クローン動物はどのように作られるか

昨年2月に Wilmut ら⁽¹⁾は、成羊の乳腺細胞のように分化した体細胞核も個体への発生能（全能性）を有していることを、核移植技術を用いて証明した。この報告が再現性のあるものであれば、クローンの作出を通じて家畜の育種・改良が画期的に進展するとともに、発生・分化、老化、がん化などの機構を解明するための新しい手法となる可能性がある。本稿では、クローン動物作出研究の歩みをふりかえりながら、最新の成果をもとに将来を展望してみたい。

Cloning in Mammals

Yukio TSUNODA*^{1,2}, Yoko KATO*^{1,2}, *¹近畿大学農学部, *²同大学動物発生工学研究所

動物が発生する過程で個々の細胞が分化していく仕組みは、長い間研究者の興味をかきたててきた。その仕組みを解明するための手段として、動物では主として核移植技術が用いられてきた。1952年に Briggs と King⁽²⁾がヒョウガエルの初期胚の核を染色体を不活化した未受精卵へ核移植すると、核移植卵はオタマジャクシへ発生することを報告して以来、アフリカツメガエルやヒョウガエルを用いて、核の発生能は発生過程のどの時期まで維持されているかが調べられてきた。その結果、個体を作りだすために必要な遺伝子セットは、特殊な場合を除いては、発生・分化に伴って失われていないことが明らかになった。この過程で、同じ遺伝形質をもつ多くのカエル（クローンカエル）が作出されてきた。しかし、成カエルの体細胞をドナー核として用いた核移植では、核移植卵はオタマジャクシ（哺乳動物の胎子に相当する）へは発生するが、変態してカエルとはならないことも明らかになった⁽³⁾。

哺乳動物の卵子は、カエルの卵子に比べて小さく取り扱いが困難なことから、2～8細胞期胚の初期胚の割球をばらばらにして発育させる方法で核の全能性（個体へ発生する能力）が調べられてきた。その結果、一種のクローンである一卵性の2～4つ子が生産されてきた。1983年⁽⁴⁾にマウスを用いて最初の核移植の成功例が報告されると、分化の仕組みを明らかにする目的よりも、初期胚の核を用いた核移植でクローン個体を作成して家畜の育種・改良に貢献しようとする方向の研究が活発に行なわれるようになってきた。しかし、初期胚を用いた核移植で生産できる産子数は限られていることから、最近では胚細胞や体細胞由来の培養細胞を用いた核移植が試みられてきた。そのような中で、1997年2月に Wilmut ら⁽¹⁾は、成羊の乳腺細胞から採取した細胞を継代培養し、その核移植で子羊を得たことを報告した。この成功は、応用的な観点からだけでなく、両生類での長い研究でも成功しなかった成体の体細胞核も個体への発生能をもっていることを証明した点で学術的に高く評価されている。

核移植によるクローン動物作出研究の現状

1. 家畜、特に牛での状況

核移植のドナー細胞として用いる細胞は、初期胚の割球、初期胚由来の培養細胞、胎子を切り刻んで得られる細胞や成体の体細胞から樹立した培養細胞などである。1987年⁽⁵⁾に初期胚割球をドナー細胞として用いた核移植で子牛が生まれて以来、成功率を高めるための種々の

検討が行われてきた。その結果、現在では1個のドナー胚から30個程度の胚を複製し、数頭のクローン牛が作出できるようになっている⁽⁶⁾。我国では核移植によってこれまで300頭を超える子牛が誕生しているが、一卵性6子が1例、5子が4例、4子が9例、3子が15例、2子が50例、そして残りはすべて単子という状況である。

