

### 3. 動物実験における安全性の検討 クローン胚は安全か

勝木 元也\*

クローンヒツジが作られ、ヒト ES 細胞(胚性幹細胞)が樹立されて以来、難病の治療に対してこれらの方法が使えるのではないかと議論が世界中で起こっている。

ヒトの細胞を使うに当たっての倫理的な問題点については、意見の分かれるところであるが、その点は別に論じるとして、ヒトクローン胚から ES 細胞を樹立し、目的の移植用の細胞を手に入れるには、どのようなことを前もって動物で検討すべきであろうか。核移植という、受精過程のみならず、配偶子形成過程を経ない体細胞核の移植によって作られたクローン胚について、その性質を知ることが必要と思われる。また、細胞系譜にしたがう発生分化の過程とは異なる歴史を経て作られた細胞の性質についても十分な検討が必要であると考えられる。いくつか思いつくままに列挙すれば、

1. 核移植によってもたらされるクローン胚は正常か。
  2. 適切な培養条件の設定によってヒトクローン胚から樹立された ES 細胞の性質は、余剰胚からの ES 細胞と同じか。
  3. 培養による酸化ストレスの影響はいかなるものか。
  4. 体細胞核のドナー細胞の核には、どのくらいの突然変異が蓄積されているか。
  5. 細胞系譜によって発生分化した細胞は、*in vitro* での分化と本質的な違いはないか。
  6. クローン動物個体に種を越えてみられる免疫不全や、免疫能の低下の原因は何か。
  7. ミトコンドリアの安定性について。
  8. 核移植によるクローン胚の異常性を克服することは可能か。
- などが挙げられる。

ヒトに外挿できる安全性の研究が、動物実験でどこまで可能かについてさらに議論する。

---

#### A Problem of Human Therapeutic Cloning

MOTOYA KATSUKI National Institute for Basic Biology, National Institutes of Natural Sciences

---



\*かつき・もとや：自然科学研究機構基礎生物学研究所所長。昭和42年東京大学理学部卒業。昭和63年東海大学医学部教授。平成4年九州大学生体防御医学研究所教授。平成8年東京大学医科学研究所教授。平成13年現職。主研究領域/発生工学、分子生物学。

#### Key words

ヒトクローン胚  
ES細胞  
細胞系譜

## 1. クローンヒツジ「ドリー」の誕生

医学および臨床研究に、ヒトクローン胚あるいはヒトES細胞(胚性幹細胞)の利用が、将来に期待されている。そこで社会の理解を得ながら、科学的合理性を持って進めるためには、これらのヒト材料が、いかなる生物学的性質をもっているかをあらかじめ動物において検討しておく必要がある。また、現状ではヒトクローン胚を使って実験を行うのは国際的にも社会的制約がある。動物ではクローン胚をつくって、それを個体まで発生させる実験が盛んに行われており、発生の過程でさまざまな知識が蓄積されている。これらの胚の性質から、ヒトクローン胚の性質の重要な問題点が判ってきた。

1997年、イギリスでヒツジのクローン「ドリー」が誕生して、一大センセーションを巻き起こした(Wilmot et al. Nature 1997)。その手法は6歳メスヒツジの乳腺細胞を培養してG0期の状態(DNAの複製や蛋白合成がなく、シャーレにびっしり張りついて、それ以上に増えない状態)から、核を取り出し、その細胞核を、別の種類のヒツジのあらかじめ除核した未受精卵に注入して、新しい受精卵を構成するというものであった。

核を注入されたのが未受精卵であるため、活性化が必要である。金属イオンでショックを与えられた核移植卵は分裂を始め、仮親の子宮に移植されると発生を続け、結果的に1頭だけが個体として生まれてきた。このヒツジのみかけ上の性質は、細胞核のドナー(乳腺細胞を提供したヒツジ)と同じであった。

