

ていた2つの施設(ウィスコンシン大学とカリフォルニア大学サンフランシスコ校)は1細胞株\$5,000で提供していたので、経済的にも容易に利用できるものではなかった。

2002年にはNIHは大統領のヒトES細胞研究政策の基準にあうNIH登録ES細胞株数は78に増えたと発表したが、2004年にはNIHが連邦議会に約30%の23細胞株だけが研究に利用可能であると報告している。国内の幹細胞研究者や難治疾患の患者グループはブッシュ政権の政策で自国のヒトES細胞研究が思うように進歩せず、そのため近い将来の画期的な治療法への希望が薄れていくことを憂慮し、議会や社会へヒトES細胞研究に対して、より緩やかな政策へ変更するように訴えてきた。

その間、世界ではイギリス、スウェーデン、イスラエル、韓国、シンガポールなどでヒトES細胞研究が活発に進められてきた。2004年は大統領選挙の年であり、ブッシュ大統領と民主党候補の間でのヒトES細胞研究に関する方針の違いは大統領選挙の大きな争点のひとつとなり、連日メディアに取り上げられる状況であった。結果的にはブッシュ大統領が再選され、ヒトES細胞研究に対する制限政策は当面引き続き行われることになったが、そんななか、州が独自にヒトES細胞研究を認め、支援していこうとする動きがみられてきた。そのなかでもカリフォルニア州は住民の盛り上がりも援助資金も大きいものであった。2004年11月に“提案71号”(カリフォルニア州幹細胞研究・治療イニシアチブ)が住民投票で可決され、今後10年間で約30億ドル、1年につき3億ドルの資金導入をアーノルド・シュワルツネッガー州知事が支援した。これは優秀な幹細胞研究者たちをアメリカに引き留める目的もあり、国内の資金的に制限がある幹細胞研究者からすれば、第2のゴールドラッシュなのかもしれない(しかし、2006年1月時点でこのイニシアチブから資金援助を受けた研究施設はなく、カリフォルニア州に“提案71号”の効果がどう出るかいまのところ不確定である)。

各方面からヒトES細胞研究推進への声が高まるなか、NIHは2005年10月に公的な幹細胞バン

クの設立と臨床応用をめざしたヒト幹細胞トランスレーショナル研究(基礎研究成果を効果的に臨床へ応用していく研究)を行う研究拠点設立を発表した。幹細胞バンクとしてウィスコンシン州のWiCell研究所(主任研究者:トムソン博士)が選ばれ、NIH認定のヒトES細胞を集中管理し、品質維持と研究者への提供と技術的支援に努めることになった。幹細胞バンクには1,610万ドルを向こう4年間にわたり拠出していくことになり、それに伴い1細胞株が\$5,000だったWiCellヒトES細胞株が\$500へと大幅に引き下げられた(国外施設には\$1,500)。トランスレーショナル研究拠点としてはノースウェスタン大学とカリフォルニア大学デービス校が選ばれた。NIHはこれによりヒトES細胞研究の推進を期待し、なによりヒトES細胞政策に対する批判を和らげることを期待している。

ヒトES細胞に関するもうひとつの問題は、ヒト体細胞核移植(NT)胚由来のES細胞研究を認めるかどうかであった。ヒトNT-ES細胞は細胞移植時の免疫拒絶を回避するために必要であり、病気モデルのES細胞が作成でき、その治療法および治療薬開発に大きな可能性があると思われる。いくつかの州で議会の承認が得られている。マサチューセッツ州でのNT-ES細胞認可については前述した<sup>7)</sup>。

### 1. 研究整備

2001年のブッシュ大統領就任以降、ヒトES細胞研究が思うように進まなかったのは、政策的に制限されただけではないと思われる。ヒトES細胞を培養維持していくことは、それまで多くの研究者たちが慣れ親しんできたマウスES細胞培養法と異なって、より注意深さが必要で、継代する時間もかかるものであった。そのような培養法の技術的困難さがNIH細胞株の非常に低い利用可能細胞株数となる一因であると思われる。ヒトES細胞研究を進めるうえで、このようなさまざまな困難な環境が研究者たちを団結させたように著者には感じられた。

2003年ごろからアメリカ国内のヒトES細胞研究の主要な施設で、ヒトES細胞培養技術講習会が開かれるようになった。NIHでも細胞培養ト

表 1 幹細胞研究に対するNIH研究費割合(単位：\$ 100 万)

	1999 年	2000 年	2001 年	2002 年	2003 年	2004 年
全幹細胞研究領域	\$ 225.4	\$ 256.3	\$ 305.9	\$ 386.6	\$ 516.6	\$ 566.1
ヒト ES 細胞研究	—	—	—	\$ 10.1	\$ 20.3	\$ 24.3

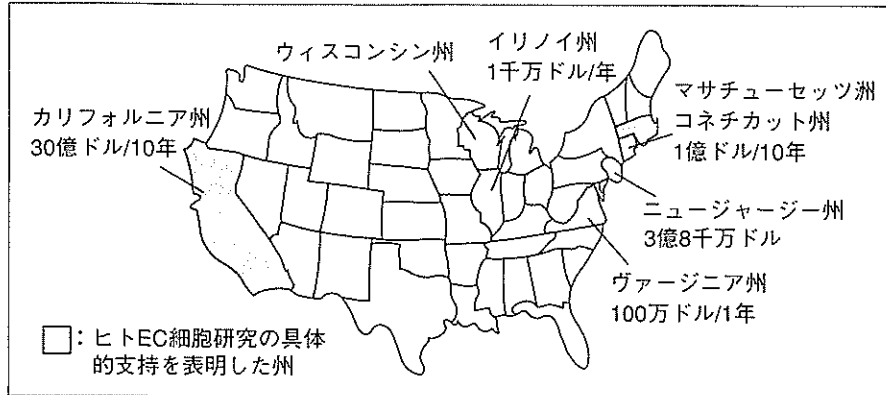


図 1 ヒトES細胞研究推進州

レーニングプロジェクトに研究費を提供するようになってい。2004 年にハーバード大学のダグラス・メルトン教授とアンディー・マクマホン教授のグループが、NIH 研究費を使用せず、あらたに 17 のヒト ES 細胞株を樹立し、アメリカのみならず世界中の研究者へ無償で提供すると発表した<sup>8)</sup>。ヒト ES 細胞は再生医学、発生学、薬物開発のためのマスキリングシステムや毒性検査システムへの応用など幅広い分野での研究が進められている。

## 2. ビジネス

2003 年に積極的にヒト ES 細胞に関連した仕事をしてきたアメリカのバイオテック会社はたった 10 社だけで、合計 \$ 7,000 万であった。ハーバード大学デボラ・スパー教授は、ヒト ES 細胞が関連した分野は将来的にはビジネスマーケットとなる可能性はあるが、現在のところマーケットとよべる代物ではないといっている。一方で、ある法律事務所はサンフランシスコにおいて、幹細胞研究資金運用に対して無償で法的コンサルティングを行うと発表した<sup>9)</sup>。通常のコンサルタント料は \$ 300/hr、その約 5,000 時間を無料で行うそうで、多分に将来の再生医療ビジネスを見越した投資である。今後、おもだったバイオテクノロジー

会社が以前から集まっていたカリフォルニア州で、“提案 71 号”の恩恵を受けて成功していく会社が出てくるか注目される。

## 今後

アメリカ国民の大多数は幹細胞研究でも世界のリーダーたるべきだと考えている<sup>2)</sup>。しかし、ヒト ES 細胞研究に対する政策に対して不満・不安を抱いている関係者は多い。ヒト ES 細胞研究に対する NIH 研究費は全幹細胞研究費の約 5%である(表 1)。多くの研究者は安定して ES 細胞研究を進められないということだけでなく、このような不安定な研究領域に有望な若手研究者が進んでこないのではないかという危機感を相当強く抱いている。同時に産業界も投資に対して大きな不安を抱いている。現在、アメリカの幹細胞領域における研究者とバイオビジネス関連の人たちの共通認識は、ヒト ES 細胞研究でアメリカは世界をリードしている位置にはいないということであった。

州単位でヒト ES 細胞研究に対する温度差がはっきりしているアメリカでは(図 1)、今後、“提案 71 号”が幹細胞研究の磁石的役割で研究・ビジネス界を引きつけているカリフォルニア州や、ヒト体細胞核移植 ES 細胞法案が認められ、ハー

バード大学を中心に幹細胞研究が活発なマサチューセッツ州などのヒト ES 細胞研究推進州で  
どういう成果が出てくるか注目してみたい。

### 文献

- 1) Smith, A. G. : Embryo-derived stem cells : of mice and man. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*, **17** : 435-462, 2001.
- 2) A Public Opinion Study for Research! America. Americans Speak Out on Stem Cell Research. 2005.
- 3) Wilmut, I. et al. : Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, **385** : 810-813, 1997.
- 4) Thomson, J. A. et al. : Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, **282** : 1145-1147, 1998.
- 5) Venter, J. C. et al. : The sequence of the human genome. *Science*, **291** : 1304-1351, 2001.
- 6) International Human Genome Sequencing Consortium : Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, **409** : 860-921, 2001.
- 7) 阿久津英憲 : 米国マサチューセッツ州でのヒト体細胞核移植に関する新たな動き—難病治療へ挑むハーバード大学研究チームの背景. *医学のあゆみ*, **213** : 709-713, 2005.
- 8) Cowan, C. A. et al. : Derivation of embryonic-stem cell lines from human blastocysts. *N. Engl. J. Med.*, **350** : 1353-1356, 2004.
- 9) San Francisco Business Times, **19**(50), July 15, 2005.

