

- and Puri, R. K. (2004). Gene expression in human embryonic stem cell lines: Unique molecular signature. *Blood* **103**, 2956-2964.
- Chen, H., Qian, K., Hu, J., Liu, D., Lu, W., Yang, Y., Wang, D., Yan, H., Zhang, S., and Zhu, Q. (2005). The derivation of two additional human embryonic stem cell lines from day 3 embryos with low morphological scores. *Hum. Reprod.* **20**, 2201-2206.
- Cheng, L., Hammond, H., Ye, Z., Zhan, X., and Dravid, G. (2003). Human adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells in culture. *Stem Cells* **21**, 131-142.
- Cowan, C. A., Klimanskaya, I., McMahon, J., Atienza, J., Witmyer, J., Zucker, J. P., Wang, S., Morton, C. C., McMahon, A. P., Powers, D., and Melton, D. A. (2004). Derivation of embryonic stem cell lines from human blastocysts. *N. Engl. J. Med.* **350**, 1353-1356.
- Dvash, T., and Benvenisty, N. (2004). Human embryonic stem cells as a model for early human development. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **18**, 929-940.
- Evans, M. J., and Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154-156.
- Gardner, D. K., Vella, P., Lane, M., Wagley, L., Schlenker, T., and Schookraft, W. B. (1998). Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil. Steril.* **69**, 84-88.
- Genbacev, O., Krtolica, A., Zdravkovic, T., Brunette, E., Powell, S., Nath, A., Caceres, E., McMaster, M., McDonagh, S., Li, Y., Mandalam, R., Lebkowski, J., and Fisher, S. J. (2005). Serum-free derivation of human embryonic stem cell lines on human placental fibroblast feeders. *Fertil. Steril.* **83**, 1517-1529.
- Gorba, T., and Allsopp, T. E. (2003). Pharmacological potential of embryonic stem cells. *Pharm. Res.* **47**, 269-278.
- Heins, N., Englund, M. C. O., Sjöblom, C., Dahl, U., Tonning, A., Bergh, C., Lindahl, A., Hanson, C., and Semb, H. (2004). Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* **22**, 367-376.
- Hong-mei, P., and Gui-an, C. (2006). Serum-free medium cultivation to improve efficacy in establishment of human embryonic stem cell lines. *Hum. Reprod.* **21**, 217-222.
- Hovatta, O., Mikkola, M., Gertow, K., Strömberg, A., Inzunza, J., Hreinsson, J., Rozell, B., Andläng, M., and Åhrlund-Richter, L. (2003). A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. *Hum. Reprod.* **18**, 1404-1409.
- Inzunza, J., Gertow, K., Strömberg, A., Matilainen, E., Blennow, E., Skottman, H., Wolbank, S., Åhrlund-Richter, L., and Hovatta, O. (2005). Derivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells. *Stem Cells* **23**, 544-549.
- Keller, G. (2005). Embryonic stem cell differentiation: Emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev.* **19**, 1129-1155.
- Kim, S. J., Lee, J. E., Park, J. H., Lee, J. B., Kim, J. M., Yoon, B. S., Song, J. M., Roh, S. I., Kim, C. G., and Yoon, H. S. (2005). Efficient derivation of new human embryonic stem cell lines. *Mol. Cells* **19**, 46-53.
- Klimanskaya, I., and McMahon, J. (2004). Approaches for derivation and maintenance of human ES cells: Detailed procedures and alternatives. In "Handbook of Stem Cells" (R. Lanza, J. Gearhart, B. Hogan *et al.*, eds.), Vol. 1. pp. 437-449. Elsevier/Academic Press, San Diego.
- Klimanskaya, I., Chung, Y., Meisner, L., Johnson, J., West, M. D., and Lanza, R. (2005). Human embryonic stem cell derived without feeder cells. *Lancet* **365**, 1636-1641.
- Lee, J. B., Lee, J. E., Park, J. H., Kim, S. J., Kim, M. K., Roh, S. I., and Yoon, H. S. (2005). Establishment and maintenance of human embryonic stem cell lines on human feeder

- cells derived from uterine endometrium under serum-free condition. *Biol. Reprod.* **72**, 42-49.
- Lee, J. B., Song, J. M., Lee, J. E., Park, J. H., Kim, S. J., Kang, S. M., Kwon, J. N., Kim, M. K., Roh, S. I., and Yoon, H. S. (2004). Available human feeder cells for the maintenance of human embryonic stem cells. *Reproduction* **128**, 727-735.
- Ludwig, T. E., Levenstein, M. E., Jones, J. M., Berggren, W. T., Mitchen, E. R., Frane, J. L., Grandall, L. J., Daigh, C. A., Conard, K. R., Piekarczyk, M. S., Llanas, R. A., and Thomson, J. A. (2006). Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nature Biotechnol.* Advanced published Jan. 1.
- Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 7634-7638.
- Martin, M. J., Muotri, A., Gage, F., and Varki, A. (2005). Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nature Med.* **11**, 228-232.
- Mateizel, L., De Temmerman, N., Ullmann, U., Cauffman, G., Sermon, K., Van de Velde, H., De Rycke, M., Degreef, E., Devroey, P., Liebaers, I., and Van Steirteghem, A. (2006). Derivation of human embryonic stem cell lines from embryos obtained after IVF and after PGD for monogenic disorders. *Hum. Reprod.* **21**, 503-511.
- Mitalipova, M., Calhoun, J., Shin, S., Wninger, D., Schulz, T., Noggle, S., Venable, A., Lyons, I., Robins, A., and Stice, S. (2003). Human embryonic stem cell lines derived from discarded embryos. *Stem Cells* **21**, 521-526.
- Oh, S. K., Kim, H. S., Ahn, H. J., Seol, H. W., Kim, Y. Y., Park, Y. B., Yoon, C. J., Kim, D. W., Kim, S. H., and Moon, S. Y. (2005). Derivation and characterization of new human embryonic stem cell lines: SNUhES1, SNUhES2, and SNUhES3. *Stem Cells* **23**, 211-219.
- Park, J. H., Kim, S. J., Oh, E. J., Moon, S. Y., Roh, S. I., Kim, C. G., and Yoon, H. S. (2003). Establishment and maintenance of human embryonic stem cells on STO, a permanently growing cell line. *Biol. Reprod.* **69**, 2007-2014.
- Park, S., Lee, Y. J., Lee, K. S., Shin, H. A., Cho, H. Y., Chung, K. S., Kim, E. Y., and Lim, J. H. (2004). Establishment of human embryonic stem cell lines from frozen-thawed blastocysts using STO cell feeder layers. *Hum. Reprod.* **19**, 676-684.
- Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C. Y., Trounson, A., and Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: Somatic differentiation *in vitro*. *Nature Biotechnol.* **18**, 399-404.
- Richards, M., Fong, C. Y., Chan, W. K., Wong, P. C., and Bongso, A. (2002). Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nature Biotechnol.* **20**, 933-936.
- Rosler, E. S., Fisk, G. J., Arcs, X., Irving, J., Miura, T., Rao, M. S., and Carpenter, M. K. (2004). Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Dev. Dyn.* **229**, 259-274.
- Simon, C., Escobedo, C., Valbuena, D., Genbacev, O., Galan, A., Krtořica, A., Asensi, A., Sanchez, E., Esplugues, J., Fisher, S., and Pellicer, A. (2005). First derivation in Spain of human embryonic stem cell lines: Use of long-term cryopreserved embryos and animal-free conditions. *Fertil. Steril.* **83**, 246-249.
- Smith, A. G. (2001). Embryo-derived stem cells: Of mice and men. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**, 435-462.
- Solter, D., and Knowles, B. B. (1975). Immunosurgery of mouse blastocyst. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 5099-5102.
- Stojkovic, M., Lako, M., Stojkovic, P., Stewart, R., Przyborski, S., Armstrong, L., Evans, J., Herbert, M., Hyslop, L., Ahmad, S., Murdoch, A., and Strachan, T. (2004). Derivation of

