成期: マウス胚の多くが発生停止する。
- (3) 後期胎仔発生期: ウシ、ヒツジ胎仔の多くが発生停止する。
- (4) 周産期: ウシ、ヒツジに死産、異常産子が多い。
- (5) 発育期～成体: 各種動物に多様な異常が見られる。

発生後期ほど異常の予測が困難になる。

- ・代謝や機能の複雑化
- ・異常の蓄積
- ・加齢の影響

#### 【まとめ】

核移植クローン技術には、特異的あるいは非特異的、そして遺伝的 (genetic) あるいは非遺伝的 (epigenetic) というあらゆる異常が生じる可能性があり、しかもそれらの異常の程度には種特異性が関与する。

よってこれらの異常は、科学的(統計学的手法の導入や適切な対照の設置)および多面的な解析により、初めて正確な解釈が可能になるといえる。

出生までの異常はほぼ経験的に把握されてきているが、成長後の異常はほとんど予測が不可能である。

核移植クローンに付随する異常の分類

	Genetic	Epigenetic
クローン特異的	染色体と紡錘体形成の異常	ゲノム再プログラム化のエラー
非特異的	核への物理的な傷害	胚の培養などによる異常