

Mining the secrets of the egg

卵の秘密を掘り当てる

Nature Vol.439(652-655)/9 February 2006

モナシュ大学（オーストラリア、メルボルン）の幹細胞研究者 Alan Trounson のもとには時おり、女性たちから卵子（卵ともいう）提供の申し出がある。患者の声を聞くフォーカスグループで彼が話をすると、その後、卵の提供を申し出る女性たちが出てくるのだ。Trounson が目指しているのは、卵を使って患者の遺伝的構成に適合する細胞を作り出す、治療用クローン作製（セラピューティック・クローニング）という手法を使って神経変性疾患を治療することである。「この手法はオーストラリアでは違法なので、実際にはかなりかいつまんだ話しかすることができない」と彼はいう。

ねつ造疑惑の渦中にある Woo Suk Hwang（黄禹錫）は、こうした患者特異的な幹細胞をほぼ日常的な方法で作り出したと主張し、そのおかげでヒトクローン研究界で傑出した存在となっていた。しかし、彼の主張は打ち破られた。Trounson のような目的をもつ研究者たちは、振り出しに戻って、患者に適合する細胞を本当に作り出せるものかどうかを見極めようとしている。

治療用クローン作製研究の究極の目的は、インスリン産生細胞や心臓細胞といった特殊化した型の細胞を作り出し、糖尿病などの疾患を治療したり損傷を受けた心臓その他の器官を修復したりすることにある。また近い将来には、神経変性疾患などの患者から胚細胞を再生し、そこから明らかになる病気を研究したり、新薬の試験をしたりしたいと考えられている。

治療目的のヒトクローン作製が許されている地域では、実験開始の認可を受けた研究者の数が増えてきている。現在はこの手法が許可されていないオーストラリアなどの国々でも、法の見直しがなされつつある。しかし、これらの細胞を作るにはヒトの卵が必要だ。そしてその卵の不足は、この研究分野全体の停滞を意味する。そこで研究され始めているのが、未成熟卵を熟成させたり、実験室で人工の卵を育てたり、動物の卵を代用品として使ったりといった代替案だ。だがそれらはいずれも、技術的、そして倫理的に解決せねばならない問題を抱えている。

心臓細胞など、治療に使う組織を作るには多くの場合、「胚性幹細胞（ES細胞）」

とよばれるまだ特殊化していない未成熟な細胞から始める。胚性幹細胞はその名が示すように、胚盤胞とよばれる、受精後わずか数日のヒト胚に由来する。現在の研究では、体外受精を行う医療機関で余った胚から採取された幹細胞が使われている。しかし、これらの細胞を単純に患者に移植するだけでは、免疫系によって外来組織と認識され拒絶されてしまう可能性がある(本特集の p.12-15 の記事を参照)。

この免疫の問題は原理的に、治療用クローン作製によって解決できる。すでに動物実験から、核を除去した卵(未受精卵)に成体の体細胞の核を移植すると、どうやら卵は成体の核を未成熟の状態に「再プログラミング」し、胚発生を導くことがわかっている。その結果できた胚は、元々の核の持ち主である成体の遺伝的クローンとなる。もしこの手法がヒトでも有効であれば、クローン胚を使って、患者の細胞と本質的に同一の遺伝的コピーである治療・研究用の細胞を作り出せることになる。そのような細胞は、患者の免疫系から攻撃されないはずだ。

余った卵で

しかし、クローン作製法はまだ荒削りで非効率な技術であり、生存能力のあるクローンをたった1個作り出すのに何百個もの卵を必要とする場合がほとんどだ。実際、Hwangの事件で表ざたになった事実の1つに、彼の研究室で使われた卵の数が非常に多かったことがある¹。しかも、ヒトの卵の入手は容易ではない。卵の提供には女性にとって不快で侵襲的な処置を伴う。こうした処置は女性の生殖能力に小さいながらもリスクをもたらす、まれに命にかかわるような副作用を引き起こすこともある。このことが提供者を募るのをむずかしくしているのかもしれない。「ヒトの卵を得るのがどの程度むずかしいものか、成り行きを見守るしかない」とカリフォルニア大学サンフランシスコ校の幹細胞・組織生物学研究所の所長 Arnold Kriegstein は話す。