- human embryonic stem cells from day-8 blastocysts recovered after three-step *in vitro* culture. *Stem Cells* **22**, 790-797.
- Stojkovic, P., Lako, M., Stewart, R., Przyborski, S., Armstrong, L., Evans, J., Murdoch, A., Strachan, T., and Stojkovic, M. (2005). An autogenic feeder cell system that efficiently supports growth of undifferentiated human embryonic stem cell. *Stem Cells* **23**, 306-314.
- Sun, B. W., Yang, A. C., Feng, Y., Sun, Y. J., Zhu, Y. F., Zhang, Y., Jiang, H., Li, C. L., Gao, F. R., Zhang, Z. H., Wang, W. C., Kong, X. Y., Jin, G., Fu, S. J., and Jin, Y. (2006). Temporal and parental-specific expression of imprinted genes in a newly derived Chinese human embryonic stem cell line and embryoid bodies. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 65-75.
- Suss-Toby, E., Gerecht-Nir, S., Amit, M., Manor, D., and Itskovitz-Eldor, J. (2004). Derivation of a diploid human embryonic stem cell line from a mononuclear zygote. *Hum. Reprod.* **19**, 670-675.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145-1147.
- Wobus, A. M., and Boheler, K. R. (2005). Embryonic stem cells: Prospects for development biology and cell therapy. *Physiol. Rev.* **85**, 635-678.
- Yoo, S. J., Yoon, B. S., Kim, J. M., Song, J. M., Roh, S. I., You, S., and Yoon, H. S. (2005). Efficient culture system for human embryonic stem cells using autologous human embryonic stem cell-derived feeder cells. *Exp. Mol. Med.* **37**, 399-407.

## Possible Involvement of CD81 in Acrosome Reaction of Sperm in Mice

MAYA TANIGAWA,<sup>1,2</sup> KIYOKO MIYAMOTO,<sup>1</sup> SATOSHI KOBAYASHI,<sup>3</sup> MASAHIRO SATO,<sup>4</sup> HIDENORI AKUTSU,<sup>1</sup> MASARU OKABE,<sup>2,5</sup> EISUKE MEKADA,<sup>3</sup> KEIICHI SAKAKIBARA,<sup>1</sup> MAMI MIYADO,<sup>1</sup> AKIHIRO UMEZAWA,<sup>1</sup> AND KENJI MIYADO<sup>1,6,7\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Reproductive Biology and Pathology, National Center for Child Health and Development, Tokyo, Japan

<sup>2</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Osaka, Japan

<sup>3</sup>Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka, Japan

<sup>4</sup>Frontier Science Research Center, Kagoshima University, Kagoshima, Japan

<sup>5</sup>Genome Information Research Center, Osaka University, Osaka, Japan

<sup>6</sup>PRESTO, Japan Science and Technology Agency, Saitama, Japan

<sup>7</sup>School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

**ABSTRACT** Tetraspanin CD81 is closely homologous in amino acid sequence with CD9. CD9 is well known to be involved in sperm–egg fusion, and CD81 has also been reported to be involved in membrane fusion events. However, the function of CD81 as well as that of CD9 in membrane fusion remains unclear. Here, we report that disruption of the mouse CD81 gene led to a reduction in the fecundity of female mice, and CD81<sup>-/-</sup> eggs had impaired ability to fuse with sperm. Furthermore, we demonstrated that when CD81<sup>-/-</sup> eggs were incubated with sperm, some of the sperm that penetrated into the perivitelline space of CD81<sup>-/-</sup> eggs had not yet undergone the acrosome reaction, indicating that the impaired fusibility of CD81<sup>-/-</sup> eggs may be in part caused by failure of the acrosome reaction of sperm. In addition, we showed that CD81 was highly expressed in granulosa cells, somatic cells that surround oocytes. Our observations suggest that there is an interaction between sperm and CD81 on somatic cells surrounding eggs before the direct interaction of sperm and eggs. Our results may provide new clues for clarifying the cellular mechanism of the acrosome reaction, which is required for sperm–egg fusion. *Mol. Reprod. Dev.* © 2007 Wiley-Liss, Inc.

**Key Words:** CD9; acrosome reaction; fertilization; mice; zona pellucida

### INTRODUCTION

Fertilization is accomplished by the direct interaction of sperm and eggs, a process mediated primarily by predicted, but yet unidentified gamete membrane proteins. In fertilization, the acrosome reaction is a change in sperm that is required for penetration into the zona pellucida, the egg coat, and facilitates the subsequent fusion with the egg plasma membrane (Moreno and Alvarado, 2006). Zona pellucida protein 3 (ZP3), one of the components forming the meshwork of the zona pellucida, has been considered to be the prime

physiological inducer of the acrosome reaction in sperm, although the frequency of acrosome reaction is low after incubation with recombinant ZP3 (Beebe et al., 1992). This discrepancy suggests that, besides ZP3, unknown major factor(s) might be responsible for the acrosome reaction. To date, despite the importance of the acrosome reaction in fertilization, the underlying cellular mechanisms that regulate the acrosome reaction remain unclear.

Two tetraspanins, CD9 and CD81, are known to be important in the membrane fusion events in various biological systems. In virus–host cell fusion, human CD81 has been identified as a co-receptor for hepatitis C virus (Higginbottom et al., 2000; Cormier et al., 2004). Both CD9 and CD81 have been implicated in myoblast fusion (Tachibana and Hemler, 1999; Schwander et al., 2003) and monocyte/macrophage fusion in mice (Takeda et al., 2003). Recent studies using gene-targeting techniques demonstrated that female mice carrying a deletion of the CD9 gene produce eggs that mature normally but are defective in sperm–egg fusion (Kaji et al., 2000; Le Naour et al., 2000; Miyado et al., 2000; Takahashi et al., 2001). CD81 has also been reported to be expressed on the plasma membrane of unfertilized mouse eggs (Takahashi et al., 2001). Furthermore, CD81<sup>-/-</sup> mice have been reported to have defects in reproduction after several generations of backcrossing (Deng et al., 2000).

