

1	体細胞クローン技術から想定される異常
2	
3	
4	目次
5	1. 体細胞クローン動物とエピジェネティクスの関連性
6	
7	2. エピジェネティクスとは
8	
9	3. 体細胞クローン動物のエピジェネティクス
10	(1) DNA のメチル化
11	(2) 遺伝子の発現解析
12	(3) 後代
13	
14	4. その他
15	(1) DNA 変異及び染色体異常の可能性
16	(2) ミトコンドリア DNA による可能性
17	(3) テロメアによる可能性
18	

19 体細胞クローン技術から想定される異常

20

21 1. 体細胞クローン動物とエピジェネティクスの関連性

22 体細胞クローン技術は、ドナー個体の皮膚や筋肉などの体細胞から遺伝子を
23 含む核を取り出し、核を抜いた未受精卵（レシピエント）にドナー個体の核を
24 移植し、電気的刺激により融合させた再構成胚を雌の家畜の子宮へ移植・受精
25 させ、クローン個体を出産させる。通常の有性生殖と異なり、受精を介さず、
26 分化した体細胞を使用することから、再構築胚が全能性を有する状態にする（リ
27 プログラミング）必要がある。

28 全能性を有する胚は、1個の細胞から、筋肉細胞、脂肪細胞、脳細胞等の数
29 百種類の細胞へ分化することができる。つまり、これらの細胞は同じ遺伝子を
30 もちながら、遺伝子の機能を変化させ、異なる役割をもつ細胞へ分化する。こ
31 の概念は近年のエピジェネティクス研究の発達により樹立されたもので、自然
32 交配、人工授精及びクローン技術の如何を問わず、発生の基礎となる。

33 体細胞クローン操作において、再構築胚の全能性の獲得が適切に行われない
34 場合には、適切な細胞、組織、器官の形成の妨げとなると考えられ、エピジェ
35 ネティクス研究により、クローン動物の発生と発育の解明が進んだ。

36

37

38 2. エピジェネティクスとは

39 エピジェネティクスとは、発生及び細胞分裂の過程で生じる遺伝子の発現に
40 おける持続的な変化に関する研究 (Jaenisch and Bird 2003 (338)) 又は DNA
41 配列を変えずに起こる DNA の機能の変化に関する研究 (Jones and Takai 2001
42 (353)) として定義されている。

43 エピジェネティクスの制御には、DNA のメチル化、ヒストンの修飾（メチル
44 化、アセチル化、リン酸化及びユビキチン化）等がある。特に DNA のメチル化
45 は、エピジェネティクスの制御の中心を占めており、遺伝子の発現調節を考慮
46 する上で重要な課題と考えられている (Kanka, 2003, Quivy et al., 2004,
47 Cheung・Lau, 2005, Fuks, 2005, Verschure et al., 2005, Holliday, 2005,
48 Scarano et al., 2005, Bird, 2002, Jaenisch, 2004 (360, 608, 130, 233, 805, 320,
49 660, 57, 336))。

50 DNA のメチル化は、シトシンにメチル基が転移し、5-メチルシトシンに変
51 換する化学修飾で、多くの場合、遺伝子の発現を抑制する。

52

53 DNA のメチル化のパターンは、筋肉、脂肪、脳等の器官を構成する細胞の種
54 類により異なる。

55 例え、着床前のマウス胚について、*Oct-4* 遺伝子（他の遺伝子の転写を調節
56 する遺伝子）のメチル化の状態及び遺伝子発現を調べた結果、内細胞塊ではほ
57 んどメチル化されておらず、遺伝子の発現が認められたが、栄養膜細胞では
58 高度にメチル化されており、遺伝子の発現も認められなかった。

59 DNA のメチル化のパターンは細胞分裂後も維持されうる。さらに、遺伝的背
60 景や初期胚の培養条件によって DNA のメチル化のパターンが変化する場合が
61 あることも明らかにされている。

62

63 哺乳類の胚の発生過程及び細胞分化の過程でゲノム全域のエピジェネティク
64 スの変化が起きる。研究者によっては受精直後に起こるエピジェネティクス
65 の変化を着床前のリプログラミングと呼び、胚形成期に起こるエピジェネティク
66 スの変化を配偶子形成のリプログラミングと呼んでいる。さらにリプログラミ
67 ングを「分化と発生のメカニズム」という意味で使用されることもある。これ
68 までの以下に記す研究の結果から、「リプログラミング」とは「エピジェネティ
69 クスの変化」と考えてよい。

70 体細胞クローン動物や通常の繁殖技術によって生まれた動物のエピジェネテ
71 ィクスの調節不全に関する文献は、ほとんど着床前のリプログラミングに関す
72 るものである(Jaenisch et al., 2004, Yamazaki et al., 2003 (336, 874))。