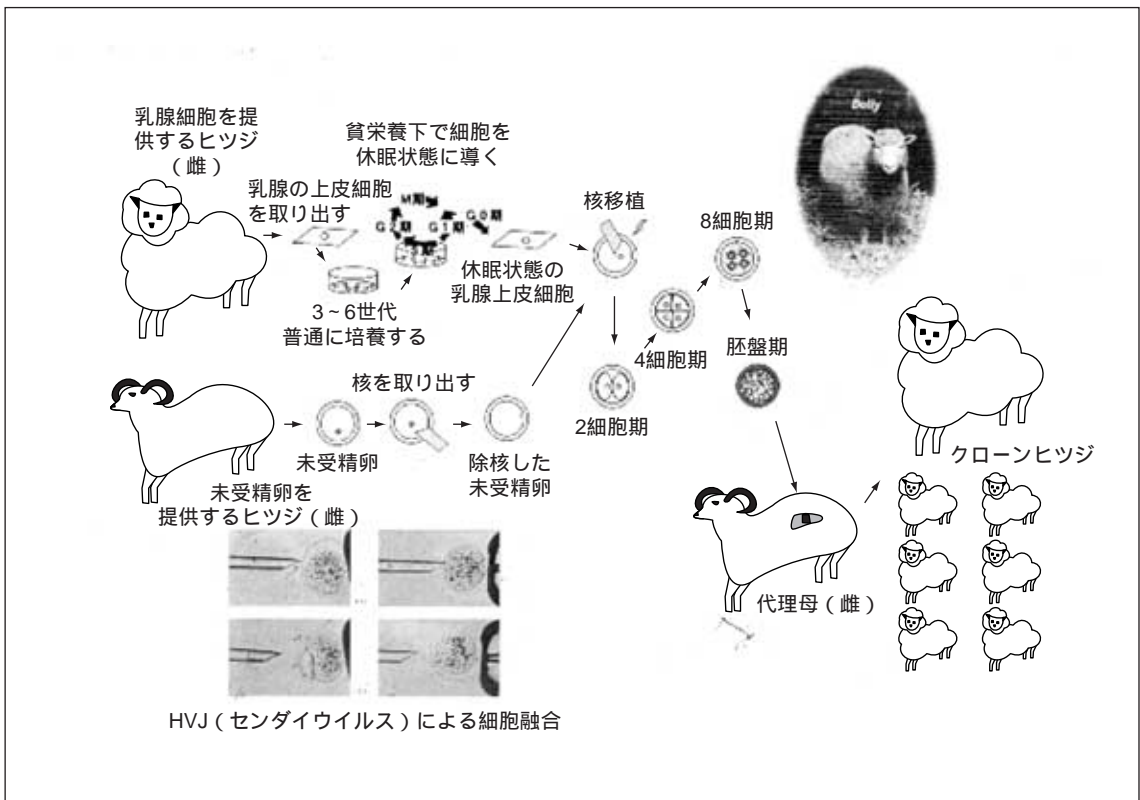


図 クローンヒツジの誕生

遺伝子的な検査もなされたが、核移植によるクローンヒツジの誕生である(図)。

受精卵から特定の細胞に分化するまでには細胞の履歴(細胞系譜)がある。そこには、まだわかっていないが、不可逆的な変化もあるはずで、たとえば免疫細胞は遺伝子の再配列という変化が起こっている。また不可逆的变化の一つとして、テロメア長が測られた。もともと6歳のヒツジの乳腺細胞であったが、ドリーはテロメア長から見ると、生まれたときすでに4歳程度ではないかと報告された。ドリーは6年経ったところで、老化が進行し、欠陥が認められたために薬殺され、臓器や細胞についての詳細が調べられた。

核移植胚は、通常の精子と卵子の受精により新たな核ができて発生するというプロセスとは違い、体細胞まで育った核を除核未受精卵に移植して発生させるのであるから、分化してしまった細胞の核がもう一度受精の状態まで戻ったものと考えられ、このことを初期化(reprogramming)といっている。初期化の内容については、まだよくわかっていない。注意すべきことは、初期化が起こったことは確かであるが、通常の受精から出発した受精卵とどこがどう違うのかは、まだはっきりしていないということである。