Grant sponsor: Precursory Research for Embryonic Science and Technology (PRESTO); Grant sponsor: The Ministry of Health, Labour and Welfare; Grant sponsor: The Ministry of Education, Culture, Sports, and Technology, of Japan.

\*Correspondence to: Kenji Miyado, National Center for Child Health and Development, 2-10-1 Okura, Setagaya, Tokyo 157-8535, Japan. E-mail: kmiyado@nch.go.jp

Received 31 October 2006; Accepted 8 December 2006

Published online in Wiley InterScience

(www.interscience.wiley.com).

DOI 10.1002/mrd.20709

Recently, Rubinstein et al. (2006) provided more detailed data showing that eggs of CD81<sup>-/-</sup> mice are unable to be fertilized with sperm, although the degree of the defect appeared not to be severe compared with that of CD9<sup>-/-</sup> eggs. Moreover, injection of CD9<sup>-/-</sup> eggs with mouse CD81 mRNA revealed that mouse CD81 was only moderately effective at reversing the infertility of CD9<sup>-/-</sup> eggs (Kaji et al., 2002). These findings taken together indicate that CD81 and CD9 each have different roles in fertilization.

Here we studied the role of CD81 in fertilization by *in vitro* fertilization (IVF) and immunohistochemical analysis, and propose a possible role of CD81 in the acrosome reaction in sperm.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

CD81<sup>-/-</sup> mice (Miyazaki et al., 1997) were kindly provided by Dr. Miyazaki and were backcrossed to C57BL/6 mice. Genotyping was carried out using polymerase chain reaction as previously described (Miyazaki et al., 1997). To visualize acrosome-intact sperm, EGFP-transgenic mice expressing EGFP in the acrosomes were generated by pronuclear injection of constructs carrying the EGFP gene driven by the mouse acrosin promoter (Nakanishi et al., 1999) and the DsRed2 gene tagged with a mitochondrial transport signal and driven by the CAG promoter into fertilized eggs of BDF1 mice (unpublished information). After the sperm were acrosome-reacted, EGFP was lost from the sperm heads and DsRed remained in the mitochondria of the mid-piece region. All animal procedures were performed according to protocols approved by the National Center for Child Health and Development and use committees.

### Egg Collection

Female mice (aged 8–15 weeks) were injected with 5 U of hCG (Gonotropin; Aska Pharmaceutical Co., Ltd, Tokyo, Japan) 48 hr after administration of 5 U of PMSG (Serotropin; Aska Pharmaceutical Co., Ltd). Ovulated eggs were collected from the oviductal ampulla 13.5–15 hr after hCG injection, and placed in 100- $\mu$ l drops of TYH medium equilibrated with 5% CO<sub>2</sub> in air at 37°C. Cumulus cells were removed with 300 IU/ml of hyaluronidase (H-3506, Sigma-Aldrich, Missouri, MO), and eggs were incubated with a defined number of sperm.

### Sperm Preparation and *In Vitro* Fertilization

Sperm were collected by squeezing two cauda epididymides of 8- to 10-week-old B6C3F1 or transgenic male mice in a well containing 100- $\mu$ l of TYH medium. Sperm were incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for 90 min before being mixed with eggs derived from wild-type or CD81<sup>-/-</sup> female mice. The final concentration of sperm added to an egg-containing drop was  $1.5 \times 10^6$  sperm/ml. To examine the rate of fertilization, we counted the number of eggs at the two-cell stage 24 hr after incubation with the sperm. For counting the number of

fused sperm, the zona pellucida was removed from the eggs by a brief incubation in acid Tyrode solution, and sperm were incubated with eggs preloaded with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for counting the number of sperm fused with eggs (Yamagata et al., 2002). For counting the number of acrosome-intact sperm, EGFP-expressing sperm were incubated with zona-intact CD81<sup>+/+</sup> or CD81<sup>-/-</sup> eggs. The eggs were all subjected to confocal microscopic analysis for the presence of sperm exhibiting red and green fluorescence or red fluorescence alone within the perivitelline space 4 hr after incubation.

### Immunostaining

For immunostaining of cryostat sections, ovaries from 8- to 10-week-old wild-type C57BL/6 females were fixed in 2% paraformaldehyde in PBS (-) for 2 days at 4°C, and then immersed in 30% sucrose in PBS (-) for more than 2 days at 4°C, embedded in Tissue-Tek OCT compound (Sakura Finetek Co., Tokyo, Japan), and finally frozen before serial cryostat sectioning (8  $\mu$ m in thickness). Slides were fixed in an acetone and incubated with anti-CD81 antibody (Eat-1) diluted 1:300 in PBS (-) containing 0.1% bovine serum albumin (BSA), BSA/PBS (-), or anti-ZP3 antibody diluted 1:300 in BSA/PBS (-), overnight at 4°C. After washing three times with BSA/PBS (-), the samples were incubated with Alexa 546-conjugated goat anti-hamster IgG (A-21111, Invitrogen, California, CA) or Alexa 488-conjugated goat anti-rat IgG (A-11006, Invitrogen) for 2 hr at room temperature. After extensive washing, the slides were inspected for fluorescence using LSM 510 META confocal microscope.

### Immunoblotting

Samples containing equal amounts of eggs were dissolved in nonreducing sample buffer and subjected to 12% SDS-PAGE according to procedures described previously (Miyado et al., 2000). After electrophoresis, the gels were transferred to PVDF membranes for immunoblot analysis. The blots were blocked in 1% nonfat dry milk, and were probed with the primary antibodies, anti-mouse CD81 antibody (Eat-1, BD Biosciences, California, CA) or anti-mouse CD9 antibody (KMC8, BD Biosciences). After washing in TBS-Tween buffer, the membranes were incubated with HRP-labeled secondary antibodies; goat anti-rat antibody or goat anti-hamster antibody. The expression level of immunoreacted products was determined by treatment of the blots with an ECL or ECL Plus Detection Kit (GE Healthcare Bio-Science Co., New Jersey, UK) and exposure to X-ray film at room temperature.

### Statistical Analysis

Data from different groups were tested by the *t*-test for the significance of the difference between the means of two independent samples using the computer software KaleidaGraph (version 3.6, Synergy Software, Inc., Pennsylvania, PA).

## RESULTS

## Female Fertility Impaired by CD81 Deficiency

Figure 1A depicts the average litter size in matings of three genotypes of females, wild-type, CD81<sup>+/-</sup> and CD81<sup>-/-</sup> mice, with CD81<sup>+/-</sup> males over a period of 6 months. Although these females displayed normal mating behavior with the males (data not shown), the average litter size of CD81<sup>-/-</sup> females was markedly reduced relative to those of CD81<sup>+/-</sup> and wild-type mice (on average,  $1.3 \pm 2.5$  vs.  $11.3 \pm 1.3$  and  $11.0 \pm 0.8$ ) (Fig. 1A). To examine the oocyte maturation and ovulation, we also collected the eggs from mice superovulated by stimulation with exogenous gonadotropin. The eggs collected from CD81<sup>-/-</sup> mice were indistinguishable with regard to morphology and number (on average,  $18.0 \pm 2.8$ ) from those wild-type and CD81<sup>+/-</sup> mice (on average,  $19.9 \pm 1.7$  and  $21.7 \pm 2.8$ ) (Fig. 1B). Therefore, the reduction in fertility of CD81<sup>-/-</sup> females did not seem to be due to defects of ovulation or oocyte maturation.