\* \* \*

# 核移植による多能性誘導

## クローン法の新たな可能性へ向けて

阿久津英憲, 梅澤明弘

体細胞クローン動物の作出成功から分化細胞が卵細胞の力を借りれば全能性を誘導できることが明らかとなった。もっとも、クローン個体作出率がきわめて低いことからすると、不完全な全能性の獲得かもしれないが、クローン胚盤胞からのES細胞の樹立は、比較的効率がよいので十分な多能性は誘導できているといえる。核移植法で体細胞核が体細胞の記憶を捨て、胚発生型に変化させるリプログラミング機構は不明なことが多いが、理解の一助のために核移植法のステップとリプログラミングの関連性について議論する。

**キーワード** ● 体細胞核移植, クローン, 多能性, リプログラミング

### はじめに

クローン羊 Dolly の誕生が Nature 誌に報告されて 10 年が経った。Dolly の存在はわれわれに何を明示し、何を語ってきたのであろうか。1880 年代に Weismann と Roux がそれぞれ唱えた生殖質説 (The Germ Plasm Theory) は、生殖細胞の精子と卵子が等価半量の遺伝形質をもち、受精により新しい個体を形成することができるとした。この説では、生殖細胞だけが完全な遺伝形質をもち、他の体細胞はその細胞を特化させる一部の遺伝形質しかもたず、その他は発生過程で失われるとされていた。生殖説は結局のところ反証可能な仮説であったので、基本的には実験による反証が必要であった。ちょうどこの時期、生物学はそれまでの博物学的アプローチから生物の現象を実証する動きが起こっており、実験発生学が現れた。Driesch や Spemann はそれぞれウニとイモリの初期胚を用い受精卵から発生が進んだ卵割期胚の割球 1 つが個体へ発生する能力があることを証明した。つまり、少なくと

も初期発生において発生とともに細胞の遺伝形質は脱落するのではなく、各細胞のゲノムは均一で全能性があることを示した。より発生の進んだ細胞を用いて受精卵の核との遺伝的等価性を証明するには、技術的進歩が必要であったのだが、その点について Spemann は除核した卵子へ分化細胞核を移植すると正常発生が可能かもしれないことを 1938 年の自著で述べていた。1950 年代になって Briggs と King が現在の体細胞核移植法の原型となる方法を確立し、カエル胚の細胞よりクローン体 (オタマジャクシ) 作製に成功した。その後核移植法の研究は哺乳動物を用いても行われるようになり、最終的に Wilmut らが体細胞クローン体の作製に成功したのである<sup>1)</sup>。

一世紀以上かけて発生生物学的に「受精卵の核と分化細胞の核は遺伝的に等価である」という答えをだすことができた。しかし、クローン研究はただ 1 つの答えを追い求める研究だったのだろうか。核移植法による研究の深みについては、1952 年に Briggs と King は核移植法が細胞核分化能解析に用いる以外にも、癌、

Somatic cell nuclear transfer and pluripotency : progress toward the possibilities of mammalian cloning  
Hidenori Akutsu/Akihiro Umezawa : Department of Reproductive Biology and Pathology, National Research Institute for Child Health and Development (国立成育医療センター研究所生殖医療研究部)

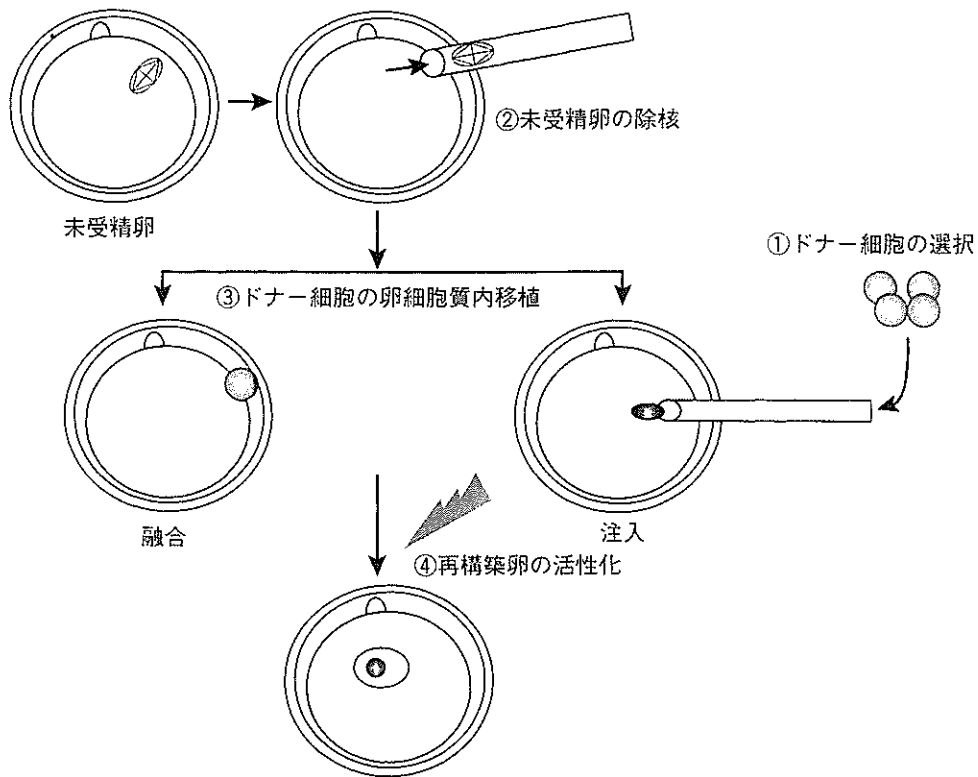


図1 体細胞核移植法

これまでクローン体作出に用いられた細胞の種類は20種未満である。研究の目的によって利用しやすい細胞を用いればよいが、分化を同定した細胞を用いる場合、分化マーカー遺伝子発現が可視化できることが必要である(①)。第二減数分裂中期の未受精卵がレシピエントとして用いられるが、最近ウシで初期の受精卵を使ったクローン体作出法が報告されている(②)。ドナー細胞の移植法は、センダイウイルスや電気刺激による融合法とマイクロインジェクションシステムによる直接注入法がある。マウスではもっぱら直接注入法が汎用されているが、その他の種では融合法が主である(③)。他に、ウシではマイクロマニピュレーターシステムを用いない方法(ハンドメイド・クローニング法)も報告されている。マウス再構築卵の活性化には二価陽イオンのストロンチウムによる活性化方法が汎用されているが、ストロンチウムの反応性は、種によって異なることが知られている。通常の受精においてもドナー(精子)と卵の活性化のタイミングが種によって異なるので、種に合わせた活性化方法、活性化のタイミングなどが必要になる(④)。

細胞老化、免疫学、そして遺伝子発現の分子レベルでの研究など幅広く応用できることを示唆していた<sup>2)</sup>。実際に哺乳動物で最初に細胞核移植法を成功させたMcGrathとSolterは、実験動物マウスを用いた核移植法により哺乳類の発生には雌雄両ゲノムが必要であることを証明し、インプリンティングメカニズムの研究推進に多大なる貢献をした<sup>3)</sup>。

体細胞核移植法により分化細胞核も受精卵同様のゲノム全能性を取り戻すことが示された。細胞の多能性誘導はヒトES細胞(embryonic stem cells)樹立成功の報告とともに、“再生”というキーワードを通して医療への応用も期待されている。本稿では、核移植法において体細胞が多分化能を獲得するためのキーと

なる技術的ステップとメカニズムを若干の私見も交えて紹介する。

## 1 体細胞核移植法

体細胞核移植法(nuclear transferまたはnuclear transplantation: NT)にはさまざまなバリエーションが存在するが、中心部分の手技を分けると、①ドナー細胞の選択(①)、②除核した未受精卵(②)、③ドナー細胞の卵細胞質内移植(③)、④再構築卵の活性化(④)、ということになる(図1)。クローン胚の発生率に寄与する上記①~④の各ステップについては、丹念に研究されている。具体的な方法に関しては

表 NTパラメータの概要 (文献4より改変)

種	ドナー細胞	移植方法	卵活性化	胚性遺伝子 活性化	クローン体 作出率	文献	
ヒツジ	乳腺上皮細胞	融合	電気刺激	8～16細胞期	3.40%	1	
	胎仔線維芽細胞	融合	電気刺激		5～20%	18	
	卵丘細胞	融合	電気刺激		50%	19	
ウシ	卵管上皮細胞	融合	電気刺激	8～16細胞期	33.30%	20	
	線維芽細胞	融合	電気刺激		9～20%	21, 22	
	卵丘細胞	直接注入	塩化ストロンチウム		1～3%	23	
	セルトリ細胞	直接注入	塩化ストロンチウム		6%	24	
	NKT細胞	直接注入	塩化ストロンチウム		1～2%	25	
	B/Tリンパ球	直接注入	塩化ストロンチウム		0% <sup>#</sup>	26, 27	
	神経細胞	直接注入	塩化ストロンチウム		0% <sup>#</sup>	28	
マウス	線維芽細胞	直接注入	塩化ストロンチウム	2細胞期	1%	29	
	線維芽細胞	融合	塩化ストロンチウム		2～3%	30	
	ES細胞	直接注入	塩化ストロンチウム		11～23%	31	
	胎仔性細胞	融合	電気刺激		2～16細胞期	3.5%	32
	顆粒膜細胞	融合	電気刺激		4細胞期	1.2%	33
ブタ	胎仔線維芽細胞	融合	電気刺激	4細胞期	4%	34	
	線維芽細胞	融合	電気刺激		—	1.1%	35
ネコ	線維芽細胞	融合	電気刺激	—	1.6%	36	
ウサギ	卵丘細胞	融合	電気刺激	8～16細胞期	1.7%	37	
ラット	胎仔線維芽細胞	直接注入	ブチロラクトン	4細胞期	5.9%	38	
ウマ	線維芽細胞	融合	イオノマイシン	—	0.2%	39	
	線維芽細胞	融合	イオノフォア	—	1%		
	線維芽細胞	融合	電気刺激	—	0%		
フェレット	線維芽細胞	直接注入	電気刺激	—	1.8%		
	卵丘細胞	融合	電気刺激	—	1.2%		
	卵丘細胞	直接注入	電気刺激	—			