最近、初期胚由来の培養細胞や胎子由来の培養細胞からも子牛が得られているが、成功率は極端に低いのが現状である。我国では、農林水産省畜産試験場と鹿児島県肉用牛改良研究所のグループで、胎子繊維芽細胞の核移植卵の移植によって数例の受胎が確認されており、本年7月24日に1頭分娩したのに続き、次々と分娩が予定されている。培養細胞を用いた核移植技術が確立されると、初期胚割球を用いた場合に比べて、得られる産子数は飛躍的に増大すると予想される。しかし、これらの細胞を用いて得られる産子はいずれも一卵性個体であり、産子間での遺伝形質は同一である可能性が高いが、親の遺伝形質とは当然異なっている。

これに対して、ドナー細胞として成体の体細胞を用いた核移植によって産子が得られると、親と同じ遺伝形質をもつコピーが作出できることとなる。Wilmurら⁽¹⁾は、6歳の雌羊の乳腺から細胞を採取し、これを体外で継代培養した。ついで、通常の培地では10%程度含まれている血清の濃度を0.5%に低下させて、細胞を飢餓状態にすることによって、細胞核の細胞周期を休止(G₀期)させた後、未受精卵へ核移植した。ついで、核移植卵をいったん羊の卵管内に移植して发育させ、回収した发育胚を最終的に受胎雌へ移植して1頭の産子を得た。これがドリーである。成牛の体細胞を用いた核移植も世界各国で実施されているが、妊娠期間が280日と長いこともあって、最近まで分娩例は報告されていなかった。筆者らは、成雌牛の卵丘細胞と卵管上皮細胞由来の培養細胞を核移植して发育させた胚を、昨年11月13日に石川県畜産総合センターへ運搬して受胎牛への移植を依頼したが、7月5日に双子、同29日に単子、同30日に双子の分娩にそれぞれ成功した。しかし、農林水産省と鹿児島県との共同研究で生まれた胎子体細胞由来の子牛ならびに筆者らが得た成体の体細胞由来の後2者の子牛はいずれも分娩直後あるいは数日後に死亡している。これまでのところ、死亡した子牛に体細胞の核移植によると思われる大きな異常はみとめられていないが、体細胞クローン作出技術が家畜の育種・改良技術として応用されるまでには多くの検討すべき課程が残されている。その他、フランスの研究グループや、農林水産省と鹿児島県のグループ、大分県畜産試験場、近畿大学農学部と石川

県畜産総合センターのグループをはじめ多くの研究機関で、あいついで成牛体細胞による受胎に成功したとの学会発表報道がなされている。

2. 実験動物、特にマウスでの状況

マウスにおける核移植は、哺乳動物で最初に成功したにもかかわらず、牛の核移植と比べて遅れているのが現状である。その理由は明らかではないが、胚由来のゲノムが働きはじめる時期がマウスでは2細胞期と、牛の8~16細胞期に比べて早いことも1つの原因と考えられる。初期胚割球の核を、牛の場合と同様に核移植後、受胎雌へ移植しただけでは個体へ発生しにくい。しかし最近、核移植卵が2細胞期に发育した時点でその核をもう一度受精卵の細胞質へ入れかえるという2段階核移植⁽⁷⁾を行なうことによって、4細胞期胚、後期桑実胚ならびに胚盤腔内細胞塊細胞の核移植で産子が得られるようになった。また、将来胎盤を形成するように運命づけられた、哺乳動物で最初に出現する生殖系列上細胞である胚盤腔栄養外胚葉細胞の核移植でも産子が得られている。

胎子繊維芽細胞や成熟雌卵巢から採取した卵胞上皮細胞から樹立した培養細胞の核移植も行なわれているが、産子が得られた確実な報告はない。最近筆者らは、卵胞上皮細胞の核移植で産子を得たが、再現性のある結果ではない。しかし、WakayamaとYanagimachiらはごく最近、排卵直後の卵子の周りの卵丘細胞を未受精卵細胞質へ直接注入することによって、多数のマウスを得たことを報告した⁽⁸⁾。