現在、研究に提供される卵のほとんどは体外受精処置の残り物である。すなわち、受精に失敗したか、さもなければ捨てられる運命にある卵だ。しかし、こうした卵は通常、

再プログラミングがなされない²。それは「おそらく受精に失敗したのと同じ理由による」と、ニューカッスル・アポン・タイン大学(英国)の Alison Murdoch はいう。Murdoch のチームは、不妊治療を受けた女性から採取して余った卵を使い、1個のクローン胚を胚盤胞まで育てている³。

理想をいえば、研究者たちが欲しいのは健康かつ合法的な卵である。Murdoch は今、体外受精治療中で多数の卵(1回の処置で12個以上)を排卵する女性に、12個の卵を採取した後の余った2個を提供してもらえないかたずねている。「計算したところ、このやり方ならば提供者の妊娠の確率を有意に減らさずにすむ」のだという。

たくさん得るには

研究目的であれば、善意による利他的な卵の提供で十分まかなえると考える研究者もなかにはいる。「私のみたところでは、大部分の卵は、家族がかかっている病気の研究を進展させるために自分の卵を提供したいという女性からのものになると思う」と Trounson は話す。

しかし、治療用の卵の獲得は、少なくとも近い将来においては大いに支障をきたしそうである。「大規模に使えるほど卵が十分に得られるとは思えない。結局は他の方法を開発するしか選択肢はない」とアドバンス・セル・テクノロジー社(マサチューセッツ州ウスター)の Robert Lanza はいう。同社では、利他的な提供者からの卵を使った治療用クローン作製研究を行っている⁴(p.16-17を参照)。

卵の提供、なかでも利他的な卵の提供は特に、倫理的な葛藤を生み出す。健康で妊娠可能な女性にそのような処置を施すことは適切だろうか。彼女らの卵に対して謝礼は支払われるべきだろうか。これらの問題は、研究者によって意見が分かれる。「クローン作製の効率が妥当なレベルに達するまで、ヒトの卵で研究すべきではない」とウォルフソン加齢関連疾患センター(英国ロンドン)の幹細胞研究者、Stephen Minger はいう。

従来の卵の提供に代わる方法を模索するうえで、もっともな着眼点は、卵巣である。女性は一生の間に500個前後の卵しか排卵

しないが、卵巣には異なる成長段階にある何千個もの卵が詰まっている。もし、研究者がこれらの卵を何とかして(卵巣生検などで)手に入れ、研究室内で成熟するまで育てられるとしたら、どうなるだろうか。

成長の最終段階にある卵の培養については、一定の成果が上がりつつある。スウェーデンのストックホルムにあるカロリンスカ研究所の Outi Hovatta は、排卵直前の卵を研究している。こうした卵は、通常の体外受精治療で成熟した卵といっしょに採卵され、受精の準備の最終段階へと誘導することができる。Hovatta は、自分たちが開始しようとしているクローン作製実験において、こうした卵をちゃんと機能させることができるだろうという楽観的な見通しをもっている。彼女の見積もりによると、これらのほぼ成熟した卵の利他的提供は、協力を得ている体外受精治療機関から年間300個ほどになる予定だという。

しかし、かなり未成熟な卵を培養させるとなると、話は極めてむずかしくなることが実証されている。ヒトの卵の成長は長い時間がかかるうえに並外れて複雑で、あまりよく解明されていない。卵の成長は胚の段階で始まる。胚の特別な細胞が発生中の卵巣に向かうのである(次ページの図を参照)。到着した卵巣で、これらの特別な細胞は何度も分裂を繰り返して、一次卵母細胞とよばれる卵の前駆細胞を何百万個も生み出す。生まれたての赤ん坊の卵巣には卵胞が約50万個ある。卵胞は、一次卵母細胞とそれを包む1層以上の細胞層からなっていて、この細胞層が卵母細胞の成長を助け、胚の初期発生に必要な栄養を蓄える。

思春期を過ぎると卵胞が完全に発達するようになり、月経周期ごとに1個の卵胞が最大サイズに成長して、中にある卵母細胞を放出する。この卵母細胞は、排卵の直前に半数の染色体を細胞外へはじき出し、精子が卵に接触すると残りの染色体の半数が押し出される。

メイン州バーハーバーにあるジャクソン・ラボラトリーの研究者 John Eppig の手にかかれれば、こうした成長段階を踏まえながら卵を培養させるのも、ごく簡単なことにすら思える。彼は、生まれたてのマウスの

