

# *Manipulation of Development by Nuclear Transfer*

*Gianpiero D. Palermo*

*Ἡ θυσία ἔχει τὸ διανεμητικὸν δίκαιον*

「核移植マニュアル」

## 概論

細胞のマイクロマニュアルは最ず一世紀以上前にドイツで企図され昨今 Chambers (1940) や Fonbrune (1949) らに拠って洗練された。それから Hiramoto (1962) や Lin (1966) らがウニ卵子への精子の注入を研究し此の技術は受精に関連する配偶子機能障害の研究収集であると同時に今の配偶子研究の枢必要な仕事となっている。多くの不妊症男性の精子受精不能を治療するこの功績に続いて今の研究は枢として卵ゲノムを章かとし、そしていうなれば老年女性の卵母細胞に生じる遺伝子的不備を正す術式を進化させ試を収む理範を準備する事に照準をあてている。3章で十分な壮体マウスの始期卵母細胞と再び構成する卵母細胞が体外で減数分裂を復旧し減数分裂前期へと編絡するそのさなかに生じる卵核包相互転移へ実験究査を行っている。4章でこのプロセスが実験を行う人間の卵子で生じうる範幅の研究論議を行う。5章で普通の卵細胞質が想定し得る「老衰」した卵母細胞の卵核包を「救う」事が出来るかどうかという研究に拠る卵母細胞年齢を量る形式としての卵母細胞ミトコンドリアへのダメージ選択の長編ともいえない意味を内包したパラダイムを伝える。6章と7章でヒトとマウスでの受精能卵母細胞の実験を行う一体細胞核のハプロイド化を導引する時の卵核包と減数分裂前期卵母細胞の性能比較である一老齢と化した女性の卵母細胞染色体異数異常を治癒するもう1つのアプローチといえるだろう。最期に8章で胚や胎生組織でのDNAメチライゼーションやヒストン尾部の、そして胎生組織が核移植を経て生成されそして/或いは体外培成へと至る遺伝表象の冒険の旅へ出発する。

## 1 章

### 序章

#### 1.1 コンテキスト

細胞と配偶子のマイクロマニュアルは 50 年以上も以前 (Chambers, 1940) 為されたが昨今になって原子構成生物学や原子構成遺伝学へ活使もされている。三十数年前マイクロマニュアルは多くの動物の受精を研究する為施行され (Hiramoto 1962, Lin 1966)、それから初期胚から切り離された割球の発達ポテンシャルを評価する為に使活された (Edwards と Gardner, 1967)。より時下となって核移植術は細胞分化の時の核細胞質構造変化 (McGrath と Solter, 1983) そして初期受精卵発生を指揮する核の務を検ずる時 (McLaren, 1984) に役立っている。マイクロマニュアルで遺伝子組み換え動物の生成を行う事も出来て導引遺伝子圧縮を行ったり遺伝子干渉が存在する時、機能的遺伝学と発達と進化の前後の遺伝子検証を行う機会が存在する。

昨今の 20 年間で人間配偶子へマイクロマニュアルが対応し (Cohen, 1988) 精液パラメータが正しいなら受精する事も出来る。同時にマイクロマニュアルは人間受精の理解の進歩にも役立っていて (Palermo と Rosenwaks, 1995) 人間受精の診断とケアを促進している。マイクロマニュアルの基礎研究と商業活使からの自然な進歩として此の技術の治療医術の進展が続くだろう。

時下、ヒト配偶子と胚のマイクロマニュアルは着床前診断 (PGD) が遺伝子病や染色体不備を診断し予防する為 (Palermo と Bedford, 2000)、そして卵細胞室内精子注入法 (ICSI) が精子の数が少なかったり精子に機能不全が存在した時に受精を完行するべく活使が為されている (Palermo ら, 1995a, 1995b)。ヒト卵母細胞の体外受精 (IVF) が 1980 年代初期から行われ (Cohen ら, 1984a) 精子数が少なかったり精子不十分状態である時に受精率が低かったり受精が生じないとの事例が起こった (Palermo と Rosenwaks, 1995)。受精確率の改善は (1) 受精中期での精子細胞増加 (Cohen ら, 1984b) (2) 数マイクロリットルの培養液で精子注入受精を行う (3) 精子走行能力を内包した精子選択と沈殿法或いは不連続比率勾配 (Guerin ら, 1989) (4) 走行エンハンサーの活使 (Yovich ら, 1990) (5) 卵丘細胞の一部除去 (Lavy ら, 1988)。精子細胞の他のケア方法は精子頭部のアクロソームを不安定化させるであろう (Palermo と Van teirteghem)。しかしながら深刻な精子減少と精子無力症そして精子の奇形のケースだとするとマイクロマニュアルに基づいたよりアグレッシブな技術が受精を完行させるべく枢必だったのである (Palermo ら, 1992a, 1995a)。