## Involvement of CD81 in Fertilization

To clarify the cause of the reduced fertility of CD81<sup>-/-</sup> females, the function of CD81<sup>-/-</sup> eggs was further examined by IVF. When cumulus oocyte complexes (COCs) collected from CD81<sup>-/-</sup> or wild-type control mice were incubated with the wild-type sperm,

the sperm could disperse cumulus cells, somatic cells surrounding eggs, and reach and apparently penetrate the zona pellucida of CD81<sup>-/-</sup> and wild-type eggs. However, the average rate of eggs developing to the two-cell stage was substantially decreased for CD81<sup>-/-</sup> eggs (on average,  $15.0 \pm 2.5\%$ ) compared with that for wild-type eggs (on average,  $65.0 \pm 10.8\%$ ) 24 hr after incubation with the sperm (Fig. 1D). Furthermore, in CD81<sup>-/-</sup> eggs, several sperm were observed in the perivitelline space (Fig. 1C). The delayed formation of two-cell embryos and the accumulation of more than one sperm within the perivitelline space in CD81<sup>-/-</sup> eggs demonstrate that CD81<sup>-/-</sup> eggs have impaired ability of fertilization. Subsequently, to examine the cause of the impaired fertilization, we performed IVF for CD81<sup>-/-</sup> eggs and wild-type eggs after the zona pellucida was removed using acid Tyrode solution (Fig. 2A,B). To measure the number of sperm fused with eggs, both types of eggs were preloaded with DAPI before incubation with wild-type sperm (Yamagata et al., 2002). One hour after insemination, estimation of the average number of sperm fused with one egg by measurement of DAPI fluorescence revealed that CD81<sup>-/-</sup> eggs showed a decreased number of fused sperm (on average,  $1.21 \pm 0.23$ ) in comparison with the wild-type eggs (on average,  $1.95 \pm 0.27$ ). Those results suggest that CD81 is involved in sperm-egg fusion, either directly or indirectly.

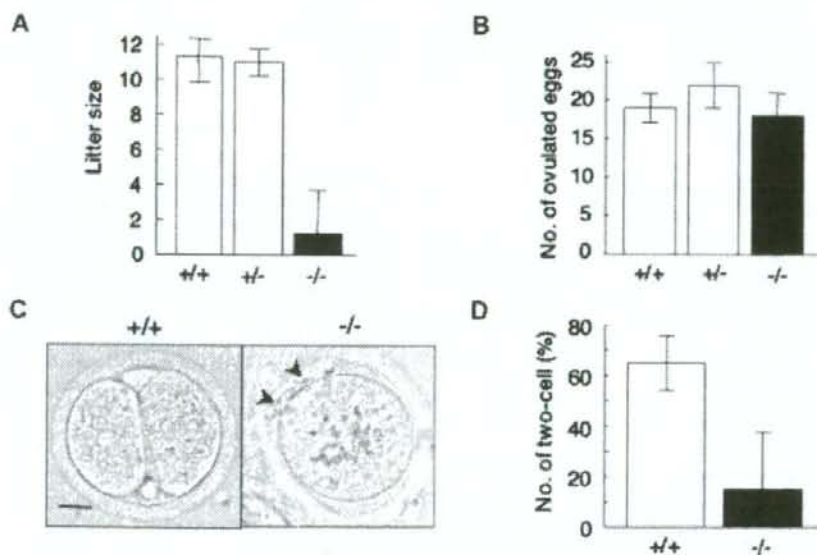


Fig. 1. Female infertility caused by CD81 deficiency. A: Average litter sizes of crosses between CD81<sup>+/-</sup> males and three types of females, wild-type, CD81<sup>+/-</sup> and CD81<sup>-/-</sup> mice. Each of the mating pairs was kept in a separate cage, and births over a 6-month period were monitored. Data of births during successive 2-month periods were grouped together, and the average litter size of wild-type, CD81<sup>+/-</sup> and CD81<sup>-/-</sup> females was calculated from data recorded for five mating pairs 8–15 weeks of age at the start of the experiment. B: Average

number of ovulated eggs from wild-type, CD81<sup>+/-</sup> and CD81<sup>-/-</sup> female mice. The eggs were collected 13.5–16 hr after hCG treatment, and counted. C: Representative micrographs of CD81<sup>+/+</sup> and CD81<sup>-/-</sup> eggs. The eggs were obtained 24 hr after incubation with the wild-type sperm. D: Average number of eggs that developed to the two-cell stage 24 hr after incubation with the wild-type sperm. The black bars show the results for CD81<sup>-/-</sup> eggs (A,B,D). Error bars represent SEM (A,B,D). Scale bar, 20  $\mu$ m (C).

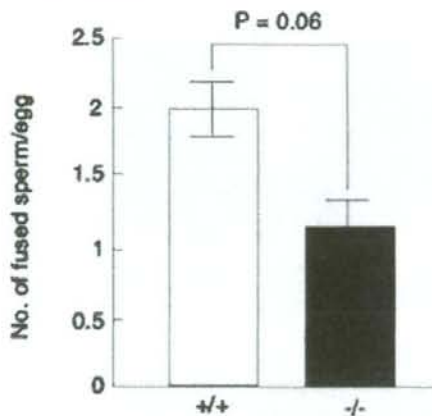


Fig. 2. In vitro sperm-egg fusion. Average number of sperm fused with wild-type or CD81<sup>-/-</sup> eggs after 3 hr of incubation. Error bars represent SEM. Data from different groups were tested by the *t*-test for the significance of the difference between the means of two independent samples ( $P = 0.06$ ).