73 また、体細胞クローン技術のドナー細胞や胚のリプログラミングに関する研
74 究は、ここ数年注目されており、多くの報告がなされている (Rideout et al.
75 2001, Jaenisch et al. 2002, Mann and Bartolomei 2002, Cezar 2003, Han et al.
76 2003, Jouneau and Renard 2003, Smith and Murphy 2004, Young and
77 Beaujean 2004, Wrenzycki et al. 2005, Armstrong et al. 2006, Eilertsen et al.
78 2007 (630, 339, 486, 113, 276, 354, 705, 888, 861, 17, 194))。

79

80 生命を維持するためには、DNA のメチル化のパターンにおいて、メチル化と
81 非メチル化の適切なバランスが最も重要である。また、エピジェネティクスの
82 調節不全は、体細胞クローン動物に限らず、通常の繁殖技術によって生まれた
83 動物でも認められることが明らかになってきた。

84

85

86 3. クローン動物のエピジェネティクス

87 以下に、体細胞クローン動物のエピジェネティクスに関する知見について概
88 説する。

89

90 (1) DNA のメチル化

91 (細胞融合～着床前・胚盤胞)

92 牛、豚、ラットの体細胞クローン胚では、細胞融合の段階でメチル化の変化

93 が認められている (Dean et al., 2001; Kang et al., 2001a; Kang et al., 2001b
94 (171, 355, 357))。そのために、うまく発生が進んだ胚とそうでない胚が生じる
95 と考えられる。

96

97 体細胞クローン牛の胚では、4細胞期まではドナー細胞のメチル化パターンが
98 維持されており、脱メチル化は認められないことが報告されている (Bourc'his
99 et al., 2001, 77)。しかし、ゲノム全域の解析はなく、脱メチル化が全く起きて
100 いないとは考えられない。

101

102 体細胞クローン牛の着床前の胚では、ゲノムのサテライト領域の脱メチル化
103 が適正に行われず、ドナー細胞によく似たメチル化レベルが維持されるとの報
104 告がある (Kang et al., 2001a (355))。

105

106 マウスでは、体細胞クローン胚と体内受精胚について、胚盤胞の内細胞塊の
107 転写活性とメチル化プロファイルが類似していることから、体細胞クローン胚
108 でも、内細胞塊ではエピジェネティクスが適正にリプログラミングされると考
109 えられる (Brambrink et al., 2006; Kishigami et al., 2006 (81, 384))。そうでな
110 いと発生は進行しない。

111 一方、栄養膜細胞では対照と比べ高メチル化を示すことが報告されている
112 (Yang et al., 2007a (879))。胎盤は比較的進化的に新しい臓器で、動物種間で最
113 も形態的に差が見られる臓器である。

114 従って、体細胞クローンマウス胎盤の肥大については、栄養膜細胞における
115 リプログラミングの差に起因し、代償的に細胞の数や種類が変わったと考えら
116 れる (Tanaka et al., 2001 (745))。

117

118 また、マウスでは、着床前のメチル化のエラーは胎子に発達するまで続く
119 という報告がある (Hiendleder et al., 2004 (301))。

120

121 豚の生殖細胞及び体細胞について、動原体 (染色体の長腕と短腕が交差する
122 部位) のサテライト DNA 配列やユークロマチンに存在する PRE-1 配列の脱メ
123 チル化を比較した結果、卵子はごくわずかにメチル化され、精子は高度にメチ
124 ル化されていた。また、体細胞 (線維芽細胞) は高度にメチル化され、4~8 細
125 胞期までその状態を維持していた。それ以降になると、脱メチル化がはじまり
126 (体外受精胚や体内受精胚と同様)、胚盤胞ではメチル化部位の数が明らかに減
127 少していた (Kang et al., 2001c (356))。この報告から、体細胞クローン胚では、
128 通常の受精胚と同じように着床前の脱メチル化が起こると考えられた。

129

130 (胎盤及び胎子)

131 体細胞クローンマウスの胎盤のゲノムのメチル化を解析した結果から、ひと
132 つの遺伝子発現の急激な変化よりも、むしろ様々な遺伝子の軽度の発現の乱れ
133 の方が、胎盤の成長と機能に大きな打撃を与える可能性があることが示唆され
134 ている (Tanaka et al., 2001, Ohgane et al., 2001 (745, 554))。

135

136 体細胞クローンマウスの胎盤と皮膚の細胞を用いてゲノムの CpG アイランド
137 (CG 含有量の豊富な配列) のメチル化状態について調べた。その結果、大部分
138 の領域 (胎盤の 99.5%と皮膚の 99.8%) は、有性生殖による対照と同一であっ
139 したが、異なるメチル化パターンも認められた。メチル化のパターンが異なる領
140 域は、組織特異的な遺伝子の発現に対応する領域と一致していた (Ohgane et
141 al., 2001(554))。