クローンヒツジは、一大センセーションを巻き起こしたが、落ち着いて生物学的に考えると、全能性の受精時の核から、どのような歴史を経て、さまざまに分化した個体の細胞になるのか、その核を除核未受精卵に移植し、移植された細胞核が初期化されたとしても、それが正常な遺伝子発現上の構造と機能とをどの程度獲得できたのかということはクローン胚の正常性を前提とする再生医療を進めるうえでも重要である。また乳腺細胞で始まったが、どのような種類の細胞でも可能なのか、リンパ球細胞はどうか、高度に分化していると思われる神経細胞はどうかかなど、

興味深い。

## 2. ヒト ES 細胞の樹立

クローンヒツジの翌年(1998年)、ヒト ES 細胞の樹立成功が学術誌(Thomson et al. Science 1998)に発表された。筆者はマウスの ES 細胞を用いて、発生工学という手法を使ってさまざまなミュータントをつくり、それをヒト疾患モデルにして、疾患の原因、発生のメカニズムを研究していた。そのため、ヒトで ES 細胞がつくられたことは有望な治療の素材になると、世界中の人と同じように筆者も感じた。

この樹立については、それほど特殊な技術を使っているわけではなく、あとから想定すると誰にでもできたことである。ではなぜやらなかったかといえば、ヒトの受精卵からこうしたものをつくってよいのかという倫理的なためらい、恐れがあったからだと思われる。ヒトの ES 細胞ができれば、ヒトの病気の研究に使えるであろうということは容易に想像できるにかかわらず、多くの研究者はきわめて慎重であったわけである。

しかし、クローンヒツジに続いて、今度はヒト ES 細胞の樹立という口火が切られ、即座に医学への応用の期待が広まった。そして世界中ですでに100を超える ES 細胞株ができています。わが国でも中辻憲夫(京大)が3株を樹立している。

ES 細胞であることの検定にはいくつかの性質が調べられる。特有の遺伝子が発現されていることはもちろんであるが、マウスの皮下に植えたときに奇形腫をつくること。つまりほとんどすべての種類の体細胞に分化できる多分化能検査である。奇形腫は、その組織化がうまくいっていないので、網膜の細胞の隣に腸管の上皮細胞があるという変なものになってしまうのである。しかし一つ一つの細

胞は正常な細胞に見えることから、多分化能を持つという意味での奇形腫形成能が一つの検定になっており、それをクリアすることによってES細胞であると判断される。

ただ実際は、試験管の中で、血管に分化させたい、神経に分化させたい、あるいは内胚葉性細胞に分化させたいという場合、マウスの経験でいえば、ES細胞株によってそれぞれに分化のしやすさが違うということがある。ヒトについてもそういうことがきつとあるのだろうと思われるので、ES細胞が樹立されたといってもそれぞれの性質は大きく異なることが予測される。

樹立されたES細胞は多分化能を持っているが、実際に使うときは、背景にある性質を制御できないので、使いやすいものから使うことになる。世界で100を超える株があるといっても、今後それぞれに有用性の違いが出てくるのだろうと思われる。

ヒトES細胞を使う医学研究は始まった。一方、クローンとES細胞を組み合わせることによって、ヒトのクローン胚をつくり、それからES細胞を樹立して、そのES細胞を特定のものに分化させることができれば、その細胞を使って細胞移植の治療ができるはずである。もちろんそこには安全性その他の問題を含む基礎研究が必要である。

さて、クローン胚は精子と卵子の受精から発生した正常なものと同じなのか、核移植をしたことによって、何か特殊なものに変化していないかという疑いがある。ドリーにみられたように、クローン胚を発生させると異常が生じるが、それは偶然なのか、それとも核移植によって必ず引き起こされるものなのか。そのことはその後、多くのクローン動物で調べられている。