#### Expression of CD9 in CD81<sup>-/-</sup> Eggs

The mechanisms by which CD81 acts are still unclear. However, CD81 tends to form multimolecular complexes in which tetraspanins associate with specific proteins depending on the type of cell. In B cells, CD81 directly associates with CD19, taking part in the CD19-CD21-CD81 signaling complex (Pileri et al., 1998), which accords with the evidence that the expression of CD19 in bone marrow, spleen, and peripheral B cells is reduced in CD81<sup>-/-</sup> mice (Miyazaki et al., 1997). As previously mentioned, CD9 on the egg plasma membrane is required for fusion with sperm, and the impaired fusibility of CD81<sup>-/-</sup> eggs with sperm may likely be dependent on the expression of CD9. To investigate whether CD81 deficiency may cause downregulation of CD9 expression, the expression level of CD9 was examined (Fig. 3). We collected three types of eggs,

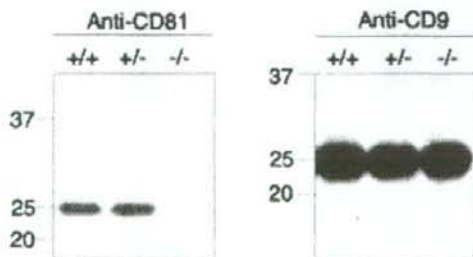


Fig. 3. The expression of CD9 in wild-type, CD81<sup>+/-</sup> and CD81<sup>-/-</sup> eggs. Proteins were isolated from the types of eggs indicated and resolved by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis under nonreducing conditions. The proteins were electrophoretically transferred to a membrane, where they were probed with antibodies to CD81 (panel A) and CD9 (panel B). The proteins corresponding to each 110 egg (panel A) and 10 eggs (panel B) were analyzed.

wild-type, CD81<sup>+/-</sup> and CD81<sup>-/-</sup> eggs, 13.5–15 hr after hCG injection into mice, and examined the expression level of CD9 in comparison with that of CD81 by SDS-PAGE. The amounts of CD81 were invariable in wild-type and CD81<sup>+/-</sup> eggs, but CD81 was lost in CD81<sup>-/-</sup> eggs. By contrast, there were no significant differences in the expression of CD9 among these eggs. Therefore, the impairment of fertilization caused by CD81 deficiency cannot be attributed to decreased expression of CD9 in eggs.

#### Expression of CD81 During Folliculogenesis

The expression and localization of CD81 in ovarian tissues were immunohistochemically assessed using cryostat sections of adult wild-type ovaries. The follicles consist of immature eggs and granulosa cells that surround the egg; a single follicle usually grows to the preovulatory stage and releases the egg for potential fertilization (Buccione et al., 1990). Immunohistochemical staining with anti-CD81 mAb demonstrated that CD81 was continuously expressed in the egg and surrounding follicles (Fig. 4), and in cumulus cells surrounding ovulated eggs (data not shown). These data indicate that the sperm may encounter CD81 on the somatic cells surrounding eggs before direct interaction of sperm and eggs.

#### Possible Involvement of CD81 in Acrosome Reaction

Based on the localization of CD81 and the impaired fertilization of CD81<sup>-/-</sup> eggs, we speculated that the inability of wild-type sperm to fuse CD81<sup>-/-</sup> eggs might be due to impairment of prefusional stages, including the acrosome reaction. To examine the involvement of CD81 in the acrosome reaction of the sperm, CD81<sup>-/-</sup> eggs or wild-type eggs were incubated with the sperm collected from transgenic mice specifically expressing enhanced green fluorescent protein (EGFP) in the acrosomes (Fig. 5). The acrosome corresponds functionally to a lysosome and thus contains lysosomal enzymes (Moreno and Alvarado, 2006), and acrosin is a sperm acrosomal serine proteinase that is lost from the sperm head after the acrosome reaction is completed (Baba et al., 1994). Therefore, sperm expressing EGFP at the acrosomes in the heads are useful for the detection of acrosome-intact sperm. After 3 hr of incubation, we counted the number of acrosome-intact sperm within the perivitelline spaces. To count the sperm that had penetrated into the zona pellucida, the eggs were incubated with  $3.0 \times 10^5$  sperm/ml. When the number of sperm within the perivitelline space were counted 3 hr after incubation with the eggs, we observed that an increased percentage ( $8.5 \pm 2.3\%$ ) of the sperm that had penetrated into the perivitelline space of CD81<sup>-/-</sup> eggs exhibited EGFP fluorescence in their head portion. In contrast, very few sperm that had penetrated into the perivitelline space of wild-type eggs exhibited green fluorescence ( $1.4 \pm 1.0\%$ ). These results suggest that the sperm that penetrated into the zona pellucida of the CD81<sup>-/-</sup> eggs were impaired in the acrosome reaction.

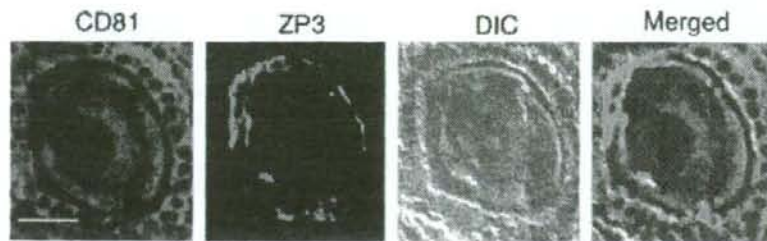


Fig. 4. CD81 is expressed at high levels in granulosa cells during oogenesis. Frozen sections of ovaries from wild-type mice were stained with anti-mouse CD81 mAb and with anti-ZP3 mAb. DIC represents a photograph taken by differential interference contrast. Scale bar, 20  $\mu$ m. [See color version online at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

## DISCUSSION

CD81 has been suggested to be a protein playing a role in membrane fusion events, but the function of CD81 in sperm-egg fusion remains unknown. As suggested by Rubinstein et al. (2006), CD9 and CD81 may have different roles in sperm-egg fusion. This notion is supported by the following facts: (1) deletion of a single gene, CD9 or CD81, causes impaired fertilization, and the expression of CD9 on eggs is not perturbed by CD81 deficiency, and (2) CD9<sup>-/-</sup> eggs injected with mRNA encoding CD81 cannot be fully rescued to the same degree as those injected with CD9 mRNA (Kaji et al., 2002).

Generally, the acrosome reaction is a change in the membrane of sperm that are activated for penetration into zona pellucida and facilitates the subsequent fusion with the egg membrane (Baba et al., 1994). During the acrosome reaction, the disruption of the acrosome covering the sperm head causes the release of acrosin and other proteolytic substances. As previously reported (Moreno and Alvarado, 2006), these materials included in the acrosome are important for the penetration of sperm into the zona pellucida and for sperm-egg fusion, but the molecular mechanism underlying the acrosome reaction is largely unknown. When wild-type eggs were incubated with sperm expressing EGFP in the acrosomes, we found the presence of acrosome-intact