核移植の方法

通常の核移植には、核そのものではなく細胞(ドナー細胞)を用いる。ドナー細胞に前処置を施した後、あらかじめ染色体を除去してある未受精卵の細胞質(レシピエント卵細胞質)に膜融合を介してとり込ませる。融合の前後に、レシピエント卵細胞質に発生刺激を与えて受胎雌へ移植するまで发育させる。ついで、发育した核移植胚を受胎雌へ移植するという一連の操作によって実施する。

1. 家畜における方法

1) 初期胚割球をドナー細胞として用いる方法

最も広く実施されている方法である。人工授精後、雌牛より採取した8~32細胞期胚、あるいは体外受精後同程度のステージに发育した胚の割球をドナー細胞として用いる。レシピエントとなる未受精卵の染色体は染色し

図 1 ■ マイクロマニプレーター (成茂社製)

ないと観察できないが、幸い第一極体が存在する近辺の卵細胞質に存在する。そこでまず、第一極体が存在する近辺の透明帯の一部にマイクロマニプレーター (図 1) にとりつけたガラス針を使って切り込みを入れ (図 2-A)、ついで卵子を上から押しつけて第一極体と一緒に近辺の卵細胞質を透明帯の外へ押し出す (図 2-B)。押し出した細胞質は蛍光色素で染色してから染色体の有無を検査し、染色体が存在する場合は残りの細胞質をレシピエン

ト卵細胞質として用いる。慣れると、90 %以上の確率で染色体を除去することができる。

次に、レシピエント卵の透明帯の切り口からドナー細胞を 1 個囲卵腔へ注入し、1 mm の幅で 2 本の電極をはりつけた融合用チャンバーに移す (図 2-C)。ついで、直流電流 (150 V/mm) をごく短時間 (25 μ sec) 通電して、ドナー細胞とレシピエント卵細胞質を融合させる。この融合刺激によっても発生のための刺激が与えられたことになるが、より確実に発生させるために別途電気刺激を与え、シクロヘキシミドを含む培地で 6 時間培養して核を形成させる。融合した卵子は、通常の牛体外受精卵の場合と同様の方法で 7~8 日間培養して胚盤胞へ発生させた後、非外科的に受胚牛へ移植する。日本の場合、核移植卵の培養はすべて体外で行なわれているが、ドリーの例のように羊の卵管を使って培養する場合も多い。

これらの一連の操作が完全に成功すると、1 個の初期胚を用いて 8~32 個の胚盤胞が複製できることになるが、ステップごとの成功率が低いことから、通常は数個の胚盤胞ができるにすぎない。そこで、核移植胚がある程度発育した時点で再度バラバラにして、ドナー細胞として用いるという継代核移植が行なわれている。無限に

図 2 ■ 核移植の方法

A: 第 1 極体を指標として、透明帯の一部にガラス針で切り込みを入れる。B: ガラス針で押しつけて、透明帯の切り込みから染色体を含む少量の細胞質を押し出す。C: 融合用チャンバーへ移したところ

核移植を繰り返せるわけではないが、筆者らは1つの胚を用いて3回核移植を繰り返して最大43個の胚盤胞を複製している⁶⁾。

2) 培養細胞をドナー細胞として用いる方法

将来個体を形成する生殖系列上細胞である胚盤胞内細胞塊細胞を体外で培養後、除核未受精卵へ核移植して発育させ、受胚雌へ移植することにより子羊と子牛が得られている。1993年に牛で報告された本手法は再現性に乏しかったが、1996年⁹⁾に培養液中の血清濃度を低下させて細胞を飢餓状態にした後核移植する方法が報告され、産子が得られることが確実になった。