### 3. クローン動物に認められる異常

現在までに哺乳類のクローン動物は多数つくられている。家畜に属するヒツジ、ヤギ、ウシ、ウマ、ブタ、ウサギでクローン動物がつけられている。クローン動物の最初の目的は、肉質のよい、あるいは乳量の多い家畜の育種、そしてその大量生産に有用であるということである。わが国でも、もちろん学術的な研究が背景にあるが、これを推進してきたのは主に畜産学の研究者である。特にウシについては、わが国では多くのクローンウシが誕生していて、厚生労働省でも、その食品としての安全性が議論された。

多くの畜産学の研究者がクローンの技術を磨き、クローンをつくることに参加している。複雑な核移植技術をどう簡単にするかということを含めて、さまざまな技術的な改良が行われた。その結果、核移植はそれほど難しくない技術になっている。わが国では農林水産省を中心にクローンウシの研究が進められ、年間100頭程度の割合で誕生しているの、異常が出るのか、遺伝子が本当に同一か、遺伝子の修飾、メチル化が受精卵と同じかといったことが検討されている。

またペットでもクローンがつくれ、イヌ、ネコのクローンは営利目的である。

医学研究にとっては、マウスは欠かせない実験動物の一つであるが、クローンマウスが成功している。これは若山照彦（理化学研究所）が開発した方法に改良が加えられ、多くの人ができるようになった。ラットは大変難しいが、成功している。サルは米国で成功している。このように、現在11種類の哺乳類で成功していて、みかけ上は正常であることが確認されている（表1）。

体細胞核移植の効率については、培養できることを母数にすると成体まで発生するもの

表1 哺乳類クローン  
動物の種類

・ヒツジ	・マウス
・ヤギ	・ラット
・ウシ	・サル
・ウマ	
・ブタ	・イヌ
・ウサギ	・ネコ

は0.5~3%、多くのものは約1%である。マウス、ウシ、ブタ、ウサギのようにかなり多数が生まれているものもあれば、ウマ、ネコのように成体まで発生したのは1頭あるいは数頭というものもある。それらをすべて考慮しても1%前後であるということである。これだけ発生率が悪いということは、哺乳類に共通する核移植特有の生物学的問題があると想像される。

もう一つ、正常な発生と異なるのは、さまざまな見かけだけからは判らない異常が出ていることである。動物種によって異なっている。マウスでは、過大仔、胎盤過形成、肝機能不全、特に成体になってから肝臓癌が多くみられる。筆者も4匹つくって経過観察をしたところ、2匹で肝臓癌が発症した。免疫不全も多く出てくる。

胎盤過形成は、胚細胞とは関係ない、あるいは免疫不全は免疫監視機構の不全で体細胞とは関係ないと思われがちだが、マイクロアレイで遺伝子の発現の解析をすると、ほとんどの細胞で約1~4%の遺伝子で正常とは異なった発現をしている(Jaenish R, et al. Prog Natl Acad Sci 2002)。おそらくその結果として、このような異常が出てくるのだらうと思われる。

ウシでは、正常では全くと言っていいほど経験しない妊娠後期の流産、それも産まれる直前の流産、あるいは産まれた途端に大出血を起こして死亡といった例が多数出てくる。

表2 体細胞核移植の効率と異常

- ・成体まで発生するものは、いずれも約1%
- ・動物種によって異なる異常のタイプがある
  - \*マウス：過大仔，胎盤過形成 肝臓機能不全 免疫不全など
  - \*ウシ：妊娠後期の流産，免疫不全など

またマウスと同じように免疫不全も出ている。ふつうに生まれてくる子供とは違う病理学的な異常が多くみられる(表2)。

2年ほど前に『蛋白質 核酸 酵素』に発表されたデータによれば、クローンマウス4匹について、主に肝臓と腎臓の細胞について調べたところ、約1万の遺伝子につき100個前後が正常と量的、あるいは質的に異なる発現をしているということである。