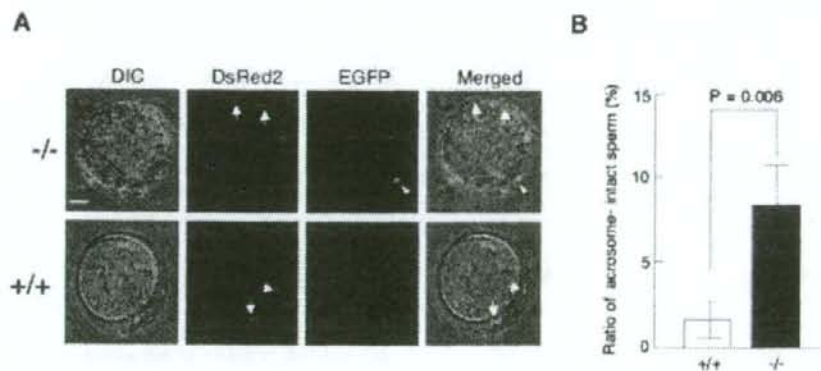


Fig. 5. In vitro fertilization assay for acrosome reaction. A: Representative photographs. CD81<sup>-/-</sup> eggs were incubated with transgenic sperm expressing EGFP at acrosomes in the sperm heads. Eggs from wild-type females were also subjected to fertilization using the AR-GFP transgenic sperm as controls. Four hours after insemination, the eggs were inspected for fluorescence using a confocal microscope. As shown in the upper panel, some CD81<sup>-/-</sup> eggs had sperm with green fluorescence (indicated by arrowheads) in their head region in the perivitelline space, while almost no wild-type eggs had such types of sperm (lower panel). Photomicrographs taken under light (DIC); photomicrographs taken for detecting DsRed2 translocated to mitochondria by the retention signal (Mt-DsRed2) and specifically expressed in the mid-piece of sperm (indicated by arrows); photomicrographs taken for detecting EGFP-derived green fluorescence specifically expressed in the head region of sperm (indicated by arrowheads);

merged images. Scale bar, 20  $\mu$ m. B: Examination of acrosome reaction using EGFP-expressing sperm. CD81<sup>-/-</sup> or wild-type eggs were fertilized in vitro with epididymal sperm expressing EGFP in the acrosomes. Four hours after insemination, the sperm entering into the perivitelline space were inspected for fluorescence using a confocal microscope. Note that the number of sperm carrying intact acrosomes (exhibiting green fluorescence in the sperm head region, as shown in A) and entering into the perivitelline space of CD81<sup>-/-</sup> eggs was significantly higher than that of acrosome-intact sperm entering into the perivitelline space of wild-type eggs. Acrosome-intact sperm can easily be detected since they exhibit bright green fluorescence in their head region. The total number of sperm entered into perivitelline space can be counted by inspection for red fluorescence in the mid-piece of the sperm. [See color version online at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]



sperm in the outer layer of the zona pellucida (data not shown), but almost all sperm that penetrated into the perivitelline space had lost the acrosome caps (Fig. 5). These findings suggest that the acrosome reaction may occur in the perivitelline space and/or inner layer of the zona pellucida.

Another possible reason for the failure of the acrosome reaction of EGFP-expressing sperm in CD81<sup>-/-</sup> eggs is that "zona hardening" in CD81<sup>-/-</sup> eggs may not be sufficient compared to that in wild-type eggs. The weakened zona hardening might permit the penetration of some acrosome-intact sperm into CD81<sup>-/-</sup> eggs. However, since proteins other than components forming the zona pellucida may be triggers for preventing polyspermy and zona hardening (Sun, 2003), it would be of interest to test whether CD81 and ZP3 interact with each other.

In conclusion, the results of our IVF experiments suggest the possible involvement of CD81 in the acrosome reaction of zona pellucida-penetrated sperm prior to the fusion of sperm with eggs. Extensive attempts to elucidate the role of CD81 in the acrosome reaction are now underway.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are thankful for Dr. Tsujimoto (Faculty of Medicine, Osaka University) for kindly providing mtDsRed2 contract for transgenic production. This work was supported by a grant from Precursory Research for Embryonic Science and Technology (PRESTO), The Ministry of Health, Labour and Welfare, and a grant-in aid for Scientific Research, The Ministry of Education, Culture, Sports, and Technology, of Japan.

#### REFERENCES

- Baba T, Azuma S, Kashiwabara S, Toyoda Y. 1994. Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. *J Biol Chem* 269: 31845-31849.
- Beebe SJ, Leyton L, Burks D, Ishikawa M, Fuerst T, Dean J, Saling P. 1992. Recombinant mouse ZP3 inhibits sperm binding and induces the acrosome reaction. *Dev Biol* 151:48-54.
- Buccione R, Schroeder AC, Eppig JJ. 1990. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol Reprod* 43:543-547.
- Cormier EG, Tsamis F, Kajumo P, Durao RJ, Gardner JP, Dragic T. 2004. CD81 is an entry receptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:7270-7274.
- Deng J, Yeung VP, Tsitoura D, DeKruyff RH, Umetsu DT, Levy S. 2000. Allergen-induced airway hyperreactivity is diminished in CD81-deficient mice. *J Immunol* 165:5054-5061.
- Higginbottom A, Quinn ER, Kuo CC, Flint M, Wilson LH, Bianchi E, Nicosia A, Monk PN, McKeating JA, Levy S. 2000. Identification of amino acid residues in CD81 critical for interaction with hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *J Virol* 74:3642-3649.
- Kaji K, Oda S, Miyazaki S, Kudo A. 2002. Infertility of CD9-deficient mouse eggs is reversed by mouse CD9, human CD9, or mouse CD81: polyadenylated mRNA injection developed for molecular analysis of sperm-egg fusion. *Dev Biol* 247:327-334.
- Kaji K, Oda S, Shikano T, Ohnuki T, Uematsu Y, Sakagami J, Tada N, Miyazaki S, Kudo A. 2000. The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice. *Nat Genet* 24:279-282.
- Le Naour F, Rubinstein E, Jasmin C, Prenant M, Boucheix C. 2000. Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science* 287:319-321.
- Miyado K, Yamada G, Yunada S, Hara H, Nakamura Y, Ryu F, Suzuki K, Kusai K, Inoue K, Ogura A, Okabe M, Mekada E. 2000. Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science* 287:321-324.
- Miyazaki T, Muller U, Campbell KS. 1997. Normal development but differentially altered proliferative responses of lymphocytes in mice lacking CD81. *EMBO J* 16:4217-4225.
- Moreno RD, Alvarado CP. 2006. The mammalian acrosome as a secretory lysosome: New and old evidence. *Mol Reprod Dev* 73:1430-1434.
- Nakanishi T, Ikawa M, Yamada S, Parvinen M, Baba T, Nishimune Y, Okabe M. 1999. Real-time observation of acrosomal dispersal from mouse sperm using GFP as a marker protein. *FEBS Lett* 449:277-283.
- Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Fahigi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S. 1998. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282:938-941.
- Rubinstein E, Ziyat A, Prenant M, Wrabel E, Wolf JP, Levy S, Le Naour F, Boucheix C. 2006. Reduced fertility of female mice lacking CD81. *Dev Biol* 290:351-358.
- Schwander M, Liu M, Stumm M, Dorchies OM, Ruegg UT, Schittny J, Muller U. 2003. Beta1 integrins regulate myoblast fusion and sarcomere assembly. *Dev Cell* 4:673-685.
- Sun QY. 2003. Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs. *Microsc Res Tech* 61:342-348.
- Tachibana I, Hemler ME. 1999. Role of transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins CD9 and CD81 in muscle cell fusion and myotube maintenance. *J Cell Biol* 146:893-904.
- Takahashi Y, Bigler D, Ito Y, White JM. 2001. Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 3 and murine eggs: Role of beta1 integrin-associated proteins CD9, CD81, and CD98. *Mol Biol Cell* 12:809-820.
- Takeda Y, Tachibana I, Miyado K, Kobayashi M, Miyazaki T, Funakoshi T, Kimura H, Yamane H, Saito Y, Goto H, Yoneda T, Yoshida M, Kumagai T, Osaki T, Hayashi S, Kawase I, Mekada E. 2003. Tetraspanins CD9 and CD81 function to prevent the fusion of mononuclear phagocytes. *J Cell Biol* 161:945-956.
- Yamagata K, Nakanishi T, Ikawa M, Yamaguchi R, Moss SB, Okabe M. 2002. Sperm from the calmodulin-deficient mouse have normal abilities for binding and fusion to the egg plasma membrane. *Dev Biol* 250:348-357.