## 1.2 核のマイクロマニユアル

核移植技術は40年以上前脊椎類のクローン作製の為に活使され、遺伝子的同一性生物の生成の枠を超えて幅広く活かされる事となった。核移植実験は1958年からアフリカツメガエルで施行(Fischberg ら, 1958)され、分化した内胚葉核(Gurdon, 1962)或いは十分に分化した腸の細胞(Gurdon, 1962)が通常の筋肉細胞や神経細胞の形成を支援仕得る事を証した。除核したカエル卵への移植後、アフリカツメガエルのオタマジヤクシの腸上皮の核移植に拠り雌雄7匹が得られた(Gurdon と Uehinger, 1966)。分化した細胞の核遺伝子の不活性化が不可逆的であるかどうか一言い換えるならばそのような核が多分化性を維持しているかがどうかは枢必の対象だったのである。此と続く研究が多くの科学的関心を喚起したが人間を媒体として核の移植を行う事については固く口が閉ざされ、その理由はヒトとカエルの進化学的な距離と、分化した壮体の核から壮体のカエルを生じさせる事が出来ないという事だった(Gurdon と Luskey, 1970. Kikyo と Wolffe, 2000)。このクローン認識は《ドリー》の誕生に拠りドラマティックに変劇した(Wilmur ら, 1997)。

カエルでの Gurdon と同僚の功績は理解に難くないが、昆虫、ホヤ、魚類、そして哺乳類を内包した多くのスピーシーでの核移植の試みを促した(Gurdon と Uehinger, 1966)。事実マウス受精卵体拠り抽出した前核は移植後発達の支援を行い得る(McGrath と Solter, 1983)。哺乳類での再生産の功はマウス初期胞胚段階割球の核より得られ(Surani ら, 1984, 1986, 1990)、2細胞胚へ移植を行った(Tsunoda ら, 1987a)。反芻動物での実験により生誕が得られた(Willadsrn, 1986)。更に3枢必ファクターが核移植に拠る出生の成否に関連しているようであることが明らかとなった(Sun と Moor, 1995)。レシピエントの細胞質状態、ドナー細胞の発達状態、そしてドナー核の細胞サイクル段階がレシピエント細胞質の細胞サイクル段階と関連しているのである。羊の《Megan》と《Morag》が1995年(Campbell ら, 1996a)、そして《Dolly》が1996年(Wilmur ら, 1997)以上の研究の道を冒険し壮体体細胞核の分化全能性ポテンシャルの最終証の準備を行った。然しながら《Dolly》の功績はユーティリティー性があるというより概念としての功績だったといえる。事実胚由来細胞と胎児繊維芽細胞の子児を生じる総した効率は4.6%と10.0%だった。上皮細胞核より生誕した率は3.4%である。より枢必なのは247胚のたったの29(11.4%)胚だけが桑実胚あるいは胚盤胞へと辿りついたという事である。

1990年代中盤の枢必な進歩は幾つかの研究グループが至った哺乳類実験でドナーとレシピエントの細胞周期状態が核移植実験の成否に関わるという認識である(Barnes ら, 1987. Cheong ら, 1993. Campbell ら, 1993)。特に減数分裂前期(MII)の細胞質環境がドナー細胞染色体の命運と保全に強い影響を与えるということが証された。Campbell らによると(1996b)、移植された核の核被膜が溶け出す事と染色体凝縮は少なくとも卵母細胞の発達促進因子(MPF)だけに拠らない。卵母細胞活性化で核被膜形成が為されDNA融成がはじまる。

移植される核が2倍体なら一連の複製が生じる。しかしながら移植核がより多い培数体であるなら進行している複製も継続せずまとまりのない複製は正常ならざる(すなわち $>4n$ )培数体となるか融成フェーズにおいて染色体碎状化が生じるだろう(Harper と Delhanty, 1996)。4細胞胚からはじまった割球核は減数分裂中期にシンクロし除核された卵細胞質に移植されたマウスクローンは一連の核の移植で生成される。以上の移植された卵母細胞は2倍体の核を形成しサイトカラシンBに拠る極体押出の活性化と抑制化が続く。このような核を除核された受精卵へ移植する事は83%の未分化胚芽細胞発達と57%の胎生の結果となった(Kwon と Kono, 1996)。以上のドナー細胞周期状態への制約は活性化卵子或いは受精胚がレシピエントとして活使されるとより狭い規模で対応した。然しながら一番の功績は減数分裂前期卵母細胞の研究であり、減数分裂前期卵母細胞の始期発達段階が導引された遺伝子のリプログラミングの時間を与えている事実が証された事であろう。