142

143 体細胞クローンマウスの胎盤の過成長、特定の遺伝子の DNA のメチル化及び
144 遺伝子発現の関連性の有無を調べた。その結果、組織特異的なメチル化の領域
145 が特定された。その領域には、検討したすべての体細胞クローンマウスの胎盤
146 で、高度にメチル化された *Sall3* 遺伝子座が含まれていた。*Sall3* 遺伝子座のメ
147 チル化の割合は胎盤肥大の程度に相関していた。このことから、*Sall3* 遺伝子座
148 は、核移植に起因するエピジェネティクスの変化が起きやすい遺伝子座である
149 と結論づけられた (Ohgane et al., 2004 (555))。

150

151 妊娠 40 日目の体細胞クローン牛において、胎盤で 3 つの対立遺伝子 (*IGF-2*、
152 *GTL2*、*Xist*) の DNA のメチル化パターンが異なり、リプログラミングの違い
153 があるのではないかと報告された (Dindot et al., 2004, (173))。

154

155 妊娠 59 日目の体細胞クローン牛と人工授精牛の胎子の胎膜及び脳について、
156 比較した結果、複数の特定の遺伝子領域で DNA メチル化の違いが見つかってい
157 る。

158

159 体細胞クローン牛の胎子期では、通常の受精由来の対照群よりも高度なメチ
160 ル化が認められている (Bourc'his et al., 2001, Dean et al., 2001, Kang et al.,
161 2001b (77, 171, 356))。また、体細胞クローン牛の胎子の DNA 反復配列 (CpG
162 アイランドを含む) のメチル化について解析した結果から、体細胞クローン牛
163 のメチル化パターンと発達障害は直接関連があると考えられている
164 (Kremensky et al., 2006, (392))。体細胞クローン牛の流産胎子について、ゲノ
165 ム刷り込み遺伝子のメチルを解析した結果についても同様の結論が得られてい
166 る (Liu et al., 2007; Long and Cai, 2007; Lucifero et al., 2007 (459, 470, 477))。

167

168 体細胞クローン牛の胎子、流産胎子及び成牛について、DNA 中の 5-メチルシ

169 トシンの量を測定した。その結果から、体細胞クローン牛の胎子と流産胎子は、
170 対照牛（人工授精）と比較して低メチル化しているという結論が得られた。逆
171 に、他の研究では、体細胞クローン牛において対照群よりも高メチル化であっ
172 たと報告されている(Bourc'his et al., 2001, Dean et al., 2001, Kang et al.,
173 2001b (77, 171, 356))。しかし、成牛になると対照牛と同程度のメチル化であっ
174 た。このことから、DNA のメチル化には成体に成育する程度の閾値が存在する
175 可能性がある」と結論づけられている (Cezar et al., 2003, (114))。

176

177 体細胞クローン牛と人工授精の流産胎子（妊娠 60～90 日）、成牛（生後 18～
178 24 ヲ月）について、ゲノムの反復配列及びシングルコピーの遺伝子（IL-3 遺伝
179 子、サイトケラチン遺伝子）のプロモーター領域のメチル化を解析した。その
180 結果、成牛では、どの遺伝子座においても、すべてメチル化レベルがほぼ同じ
181 であったが、流産胎子では非常に低いメチル化を示す群と人工授精の流産胎子
182 と類似のメチル化パターンを呈する群が確認された。これらのことから、少な
183 くともゲノムのある領域での、適切なメチル化が正常な発達と相関していると
184 考えられた (Chen et al., 2005 (126))。

185

186 体細胞クローンマウスの胎子の DNA のメチル化について分析すると、生殖細
187 胞のメチル化パターンに異常が認められた。しかし、これらの異常は 1000～
188 2000 箇所にならずに数箇所しか認められず、個体差も大きかった。

189

190 (出生後)

191 マウスの新生子、成体（8～11 ヲ月）、老齡（23～27 ヲ月）の腎臓細胞のゲノ
192 ムのメチル化について 2,000 箇所調べた。その結果、マウスの体細胞クローン
193 胚と体外受精胚では、2,000 ヲ所中わずかに 3 ヲ所しかメチル化パターンの差は認
194 められなかった。このことから、体細胞クローンマウスのメチル化については、
195 体外受精由来のマウスとほとんど同等と考えられる。また、体細胞クローンマ
196 ウスと有性生殖マウスの間で認められたメチル化の差異は、生後 11 ヲ月では 1
197 箇所、生後 23～27 ヲ月までには消失した。このことから、体細胞クローンに有
198 害な転帰をもたらすとされるエピジェネティクスの調節不全は、加齡に伴い消失
199 する可能性があると考えられた。また、体細胞クローン動物の核を繰り返してド
200 ナー細胞として使用しても、メチル化パターンの差異の増大や、差異の継続は
201 認められなかった (Senda et al., 2007; Ohgane et al., 2001 (674, 554))。

202

203 体細胞クローン豚では、ゲノムの転写領域、非転写領域の両方でメチル化の
204 違いが認められた。しかし、調べた豚（27 週齡）はすべて健康だった。(Archer
205 et al., 2003a (14))。

206

207 (X 染色体)