細胞を飢餓状態にする方法は、体細胞の培養にも応用され、体細胞からも個体を得られることが報告されている。Wilmur ら¹⁾は、羊の妊娠26日齢胎子を小さく切り刻んで体細胞を採取後培養し、培養皿一面に増殖した時点で別の複数の培養皿へ移し替えるという継代培養を4～5回繰り返して細胞数を増加させた。ついで、培養液中の血清濃度を0.5%に低下させて細胞の細胞周期を分裂休止期(G₀期)とした後、レシピエント卵の囲卵腔へ注入した。ついで、ドナー細胞として初期胚の割球を用いる場合と同じように、直流電流を与えてドナー細胞をレシピエント卵細胞質に融合すると同時に、活性化刺激を与えた。融合卵は、羊の卵管内に移植して一時的に培養し、回収した発育胚を受胚雌へ移植して3頭の子羊を得ることに成功した。また、牛胎子由来の体細胞を用いた核移植によって子牛が得られたことが、1998年1月の国際胚移植学会で発表されるなど、胎子由来の体細胞(繊維芽細胞)から個体への発生能を誘導することは可能な状態になっている。これに対して、成体の体細胞の核移植で産子が得られた確実な成功例は、Wilmur ら¹⁾とWakayama ら²⁾の報告ならびに筆者らの知見(未発表)があるのみである(8月5日現在)。

筆者らは成牛由来体細胞の核移植を行なっている。まず、成牛の体組織から細胞を分離し、10%牛胎子血清を含むD-MEM培地で増殖させる。継代培養を行なって細胞数をさらに増加させるとともに、一部の細胞は低張処理後染色体検査を行なう。染色体数が2倍体である細胞の割合は70～80%である。ついで、BrdUのとり込みを指標として、細胞の核を休止期に入れるための血清濃度と処理日数を検討する。さらに、BrdUがとり込まれ

図3 ■ 体細胞由来牛クローン胚盤胞

ない細胞の核はG₂期ではないことを、フローサイトメトリーによって確認する。

レシピエント卵細胞質には、屠畜場から採取した卵巢から回収する卵胞卵を用いる。まず、卵巢の小卵胞から未成熟な状態にある卵子を回収し、体外で24時間前後培養して、第1極体を放出した第2減数分裂中期の状態にまで成熟させる。次に、第1極体の位置を指標として染色体を機械的に除去し、残りの卵子をレシピエント卵細胞質として用いる。初期胚の割球をドナー細胞として用いる場合と同様の方法で培養細胞をレシピエント卵子の囲卵腔に注入し、直流電流を与えて融合させる。20分後、再度活性化刺激を与えて、10 μg/ml シクロヘキシミド添加CR1aa培地で6時間培養する。ついで、CR1aa培地で3日間培養した後、マイトマイシン処置を施したマウス胎子繊維芽細胞とさらに5日間共培養して胚盤胞へ発育させる。この実験では2種類の体細胞を用いたが、表1に示すようにドナー細胞とレシピエント卵細胞質との融合率は60%、胚盤胞への発育率は30～36%であった。本技術を用いれば、100個程度の体細胞由来のクローン胚盤胞を作出することは比較的容易である(図3)。発育胚は、石川県畜産総合センターなどの協力を得て、受胚牛への移植を行なっている。前述のように、このうち3例が分娩している。

2. マウスにおける方法

最近、筆者らがマウス初期胚の割球を用いて確立した、マウスにおける核移植法⁷⁾を図4に示した。まず、初期胚をノコダゾール添加培地で12時間培養して、核の細胞周期をM期に同調させる。ついで、ノコダゾールを除去後、DNA複製阻害剤であるアフィディコリン添加培地に移して分裂させると、細胞の核はG₁/S期で停止する。核の細胞周期が休止していることは、BrdUの

表1 ■ ウシ体細胞由来核移植卵の体外発生能

体細胞の由来	融合卵数/供試卵数(%)	胚盤胞数/培養卵数(%)
A	639/1105 (58)	165/547 (30)
B	562/ 952 (59)	170/475 (36)

図 4 ■ マウスにおける核移植方法

とり込みを指標として確認する。レシピエント卵細胞質として用いる未受精卵は、妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG) とヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) を投与した雌マウスの卵管から採取する。マウスの未受精卵は、ウシの未受精卵と異なって第 1 極体が一箇所にとどまらず、その位置から染色体の位置を正確に推測することは困難である。しかし、染色体が存在する部分の細胞は少し盛り上がっており、またよく見ると染色体の存在が確認できる (図 5)。そこで、その盛り上がりが存在する部分に近い透明帯の一部にガラス針で切り込みを入れ、細いピペットをさし入れて染色体を確認しながら除去する。