此のアプローチのほとんどが今クローンと認識されている問題を生じさせた。幾つかの進歩したクローンプロトコルはマウス胚を活使して発達しそこで発達生物学と再生殖生物学は素晴らしい事に受精妊娠を20日で、生成期間をおよそ3か月で為すのである。遺伝子組み換えと遺伝子消失(ノックアウト)モデルは基礎に連関していたが不受精卵母細胞コントロールの技術的問題に拠る再生殖エンジニアリングの特定の位形にそのマウスが応じているとはいえないだろう。人工受精と核の移植は1980年代の始期にヒツジ、ウシ、ウサギで功績をあげていた(First と Prather, 1991, Iritani, 1991)。しかしマウスにおいては精母細胞に圧電デバイス技術を活使して子児を得たKimuraとYamaguchiに拠るマイクロ注入術式が導入されるまで問題として残った(Kimura ら, 1998, Ogura ら, 1998)。マウスクローニングは2細胞割球核が除核卵母細胞に核移植された後に完全にリプログラミングされなければいけないので非常に難しかった(Kono ら, 1991)。進展独歩として2つの日本の研究グループが4細胞胚或いはそれより後の段階の胞胚の核は胚再構成の全ての発達段階を経過する為2度に涉って移植されなければいけない事を認識した。最初に除核した卵母細胞にそれから除核した胚にである(Kwon と Kono, 1996, Tsunoda と Kato, 1997, 1998)。何故連続した移植が枢必なのかはわからなかったが成長した卵母細胞の「リプログラミングファクター」が、今も確認されていないが、マウス移植前発達段階の核に不十分であるという事が往々に認識された。しかしながらマウス体細胞の核のクローニングが簡単な技術で行えるようになると(Wakayamara ら, 1998)、連続した核の移植に拠る割球クローニングは限られた用途となった。マウス体細胞クローニングは最ず卵丘細胞の移植に拠って完行され(Wakayama ら, 1998)、精子或いは精子形成細胞の人工授精で遺伝子組み換えマウスの生成や受精を行えるマウス系繁殖という為果を得る事が出来た(Ogura ら, 2001)。

### 1.3 ヒト配偶子、受精卵、そして胚のマイクロマニュアル

1978年の体外受精(IVF)でのヒト誕生後(SteptoeとEdwards, 1978)、体外受精(IVF)は受精に広く活使されている。しかしながらマイクロ技術が決定的任務を果たすのは「男性が原因」で精子が受精を行えないケースである(PalermoとRosenwaks, 1995)。この技術が受精に役立つのは精子の受精が難しいケースと精子形態が通常ならざるケースであり、この技術は卵母細胞の成長や受精や始期の発達の研究の力強い手段ともなり得る。孵化した4から8細胞胚段階の部分的解剖が移植を進展させるためになされているがその価値は議論の対象として残っている。マイクロマニュアルは4から8細胞胚の区離された割球で着床前診断(PGD)を行う中心的任務をも果たしている。

#### 1.3.1 受精を完行する為に活使されるマイクロ技術

透明帯バーストにバイパス手術を行う 1980年代半ばの透明帯開孔法(ZD)(GodonとTalansky, 1986, Gordonら, 1988)、部分的透明帯解剖(PZD)(Cohenら, 1988)、そして補完透明帯注入(SUZI)(Metkaら, 1985, Laws Kingら, 1987, Mettlerら, 1988, Fishelら, 1991)が実使された。然しながら此の初期の受精完行アプローチは細胞内精子注入法(ICSI)が採用され今だと活使されていない(Palermoら, 1992a, 1995a)。

細胞内精子注入法(ICSI)で選択した精子を直接卵母細胞に注入する。この技術は最ずHiramotoによってウニで(1962)、それからLinによってマウスで為された。それからUeharaとYanagimachiはヒトの精子注入或いはゴールデンハムスターのハムスター卵子への精子注入後の男性精子脱凝縮を確認し、そして今では細胞内精子注入法(ICSI)は男性前核形成決定の研究に活使されている(Perreayktら, 1984, Naishら, 1987)。

受精の融成段階は細胞内精子注入法(ICSI)に抛りバイパスの施行がされるのでほとんどのスピーシーで実験された男性前核発達は卵母細胞活性を得る事が出来た(PalermoとBedford, 2000)。これは精子核注入の前或いは間に幾つかの細胞質のエネルギーな吸気に抛り生じたといえるだろう(ParreaultとZirkin, 1982)。ハムスター(Hoshiら, 1992)とウシ(Younisら, 1989, Keeferら, 1990)で卵母細胞活性の尤度はカルシウムイオノフォア(e.g. A23187)の卵母細胞への被曝に抛り上昇した。この行為は卵母細胞の単為生殖活性を除外しているが男性配偶子の脱凝縮とともに第二極体形成が細胞質研究に抛って確とされた両親の受胎産物であることを証している(Sultanら, 1995)。