※ ES細胞を樹立してからクローン個体を得る2ステップ法による

成書に詳しい (参考図書参照)。

### ① ドナー細胞の選択

これまでクローン個体作出に用いられたドナー細胞は、胎児から成体にいたるさまざまな組織から選択されている (表) <sup>4)</sup>。哺乳類でのクローン個体作成に成功しているドナー細胞は、すべて外胚葉と中胚葉組織由来である。内胚葉系細胞由来のクローンでは報告がないが、われわれは成体脾β細胞特異的遺伝子 Pdx1-GFP陽性細胞をドナーとしてクローン個体を作成することに成功している (未発表)。各胚葉の由来にかかわらずクローン個体作出は可能であるようだが、成体には200種以上の細胞が存在するにもかかわらず10数種の細胞だけがNTに成功している。この点については、ドナー細胞として選択がしやすかったり、培養法が確立されているといった手技的な点によるところも大きい。細胞自体の何らかの性質がNTとその後の

胚発生に影響を与えている可能性もある。マウスでは同種の細胞をドナーとしても系統間でクローン個体作出率に差がでることが報告されている<sup>5) 6)</sup>。細胞周期としては、培養細胞であるかないかにかかわらずG0/G1期またはG2/M期の細胞からクローン個体が作出されている。

### ② 除核卵とドナー細胞の移植

ドナー細胞の移植に関しては、直接卵細胞質に注入するマイクロインジェクション法あるいはセンダイウイルスや電気刺激による細胞融合法により除核卵と体細胞との再構築卵が形成される。マウスを用いた研究では、NTによる発生効率を上げるためには、ドナー細胞を受け入れる卵を卵成熟促進因子 (maturation promoting factor: MPF) とマイトジェン活性化タンパク質キナーゼ (mitogen-activated protein kinase: MAPK) 活性の高い未受精卵にする必要が

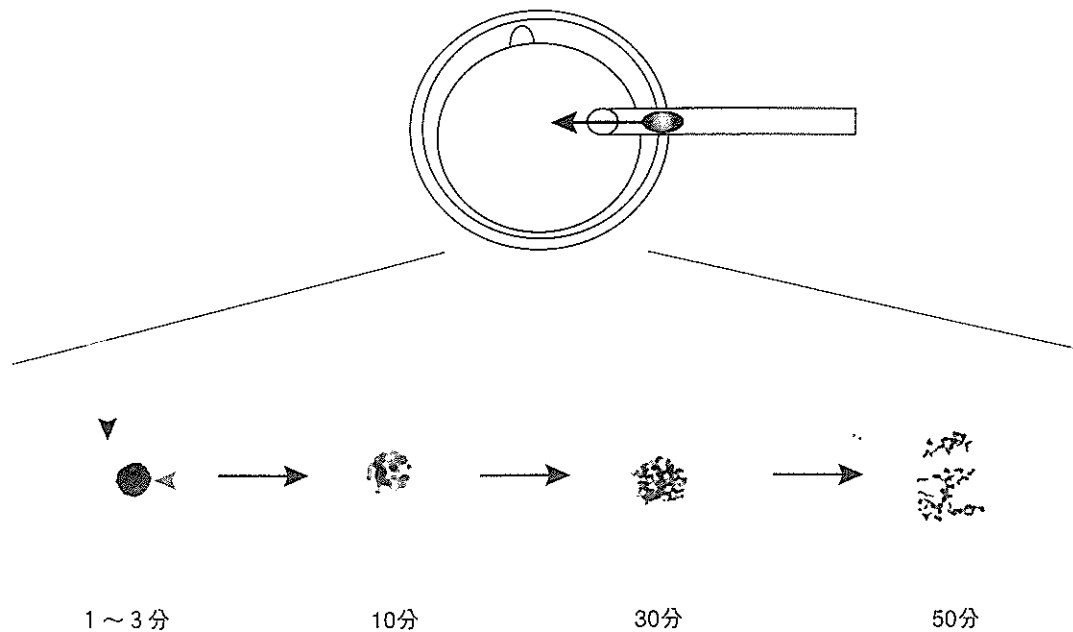


図2 除核卵内で起こるドナー細胞核の変化

卵丘細胞を除核卵に注入して直後、10分、30分、50分後の卵を固定して細胞核の変化を追った。卵丘細胞注入直後では、まだ卵丘細胞の細胞質が認められ（黒矢頭）、高倍率の顕微鏡下では染色質がまだ一様（赤矢頭）である。その後、PCCはダイナミックに進行していく

あるとされている<sup>7)</sup>。ドナー細胞核はMPFおよびMAPKの作用により核膜崩壊が起こり、染色質はただちに凝集し未熟な染色体を形成する（premature chromosome condensation: PCC）（図2）。種の違い、ドナー細胞の種類、細胞移植法の違いなどにより核膜崩壊やPCCに程度の差はでてくるが、この核膜崩壊により卵細胞質内にある初期化因子群がドナー細胞のクロマチンにアクセスすることができるだろう。

ドナー細胞核と卵細胞の相性に関していえば、DNA複製が起きているS期の場合、クロマチン構造とDNA複製中の状態がPCCに耐えることができずDNA損傷が引き起こされるようである。マウスES細胞の大部分はS期であることが多く、そのためにES細胞をドナー細胞としたNT胚では第一卵割期で停止する割合が多く発生率が悪いと考えられる<sup>6)</sup>。ドナー細胞核が分裂中期の場合には、核膜構造が形成されておらず、染色体として存在しているので卵細胞質の初期化因子がアクセスしやすい状況にあり、MPFやMAPKの直接的なドナー細胞への影響が少ない可能性がある<sup>8)</sup>。

いずれにせよ、ドナー細胞核移植後に短時間の内に

クロマチン構造はダイナミックに変化する。カエルの研究では、瞬間にクロマチンタンパク質が入れ替わるとされ<sup>9)</sup>、哺乳動物卵でも解析が待たれる。

### ③ 再構築卵の活性化

除核卵にドナー細胞を移植してできた再構築卵は、発生を進行させるために人為的に卵活性化を起こし、卵細胞質でカルシウムシグナルを発生させる必要がある。人為的卵活性化には、塩化ストロンチウム、エタノール、カルシウムイオノフォアや電気刺激などによるさまざまな方法がある。通常受精時に起こるカルシウムウェーブや周期的カルシウム濃度上昇（カルシウムオシレーション）を再現するように卵細胞内のカルシウム濃度を変動させてはいるが、その頻度、時間的・空間的パターンは精子によるものと異なる。マウスでは卵活性化方法によりクローン効率に有意な差はでないようであるが<sup>10)</sup>、ラットではタンパク質分解酵素阻害剤（MG132）が必須であったり、ウサギでは卵活性化とドナー細胞移植のタイミングがその後の発生に重要であったり、イヌやフェレットでは卵活性化と移植のタイミングがクローン個体作出を左右する要

因であったりと、再構築卵の活性化方法や移植とのタイミングなどに種による特異性がある<sup>4)</sup>。

## ② 体細胞核移植法による多能性の獲得

人為的な方法により分化した細胞を多能性をもつ細胞へリプログラムするには、NT以外に現在では、ES細胞との融合<sup>11)</sup>と特定遺伝子導入による多能性幹細胞の誘導<sup>12)</sup>という方法が認められている(多田の稿、高橋らの稿参照)。NTによる多能性の獲得では、再構築卵が機能性をもった胚盤胞にまで発生できなければならない。ここでいう機能性をもつ胚盤胞とは、着床と胎盤形成、そしてそれらを通した母体組織とのクロストークを可能にする栄養外胚葉(trophectoderm)と、胚体へと分化する内部細胞塊(inner cell mass: ICM)という2つの細胞系列をもつことである。クローン個体作成の場合、胎盤形成に形態的異常と遺伝子発現レベルでの異常が高頻度で認められ<sup>13)~15)</sup>、結果的に着床や着床後の発生不全(post-implantation loss)が高率に引き起こされることから胚体外組織への最初の分化起点である胚盤胞の栄養外胚葉で分子レベルの逸脱が引き起こされている可能性がある。栄養外胚葉だけで論じられることではなく、当然、ICMから分化するエピブラストと原始内胚葉細胞、そして栄養外胚葉細胞との間の分子レベルでのミスコミュニケーションがその後の発生不全を引き起こす1つの要因であろう。

## ③ 体細胞初期化(リプログラミング)に関する一考

前述したように機能性をもつ胚盤胞が発生することがより具体的な多能性獲得と考えた場合、私見ではあるが、NTにおける体細胞核のリプログラミングを便宜上、卵への移植直後に起こるアクティブーリプログラミングと胚盤胞までの発生過程で起こるパッシブーリプログラミングの2つに分けられる可能性がある。

### ① アクティブーリプログラミング

体細胞型であった遺伝子発現パターンは初期胚発生型へ再プログラム化されなくてはならない。NTでは

DNAの一次構造が変化するわけではないので、クロマチン構造やDNAの修飾が変動し遺伝子発現が調節される。通常、初期胚のゲノムから胚特異的な転写活性(zygotic gene activation: ZGA)が認められるのは、ウシやヒツジでは8~16細胞期なのに対しマウスでは1細胞期後半から4細胞期である。マウスを用いた体細胞とES細胞の細胞融合実験では、ヒストンH3, H4のアセチル化とヒストンH3-lysine4のメチル化に特徴づけられるようなクロマチンの脱凝縮が起こり体細胞型クロマチン構造から未分化細胞型クロマチンへリプログラムされている<sup>16)</sup>。カエル卵を用いた研究より、同様のことがNT再構築卵でも起きていると考えられる(桔梗の稿参照)。

移植直後に体細胞型から初期発生型へクロマチン構造がダイナミックに変動し初期発生を開始することをアクティブーリプログラミングとすると、両生類の研究からもアクティブーリプログラミングは、その後の発生にとって非常に重要である。ZGAは種によって異なるが、マウスでは2細胞期には胚性遺伝子転写が活発に行われなくてはならない。アクティブーリプログラミングの主体はクロマチンリモデリングになるかと思われるが、主としてヒストン修飾因子とATP依存なりモデリング因子などがクロマチンに作用することが必要で、マウス卵にはクロマチンリモデリング因子が豊富に含まれていることが判明している<sup>17)</sup>。