# アメリカでのヒト胚性幹細胞事情

Human ES cells research progress in USA



阿久津英憲(写真) 梅澤明弘

Hidenori AKUTSU and Akihiro UMEZAWA

国立成育医療センター研究所生殖医療研究部

◎ヒト胚性幹細胞は無限増殖能と分化多能性というユニークな性質をもち、基礎医学研究から再生医療応用へと大きな可能性を社会へ提示している。しかし、この細胞は胚を破壊して作成するために、社会性の強い研究分野である。アメリカにおけるヒト胚性幹細胞研究の法的小および倫理的枠組みとその現状について述べてみたい。

**Key word** ヒトES細胞、アメリカ、再生医療、生命倫理

胚性幹細胞(embryonic stem cells: ES 細胞)はある特定の培養環境下で2つのユニークな性質を同時に保持している細胞である。ひとつは際限なく増殖するということ(自己増殖能)であり、もうひとつはすべての成体細胞に分化する能力(分化多能性)があるということである<sup>1)</sup>。これらの特性により、ES細胞はParkinson病や糖尿病などの変性疾患に対する細胞移植、または脊髄損傷、心筋梗塞などの組織損傷に対する組織再生に必要な細胞の無尽蔵な供給源となりうる。

アメリカでは慢性変性疾患に罹患している患者が約1億2,500万人にのぼり、その経済的支出は全医療費の80%近くを占めている。多くの人びとが有効な治療法を待ち望んでいるなか、ヒトES細胞の再生医療応用へ大きな期待が寄せられている。ある調査結果ではアメリカ国民の約60%はES細胞を用いた再生医学研究を支持している<sup>2)</sup>。1990年代後半からの5年間に、体細胞クローン動物作製<sup>3)</sup>、ヒトES細胞樹立の成功<sup>4)</sup>、そしてヒトゲノム解読(概要版)<sup>5,6)</sup>など、生命化学に関する大きな研究成果が立て続けに報告され、幹細胞研究も難治疾患治療に対する医療的関心のみならず、経済、法律、生命倫理、政治、宗教と連関して社会全体での関心が非常に高まっていった。そのな

かでアメリカでのヒトES細胞研究はどのような状況にあり、どこへ向かおうとしているのか、著者は2004~2005年にハーバード大学にてヒトES細胞研究に携わってきたので、そのときの経験も交えアメリカでのヒト胚性幹細胞研究事情を述べていきたい。

ヒトES細胞の樹立には必然的にヒト胚の破壊を伴うため、その是非には個人的・宗教的、そして文化的な信条によってさまざまな見解がある。アメリカではヒトES細胞研究が政治的駆け引きの場に持ち込まれ、実際にES細胞研究のおかれている状況や方向性は新聞の見出しからだけでは非常にわかりにくい。ヒトES細胞が樹立されたのは1998年で、まだ10年もたっていないが、その研究支援政策はその間の2回の大統領選挙を経て大きく変動している。そこで本稿では、ジョージ・W・ブッシュ大統領が就任した2001年1月を起点に述べていきたい。

## ヒトES細胞をめぐる状況——1998~2001年

それまでマーマセット、サルでES細胞樹立に成功していたアメリカ・ウィスコンシン大学のトムソン博士らが1998年にヒトES細胞の作成を報告した<sup>4)</sup>。当時ヒト胚を用いた研究には政府資金

援助が認められていなかった(The Dickey Amendment; 研究目的のためにヒト胚を作出することやヒト胚を滅失して行う研究には NIH 研究資金が認められない, 1997~2005 年有効), トムソン博士らは、バイオベンチャー企業の Geron Corp. と the Wisconsin Alumni Research Foundation の援助のもと、ヒト ES 細胞研究を行う研究室を別個に立ち上げ、NIH 研究費フリーの施設でヒト ES 細胞樹立を成功させたのである。すぐさまクリントン大統領は国家生命倫理諮問委員会に対し、ヒト ES 細胞研究に関連する課題について倫理的・医学的観点をバランスさせた綿密なレビューを下命した。国家生命倫理諮問委員会のヒト ES 細胞研究に関する倫理的側面の考察結果の答申を受けて、2000 年 8 月に国立衛生研究所(National Institutes of Health: NIH)が行政指針“National Institute of Health Guidelines for Research Using Human Pluripotent Stem Cells”によりヒト幹細胞研究に対する資金提供の容認を発表した。これは胚を滅失させるヒト ES 細胞樹立には NIH 研究資金は許可しないが、私的資金を用いて樹立されたヒト ES 細胞を使用する研究には NIH 研究資金を提供できるというものであった。つまり、研究者はヒト ES 細胞使用研究に対して NIH 研究費を獲得し、研究を進めることが可能になったわけである。ちなみに、一般的にアメリカでの研究者の研究費・人件費は約 50%が NIH の研究費より捻出されている。NIH 研究費が申請できない分野では当然、研究の進歩や後進の育成などが滞る可能性が出てくる。

クリントン大統領はヒト ES 細胞の件より以前の 1997 年に、国家生命倫理諮問委員会に対しクローニング技術の利用に関する法的・倫理的課題のレビューを諮問しており、ヒトクローニングの生殖応用を禁止する大統領令を発している。

“National Institute of Health Guidelines for Research Using Human Pluripotent Stem Cells”を受けて、NIH にはヒト ES 細胞研究の研究費申請が集まってきたが、その年の大統領選挙のキャンペーン期間中、ブッシュ大統領候補はヒト胚の破壊のうえに成り立つ ES 細胞研究に対して政府資金援助を与えない方針だと声高に訴えていた。

2000 年の大統領選挙は近年まれにみる激戦の末、共和党のブッシュ大統領が第 43 代大統領に就いたのである。

この時期、実際の研究領域では、最初のヒト ES 細胞樹立の報告以後ようやく 2 番目のヒト ES 細胞樹立が 2000 年にシンガポールとオーストラリアの共同研究グループから報告された。2001 年ごろまではヒト ES 細胞に関しては樹立・培養に関する報告が大半を占めていたが、それ以降、徐々にヒト ES 細胞に関する研究報告が活発になってきた。