208 生存した体細胞クローン牛の胎盤組織でX染色体連鎖遺伝子の発現を調査し
209 たところ、X染色体の不活化が正常に行われていたが、死亡した体細胞クロー
210 ン牛では不完全であった(Xue et al., 2002 (870))。

211 牛の体細胞クローン胚は、着床初期の X 染色体連鎖遺伝子の発現が体内受精
212 胚よりも遅かった (Wrenzycki et al., 2002 (863))。また、体細胞クローンマウ
213 スの胚では、妊娠中～後期の胎盤の X 染色体に連鎖する遺伝子の発現を正常に
214 調節できなかった (Senda et al., 2004 (675))。

215

216 (DNA メチル化への影響因子)

217 これまで述べてきたメチル化は、培養条件やドナー細胞の種類に影響を受け
218 ることが報告されており、最近の報告では、体細胞クローン技術の効率を上げ
219 るための重要な点として、形態、培養条件、染色体安定性、細胞の種類、細胞
220 周期の段階が挙げられている(Giraldo et al., 2006, Mastromonaco et al., 2006
221 (248, 492), Bosch et al., 2006, Inoue et al., 2006, Beyhan et al., 2007b (76, 332,
222 51), Bordignon and Smith, 2006 (73))

223

224 (メチル化のまとめ)

225 体細胞クローンマウスでも対照マウスでも、外見は正常でも DNA メチル化の
226 違いが検出される (Ohgane et al., 2001, (554))。

227 体細胞クローンマウスの DNA のメチル化のパターンは個体により異なっ
228 いた (Shiota and Yanagimachi, 2002 (686))。また、マウスに限らず、牛、豚、
229 羊、ラットの体細胞クローン胚において、胚ごとにメチル化のレベルと mRNA
230 の発現量は異なり、幅広い多様性が観察されている (Dean et al., 2001,
231 Beaujean et al., 2004, Wrenzycki et al., 2005 (171, 35, 861))。

232

233 牛などで認められるエピジェネティクスの変化の制御異常は体細胞クローン
234 動物作製に限ったことではなく、すべての生殖で認められるものであるが、特
235 に *in vitro* での操作が多い生殖補助技術での頻度が高く、体内受精胚よりも体外
236 受精胚や体細胞クローン胚で頻繁に観察されている(Camargo et al., 2005,
237 Gardner and Lane, 2005, Wrenzycki et al., 2005, (93, 244, 861))。

238

239 体細胞クローンの成功率が低いことは、ドナー細胞の核が受精卵の状態にま
240 でリプログラミングできないことに関連性があると考えられている
241 (Gardner・Lane, 2005, Wrenzycki et al., 2005 (244, 861))。

242

243 以上を考え合わせると、エピジェネティクスはクローン動物に限らず正常対
244 照動物の発生の基礎となっており、クローン動物の成功率の低いことは、エピ

245 ジェネティクスのメカニズムと起因することがわかる。

246

247 (2) 遺伝子の発現解析

248 (胚時期)

249 マイクロアレイ解析により、妊娠早期における牛の体細胞クローン胚と他の
250 繁殖技術由来の胚の遺伝子の発現パターンは異なることが報告されている
251 (Smith SL et al., 2005, Herath et al., 2006, Beyahan et al., 2007a (708, 290,
252 51))。

253 遺伝子の発現の観点からすると、発生が順調に進んだ場合、胚盤胞までには、
254 核のリプログラミングが比較的正常になることが報告されている (Yang et al.,
255 2007a (879))。

256

257 体細胞クローン、受精卵クローン、体外受精及び体内受精により作製した牛
258 の胚において、*Igf* 受容体遺伝子の発現についてリアルタイム PCR により解析
259 を行った。その結果、*Igf-1* 受容体遺伝子の発現量は、胚間で有意差はないこと
260 が示された。また、*Igf-2* 受容体遺伝子は、胚間で異なる発現量を示した。また、
261 体細胞クローン胚では *Igf-2* 受容体遺伝子の発現の多様性の幅が広がった
262 (Sawai et al., 2005 (659))。

263 一方、牛の体細胞クローン胚では *Igf-2* 受容体遺伝子の発現の有意差は認めら
264 れないとする報告もあり (Wrenzycki et al., 2001 (864))、また、牛のクローン
265 胚、体外受精胚及び体内受精胚では、*Igf-2* 受容体遺伝子を発現する胚の比率に
266 有意差は認められなかったと報告されている (Heyman et al., 2002a (297))。

267

268 体細胞クローン及び体外受精によって作製したマウス胚において、胚発生に
269 重要な遺伝子群の転写は、作成法によらず、ほぼ同時に開始した。しかし、体
270 細胞クローン胚では、発生が進むにつれて遺伝子の発現レベルの差異が認めら
271 れた。このことから、発生初期は、リプログラミングは胚の発育方向に急速に
272 進むものの、着床前の最終段階では不完全で不正確であると考えられた
273 (Sebastiano et al., 2005 (672))。