### ② パッシブーリプログラミング

マウス初期胚発生の遺伝子発現プロファイリング解析より、受精卵から胚盤胞に至る着床前期胚発生では遺伝子発現のパターンが大きく3つに分けられた<sup>17)</sup>。第1のグループは、卵形成過程で蓄えられ受精後に分解される卵性RNA、第2のグループはZGAに関する胚性RNAであり、第3のグループは4~8細胞期に発現が上昇してくるRNAで、第3の遺伝子発現上昇をMGA(mid-preimplantation gene activation)と名付けている。MGAグループには、*Nanog*, *Lefty1*, *Lefty2*, *Sox2*, *Bmyb*, *Sall4*, *E-cadherin*, *Glut2*, *Oct3/4*, *Dnmt3b*, *Spp1*, *Fragilis*などが含まれ、コンパクション、胚盤胞腔形成、ICMとTE(trophectoderm)分化にかかわっていることが示唆された。DNA合成阻害剤、転写阻害剤、翻訳阻害剤を用いた



実験より、MGAの誘導にはZGA遺伝子産物が必要であるとされることから、NTにおいてもアクティブリープログラミングの結果引き起こされるZGAにより、機能性をもつ胚盤胞に必要なMGA遺伝子がタイミングよく誘導されなければならないと思われる。エピジェネティックな変化についても、通常、受精後母性ゲノムでは細胞周期を経て胚盤胞にかけて受動的に脱メチル化される。NT胚でも受動的なエピジェネティック修飾とZGAからMGAへの確立は、機能的な胚盤胞への発生に必要である。細胞周期依存的にエピジェネティック修飾とMGAパターンが確立されていくことがパッシブリープログラミングであり多能性誘導に重要であると思われる。

## おわりに

核移植法により体細胞核が全能性を獲得できることとそのメカニズムを探ることで発生学、基礎医学そして再生医療へさまざまな新発見を与えているということからすると、Dollyの存在は、“初の体細胞クローン動物”という記念碑的な存在を超えている。体細胞リプログラミングについては、現象的な観点から論じられる場合が多く、そのメカニズムの知見が不足しているためわれわれは卵の中で起こっている体細胞リプログラミングを操作することはできない。今後具体的なリプログラミングメカニズムが生化学的、分子生物学的に解明されることを期待したい。

## 文献

- 1) Wilmut, I. et al. : Nature, 385 : 810-813, 1997
- 2) Briggs, R. & King, T. J. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 38 : 453-463, 1952
- 3) McGrath, J. & Solter, D. : Cell, 37 : 179-183, 1984
- 4) Meissner, A. & Jaenisch, R. : Dev. Dyn., 235 : 2460-2469, 2006
- 5) Wakayama, T. & Yanagimachi, R. : Mol. Reprod. Dev., 58 : 376-383, 2001
- 6) Eggan, K. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98 : 6209-6214, 2001
- 7) Wakayama, T. et al. : Nature Genet., 24 : 108-109, 2000
- 8) Tani, T. et al. : Biol. Reprod., 69 : 1890-1894, 2003
- 9) Kikyo, N. & Wolffe, A. P. : J. Cell. Sci., 113 : 11-20, 2000
- 10) Kishikawa, H. et al. : Cloning, 1 : 154-159, 1999
- 11) Tada, M. et al. : Curr. Biol., 11 : 1553-1558, 2001
- 12) Takahashi, K. & Yamanaka, S. : Cell, 126 : 663-676, 2006
- 13) Tanaka, S. et al. : Biol. Reprod., 65 : 1813-1821, 2001

- 14) Humpherys, D. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99 : 12889-12894, 2002
- 15) Wakisato-Saito, N. et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 349 : 106-114, 2006
- 16) Kimura, H. et al. : Mol. Cell. Biol., 24 : 5710-5720, 2004
- 17) Hamatani, T. et al. : Dev. Cell, 6 : 117-131, 2004
- 18) Schnieke, A. E. et al. : Science, 278 : 2130-2133, 1997
- 19) Kato, Y. et al. : Science, 282 : 2095-2098, 1998
- 20) Brophy, B. et al. : Nature Biotechnol., 21 : 157-162, 2003
- 21) Wakayama, T. et al. : Nature, 394 : 369-374, 1998
- 22) Wakayama, S. et al. : Biol. Reprod., 72 : 932-936, 2005
- 23) Ogura, A. et al. : Biol. Reprod., 62 : 1579-1584, 2000a
- 24) Inoue, K. et al. : Curr. Biol., 15 : 1114-1118, 2005
- 25) Hochedlinger, K. & Jaenisch, R. : Nature, 415 : 1035-1038, 2002a
- 26) Eggan, K. et al. : Nature, 428 : 44-49, 2004
- 27) Li, J. et al. : Nature, 428 : 393-399, 2004
- 28) Wakayama, T. & Yanagimachi, R. : Nature Genet., 22 : 127-128, 1999
- 29) Ogura, A. et al. : Mol. Reprod. Dev., 57 : 55-59, 2000b
- 30) Hochedlinger, K. & Jaenisch, R. : Nature, 441 : 1061-1067, 2006
- 31) Baguisi, A. et al. : Nature Biotechnol., 17 : 456-461, 1999
- 32) Polejaeva, I. A. et al. : Nature, 407 : 86-90, 2000
- 33) Lai, L. et al. : Science, 295 : 1089-1092, 2002
- 34) Shin, T. et al. : Nature, 415 : 859, 2002
- 35) Chesne, P. et al. : Nature Biotechnol., 20 : 366-369, 2002
- 36) Zhou, Q. et al. : Science, 302 : 1179, 2003
- 37) Galli, C. et al. : Nature, 424 : 635, 2003
- 38) Lee, B. C. et al. : Nature, 436 : 641, 2005
- 39) Li, Z. et al. : Dev. Biol., 293 : 439-448, 2006

## 参考図書

- 『マウス胚の操作マニュアル(第三版)』(山内一也, 豊田 裕, 岩倉洋一郎, 佐藤英明, 鈴木宏志/訳), 近代出版, 2005  
 『ジーンターゲティングの最新技術—効率よく確実なマウスの遺伝子組換えとクローン作製法』(八木 健/編), 羊土社, 2000

## Profile

### 筆頭著者プロフィール

阿久津英憲 : 1995年弘前大学医学部卒業。2002年福島県立医科大学医学研究科卒業, 医学博士。1995年福島県立医科大学産科婦人科入局(佐藤 章教授)。'99年ハワイ大学医学部解剖生殖生物学教室に留学(柳町隆造教授)。2002年福島県立医科大学産科婦人科助手。日本産科婦人科学会産婦人科専門医認定。同年米国国立老化研究所遺伝学研究室に留学(洪実先生)。'04年ハーバード大学分子細胞生物学部に留学(D. Melton教授, K. Eggan教授)。'05年より現所属。研究室長。ハーバード大学でヒトES細胞を樹立した実績とヒトES細胞の大いなる可能性を信じ、成育医療センターでのヒトES細胞樹立を目指して仲間とともにがんばっています。  
 E-mail : hakutsu@nch.go.jp

## 核移植クローニング技術の進歩

阿久津 英 憲\*

昨秋、読売新聞に「ヒト胚性幹細胞研究がアメリカ中間選挙の争点の一つに」という記事が掲載された。2年に1度行われる下院議員の国政選挙は、2年後の大統領選挙を占う重要な意義を持ち、共和党、民主党ともに熾烈な選挙合戦を繰り広げていた。その争点の一つに体細胞核移植法も含めた胚性幹 (ES) 細胞研究推進が挙がっている。ニュースなどでご存知の方もおられると思うが、ミズーリ州の民主党候補を応援するCMでパーキンソン病を罹患している俳優のマイケル・J・フォックスさんが病状をあらわに、ES細胞研究支持の民主党候補支持を訴え全米で大きな反響となった (共和党支持者からは「彼は演技している、薬を服用せず症状をわざと出している」と、攻撃を受けていたが)。ヒト体細胞核移植法はES細胞研究と相まって、再生医療分野で難治疾患に対する新規治療法として大きな期待を受けているが、ヒト体細胞核移植法は生殖クローン法と技術的に重なっているため、大きな生命倫理 (時に強固な宗教観を背景にした) 問題がついて回るのが現状である。今回は、この体細胞核移植技術がどういう経緯で始まり、発展してきたのかを、今後の再生医療あるいは生殖医療への関わりを含めて述べる。

Akutsu Hidenori

\* 国立成育医療センター研究所生殖医療研究部  
(〒157-8535 東京都世田谷区大蔵2-10-1)

上段で、私は意図的に「体細胞核移植」、「クローン」という語句を使い分けた。「クローン」という響きからどのような印象を受けるか。クローンの意味を旧科学技術庁が説明している文章から引用する。「クローンとは、「遺伝的に同一である個体や細胞 (の集合)」を指し、体細胞クローンは無性生殖により発生する。無性生殖では同じ遺伝子が受け継がれるため、有性生殖の場合のように偶然の組み合わせによる多様性はなく、同じ親から産生された個体同士はすべて同じ遺伝子を持つクローンとなる」(文部科学省「クローンって何?」)。この説明では、「クローン」が産生された個体同士で使われることになるが、実際にはドナー細胞の元の個体とその産仔 (クローン体) の関係で使われることが多い。本稿におけるクローンの意味するところ、キーワードは以下の3つである。1) 「遺伝的に同一」、2) 「生殖系を経ない」、そして、3) 「個体か細胞 (の集合) か」である。ここで使われるクローンには、当然一卵性双胎は入ってこない。もともと生殖系を経た胚の分割で得られた個体だからである。後に述べる生殖クローンの種々の問題は、「生殖系を経っていない」ところから来ていると考えられ、逆に生殖系で生殖細胞が発生してくる過程の重要性が再認識されている。米国の科学者は、「本来の研究内容や目的に誤解を与えるということで、「クローニング」と呼ばないで」と訴えている<sup>1)</sup>。Vogelstein

表1 ヒトにおける体細胞核移植と生殖クローニングの比較

	体細胞核移植	生殖クローニング
最終目的産物	体外培養細胞	個体
目的	細胞移植療法	ヒト個体の再生
代理母の必要性	なし	あり
ヒトの誕生	なし	あり
生命倫理的問題	生殖医療, ヒト ES 細胞研究に関する生命倫理規範に準ずる	非常に複雑
医学的問題	既存の細胞移植に係わる問題	安全性に憂慮 長期的影響は予想つかない