どうしてこうなっているのか。正常ではゲノムインプリンティングという現象があり、クローン胚ではこの異常が疑われる。精子の特定の遺伝子は発現が抑えられ、同じ遺伝子が卵子では抑えられていない、また、その逆もあって、それは遺伝子ごとに違っている。そうしたゲノムインプリンティングの一部は、メチル化によって起こっていることが知られている。体細胞から生殖細胞に変わる精子形成のときに、いったんすべて消去され、オス特有のメチル化が行われる。卵子形成のときにはメス特有のメチル化が行われる。これも初期化の重要な要素である。

さらに初期化は、受精後にも起こる。受精後に起こる現象だが、その段階でもある程度のメチル化の再編成が起こることが知られている。

このようにゲノムインプリンティングは、精子形成、卵子形成のとき、つまり主として受精の前に起こる現象である。一方、体細胞核移植では、このプロセスがなく発生が始まるため、正常のゲノムインプリンティングは

表3 遺伝子発現異常の原因

- |   |
|---|
| 1) インプリンティング (刷り込み)<br>メチル化の消去と再刷り込み (配偶子形成過程)      |
| 2) 胚の初期化 (Reprogramming)<br>受精後のメチル化                |
| * 体細胞核移植によって初期化されるのは受精後の状態に限られる。配偶子形成時の消去と再メチル化は不可能 |

生じないと思われる。すなわち、正常では体細胞ができる前に精子と卵子の初期化が行われるが、核移植にはその部分が欠けているわけである。

精子と卵子が融合する前の前核といわれる時期、接合子ができていない時期に、精子前核だけ除き、そこに他の受精卵から卵子前核を持ってくれば、卵子前核同士でできた受精卵をつくることができる。その逆に精子前核同士の受精卵をつくることもできる。しかし、これはいずれもおよそ9日胚で死んでしまう。オスだけでつくるとほとんどが胎盤に分化し、メスだけでつくると胚だけになってしまう。

筆者は昭和57(1982)年に Jackson Laboratory に留学したが、それは Cell の1981年1月1日号の表紙に、Jackson Laboratory で Karl Illmensee と Peter Hoppe がつくったクローンマウスが載ったことがきっかけであった。彼らは1978年に、メス同士の核、オス同士の核でも子供(uniparental)ができる、と報告した。それは移植ではなく、片一方の前核を抜いて、核分裂は行わせながら細胞分裂を1回止めると、メスの前核を残せばメスの前核が2倍に、オスの前核を残せばオスの前核が2倍になる、つまり uniparental になるというものである。その二つの実験をみて、筆者は興味を持って留学したが、その翌年、これは偽作であったと告げられた。実際には個体発生しなかったのである。

そうしたことを経て、オスとメスは違う遺伝子をコントロールしていることから、ゲノムインプリンティングが発生の重要な要素であるということが当時から言われていた。ゲノムインプリンティングがあるから、クローン個体の発生率は低く、クローン胚やそれから発生した細胞は、正常とは異なる遺伝子発現をしているのではないかと考えられるわけである(表3)。

#### 4. 核移植胚から樹立されるES細胞の性質は、正常細胞からのES細胞とは異なっている

ES細胞が多分化能を持っていることは確かであるし、ヒトES細胞を使って研究することは、すでにいくつものグループが始めている。日本のレベルは非常に高いので、研究は進んでいくと思われる。ただ、核移植胚を用いる場合は、ES細胞をつくったとしても、ふつうの受精卵を使ってつくったES細胞とは異なる、ということから研究や臨床応用に向けた開発研究は出発すべきではないかと考えられる。

再生医療を実現するには、地道な研究が必要である。まず知っておくべきことは、発生分化の過程で核に不可逆的な変化はあるのかということである。われわれはまだ見ていないが、多くの発生学者が考えているのは、正常の発生分化は一方通行の一つの道をたどっていく。in vitro では戻ったり他のものに変わったりすることがあっても、in vivo ではそうっていない。そこには何らかの不可逆的な変化があるに違いない。