ついで、ドナー細胞を融合させるが、牛の場合とは異なり、融合には不活化センダイウイルス (HVJ) を使用する。少量の HVJ と一緒に、ドナー細胞をレシピエント卵子の卵胞腔に注入して融合する。融合をより確実にすると同時に発生刺激を与えるため、50~100 V/mm の直流電流を 50~100 μ sec 間通電する。融合のみられた卵子は、1 日培養して 2 細胞期へ発育させる。さらに、この段階で 2 回目の核移植を行なう。すなわち、受精卵由来の 2 細胞期胚を採取して、両方の割球から核を除去し、そこへ核移植由来の 2 細胞期胚の核をそれぞれの割球へ HVJ を用いて融合する。融合した胚は、3 日間体外で培養して胚盤胞へ発育させ、ついで受胎雌へ移植する。このような 2 段階核移植法を用いて、筆者らは 4 細胞期胚、後期桑実胚、胚盤胞内細胞塊細胞および栄養外胚葉細胞由来の正常なマウスの作出に成功している。

生殖系列上細胞である胚盤胞内細胞塊細胞を継代培養して樹立した胚性幹細胞や、体細胞の培養細胞を用いた核移植も行なわれているが、これまでのところ産子が得

図 5 ■ マウス未受精卵のふくらみ部分 (矢印)

られたという確実な成功例は報告されていない。

*

1997 年 2 月にドリー誕生の報告がなされて以来、この技術が人間に応用されるのではないかと危惧から大きな社会的関心をよんだが、ようやくこの技術のもつ有効性にも目が向けられてきているようである。欧米諸国や国際機関での対応をみながら、我国でも科学技術会議や文部省学術審議会に委員会が設けられ、クローン研究のあり方に関する討議が行なわれている。その結果、当然のことながら、①人間におけるクローン個体の作出は禁止する、②家畜の育種・改良に画期的な貢献をする可能性があることや、発生・分化、老化、がん化機構などの解明のための新しい手法となる可能性を秘めていることなどから、動物における研究は推進するという中間報告がなされている。一方、本分野の研究に対する高い社会的関心を考え、動物における研究も適時情報公開を行なうことが必要とされている。筆者らも、研究のオリジナリティーを確保しつつ、学会や公開シンポジウムでの発表、本誌のような雑誌に依頼された場合の寄稿あるいはインターネットなどを通じて、情報の公開を行なっていきたいと考えている。

筆者らの研究の一部は、科学技術庁振興調整費、生研機構基礎研究推進事業費を受けて実施している。また、牛核移植胚の移植は、石川県畜産総合センター (立浦凱一所长) などへ依頼して実施しているものであり、関係者に深謝する。なお、筆者らが行なっている研究の最新情報は、ホームページ <http://www.nara.kindai.ac.jp/nogaku/chikusan/graduate.htm> を参照願いたい。

文献

- 1) I. Wilmut, A.E. Schnieke, J. McWhir, A.J. Kind & K.H. S. Campbell : *Nature*, 385, 810 (1997).
- 2) R. Briggs & T.J. King : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 38, 455 (1952).
- 3) M.A. DiBerardino : in "Genomic Potential of Differentiated Cells", ed. by M.A. DiBerardino, Columbia Univer-

- sity Press, 1997.
- 4) J. McGrath & D. Solter : *Science*, **220**, 1300 (1983).
 - 5) R.S. Prather, F.L. Barnes, M.M. Sims, J.M. Robl, W.H. Eyestone & N.L. First : *Biol. Reprod.*, **37**, 859 (1987).
 - 6) H. Takano, C. Kozai, S. Shimizu, Y. Kato & Y. Tsunoda : *Theriogenology*, **47**, 1365 (1997).
 - 7) Y. Tsunoda & Y. Kato : *J. Exp. Zool.*, **278**, 250 (1997).
 - 8) T. Wakayama, A.C.F. Perry, M. Zuccotti, K.R. Johnson & R. Yanagimachi : *Nature*, **394**, 369 (1998).
 - 9) K.H.S. Campbell, J. McWhir, W.A. Ritchie & I. Wilmut : *Nature*, **380**, 64 (1996).