### ● ヒトES細胞をめぐる状況——2001~2005年

2001 年 1 月、ブッシュ大統領が就任すると、政権の宗教的理念を背景にした生命倫理観がヒト ES 細胞研究政策に投影されてきた。4 月、NIH は予定していた第 1 回のヒト ES 細胞研究の研究費申請レビューを中止した。メディアでもヒト ES 細胞研究に関する注目が集まってきたが、科学的な関心に加え、ヒト ES 細胞を樹立する際に利用する初期胚に関して宗教観の相違からくる“ヒト生命のはじまり”論争が再燃してきた。そして僅差勝負だった大統領選挙を引きずった民主党と共和党との対立にも利用された感が出てきた。難治疾患の患者グループ、科学者、そしてバイオテクノロジー産業界はヒト ES 細胞研究を認めるように、反対に中絶反対グループやカトリック教会はヒト ES 細胞研究を認めないようにと、激しいロビー活動が起こった。その間、ヒト ES 細胞研究自体は推進すべきであるとして、ブッシュ大統領の共和党内部からもヒト ES 細胞研究を支持する大物議員も出てきた。

8 月、最終的にブッシュ大統領は全国民に向かってテレビ演説を行い(<http://www.whitehouse.gov/news/releases/2001/08/20010809-2.html>)、その時点で世界中より NIH に登録された 64 ヒト ES 細胞株を用いた研究にのみ政府資金を援助するという決定を下した。しかし、研究者にとっては不満の残る決定であった。なぜなら、実際に研究に利用可能な質をもった NIH 登録 ES 細胞は約 20%の細胞株数で、多くの研究者が利用できる数ではなかった。さらに、アメリカ国内で樹立し

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。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”の効果は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

クの設定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て、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述べている。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>。通常のコネクター料は\$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は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の役割で研究・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

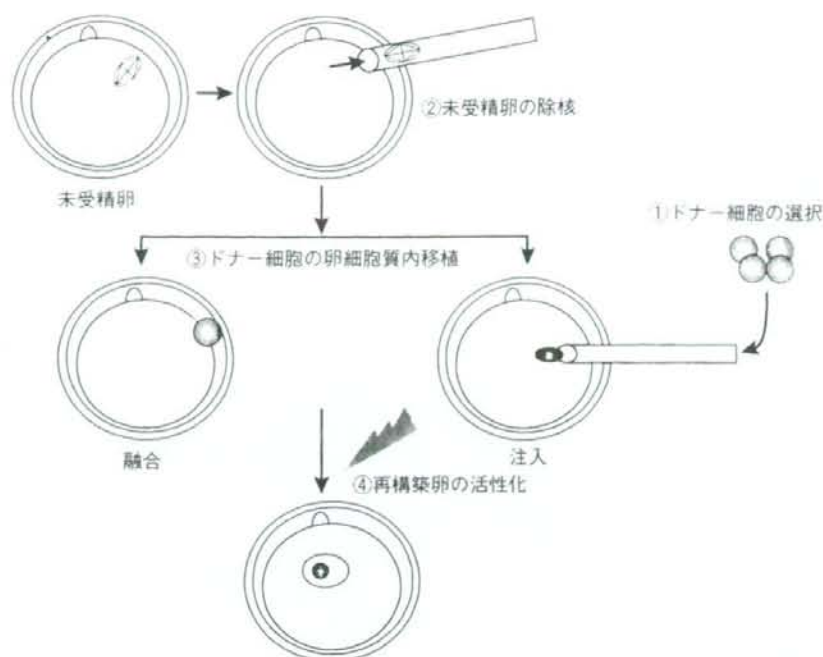


図1 体細胞核移植法

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ビ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%	
	卵丘細胞	直接注入	塩化ストロンチウム		1~3%	21, 22
	セルトリ細胞	直接注入	塩化ストロンチウム		6%	23
	NKT細胞	直接注入	塩化ストロンチウム		1~2%	24
マウス	B/Tリンパ球	直接注入	塩化ストロンチウム	2細胞期	0%*	25
	神経細胞	直接注入	塩化ストロンチウム		0%*	26, 27
	線維芽細胞	直接注入	塩化ストロンチウム		1%	28
	線維芽細胞	融合	塩化ストロンチウム		2~3%	29
	ES細胞	直接注入	塩化ストロンチウム		11~23%	30
ヤギ	胎仔性細胞	融合	電気刺激	2~16細胞期	3.5%	31
ブタ	顆粒膜細胞	融合	電気刺激	4細胞期	1.2%	32
	胎仔線維芽細胞	融合	電気刺激		4%	33
ネコ	線維芽細胞	融合	電気刺激	—	1.1%	34
ウサギ	卵丘細胞	融合	電気刺激	8~16細胞期	1.6%	35
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	1.7%	36
ウマ	線維芽細胞	融合	イオノマイシン	—	5.9%	37
イヌ	線維芽細胞	融合	イオノフォア	—	0.2%	38
	線維芽細胞	融合	電気刺激	1%		
	線維芽細胞	直接注入	電気刺激	0%		
フェレット	卵丘細胞	融合	電気刺激	—	1.8%	39
	卵丘細胞	直接注入	電気刺激	1.2%		

\* 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、われわれは成体膵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

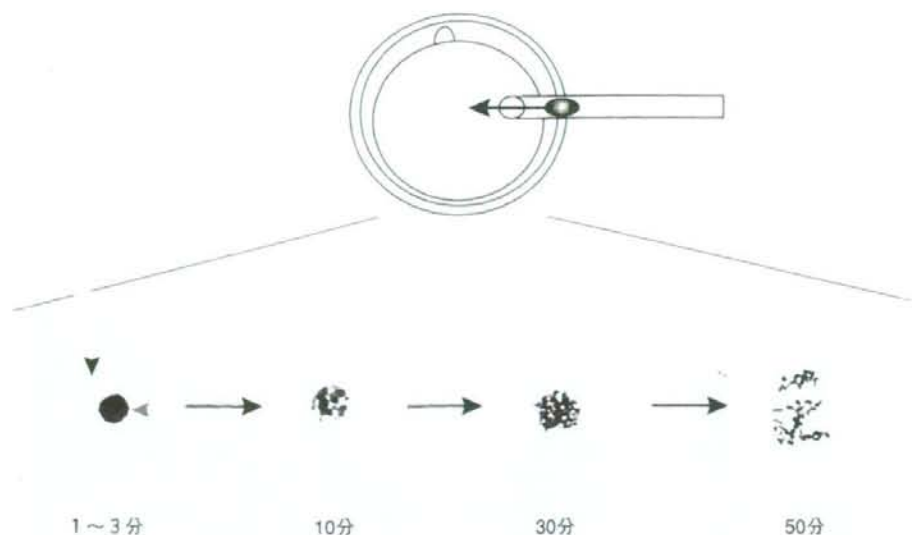


図2 除核卵内で起こるドナー細胞核の変化

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>8)</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。通常の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>11)</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>12)</sup>と特定遺伝子導入による多能性幹細胞の誘導<sup>13)</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>14)~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のではなく、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依存性リ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知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. & Wolfe, 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) Wakasato-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  
 「ジーンターゲットングの最新技術—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む重要な意義を持ち、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ニング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。