274

275 体細胞クローンマウスの胚盤胞における *Oct-4* 遺伝子の発現について調べた
276 結果、体外受精由来の胚盤胞と比較して、*Oct-4* 遺伝子の異常な発現が認められ
277 た。このことから、体細胞クローンマウスの胚が胚盤胞の段階を越えて発生が
278 進まない場合には、*Oct-4* 遺伝子の不適切な発現による誤った細胞系譜の決定と
279 の関連性が示唆された (Boiani et al., 2002 (65))。

280 マウスの *Oct-4* 遺伝子と類似の発現パターンを呈する候補遺伝子 (10 個) を
281 同定し、着床前の体細胞クローン胚 (ドナー細胞は卵丘細胞と胚性幹細胞) に
282 おける発現を調べた。10 個の遺伝子全てが再活性化 (reactivate) することと

283 体細胞クローン胚の発生に関連が認められた。また、形態学的に正常にみえても、
284 胚盤胞の約 40%では、これらの遺伝子を正しく再活性化させることができ
285 なかった (Bortvin et al., 2003 (75))。

286 マウス胚における Oct-4 遺伝子の調節領域のメチル化状態は、遺伝子の発現
287 に影響していた。また、成体の体細胞における Oct-4 遺伝子の調節領域のメチ
288 ル化状態が不均一であることを明らかにした。このことから、体細胞クローン
289 における Oct-4 遺伝子が再活性化される程度は、ドナー細胞のメチル化状態に
290 依存すると考えられた (Marikawa et al., 2005 (488))。

291

292 体細胞クローン牛の胚で 8~12 細胞期に優先的に発現している母性由来の 11
293 個の遺伝子 (Oct-4 遺伝子を含む) の発現解析を行った。その結果、11 個の遺
294 伝子の発現パターンは、体外受精と体細胞クローン由来の胚では実質的に見分
295 けがつかないことが示された。体外受精由来及び体細胞クローン由来の胚での
296 発現レベルは、体内受精由来胚と比べて、乳酸脱水素酵素を除き、すべての遺
297 伝子の発現が低レベルで認められた (Camargo et al., 2005 (93))。

298

299 ブタの体細胞クローン胚及び顕微受精 (ICSI) 胚の 2~4 細胞期及び胚盤胞に
300 ついて、正常な発生マーカーとして知られている FGFr2IIIc 遺伝子、FGFr2
301 IIIb 遺伝子、Xist 遺伝子、IL-6 遺伝子、IL-6R 遺伝子、c-kit リガンドについて
302 遺伝子の発現を比較した。体細胞クローン胚のドナー細胞は、2 種類の細胞系列
303 に由来し、活性化の手順も 2 種類の方法を用いた。その結果、遺伝子の発現の
304 程度は体細胞クローン胚と ICSI 胚で類似していたが、活性化の手順により異な
305 る発現を示した。また、体細胞クローンの 2 種類のドナー細胞間では、初期の
306 発達段階では遺伝子発現の有意差はみられなかった (Miyazaki et al., 2005
307 (523))。

308

309 (胎盤及び胎子)

310 体細胞クローン牛では、胎子ではなく胎盤で、刷り込み遺伝子 (IGF2R 遺伝
311 子) の発現パターンの異常が認められた (Yang et al., 2005 (878))。

312 体細胞クローンマウスでは、胎盤の刷り込み遺伝子を含めた特定の遺伝子の
313 異常な発現の低下が認められた。なお、この異常は胎子では認められなかった
314 という報告もある (Inoue et al., 2002 (333))。

315

316 通常のクローンと異なり、胚性幹細胞をドナーとしたクローンは、ドナー細
317 胞の刷り込み遺伝子などの異常がそのままクローン胚及び胎子に反映されやす
318 い。(Humpherys et al., 2001, (325))。

319

320 体細胞クローンマウスの妊娠末期の胎盤はコントロールと比べて 2~3 倍大き

321 かった。ドナー細胞の種類を変えても同様の結果を示した。このことから、胎
322 盤細胞の遺伝子は、ゲノムの上流に存在する何らか機能により発現が調節され
323 ている、また、この機能は刷り込み遺伝子とは独立しており、核移植か他の技
324 術が原因となり調節不全に至ると結論づけられた (Inoue et al., 2002, (333))。

325

326 体細胞クローンマウス(胚性幹細胞、卵丘細胞由来)の胎盤と肝臓について、マ
327 イクロアレイ解析により 10,000 個を超える遺伝子の発現を評価した。その結果、
328 卵丘細胞由来の体細胞クローンと胚性幹細胞由来の体細胞クローンでは、286
329 個の遺伝子の発現が同程度のレベルで変化した。このことから体細胞クローン
330 マウスにおける遺伝子の発現の異常は、ドナー細胞に由来するのではなく、体
331 細胞クローンマウスすべての胎盤に共通して認められると考えられた
332 (Humpherys et al.,2002 (324))。