(Science 295 : 1237, 2002 より改変)

らは体細胞核移植と生殖クローニングの違いを挙げ(表1), 体細胞核移植法とES細胞研究に対しネガティブなイメージがつかないように説明している。体細胞核移植と生殖クローニングの違いは、簡単に言ってしまうと目的が「細胞(の集合)」作成か「個体」作成かの違いである。クローンまたはクローニングだと、どうも手技よりも個体作成のイメージを強く含有している。そこで体細胞核移植法(Nuclear Transfer, Nuclear Transplantation: NT)という言葉が使われるようになってきた。

## クローンの歴史

### 1 クローン黎明期前

突然変異の概念を初めて報告した Hugo Marie de Vries らが1900年にメンデルの法則を再発見するまで、遺伝現象(遺伝形質)は交配とともに液体のように混じり合っていく混合遺伝として捉えられていた。しかし、その15年程前から胚発生学者達は個体を形作る情報は染色体を含む細胞核であり、それが受け継がれていくと考えていた。August Weismann は生殖細胞の精子と卵子は個体遺伝形質の等価な半量を持ち、受精により新しい個体を形成することができる(受精卵のみが全能性を持つ)こと、つまり遺伝因子は生殖細胞

にあるとする生殖質説を提唱した。生殖質説では神経、筋肉などの分化細胞はその細胞に特化させる一部の遺伝形質しか持たず、その他は発生過程で失われるとされていた。それまでの生物学は博物学的色彩が強く、収集・整理・記述で行われていたが、20世紀に入り生物の現象を実証する動きが発生学にも現れ、実験発生学が始まった。実験発生学の初期、Wilhelm Roux (1888) は、カエル2細胞期胚の一方を熱した針で死滅させた胚は個体にまで至らないという実験を行い、Weismann の生殖質説に矛盾しない結果となった。一方、Hans Driesch (1892) は、ウニの4細胞期胚をバラバラにし、それぞれが小さいながらも個体発生(プルテウス幼生)に至ることを示した実験から、発生が進行しても各細胞の核は受精卵と等価であること、発生は核と細胞質が調節し合って進行すること等、現在の生物学の重要な概念を唱えた。Driesch の実験は、世界で最初の実験クローン個体作出の成功例とも言えるかもしれない。これで、クローン実験を行う下地が整ってきた。大きな契機は、発生とともに遺伝形質は変化(減少)し細胞の全能性は失われるのかということ、それを実験で答を出そうとする実験発生学の発達であった。余談だが、Driesch は自らの実験結果があまりにも衝撃的で、その後ネオヴァイタリズム(新生氣論)を唱え哲学の教授となった。

## 2 クローン黎明期

Driesch らの卵割球を分離し発生個体を観察する実験より、少なくともごく初期の各卵割球は遺伝的等価であるという知見が得られていたが、さらに発生が進行した個体の細胞ではどうか。その問いに答えたのが Jacques Loeb (1894) と Hans Spemann (1914) である。Loeb は、ウニ受精卵を低浸透圧生理食塩水に置くことで無核細胞質と有核細胞質部分に分け、発生が進行した有核部分の 1 細胞核を無核細胞質へ移す実験を行った。Spemann は、娘の毛髪を使いイモリ受精卵を Loeb 同様に無核、有核部分に分け、16 細胞期に至った有核部分の 1 細胞核を無核部分へ移行させ発生させたところ、両胚とも正常な個体に発生した。これにより、少なくとも初期発生において遺伝形質は脱落するのではなく、各細胞のゲノムは均一で全能性があることが判明した。Spemann はその後、カエル胚を使った移植実験による発生の運命付けに関する数々の発見をし、胚発生におけるオーガナイザーに関する一連の業績により 1935 年ノーベル賞を受賞した。

それでは、細胞核を卵に移植して発生をさせるという現在のクローニング技術の原型はいつ頃から行われていたのでしょうか。Di Berardino 女史によると Rauber (1886) が最初であるらしい<sup>2)</sup>。Rauber は、細胞核そのものが遺伝形質機能を持っているか証明するためにカエル受精卵を使って細胞核を置換する実験を行った。結果は、残念ながら核置換卵は発生しなかった。しかし Spemann は、完全に分化した細胞を除核した卵子へ入れると正常発生が可能かもしれないことを記述している<sup>3)</sup>。20 世紀に入り、実験発生学においても胚を扱うことのできる器具の発達や、技術を持った研究者が台頭してきた。1940 年代に米国ペンシルバニア州フォックスチェイス癌センターの Robert Briggs は、体細胞核の遺伝的等価性（受精卵と体細胞では核ゲノムは同一であることを）を解析するためカエルを使った研究を行っていたが、なかなか思うような成果が得られず

にいた。1950 年にニューヨーク大学の大学院生 Thomas J. King が Briggs の研究室に入って歴史は動いた。King は当時、ミクロの胚操作技術ではパイオニアの一人である Robert Chambers より胚操作術の手ほどきを受け、技術的に十分なものを持っていた。そこで、ドナー細胞にダメージを加えない移植法などサイトジェネティック基礎研究をこなしつつ、細胞核移植法により 1952 年までに現在の体細胞核移植法の原型となる方法確立した。カエル胚の細胞よりクローン個体（オタマジャクシ）作成に成功した。初めてクローン胚が胞胚期まで発生したのを見た Briggs は研究室に響き渡る歓喜の声を上げ、研究所中の人々が顕微鏡をのぞきにきた。そして、大騒ぎが一段落ついた時、King が顕微鏡をのぞいてみると、せっかくできた初のクローン胞胚はつぶれていたようで、周りの人は「もしこのクローンが本当なら、君ならまた作れるよ」とひどく落ち込んでいた King を慰めたそうである。1952 年には、Briggs と King は核移植法を細胞核分化能解析に用いる以外にも、癌、細胞老化、免疫学、そして遺伝子発現の分子レベルでの研究など広く応用できることを示唆している。

その後、John Gurdon らはオタマジャクシの腸や成体の皮膚の細胞を使ったクローンを成功させてきた。1970 年代までに世界中の研究者が両生類クローンの成功を報告してきたが、幼生、成体からの細胞核移植により得られたクローン個体は成体まで発生することはなかった。その後、細胞核全能性に関する研究は昆虫、魚類、そして哺乳動物を使用したクローニング研究へと広がりを見せていった。

## 3 哺乳動物のクローン

Briggs と King がカエルでクローンの成功を伝えてから約 30 年後の 1980 年代初頭、哺乳動物クローンの成功が報告されてきた。これほどの時間がかかった理由は、一つに哺乳動物卵は両生類に比べて非常に小さく胚操作に対して脆弱であり、その卵に合わせて顕微胚操作術、顕微鏡システ

ム、除核術、卵活性化法、核移植術等を改良しなくてはならなかったからである。さらに、卵の体外培養システムと培養液の改善を待たなければならなかったこと等が挙げられる。哺乳動物でのクローン研究において当初の目的は2つあった。1つには、他の種同様に初期発生の段階での細胞核の全能性に関して答を出すことであり、2つ目は産産動物の改良であった。実験動物マウスを用い、不活性化したセンダイウイルスを細胞融合に応用した細胞核移植実験は1969年頃から行われていたが、ほとんど異常な卵割期発生で止まっていた。James McGrathとDavor Solterはマウスを用いて初めて核移植術を成功させた<sup>4)</sup>。受精卵より雌雄両前核を抜き取り、除核した卵と不活性化したセンダイウイルスにより融合させた。その結果、16%の率で正常な産仔への発生が認められた。彼らはまた、この方法を応用して雌性胚と雄性胚発生を解析することで、哺乳類の発生には雌雄両ゲノムが必要であることを証明し、インプリンティングメカニズムの研究に多大なる貢献をした<sup>5)</sup>。マウス初期胚および胎児由来の細胞を使った体細胞核移植研究で貴重な成功例を報告してきたのは、日本人の角田と河野であった。一連のマウスクローン実験より、受精卵から8細胞期胚までの細胞核は全能性があり、2細胞期と4細胞期の単離した割球は成体まで発生することができる。そして、ドナー細胞のゲノムのリプログラミングが移植後の卵内で起こることが報告された。また、マウスの他にウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウサギでクローン研究が広く行われていった。

連年ときた生物学上の大きな問いにBriggsとKingをはじめとした研究が答を出したのに、その後もクローン研究がどんどん広がりを見せてきたのは何故なのだろうか。言い換えると、クローン研究をやる意味はどこにあるのだろうか。これまでの研究成果で受精卵からの発生では遺伝形質(ゲノム)が失われ、分化した細胞になるのではないことと、細胞核(成体では答が出ていなかっ

たが)は受精卵と等しいゲノム情報を保持していることがわかった。この時点で、さらにクローン研究をやる理由は少なくとも3つ考えられる。1つは、成体では各細胞は高度に分化した細胞、つまりその組織特異的な遺伝子発現があり、特化した働きを持つ分化細胞ではゲノムの脱落、変異が本当はないのであろうか。2つ目は、分化細胞がもしゲノムの脱落、変異がない、つまりゲノムは受精卵と等価であるとするなら、分化細胞核も受精卵同様ゲノム全能性(genomic totipotency)を有する。通常、心筋細胞のような細胞が受精卵に戻ることはない。しかし、これまでのクローン研究が示したように、分化細胞核でさえ卵の中に入ると発生時計をもう一度リセットし、全能性を引き出すことができる可能性が出てきた。卵が分化細胞ゲノムをリセットできる機能、つまり細胞核リプログラミング(genomic and epigenetic reprogramming)とはどのような仕組みで起きているのか、その正体は何か、それを解明し人的に応用できれば、組織を再生することが可能になるはずである。3つ目は、当初のクローン研究の目的の一つに産産動物の生殖応用が挙げられていた。クローンの効率を上げることは、クローン研究が現場へ応用されるために非常に重要であったと考えられる。現に、1980年代から1990年代にかけて細胞核リプログラミングの研究は盛んに行われるようになってきた。リプログラミングが解明されれば体細胞クローンも可能になるであろうと考えられたのも一因である。しかし、リプログラミングメカニズムに関して分子レベルではほとんど何も解明されていなかった。