卵巣から卵を採取し、それを研究室で培養して受精させ、生きたマウスの子として出産させることができる⁵。こうした実験でできた最初の子マウス (Eggbert と名づけられた) は病弱だったが、続いて生み出されたマウスたちは健康そうだ。

しかし、もっと大きい動物となると話は別である。「齧歯 (げっし) 類以外の動物では卵の成長にもっと長い時間がかかるので、そのぶんむずかしさも増す」と Eppig という。ヒトの卵を成熟させるには3か月以上もかかる。もう1つの要因は、100マイクロメートル (0.1ミリメートル) 以上に膨れ上がる、ヒトの卵の巨大さにある。卵を成長過程に誘導するための適正な因子類の解明はもちろんのこと、膨れ上がった卵が適切な栄養を確実に受け取れるようにすることが今後の課題である。

とはいえ、ヒトの卵でもいくつかの成功例が得られている。ベイリンソン病院ラビン医療センター (イスラエル) の Ronit Abir は、取り出した卵胞を試験管内で数週間にわたって育てた。物議をかもす話ではあるが、彼女はヒトの中絶胎児から得た未成熟卵をほぼ同じ段階にま

で培養することもやっている⁶。胎児は同意の意思を示せないという事実を含め、明らかに倫理的問題があることを踏まえると、中絶胎児は卵の供給源にふさわしいとは思われない。しかし Abir によれば、この研究によって、卵を成長の初期段階から培養する際の未知の部分を知ることができ、また、卵巣を摘出・凍結したがん患者の受胎能力を回復させる道がみえてくるだろうという。

Hovatta のチームは、無傷の卵巣の薄片を培養してヒトの一次卵母細胞を育てることに成功しており、それらをさらに数段階先まで成長させた。しかし、一次卵母細胞を培養するこれらの努力をもってしても、受精可能な卵はまだ作り出せていない。「研究を始めたころはこれですべてが変わると思ったが、今ではいかに少しずつしか進めないかを実感している」と Abir はいう。

代用品で埋め合わせ

また別の研究者たちは、卵の最初の段階に立ち戻り、胚性幹細胞を使って卵を一から育て上げようとしている^{7,8}。こうした細胞を適正条件下の培養皿の中で、高

密度で育てた場合、細胞は凝集して、驚くことに卵のような構造を形成する。

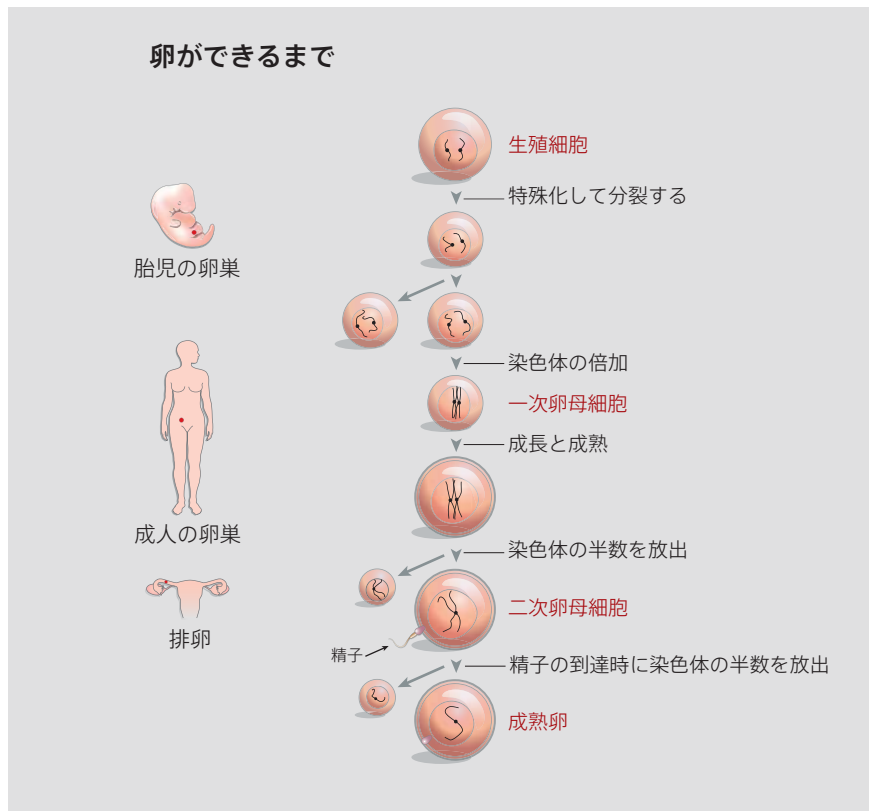
卵に似たこれらの細胞が受精可能であることを示した研究グループはまだない。しかし、核を再プログラミングするところまでは行っている可能性があるとして、マックス・プランク分子生物医学研究所 (ドイツ、ミュンスター) の Hans Schöler はいう。Schöler は、マウスの胚性幹細胞から卵に似た細胞を成長させる研究の先駆者だ。この分野の研究者たちは、再プログラミングが可能かどうかを突き止めたいと強く考えている。Schöler は、不成功に終わったものの、すでに1つの試みを行ったと話す。「我々はまだ諸条件の解明途上にある。この分野の研究は、考えられていたほど簡単にすむものではない」。