333

334 体細胞クローンマウスの胎盤で発現している遺伝子について、約 4%は対照群
335 と比較して発現レベルが異なっていた。また、胎盤の大きさと遺伝子の異常な
336 発現とは関連がなかった。このことから、細胞構成の変化は遺伝子の発現の変
337 化では説明がつかないことが示唆された (Humpherys et al., 2002 (324))。

338

339 体細胞クローンマウスの妊娠末期の胎盤について、組織学的観察及び胎子の
340 発育に関連する遺伝子の発現を評価した。その結果、体細胞クローンマウスの
341 胎盤は、コントロールよりサイズが大きく、組織レベルでは胎盤を構成する全
342 部の層(栄養膜の巨大細胞層、海綿栄養芽層、迷路層)で変化が認められた。
343 胎盤の遺伝子発現の調節では、重大な障害はみられなかった。牛や羊では、体
344 細胞クローン胎子は大きくなる傾向があるが、マウスの体細胞クローン胎子の
345 平均体重はコントロールよりも軽かった。このことから、体細胞クローニング
346 による潜在的な影響が胎子の成長にマイナスの影響を与え、そしてそれは不完
347 全な胎盤に起因すると考えられた (Tanaka et al., 2001 (745))。

348

349 *in vitro* で胚性幹細胞を培養することにより、遺伝子発現のレベルが非常に変
350 化した。胚性幹細胞から作り出した動物の遺伝子の発現は、培養中の細胞より
351 もより多様性に富んでいた。このことから、初期胚の培養は遺伝子の調節不全
352 の程度に影響を与える可能性があることが示唆された (Humpherys et al.,
353 2001 (325))。

354

355 (出生後)

356 同じドナー細胞に由来する体細胞クローン牛の生後直死した新生子と健康な
357 成牛について、リアルタイム PCR により、成長や刷り込みに関連した 3 つの遺
358 伝子の発現レベルを比較した。生後直死したクローン牛の新生子は LOS の徴候

359 を示し、自然交配牛の新生子と比較すると、遺伝子の異常な発現が認められた。
360 また、同じドナー細胞から作成したにもかかわらず、クローン牛の新生子の遺
361 伝子の発現パターンには幅広い多様性が認められた (Yang L et al., 2005 (878)).

362

363 出生後 48 時間以内の体細胞クローン牛、体外受精牛及び対照牛の 6 つの器官
364 (心臓、肝臓、腎臓、脾臓、肺及び脳) について、発生学的に重要な 8 つの遺
365 伝子の発現レベルをリアルタイム PCR により比較した。体細胞クローン牛では、
366 組織特異的に異常かつ幅広い多様性をもつ遺伝子の発現パターンが認められた。
367 そのような遺伝子は、心臓に最も多く (遺伝子 8 個中 5 個)、腎臓には最も少な
368 かった (遺伝子 8 個中 2 個) (Li S et al., 2005 (446)). マイクロアレイを用いた
369 網羅的な遺伝子発現解析では、外見上全く正常なクローンマウス新生子の脳、
370 肝臓、腎臓において、受精由来産子には見られない顕著な遺伝子発現のばらつ
371 きが明らかにされた (Kohda et al., Biol Reprod 73:1302-1311, 2005)。

372

373 同一のドナー細胞を用いた体細胞クローン豚と対照豚 (純血豚) を用いて、
374 皮膚から採取したゲノムの PRE-1 SINE (ユークロマチン領域の反復配列) と
375 動原体性 DNA (ヘテロクロマチン領域の反復配列) のメチル化のばらつきの程
376 度を比較すると、どちらも同程度であった。しかし、対照豚では PRE-1 SINE 領
377 域と動原体性 DNA の CpG サイトでは、小規模のランダムバリエーションがみ
378 られた。

379 表現型と遺伝解析の結果、2 つのグループの存在が示唆された。ひとつは、
380 体細胞クローン豚が対照ほどの多様性は示さないもの、もうひとつは対照と同
381 様に幅広い多様性が認められるもの、という 2 つのグループに分類された。

382 成長率をはじめ、生理学的な測定値や行動に関し、体細胞クローンと対照と
383 の間に差異は認められなかった (Archer et al., 2003a, Archer et al., 2003b (14,
384 15))。

385

386

387 (3) 後代

388 両親に存在するすべてのエピジェネティクスの問題は、細胞の核が生殖細胞
389 系列を経る時に消去されると考えられる (Yanagimachi 2002 (875))。健全な体
390 細胞クローンの中にリプログラミングのエラーが残っている可能性があっても、
391 新たな配偶子が自然交配すると、エラーはリセットされると考えられる (NAS,
392 2002a)。そのため、クローン動物の後代は正常であると考えられている (Fulka
393 et al., 2004b (236))。

394

395 同一体細胞クローン牛から生まれた後代 (メス 11 頭、オス 19 頭) では、父
396 親側の出生時や出生後に見られた異常が全ての個体で消失していた (Ortegon