#### 4 体細胞クローン動物の誕生

1997年、遂に体細胞クローンの成功が報告された。Ian Wilmutらは、成体雌羊の乳腺細胞を除核した未受精卵と融合させ活性化させた後仮親へ移植したところ、クローン羊の「ドリー」が誕生した。翌年より他の動物でも体細胞クローン動物の成功例が相次いで報告された。1998年には柳町と若山が実験動物であるマウスで、角田

らはウシで体細胞クローン動物の作出を報告した。現在までにヤギ、ブタ、ネコ、ウマ等で成功している。クローン動物作出の成功は、クローン技術が様々な分野で応用できる可能性を示した。Wilmutらはドリーを作成した技術と遺伝子組換え技術を使い、血友病の治療に必要なヒト血液凝固因子（第IX因子）遺伝子を組み込まれたクローン羊「ポリー」を作成した。羊乳から第IX因子タンパク質を精製し、治療薬として利用することを目指した。旧科学技術庁はクローンの応用例として、実験用動物の革新、希少動物の保護・再生、食料（畜産）の安定供給、医薬品の製造、移植用臓器の作成等を挙げている。しかし、体細胞クローン動物が作成されてわかったことは、クローン胚の個体発生率が非常に低いこと、流産や胎児奇形率が高いこと、胎盤に組織的・機能的な異常が認められること、クローン動物の中には短命な個体が出てきたこと等の問題が出てきたことである。クローン研究における社会の注目は、当初の目的である発生過程におけるゲノム不変やリプログラミング解析よりも、ヒト生殖応用への危惧へと集まった。クローン動物作成の土台となるマイクロインジェクションシステムは、生殖補助医療での顕微授精システムとほぼ同様であることで、世界中でクローン技術のヒトへの安易な応用が危惧されたため、ドリーの報告以来すぐさま世界中でヒトクローン禁止の法律が整備されていった。研究者達もヒト生殖応用禁止を訴えている<sup>6)</sup>。ヒトクローン禁止の理由として、クローン胚、胎児の異常率が高いこと、多数の正常卵の必要性が挙げられているが、母体の保護も付け加えるべきである。流産率が高いだけでなく、これまでのクローン動物作成において胎盤の形態的および組織学的な異常はほぼ100%認められている。私達が行ったクローン胚の胎盤での胎盤特異的遺伝子発現を解析した結果、すべてのクローン胎盤で遺伝子発現の異常が認められた。ヒトでは胎盤の機能低下・不全による重篤な妊娠合併症が知られているので、ヒトクローン胚の子宮への移植は非人道

的行為であると認識するべきである。

#### 5) 体細胞核移植術の広がる可能性

1952年にBriggsとKingが示唆した通り、クローニング技術はクローン個体作成目的以外の様々な分野へ応用されていった。例えば、石野と小倉らはこれまでの技術では不可能であった始原生殖細胞発生段階に起きるゲノムインプリンティング確立の解明にクローニング技術を応用することで重要な発見をしてきている<sup>7)</sup>。基礎研究においてクローニング技術が非常に有用なツールとなることが理解されていたが、“クローン”とつくことで社会から本来の研究に対してネガティブなイメージがつくのを避けるために、前述したVogelsteinらが“Please Don't Call It Cloning!”と訴えたわけである。これは何も基礎研究に対してだけでなく、次に述べる再生医療応用への影響もある。

クローン羊ドリーが報告された翌年の1998年、ヒトES細胞樹立の成功が発表された<sup>8)</sup>。これで一気に体細胞核移植法とヒトES細胞の再生医療への応用が現実味を帯びてきたのである。当初この方法は、Therapeutic Cloningと呼ばれていたが、現在ではCloningという単語を使わないCell Replacement Therapy (CRT)と呼ばれることが多い。ES細胞は胚盤胞の内部細胞塊より樹立される細胞で、身体のすべての細胞に分化することができる能力（分化多能性）を保持したまま体外培養系で無限に増殖することができる稀有な細胞である。難治疾患で機能不全あるいは低下した組織を、ES細胞を用いた細胞移植により機能を改善させようとする細胞移植療法において、他人の細胞を移植した場合拒絶されるか、副作用の強い免疫抑制剤の服用は避けられない。そこで、体細胞核移植法を応用し、患者自らの核ゲノムを持つES細胞を樹立し細胞移植へ用いるのである（CRT）。このCRTに関する研究では、韓国の黄禹錫教授の研究ねつ造と生命倫理学的手続きの不正によりその必要性自体を問われているが、米国や英国の研究グループは非常に厳しい倫理手続

きのもと、ヒト体細胞核移植法による胚の作成とES細胞樹立研究の準備を進めている。体細胞核移植法によるヒトES細胞の作成は、CRTのみに向かってはではなく、病気モデルのES細胞を作成することも大きな意義を持っている。現在多くの慢性変性疾患では有効な治療法のない、例えば、パーキンソン病患者の細胞を用いて体細胞核移植による胚からES細胞を樹立する。ゲノム上にその病気の何らかの変異を持ったと考えられるES細胞から神経へ分化誘導させ、正常なES細胞からの神経誘導と分子あるいは機能レベルで詳細に比較検討する。このヒト細胞による体外実験系によりパーキンソン病の病因解明にあたるとともに、治療薬の開発や新しい治療法の実験を行うことができる。

生殖補助医療において体細胞核移植術の応用の可能性はあるのだろうか。生殖細胞の代わりに体細胞ゲノムを半数化させて生殖補助医療へ応用する可能性も指摘されていたが、私たちはそのサイトジェネティックな明らかな不完全性を報告している<sup>9)</sup>。他には、体細胞核移植術ではないが、同様なマイクロマニピュレーション技術を使用した、GV卵の核置換や着床前診断で行う割球あるいは胚盤胞期の細胞採取に応用できる。我が国においてクローニング技術をヒト生殖に応用することを禁止する法律「ヒトに関するクローニング技術等の規制に関する法律」が平成13年より施行されている。ヒト体細胞核移植法のES細胞樹立研究に関しては、国はその必要性のあることを認識し、総合科学技術会議において、平成16年7月に「ヒト胚の取扱いに関する基本的な考え方」(意見)が取りまとめられ、人クローン(体細胞核移植)胚の研究目的の作成・利用については、他に治療法の存在しない難病等のための再生医療の研究目的に限って認め、クローニング技術規制法に基づく特定胚指針の改正等により必要な枠組みを整備すべきとされた。これを受けて、人クローン胚研究利用作業部会委員会は毎回委員会を公開で行い、さらに平成18年には関係団体や一般の方

から意見を聴取する会を2回行い、「人クローン胚の研究目的の作成・利用のあり方について一人クローン胚研究利用作業部会中間取りまとめ」を発表し、特定胚指針等の改正に向けて基本的な考え方について報告している。胚盤胞から樹立したES細胞が再生医療応用で社会の関心を集め、卵子・卵・初期胚の存在は、生殖医療のみならず再生医療への関わりを通し、今までよりも広く社会の関心を集めてきている。

体細胞核移植法は基礎研究での応用から医学研究、そして再生医療への応用等、新たな可能性を広げている。しかし、医療応用の可能性が広がるとともに社会との関わりが密接となる。医療と社会との関わり方で重要になるのは、生命倫理観の認識とそれに基づいた行動である。体細胞核移植研究が適切に評価され、社会に貢献することを期待している。

#### 参考文献

- 1) Vogtstein B, et al: Please Don't call it cloning! *Science* 295: 2002.
- 2) Di Berardino MA: Genomic potential of differentiated cells. Columbia Univ Press, 1997.
- 3) Spemann H: Embryonic development and induction. Yale Univ Press, 1938.
- 4) McGrath J & Solter D: Nuclear Transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science* 220: 1983.
- 5) McGrath J & Solter D: Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* 37: 179-183, 1984.
- 6) Jaenisch R & Wilmut I: Don't clone humans! *Science* 291: 2001.
- 7) Lee J, et al: Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. *Development* 129: 2002.
- 8) Thomson JA, et al: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1998.
- 9) Tateno H, et al: Inability of mature oocytes to create functional haploid genomes from somatic cell nuclei. *Fertil Steril* 79: 216-218, 2003.

## Selective increase in high molecular weight adiponectin concentration in serum of women with preeclampsia

Yuri Takemura, Yutaka Osuga\*, Kaori Koga, Toshiki Tajima, Yasushi Hirota, Tetsuya Hirata, Chieko Morimoto, Miyuki Harada, Tetsu Yano, Yuji Taketani

*Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan*

Received 6 February 2006; received in revised form 3 May 2006; accepted 17 May 2006

### Abstract

Total adiponectin concentrations have been shown to increase in serum of preeclamptic women. However, variance of concentrations of different isoforms has not been studied, despite the emerging notion that high, medium and low molecular weight adiponectin exert different functions. We have determined serum concentrations of each adiponectin isoform using a newly developed enzyme immunosorbent assay. High molecular weight (HMW) adiponectin concentrations were significantly higher in women with preeclampsia ( $n = 14$ ; median, 11.2  $\mu\text{g/ml}$ ; interquartile range, 9.2–15.8) compared to normal pregnant women ( $n = 14$ ; 6.8  $\mu\text{g/ml}$ , 5.4–10.7;  $P = 0.04$ ). In contrast, medium molecular weight and low molecular weight adiponectin concentrations were substantially equal between the groups. The ratio of HMW adiponectin to total adiponectin was also markedly higher in preeclamptic women (52.3%, 49.5–58.7) than control women (43.0%; 39.8–48.0;  $P = 0.004$ ). Taken together with other reports our findings imply a physiological feedback response to minimize endothelial damage in preeclamptic women.

© 2006 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Adiponectin; Preeclampsia; Molecular weight; serum

### 1. Introduction

Preeclampsia is one of the common causes of maternal death and a major contributor to both maternal and fetal morbidity. Its clinical manifestations, i.e. hypertension, proteinuria and edema, are caused by widespread endothelial damage and dysfunction throughout maternal circulation (Redman and Sargent, 2005; Roberts et al., 1989). Several candidate molecules that induce the endothelial dysfunction, sVFGFR-1/sFlt-1 being the most probable (Koga et al., 2003; Levine et al., 2004),

have been suggested; however, the etiology remains elusive.