ヒトの卵にはあまりにも多くの困難がつきまとうことから、少なくとも研究目的であればヒト以外の動物の卵を活用できないかを探っている研究者もいる。「ヒトの卵はとにかく貴重だ。なぜそれを練習用に無駄づかいするのか」と、上海第二医科大学新華病院の発生生物学センターにいる Huizhen Sheng (沈慧真) は問う。

Sheng の研究室はかつて、世界的な騒動を巻き起こしたことがある。2002年に、彼女がウサギの卵を使ってヒトクローンの胚盤胞を発生させたと報じられた時のことだ。一部の新聞は、動物とヒトを合体させたモンスターとの見出しを掲げ、大衆のヒステリーをあおり立てた。そして、ロンドン大学キングスカレッジの神経学者 Chris Shaw とクローンヒツジ、ドリーの生みの親であるエディンバラ大学の Ian Wilmut が最近、同様の実験の承認を得ようとしていると公表したことで、論議が再燃している。

Sheng は実験データを公表済みである⁹。だが、研究界は彼女の行った方法の有効性について納得していない。「実験が再現されるまでは、あの研究は不確定なものとするべきだ」と Trounson はいう。Sheng は、一部の矛盾は研究室が行った培養に原因があるとしており、問題の1つはすでに是正されたとしている。

多くの国では、ヒトの細胞の核と動物の卵から雑種クローンを作ることは禁じら



活動妨害

クローン動物の作製は知っての通り、効率が悪い。たった1個の胚を作るのに何百個もの卵が必要となる。その理由を解明しようとする研究者たちの目の前に、この問題の容疑者が現れた。細胞のエネルギーを発生する小器官である。

これらの細胞内発電装置はミトコンドリアとよばれ、自前の小さなゲノムをもっている。しかし、そのゲノムは核内の遺

伝子産物とも相互作用する必要がある。ミトコンドリアと核との不適合、さらには、元からあるミトコンドリアとクローン作製過程で持ち込まれたミトコンドリアとの間に不適合が生じて、細胞はだめになる。

「ミトコンドリアのことが完全に見落とされているのは大きな問題だ」とカリフォルニア大学アーバイン校の Doug Wallace は話す。

Wallace によると、ヒト2人の細胞を融合しても問題は生じるだろうが、ヒトの核を再プログラミングするために動物の卵を使おうとした場合には、さらに非常に深刻な問題が起こるだろうという。「我々の経験では、チンパンジーのようにヒトに近縁の種であっても、そのミトコンドリア DNA との組み合わせで不適合が生じる」。

最近のある研究から、マウスのクローン由来の細胞では、細胞の機能は影響を受けない可能性が示唆されている。しかし Wallace は、注意深く制御された実験室という環境から体内で修復中であるぼろぼろの器官に移されたとき、それらの細胞には必ず何らかの障害が起きるだろうと考えている。

れている。そのほか、オーストラリアなどのように規制を検討中のところもあるが、もっと規制のゆるい英国でも、試験はまだこれからだ。しかし、新鮮なヒト卵母細胞の供給量はわずかしくなく、治療用ヒトクローン作製技術を磨くためには実際的に動物の卵を代用するしかない、多くの研究者はみている。こうした雑種クローン細胞は、患者特異的な細胞系列を作ってヒト疾患の遺伝的基盤を研究するのに役立つ可能性がある。「我々の目的は、治療の新たな標的を見つけ出すために疾患の過程を理解することにある。これらのクローン細胞が、そのまま一般社会に出戻ることはない」と Shaw はいう。