397 et al., 2007 (563))。

398

399 牛と同様に、マウスにおいても、体細胞クローンで認められる異常は、ジェ
400 ネティックな原因よりはむしろエピジェネティクスの異常が原因である。この
401 エピジェネティクスの変化は、DNA 又はクロマチンの可逆性の修飾であり、ジ
402 エネティックな変化とは異なり、通常、生殖細胞系列で消去される
403 (Hochedlinger and Jaenisch, 2002 (316))。

404

405 体細胞クローンマウスで認められた表現型はその子孫には伝達されなかった。
406 このことから体細胞クローンの不正確なリプログラミングに由来する形質は、
407 配偶子形成リプログラミングにより、子孫では消失すると考えられた
408 (Shimozawa et al., 2002a, Tamashiro et al., 2003 (684, 742))。

409

410 哺乳類の胎子のエピジェネティクスの変化は、後代に伝達する可能性がある。
411 また、3 世代目以降では、その変化は可逆的であるとされている (Gluckman et
412 al., 2007a; Gluckman et al., 2007b (251, 252))。また、エピジェネティクスの
413 伝達は、時にはマウスの体外授精胚でも認められる (Roemer et al., 1997 (638))。

414

415

416 4. その他

417 (1) DNA 変異及び染色体異常の可能性

418 体細胞クローン技術は、体細胞を除核した成熟卵に移植し、電氣的刺激によ
419 り融合させるものであり、遺伝子を組換えたものではない。

420 一方、自然発生的に生じる可能性がある DNA の突然変異について、体細胞ク
421 ローンにおいても核移植後に生じる可能性があるが、これは通常の繁殖技術に
422 おいても生じる可能性がある。

423

424 23 種類のマイクロサテライト多型マーカーを用いたドナー牛、培養細胞、体
425 細胞クローン牛、リクローン牛の DNA 型 (対立遺伝子型) の調査によると、遺
426 伝子型は全て一致しており、体細胞クローン牛から作出されたリクローン牛に
427 ついても完全に一致していた。(山口ら, 2000(J-6), 志賀ら, 2001(J-7), 本田ら,
428 2003(J-8), 谷口ら, 2002(J-9), 加藤ら, 2003(J-10), 上田ら, 2000(J-24))

429

430 牛の体細胞クローン後の染色体異常は、着床前に形態学的に異常を示す胚で
431 認められた (Booth et al., 2003 (71))。しかし、同一の体細胞クローン牛から得
432 た 30 頭の後代牛は、染色体に一切異常を示さなかった (Ortegon et al., 2007,
433 (563))。

434

435 体細胞クローン牛の末梢リンパ球を用いた試験において、20頭のうち2頭で
436 は2倍体以外の染色体数を示す異常細胞が約21%認められ、染色体数の不安定
437 な状態は表現型が正常なクローンでも起きていることが示された (Hanada et
438 al., 2005 (278))。

439 マウスの体細胞クローン胚 (卵丘細胞由来) のうち90%以上は正常な染色体
440 構成を呈した (Yanagimachi, 2002 (875))。

441 マウスの体細胞クローン胚又は体外受精胚では胚間で染色体の安定性が異な
442 る可能性がある。しかし、これはジェネティックな原因よりもエピジェネティ
443 ックな原因に起因すると考えられている (Balbach et al., 2007 (26))。

444

445 (2) ミトコンドリア DNA による可能性

446 様々な動物の体細胞クローン作製の成功率が低い要因には、不完全又は不適
447 切なりプログラミングに加え、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の伝達パター
448 ンの変化に起因するという仮説がある (Hiendleder, 2007, St John et al., 2005,
449 Spikings et al., 2006 (301, 718, 715))。

450 通常の受精卵のミトコンドリアは1種類であるが、体細胞クローン胚では、
451 ドナー細胞とレシピエント卵子に由来する mtDNA が混在している。体細胞ク
452 ローンに由来する胚、胎子及び産子の異常の一部は、このミトコンドリアの混
453 在に起因する可能性がある (Bowles et al., 2007 (79))。

454

455 例えば、体細胞クローン (ヒツジ、ウシ、ブタ) は、ほとんどホモプラスミ
456 ー (ドナー核とレシピエント細胞のミトコンドリア DNA が同じ) であるか、あ
457 るいは軽度のヘテロプラスミー (ドナー核とレシピエント細胞のミトコンドリ
458 ア DNA が違う) のみを示し、核移植に関与する因子 (胚の培養条件、ドナー細
459 胞の型、卵母細胞レシピエントの質など) がヘテロプラスミーのレベルに影響
460 を及ぼす可能性があるという報告がある (Hiendleder, 2007 (300))。体細胞ク
461 ローンに有意な程度のヘテロプラスミーがみられた場合、体細胞クローンの健康
462 や摂食リスクに影響を及ぼし得る範囲を確定するのは困難である。体細胞ク
463 ローンのヘテロプラスミーが少ない、一切ない、あるいは幅広い多様性を示す場
464 合でも、表現型としては正常な可能性がある (Bowles et al., 2007 (79))。