細胞内精子注入法(ICSI)を活使した最初の子児はウサギで得られその後ウシでも得られた(Iritaniら, 1988, Gotoら, 1990)。最初のヒトの妊娠は1992年(Palermoら, 1992a)でありそれから幾千もの子児が此のアプローチで誕生した(Medical Research International, 2002, NygrenとAndersen, 2002)。

### 1.3.2 奇形受精補正

哺乳類で為行された多くの遺伝術式は核と前核の除去あるいは移植である (Gurdon ら. 1975. Willadsen. 1986. Palermo. 1995c)。受精卵で此の術式は前核か二雄核性受精卵と二雌核性受精卵を除去する為、或いは半数体卵子を二倍体卵子へ移行する為に活使されている (Malter と Cohen. 1989. Tang ら. 1994. Levron ら. 1995a. 1995b. Palermo. 1999)。

三前核卵受精卵は二精子受精あるいは第二極体の押出壊損から生じる。前核除去に拠る三倍体性質の補正はほとんどのケースでマイクロピペットでの吸出で行う。しかしながら Fulka と Moor (1993) は染色体複合体全体を極体押出の間に除去する為に行に続くシクロヘキシミドとエトポシドへのシンプルな被曝による化学除核を導引した。この化学除核は選択的前核除去を行えないがこの化学除核によって移植の為の卵母細胞或いは割球の核を得る為に活使された。

除核に拠る二精子受精或いは二雌核性受精の補正の中心の議義は二雄核性ヒト胚が胞状奇胎へ発達するからだけでなくターゲットとなる前核のジェンダーである。前核の親的起源はネズミ類動物で比較してはっきりしていて、その核の幅や残尾や第二極体活力などが全て関連している。ヒトでは不幸な事に男性と女性の前核は似た幅であり受精した精子尾はライトマイクروسコープで認識する事が出来ない (Malter と Cohen. 1989. Wiker ら. 1990)。

中心小体が存在しないと受精が行えず受精したヒト卵母細胞には中心小体が存在し受精卵中心体は親遺伝の系統を継ぐ (Palermo ら. 1994. Sathanathan ら. 1991. 1996)。それゆえ受精の間紡錘体を形成する中心体重複奇体の制御は体細胞の中心体重複奇体とは違いスペシフィックな構造機構が制御に枢必となる。もし両方の配偶子が機能している儘で残存しているなら受精した卵は二中心体と四中心小体が存在し、多極紡錘体となり始期有糸分裂で異数体となりモザイシズムとなるだろう (Slunder ら. 1989)。此の奇形受精を避ける為一つの配偶子 (普通卵母細胞であるが) の紡錘体が発達をせずそしてネズミ類動物で生じる表象として精子が機能性紡錘体を導引する (Schatten. 1994. Sathanathan ら. 1991. 1996. Palermo ら. 1997a)。二精子でのヒト卵母細胞受精はそれゆえに二中心小体となり、三前核卵母細胞由来の結果である異形染色体伝達胚であると認識されている。

紡錘体機能の倍数体補正を行う為の戦略も存在する。例えば第二極体から最も離れた前核がきちんと親遺伝であるか調べ、X と Y プローブの共振幅をマルチプレックスポリメラーゼ連鎖反応 (mPCR) で量ったり、同時蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) を調べたり抹消前核が除核された二精胚や三倍体の胚へ妥当するか推し量るのである (Munné ら. 1993)。不幸な事に此の二精配偶子は染色体のモザイシズムを後になって起こすが、きっと二精配偶子が受精を行わない精子中心体の結果として多極紡錘体を維持しているのだろう (Palermo ら. 1994)。幸いにも三倍体受精卵からの前核除去は胚を正常な発達である

二倍体互換状態に恢復する (Rawlins ら, 1988)。今後の研究はヒト女性前核が正しく決定される基準を決定する為に枢必となるだろう。

#### 1.4 配偶子のアルタナティブ生起源

体外受精(IVF)の間、40%のカップルが正しい受精を行う事が出来ずそれは精子の質の低下により生じている (Van Uem ら, 1985)が、然しながら細胞内精子注入法(ICSI)の確構が此の機で受精を完うさせ (Palermo ら, 1992a, 1992b, 1996a)、幾人かの無精子症の両親から子供を得る事も出来た (Schoysman ら, 1993)。細胞質内精子注入法(ICSI)が早期で医療導入されたのはその人倫的受認性 (American Society for Reproductive Medicine, 1994, 1998, Lamb and Schlegel, 1999, Lamb, 1999, Schlegel, 1999)と通常ドナーの複数の精子濫使回避を善であるとしたからである。然しながら細胞内精子注入法(ICSI)を以ってしても老齡女性の妊娠状態の論応確構を得なかった。