Adiponectin is a pleiotropic cytokine with anti-diabetic, anti-inflammatory and anti-atherogenic properties (Brakenhielm et al., 2004; Goldstein and Scalia, 2004; Kadowaki and Yamauchi, 2005; Takemura et al., 2005a,b; Yokota et al., 2000). Experimental data have demonstrated that adiponectin acts as an endogenous modulator, exerting a number of vascular-protecting activities (Arita et al., 2002; Matsuda et al., 2002; Okamoto et al., 2002; Ouchi et al., 2000, 2001). In addition, the adiponectin concentration was reported to be significantly lower in hypertensive men than in normotensive men regardless of insulin resistance (Iwashima et al., 2004).

\* Corresponding author. Tel.: +81 3 3815 5411; fax: +81 3 3816 2017.

E-mail address: yutakaos-ky@umin.ac.jp (Y. Osuga).



Therefore, circulating adiponectin concentrations were hypothesized to decrease in women with preeclampsia. Insulin-resistance associated with preeclampsia (Kaaaja et al., 1999; Solomon and Seely, 2001) also sustains the assumption, because serum adiponectin concentrations are inversely related with insulin resistance (Matsubara et al., 2002). Contrary to expectation, however, recent studies have shown that adiponectin concentrations were increased by 47% (Ramsay et al., 2003), 87% (Naruse et al., 2005) and 30% (Kajantie et al., 2005) in preeclamptic compared to normotensive women with similar body mass index. The reason of this paradoxical finding has been suggested to be due to compensatory mechanisms in women with preeclampsia.

Recent studies demonstrated that adiponectin circulates as a trimer (low molecular weight, LMW), hexamer (medium molecular weight; MMW) or high molecular weight (HMW) form (Waki et al., 2003). Each isoform has been shown to play different biological roles (Bub et al., 2006; Kobayashi et al., 2004; Matsuda et al., 2002; Wang et al., 2005). Remarkably, only the HMW form protects endothelial cells from apoptosis (Kobayashi et al., 2004). In addition, the proportion of different isoforms is altered in various pathological and physiological conditions (Bobbert et al., 2005; Kobayashi et al., 2004; Lara-Castro et al., 2006; Pajvani et al., 2003). Therefore, isoform abundance should be evaluated when examining the role of adiponectin in different disease states.

To date, all isoforms were recognized by commercial adiponectin assay kits, including those used in studies showing the paradoxical increase of adiponectin concentration in women with preeclampsia (Kajantie et al., 2005; Naruse et al., 2005; Ramsay et al., 2003). Generally, these assays were used to measure the total adiponectin concentrations. In contrast, a newly developed adiponectin assay system can measure separately the concentration of each isoform. To address further the relevance of adiponectin in preeclampsia, we have measured serum concentrations of different adiponectin isoforms in women with preeclampsia using the new assay system.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Subjects

A total of 28 pregnant women with ages of 28–38 years, with ( $n=14$ ) and without ( $n=14$ ) preeclampsia, were included in this study. Their gestational ages ranged from 26 to 40 weeks. Preeclampsia was defined as blood pressure  $>140/90$  mmHg with proteinuria of either  $>100$  mg/dl by urine analysis or  $>300$  mg in a 24-h urine

collection. None of the patients with preeclampsia had any prior history of hypertension or renal disease. Control subjects with body mass index (BMI) similar to the group with preeclampsia were collected from women who had no hypertension, proteinuria nor edema. None of the subjects had gestational diabetes or a history of metabolic disease. Each group included two women with gestational ages earlier than 32 weeks at the time of sampling. All women carried a single fetus.

The experimental procedures were approved by the Institutional Review Board, and signed informed consent was obtained from each woman.

### 2.2. Measurements

Blood samples were collected from women with preeclampsia soon after the manifestation of the disease and before commencing any medication. Blood samples were obtained after an overnight fast. Serum was separated by centrifugation and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  before use. Concentrations of total, HMW, MMW and LMW adiponectin in serum were measured using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay kit (Daiichi Pure Chemicals, Tokyo, Japan), according to the manufacturer's protocol. The minimum detectable level was 75 pg/ml. The intra- and inter assay coefficient of variations were both less than 10%.

### 2.3. Statistical analyses

Maternal ages, gestational ages at the time of sampling, parity, BMI before pregnancy and BMI at test between preeclamptic and control women were compared using Student's *t*-test. Serum adiponectin levels were compared using Mann–Whitney *U*-test.  $P < 0.05$  was considered to be statistically significant.

## 3. Results

As shown in Table 1, maternal age, gestational age, parity, BMI before pregnancy and BMI at test were substantially equal between the control and preeclamptic women.

As depicted in Fig. 1, serum concentrations of total adiponectin appeared to be higher in preeclamptic than control women, although this difference was not statistically significant ( $P=0.13$ ). Notably, concentrations of HMW adiponectin were significantly higher in preeclamptic women than in the control women ( $P=0.04$ ). Concentrations of both MMW and LMW adiponectin were comparable between preeclamptic and control women ( $P=0.26$  and  $0.65$ , respectively).

Table 1  
Characteristics of study subjects

	Control (n = 14)	Preeclampsia (n = 14)	Statistical significance
Maternal age (years)	32.7 ± 3.0	33.0 ± 2.9	NS
Gestational age (weeks)	35.0 ± 4.0	35.2 ± 3.7	NS
Parity (number)	0.21 ± 0.43	0.21 ± 0.43	NS
BMI before pregnancy (kg/m <sup>2</sup> )	20.9 ± 1.6	20.6 ± 3.8	NS
BMI at test (kg/m <sup>2</sup> )	24.1 ± 2.0	24.3 ± 4.3	NS
Systolic blood pressure (mmHg)	92.4 ± 10.8	158.5 ± 26.1	P < 0.0001
Diastolic blood pressure (mmHg)	52.4 ± 10.0	93.5 ± 14.0	P < 0.0001

Values are mean ± S.D. NS: not significant, P > 0.05.

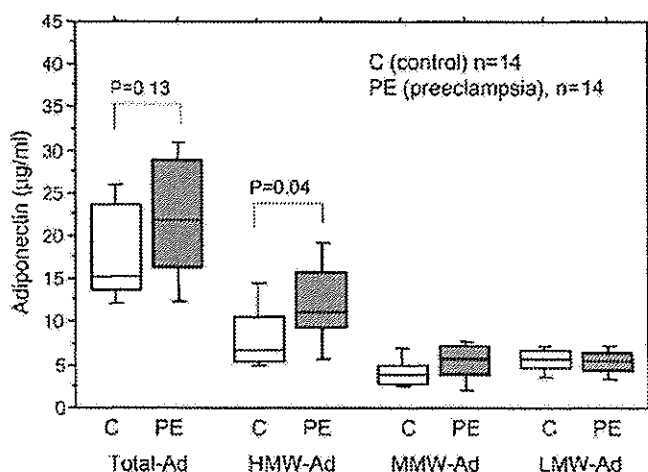


Fig. 1. Serum concentrations of total, HMW, MMW and LMW adiponectin in control (n = 14) and preeclamptic (n = 14) women. Boxes represent the distance between the first (25%) and third (75%) quartiles, and horizontal lines in the boxes represent medians. The whiskers represent the 10th percentile at the lower limit and the 90th percentile at the upper limit.

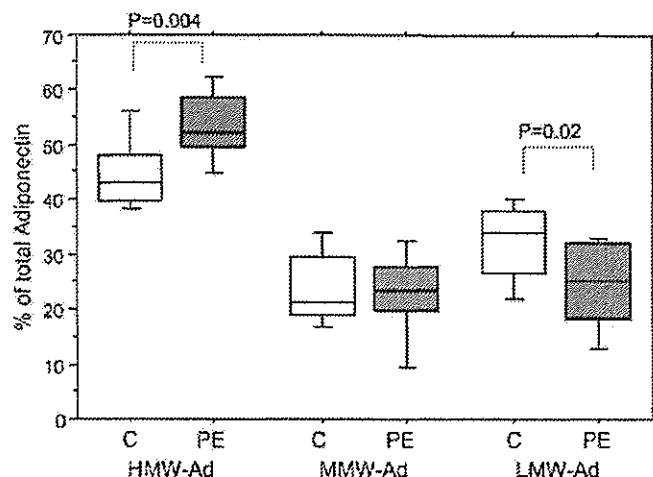


Fig. 2. The concentrations ratios of HMW, MMW and LMW adiponectin to total adiponectin in control (n = 14) and preeclamptic (n = 14) women. Boxes represent the distance between the first (25%) and third (75%) quartiles, and horizontal lines in the boxes represent medians. The whiskers represent the 10th percentile at the lower limit and the 90th percentile at the upper limit.

Fig. 2 illustrates the concentration ratio of each isoform to total adiponectin. The ratio of HMW adiponectin is markedly higher in preeclamptic than control women ( $P=0.004$ ). The ratio of MMW adiponectin is comparable between the groups ( $P=0.75$ ), and the ratio of LMW adiponectin is lower in preeclamptic than in the control women ( $P=0.02$ ).

#### 4. Discussion

A significant increase of HMW adiponectin concentration was observed in the serum of women with preeclampsia in the present study. Similarly, the ratio of HMW to total adiponectin was increased. Given that the only HMW form has vascular-protective features (Kobayashi et al., 2004), our findings, like previous findings that used a total adiponectin assay, seem paradoxical to the assumption that adiponectin causes preeclampsia.

The increase of serum adiponectin concentrations in women with preeclampsia is speculated to be a defensive reaction of the body. Vascular-protective effects of adiponectin may alleviate endothelial damage and dysfunction induced by preeclampsia. Women with preeclampsia are characterized by insulin-resistance (Kaaja et al., 1999; Solomon and Seely, 2001; Wolf et al., 2002) and chronic systemic inflammatory responses (Redman et al., 1999). As adiponectin has also anti-diabetic and anti-inflammatory features, the increase in serum adiponectin concentrations in preeclamptic women seems feasible to compensate for these detrimental conditions associated with preeclampsia.