465

466 以上より、核移植によるヘテロプラスミーが、個体発生に障害をもたらすと
467 いう明確な証拠はない (Smith LC et al., 2005 (706))。

468

469 (3) テロメアによる可能性

470 テロメアとは、染色体の末端部に位置する高頻度反復配列 DNA であり、染色
471 体の安定性に貢献している。テロメアは、DNA 複製と関連する問題があること
472 から、細胞分裂の各期間で短くなる。そのため、テロメアには加齢の過程を制

473 御する機能がある。

474

475 体細胞クローン羊（ドリー）は、通常繁殖の同年齢の動物に比べて、テロメ
476 ア長が有意に短く、体細胞クローン羊（ドリー）のテロメアの長さは、ドナー
477 核を提供した動物の年齢と核移植の前に細胞を培養した期間を合わせた年齢の
478 テロメア長となっていた（Shiels et al., 1999 (679)）。

479

480 牛、豚、山羊の体細胞クローンのテロメア長は、老化した細胞をドナー細胞
481 に使用した場合でも、同年代のコントロールと比較して、同等又は長かった
482 (Lanza et al., 2000, Tian et al., 2000, Jiang et al., 2004, Betts et al., 2005,
483 Jeon et al., 2005, Schaetzlein and Rudolph, 2005 (412, 767, 347, 50, 345,
484 662))。

485

486 同一体細胞クローン（ドナーは線維芽細胞）から生まれた 30 頭の後代のテロ
487 メア長は、同年代の牛のコントロールと同じ長さだった (Ortegon et al., 2007
488 (563))。

489

490 一方、酵素のひとつであるテロメララーゼは、生殖細胞や胚細胞などのさまざ
491 まな再生組織内に存在し、テロメアを伸展する能力や複数回の細胞分裂を経た
492 テロメアの長さを維持する能力がある。

493

494 テロメアを複製及び伸張する酵素のテロメララーゼは、胚の形成期に活性化し
495 ている。テロメララーゼの活性は出生後ほとんどの体細胞で抑制されるが、生殖
496 細胞、腫瘍細胞及び幹細胞においては活性が持続している (Xu and Yang, 2003,
497 Schaetzlein and Rudolph, 2005 (869, 662))。

498 テロメララーゼの活性化は胚ゲノムが活性化し始める時期（マウスでは 2 細胞期
499 頃、牛では 8~16 細胞期）に起こるようである (Betts and King, 2001(49))。

500 牛とマウスで、桑実胚から胚盤胞への時期に、クローン胚にテロメア長が伸
501 びた (Schaetzlein et al., 2004 (661))。

502 組織培養中の細胞の老化は、テロメアの短縮に反映されるが、SCNT の継代
503 細胞からの核移植後にテロメア長が部分的に修復され逆転する (Clark et al.,
504 2003 (142))。

505 配偶子は成熟化の過程でテロメアを伸すことができるくらいのテロメララーゼ
506 活性を持つ (Betts et al., 2001 (48))。

507

508 クローン羊の胎子から得た線維芽細胞株は、クローンを産出するのに用いた
509 ドナー細胞株と同じ増殖能力、同じテロメアの短縮率を持っていた (Clark et al.,
510 2003, 319)。このことから、クローン動物の老化は、遺伝子の制御下にあり、

511 あらかじめ決められたテロメア長によって引き起こされるものではないと推測
512 された (King et al., 2006 (320))。

513

514 体細胞クローン胚のテロメアを再構築する能力は種、ドナー核の由来、初期
515 胚の培養条件に依存する可能性がある (Betts and King, 2001, Miyashita et al.,
516 2002 (49, 522))。

517 培養された胚や胎子の細胞から生産された SCNT 羊のテロメアは、同年齢の
518 対照より 10~15%短い (Betts et al., 2001(48))。

519 テロメアの長さの減少は、動物の種類、使用したドナー細胞の種類、培養時
520 間に関係する (Shiels et al., 1999, Kuhholzer-Cabot and Brem, 2002,
521 Miyashita et al., 2002, Betts et al., 2005 (679, 397, 522, 50)) 。

522

523 リプログラミング異常は、幾つかの牛の SCNT 胚でテロメラーゼ活性に影響
524 した (Betts et al., 2001 (48))。

525

526 生体外で 30 回継代培養 (生体外での細胞の寿命はおおよそ 31~33 回) した
527 細胞からクローン胚を作製した。この胚を移植後、妊娠 40 日に胎子を取り出し
528 線維芽細胞系を確立した。これらの線維芽細胞は、ドナー細胞より寿命が延び
529 ており、生体外で 31~33 回の継代ができた (Cibelli et al., 1998a (141)) 。

530

531 胎子の線維芽細胞由来クローン山羊のテロメア長は、同年齢の対照動物より
532 短い。クローン山羊の後代は、通常の動物と比較して短いテロメアの長さを持
533 っているのが精巢で判り、その長さはドナーと同年齢対照の精巢で得られた値
534 の中間だった (Betts et al., 2005 (50))。