それは遺伝子の塩基配列の変化もあるであろうし、DNAのメチル化、あるいはクロマチンの修飾などの epigenetic な変化が起こっている可能性がある。またRNAが不可逆的あるいは可逆的な変化もコントロールしているの



表4 体細胞核移植胚について調べるべきこと

- ・発生分化の過程で記された不可逆的な変化はあるのか（細胞種によるクローンの成功率など）
- ・ミトコンドリア遺伝子の安定性
- ・体細胞突然変異が高率？（Blood Testis barrier など）
- ・培養時の酸化ストレス
- ・体外培養での分化と正常発生との細胞の相違

ではないか。われわれが遺伝子だけをみていたのではわからない現象が多数報告されているので、その検討が必要ではないか。

二つ目に、ミトコンドリアはあくまでも提供される卵子のものである。そこで核移植というドラスティックな変化を与えたときに、ミトコンドリア遺伝子やミトコンドリアそのものがどうなるかということは、大きな関心事である。ミトコンドリアについては、近ごろ重要な機能が次々と明らかになってきているが、その安定性がどうなのか。

三つ目に、培養したときに体細胞突然変異がどのくらいあるのかということも大きな関心事である。体の中の重要臓器である脳や睾丸、卵巣などは、血液関門（バリア）によって外界の変異原を含む異物から守られている。その結果、突然変異からも守られていると考えられるが、移植される核の突然変異はどの程度なのかなど、動物で十分検討できると思われる。

四つ目に、培養時の酸化ストレス等の問題である。

五つ目に、体細胞核移植では1個の核が全体を支配することになる。われわれの体は体細胞の1個ずつは死んでもよいということで成り立っているが、その体細胞の1個を採ってスタートする個体発生や細胞分化は、今度はすべてをこの細胞核の性質に依存しているので、安全性を検討する場合、体細胞に分化したものが受けているダメージ、あるい

は発生の歴史において受けている変化について、われわれは十分に知っておく必要があると思われる（表4）。

## まとめ

当然のことながら、ヒトもまた動物の一種である。哺乳動物であるヒツジで成功した核移植による個体発生は、ヒトにも核移植による個体発生を想起させた。そして夢の再生医療の実現をめざす気運が起こった。

一方、多くの哺乳動物で成功した核移植による個体発生には、移植された卵自体にゲノムインプリンティングを初めとし、ミトコンドリアの不安定性などの異常が疑われる結果が得られている。これは、核移植やES細胞の樹立が動物からヒトへと応用されたことと同様に、さまざまな異常が核移植によってヒト胚にももたらされることを語っている。そして実験の選択肢は、動物のほうがはるかに大きく、ヒトにも当てはまる結果を得ることができる。

夢の再生医療が実現できるかどうか、まず、確実な一歩から動物実験に集中して、わが国の人材と費用とを集中すべきではないかと考える。

---

## 質 疑 応 答

---

座長(清水) 貴重なご提言どうもありがとうございます。

吉倉 廣(国立感染症研) 来年から世界の食品基準でクローン動物を取り上げて、食品の安全性の話がさっそく出てきますが、その関係でおうかがいします。1代目を食べることはまず話題になりませんが、2代目以降、たとえばマウスの場合、一つのマウスから体細胞を二つの卵に移すと、完全に同じ個体が二つ

できます。それがたまたまオスカメスカとなれば、インブリーディングできることになりませんか。

**勝木** それはドナーの性で決まります。

**吉倉** そうすると一つのドナーからではオスとメス両方はできないですね。では、2代目以降のクローンのメンテナンスをどのようにするのでしょうか。メンテナンスをヘテロにしてしまうと、核移植を行った意味がなくなります。そのあたりを畜産業界はどのように考えているのかをお聞きしたい。魚では先ほどの実験がうまくいっていると思います。