The mechanism of the increase in serum adiponectin in preeclamptic women is unknown. The main source of circulating adiponectin has been claimed to be fat tissue; however, a recent study has shown that mean adiponectin mRNA levels are similar in abdominal subcutaneous adipose tissue in preeclamptic and control women (Haugen et al., 2006). Whether the placenta produces adiponectin or not is controversial at this time (Caminos et al., 2005; Corbetta et al., 2005). It is unlikely that the increase of HMW adiponectin in preeclamptic women was due to renal failure since serum creatinine levels were within the normal range ( $0.67 \pm 0.16$  g/dl, mean  $\pm$  S.D.).

In contrast to elevated adiponectin concentrations in women with preeclampsia, first trimester hypoadiponectinemia is reported to increase subsequent risk of hypertensive disorders during pregnancy (D'Anna et al., 2005). Although the finding appears contradictory, it is understandable that women with hypoadiponectinemia in early pregnancy are more vulnerable to vascular and metabolic stress of ongoing pregnancy and are predisposed to develop preeclampsia. Nevertheless, as shown

in another study, adiponectin levels were comparable after delivery in preeclamptic compared to normotensive pregnancy (Kajantie et al., 2005). This suggests that elevated adiponectin is related to the pathophysiology of preeclampsia rather than an inherent property in women with a history of preeclampsia.

Multiple lines of evidence indicate that levels of different molecular weight forms of adiponectin in circulation are distinctively regulated. Body weight inversely correlated with HMW and positively with LMW (Bobbert et al., 2005), while weight reduction increases HMW but not LMW (Bobbert et al., 2005; Kobayashi et al., 2004). HMW concentrations are correlated also with insulin sensitivity (Lara-Castro et al., 2006), and are significantly reduced in response to a systemic increase of insulin (Pajvani et al., 2003). Interestingly, female mice display significantly higher concentrations of HMW in serum than males (Pajvani et al., 2003), and testosterone selectively reduces HMW by inhibiting its secretion from adipocytes (Xu et al., 2005). However, in view of increased androgen levels in preeclampsia (Troisi et al., 2003), androgen does not seem to be a main regulator to increase serum HMW adiponectin concentrations in preeclampsia.

To date, most studies that have examined various activities of adiponectin with regard to different molecular weight forms suggest that mainly the HMW form has significant biological roles. The anti-apoptotic effect toward human umbilical vein endothelial cells was observed only with the HMW form (Kobayashi et al., 2004). The HMW form, but not the LMW form, is inhibitory for prostate cancer cell growth (Bub et al., 2006). The HMW and MMW forms, but not the LMW, bind to T-cadherin expressed in endothelial and smooth muscle cells (Hug et al., 2004). Together with these findings, our observation implies that the HMW form plays some specific role in women with preeclampsia.

Consistent with the notion that the main activities of adiponectin are attributable to the HMW form, several studies advocate the importance of the HMW form as a percentage of total adiponectin (percentage of HMW adiponectin [SA] index) in relation to pathophysiology of diseases. The SA index was a better determinant of glucose intolerance than measurements of total adiponectin (Fisher et al., 2005; Pajvani et al., 2004). The SA index was significantly lower in patients with coronary artery disease than control subjects (Kobayashi et al., 2004). Similarly, the SA index was remarkably higher in women with preeclampsia than the control in our study, supporting the significance of the index.

The present study has limitations due to the small sample size. No significant correlation of serum HMW

adiponectin concentrations was detected with either BMI or blood pressure in the present study, perhaps due to the sample size. In addition, changes of serum HMW adiponectin concentration over time remain to be elucidated, considering that serum total adiponectin concentrations decrease after delivery (Kajantie et al., 2005). Therefore, a further study with a larger sample size is required to investigate more precisely the implication of adiponectin in preeclampsia.

In summary, this study has demonstrated that serum concentrations of the HMW form of adiponectin are significantly increased in women with preeclampsia, whereas the MMW and LMW forms are comparable. Given the vascular-protective activities of the HMW form, the increase observed in preeclamptic women might be a physiological feedback response to minimize endothelial damage.

### Acknowledgements

The authors thank Drs. Masao Nakabayashi, Mitsuhiro Sugimoto and Satoko and Ryouichi Yoshida for their precious help in patient evaluation and in providing serum samples. The authors thank Dr. Shizuko Imai for editing the manuscript.

### References

- Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Maeda, K., Kuriyama, H., Okamoto, Y., Kumada, M., Hotta, K., Nishida, M., Takahashi, M., Nakamura, T., Shimomura, I., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., 2002. Adipocyte-derived plasma protein adiponectin acts as a platelet-derived growth factor-BB-binding protein and regulates growth factor-induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell. *Circulation* 105, 2893–2898.
- Bobbert, T., Rochlitz, H., Wegewitz, U., Akpulat, S., Mai, K., Weickert, M.O., Mohlig, M., Pfeiffer, A.F., Spranger, J., 2005. Changes of adiponectin oligomer composition by moderate weight reduction. *Diabetes* 54, 2712–2719.
- Brakenhielm, E., Veltonmaki, N., Cao, R., Kihara, S., Matsuzawa, Y., Zhiotovskiy, B., Funahashi, T., Cao, Y., 2004. Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 2476–2481.
- Bub, J.D., Miyazaki, T., Iwamoto, Y., 2006. Adiponectin as a growth inhibitor in prostate cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340, 1158–1166.
- Caminos, J.E., Nogueiras, R., Gallego, R., Bravo, S., Tovar, S., Garcia-Caballero, T., Casanueva, F.F., Dieguez, C., 2005. Expression and regulation of adiponectin and receptor in human and rat placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 4276–4286.
- Corhetta, S., Bulfamante, G., Cortelazzi, D., Barresi, V., Cetin, I., Mantovani, G., Bondioni, S., Beck-Peccoz, P., Spada, A., 2005. Adiponectin expression in human fetal tissues during mid- and late gestation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 2397–2402.
- D'Anna, R., Baviera, G., Corrado, F., Giordano, D., Di Benedetto, A., Jasonni, V.M., 2005. Plasma adiponectin concentration in early pregnancy and subsequent risk of hypertensive disorders. *Obstet. Gynecol.* 106, 340–344.
- Fisher, F.F., Trujillo, M.E., Hanif, W., Barnett, A.H., McTernan, P.G., Scherer, P.E., Kumar, S., 2005. Serum high molecular weight complex of adiponectin correlates better with glucose tolerance than total serum adiponectin in Indo-Asian males. *Diabetologia* 48, 1084–1087.
- Goldstein, B.J., Scalia, R., 2004. Adiponectin: a novel adipokine linking adipocytes and vascular function. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 2563–2568.
- Haugen, F., Ranheim, T., Harsem, N.K., Lips, E., Staff, A.C., Drevon, C.A., 2006. Increased plasma levels of adipokines in preeclampsia: relationship to placenta and adipose tissue gene expression. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 290, E326–E333.
- Hug, C., Wang, J., Ahmad, N.S., Bogan, J.S., Tsao, T.S., Ledish, H.F., 2004. T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 10308–10313.
- Iwashima, Y., Katsuya, T., Ishikawa, K., Ouchi, N., Ohishi, M., Sugimoto, K., Fu, Y., Motone, M., Yamamoto, K., Matsuo, A., Ohashi, K., Kihara, S., Funahashi, T., Rakugi, H., Matsuzawa, Y., Ogihara, T., 2004. Hypoadiponectinemia is an independent risk factor for hypertension. *Hypertension* 43, 1318–1323.
- Kaaja, R., Laivuori, H., Laakso, M., Tikkanen, M.J., Ylikorkala, O., 1999. Evidence of a state of increased insulin resistance in preeclampsia. *Metabolism* 48, 892–896.
- Kadowaki, T., Yamauchi, T., 2005. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr. Rev.* 26, 439–451.
- Kajantie, E., Kaaja, R., Ylikorkala, O., Andersson, S., Laivuori, H., 2005. Adiponectin concentrations in maternal serum: elevated in preeclampsia but unrelated to insulin sensitivity. *J. Soc. Gynecol. Invest.* 12, 433–439.
- Kobayashi, H., Ouchi, N., Kihara, S., Walsh, K., Kumada, M., Abe, Y., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., 2004. Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin. *Circ. Res.* 94, e27–e31.
- Koga, K., Osuga, Y., Yoshino, O., Hirota, Y., Ruimeng, X., Hirata, T., Takeda, S., Yano, T., Tsutsumi, O., Taketani, Y., 2003. Elevated serum soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 (sVEGFR-1) levels in women with preeclampsia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 2348–2351.
- Lara-Castro, C., Luo, N., Wallace, P., Klein, R.L., Garvey, W.T., 2006. Adiponectin multimeric complexes and the metabolic syndrome trait cluster. *Diabetes* 55, 249–259.
- Levine, R.J., Maynard, S.E., Qian, C., Lim, K.H., England, L.J., Yu, K.F., Schisterman, E.F., Thadhani, R., Sachs, B.P., Epstein, F.H., Sibai, B.M., Sukhatme, V.P., Karumanchi, S.A., 2004. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N. Engl. J. Med.* 350, 672–683.
- Matsubara, M., Maruoka, S., Katayose, S., 2002. Inverse relationship between plasma adiponectin and leptin concentrations in normal-weight and obese women. *Eur. J. Endocrinol.* 147, 173–180.
- Matsuda, M., Shimomura, I., Sata, M., Arita, Y., Nishida, M., Maeda, N., Kumada, M., Okamoto, Y., Nagaretani, H., Nishizawa, H., Kishida, K., Komuro, R., Ouchi, N., Kihara, S., Nagai, R., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., 2002. Role of adiponectin in preventing vascular stenosis. The missing link of adipo-vascular axis. *J. Biol. Chem.* 277, 37487–37491.
- Naruse, K., Yamasaki, M., Umekage, H., Sado, T., Sakamoto, Y., Morikawa, H., 2005. Peripheral blood concentrations of