不適合問題

だが依然として多くの科学者は、動物の卵から有用なヒト胚性幹細胞株を作り出せるかについて懐疑的である。その懸念は主に、細胞のいわば発電所にあたる、細菌状のミトコンドリアにある。ミトコンドリアは独自のゲノムをもち、細胞の核内にあるゲノムと相互作用する。種の異なる核とミトコンドリアとを混ぜても、それはまず機能しない（コラム「活動妨害」を参照）。「我々ヒトの核の染色体を、我々自身のミトコンドリア DNA と同調させることすらたいへんなことだ。しかも我々は同じ種だということなんです」とカリフォルニアにあるスタンフォード大学医学系大学院の Irving Weissman はいう。それでも科学者たち

はひるまない。「これは重要な問題であり、実験を積み重ねていかない限り、答えはまず得られない」と Shaw は話す。

卵については問題が山積している、再プログラミングの問題をまた別の角度から研究しているチームもある。彼らは、卵以外の細胞で核を再プログラミングするという卵の能力を共有しているものがあるかどうかを調べている。そうした候補の1つが、胚性幹細胞そのものである。最近、ハーバード大学の Kevin Eggan らの研究チームは、成人の体細胞を胚性幹細胞と融合させることにより胚の状態へと変換させた¹⁰。さらに、再プログラミングについてはある面では胚性幹細胞のほうが卵母細胞より優れている可能性が、いくつかの実験から示唆されている。

しかし、この方法の大きな難点は、再プログラミング過程を誘発するのに用いた胚性幹細胞の染色体が残留してしまうことだ。これだと、患者の免疫系が残留染色体を認識して攻撃を開始することになるので、治療への利用は制限される。とはいえ、この問題の解決法も研究されているところだ。例えばモナシュ大学の Paul Verma は、不要な染色体を除去する方法を考案し¹¹、未公表ながら、マウスの細胞でこの方法を使い、再プログラミングされたいことを示す証拠を得ている。

そのほかにも、成体細胞核を胚の状態に巻き戻せるような、いうなれば「魔法の因子」を卵で探している研究グループ

もある。ミネアポリスにあるミネソタ大学幹細胞研究所の桔梗伸明は、カエルの卵から、染色体をパッケージし直したり、核の構造を解体したり、遺伝子の活性のスイッチを入れたりといった、再プログラミングに関するあらゆる重要な側面の鍵を握る因子を探し出した¹²。しかし、このアプローチには時間がかかる。「運に恵まれる人も出てくるだろうが、道のりは遠いと思う」とペンシルベニア州フィラデルフィアにあるテンプル大学医学系大学院の Keith Latham はいう。

ヒトの卵に備わる神秘的な再プログラミング能力をまねることは、どうやら一筋縄ではいきそうにない。その解決法は、Weissman が話すように、1つの方法で再プログラミングを始動させ、それとはまた別の方法で終わらせるというように、複数の方法を併用することなのかもしれない。

Carina Dennis は *Nature* のオーストラリア特派員。

1. Cyranoski, D. *Nature* **439**, 122-123 (2006).
2. Lavoie, M. -C., Weier, J., Conaghan, J. & Pedersen, R. A. *Reprod. Biomed. Online* **11**, 740-744 (2005).
3. Stojkovic, M. et al. *Reprod. Biomed. Online* **11**, 226-231 (2005).
4. Cibelli, J. B. et al. *J. Regen. Med.* **2**, 25-31 (2001).
5. O'Brien, M. J., Pendola, J. K. & Eppig, J. J. *Biol. Reprod.* **68**, 1682-1686 (2003).
6. Biron-Shental, T. et al. *Fertil. Steril.* **81**, 716-719 (2004).
7. Hübner, K. et al. *Science* **300**, 1251-1256 (2003).
8. Clark, A. T. et al. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 727-739 (2004).
9. Chen, Y. et al. *Cell Res.* **13**, 251-263 (2003).
10. Cowan, C. A., Atienza, J., Melton, D. A. & Eggan, K. *Science* **309**, 1369-1373 (2005).
11. Pralong, D. et al. *Cloning Stem Cells* **7**, 265-271 (2005).
12. Tamada, H. et al. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 1259-1271 (2006).