**勝木** 魚は卵巣も精巣も持っていますので、同じものからオス、メスの転換ができます。たとえば基礎生物学研究所での実験ですが、ベラの類で、体長を測って自分より大きいとなると、大きいほうがメスになるというものがあります。それまでずっと精子をつくっていたものが、突然卵巣が発達します。それはホルモンによるコントロールで、わずか1週間で転換し、子供も生まれます。クローン魚をつくると、オス、メスがつくれるということになります。

ただ、マウスやウシの場合は難しい。そこで畜産の人たちが考えておられるのは、初代で食べるということではないでしょうか。そのくらい簡単な技術とお考えなのだと思います。

もし交配によって行おうとすると、それは無理です。もちろん染色体をいじって、あとからクローンの中にY染色体を入れることで1頭でできればあとはこちらのものですから、メスクローンを操作してオスを1頭でもつくってクローン牛を繁殖させることはどなたかお考えでしょうか、いまの技術では無理です。国際会議でどのようになるかは知りませんが、いまのところそれは難しいと言わざるをえません。

**吉倉** そうすると2代目以降が正常だと

というのは、ノーマルのものとクロスしているだけの話ですね。ところで核移植同士をクロスしたF<sub>1</sub>はあるのですか。

**勝木** それは知りません。ただ、ノーマルオスとクローンメス、またその逆でも正常が出てきますので、メチル化や配偶子形成でのepigeneticな変化は、クローン動物でもノーマルであろうと想像しています。

**座長** 免疫不全は基本的にメチル化の異常で説明しうるのですか。

**勝木** それは興味深い問題で検討中ですが、結論は出ていないと思います。いままでの知識でないことまで含めて申し上げますと、免疫監視機構そのものの問題もあるでしょうが、同時に監視される側の細胞が正常の発生の場合ときわめて違う発現をしていますので、問題の糸口がなかなか難しい。免疫監視機構だけの異常が見つかるかどうかはまだわからない状況ではないかと思います。

**座長** 逆に自己免疫のようにになっているのではないのですか。

**勝木** それも非常に注意深く申し上げないといけないのですが、その可能性も十分検討の範囲内に入っていると思います。

**曾根三郎** (徳島大) ヒトのクローン胚からES細胞(胚性幹細胞)を確立して、いま移植医療がいろいろ行われていますが、この安全性の根拠を動物実験でどこまで示すことができるのでしょうか。種を越えるということで、さまざまな問題があると思いますが、そのあたりのことを教えてください。

**勝木** それは本質的な問題だと思います。私が申し上げているのは、最終的には越えられないいくつかの問題があるかと思いますが、核移植によって起こる異常に関しては、いままで試みられたすべてのクローン哺乳類で、同じような異常が出ています。その原因を検討していけば、ある程度ヒトでも起こると想定できるところにたどりつきます。いま



---

のところメチル化が一つの大きな柱になっていますし、別の epigenetics があるのではないかと言われ始めています。それらに関してはヒトもまた哺乳類の動物で、しかも根本的な原理を示すところですので、そこで欠陥があれば、それはヒトでも容易に起こると考えられると思います。

その限りにおいて、いまクローン動物で全く正常なものが次々とできていて、何ら憂慮することがない状態であれば、ヒトにテストすることがありうると思いますが、むしろ核移植によってわれわれが初めて知ったことが多くあるので、そこは慎重であったほうがよいと思います。

いまのご質問は、正常の細胞から ES 細胞

をつくっているのです、そこで十分テストできる話ではないでしょうか。つまりヒトクローン胚については、いままで正常な ES 細胞と同じだと思っていたものが、違うかもしれないという事実が出てきた以上、ヒトでもそのようなことが起こるだろうというのがポイントです。種の壁を超えるという意味では、技術的なことでも結構ですが、もし何らかの方法で正常な発生に戻せるということがあれば、ヒトで行うより、実証的研究は動物で行ったほうがはるかによい。結局ヒトにも動物にも共通する何らかの原理ですから、そちらに関心が行ったほうがはるかに早く進むのではないかと思います。

**座長** どうもありがとうございました。