プロフィール

明 渡 均 (Hitoshi Akedo) 昭和6年5月21日生<略歴>昭和30年大阪大学医学部卒業/35年同大学大学院医学研究科修了/同年(〜37年)米国ミシガン大学生化学教室にて研究/37年大阪府立成人病センター入所/57年同センター研究所所長/平成10年退官,現在にいたる<研究テーマと抱負>癌の浸潤,転移,複雑系の科学<趣味>彫刻,ゴルフ

岡本 光弘 (Mitsuhiro Okamoto) 昭和17年5月1日生<略歴>昭和42年大阪大学医学部医学科卒業/55年同大学医学部助教授/61年同教授,現在にいたる<研究テーマと抱負>ステロイドホルモンの生合成機構,リン脂質代謝<趣味>読書(乱読),山歩き

加藤 容子 (Yoko Kato) 昭和40年4月8日生<略歴>1988年近畿大学農学部農学科卒業/同年同学科実験助手/1990年同大学大学院博士課程農学専攻進学/1995年同修了,農博/同年同大学動物発生工学研究所助手/1998年同講師,現在にいたる

柏谷 博之 (Hiroyuki Kashiwadani) 昭和19年2月10日生<略歴>昭和48年広島大学大学院理学研究科博士課程修了(理博)/同年国立科学博物館植物研究部研究官/平成5年同植物第四研究室室長/7年東京大学大学院理学系研究科教授(併任),現在にいたる<研究テーマと抱負>地衣類の分類,共生生物としての地衣類の生物的特徴の解明,地衣類の指標植物としての応用に関する研究<趣味>ソフトテニス,写真撮影

佐々木 毅 (Takeshi Sasaki) 昭和13年2月27日生<略歴>昭和37年九州大学農学部農芸化学科卒業/39年同大学大学院農学研究科農芸化学専攻修士課程修了/同年同博士課程中退,愛媛大学農学部農芸化学科助手/41年同講師/44年同助教授/平成元年同教授,現在にいたる,昭和45年農博(九州大学)<研究テーマと抱負>応用微生物学,動物細胞工学,日本酒の多角化に共鳴,動物細胞培養による抗体産生増強<趣味>スポーツ(テニスは毎日,柔道は専門),読書と旅行(唐・天竺に夢中),園芸

園部 治之 (Haruyuki Sonobe) 昭和18年2月23日生<略歴>1971年名古屋大学大学院理学研究科博士課程中退/同年甲南大学理学部生物学教室助手,その後,講師,助教授を経て,1987年教授,現在にいたる.この間,1977〜78年米国テキサス大学動物学教室客員研究員<研究テーマと抱負>エクジステロイドの生合成と代謝系酵素の生化学的・分子生物学的解析.昆虫類と甲殻類の脱皮調節の比較内分泌学的観点から,現在甲殻類の脱皮抑制ホルモンの研究を行なっている<趣味>六甲山の散策,昆虫やエビ,カニをあしらった玩具や器などの収集

玉置 尚徳 (Hisanori Tamaki) 昭和35年4月22日生<略歴>昭和60年京都大学農学部食品工学科卒業/平成元年(〜3年)日本学術振興会特別研究員/2年同大学大学院農学研究科博士後期課程単位認定/3年米国コーネル大学医学部生化学教室研究員/5年京都大学農学部(現大学院農学研究科)助手,現在にいたる<研究テーマと抱負>出芽酵母の栄養源認識とシグナル伝達<趣味>ロック,酒